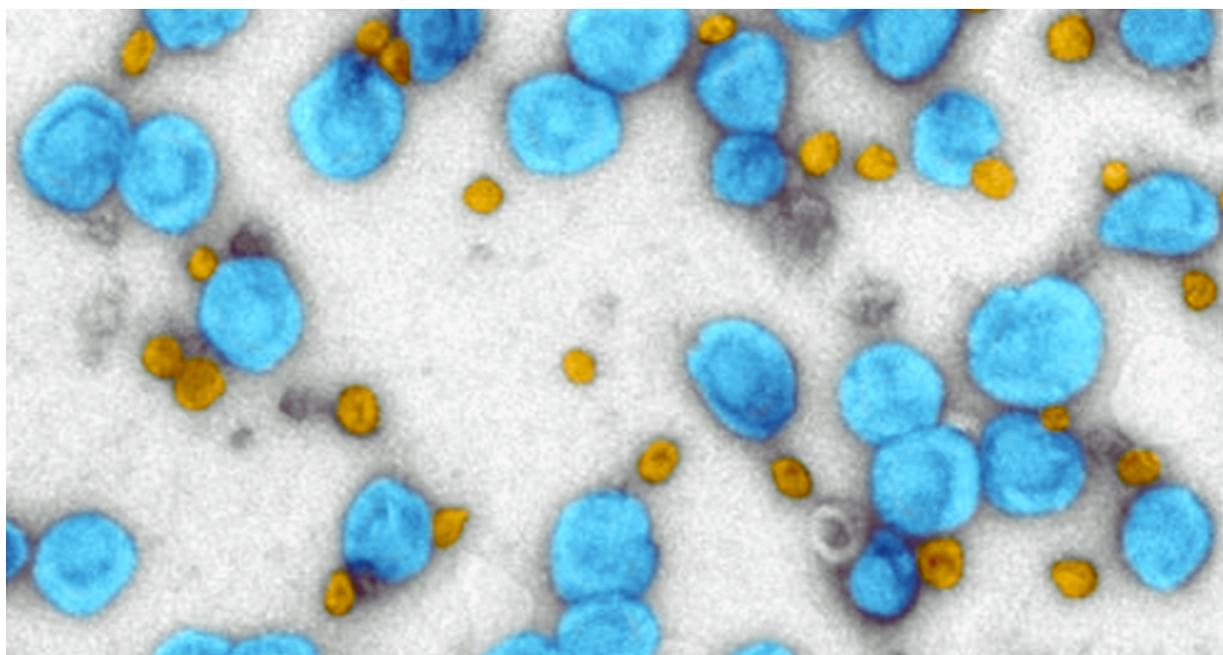


TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
PEDECIBA BIOLOGÍA: ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**COMUNICACIÓN INTERCELULAR**  
**MEDIADA POR FRAGMENTOS DE tRNA EXTRACELULARES**

Marco Li Calzi, B.Sc.



Adaptado de Jeppesen et al, 2019. Editado por el Dr. Dylan Burnette. Vanderbilt Medical School.

**Orientador de tesis:** Dr. Juan Pablo Tosar

**Coorientador de tesis:** Dr. Alfonso Cayota

**Lugar de realización:** Institut Pasteur de Montevideo, L. Genómica Funcional

Fecha de Defensa: / /2021

Tribunal: Adriana Geisinger, PhD | María Ana Duhagón, PhD | Graciela Boccaccio, PhD

*El saber no ocupa lugar*  
Proverbio anónimo

## Tabla de contenidos

<b>Glosario</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>Las vesículas extracelulares</b> .....	<b>7</b>
Tipos de EVs.....	8
Purificación de vesículas extracelulares .....	11
Composición de las EVs: el cargo .....	14
RNA no codificante extracelular asociado a vesículas extracelulares .....	15
<b>Tipos de RNAs pequeños en EVs</b> .....	<b>17</b>
snRNA y snoRNA.....	18
RNA interferencia.....	18
Micro RNAs (miRNAs) .....	19
tRNAs.....	20
<b>Empaquetado de RNA en EVs</b> .....	<b>26</b>
Mecanismo de empaquetamiento selectivo .....	27
Mecanismo de empaquetamiento no selectivo de RNAs en EVs .....	28
<b>EVs como método de entrega (“<i>delivery</i>”) de macromoléculas</b> .....	<b>29</b>
¿Qué sucede en la célula receptora al arribo de los fragmentos de tRNA? .....	30
<b>Hilo conductor de trabajo y antecedentes inmediatos</b> .....	<b>33</b>
<b>Hipótesis general</b> .....	<b>36</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>37</b>
Objetivos específicos del trabajo.....	37
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>38</b>
Cultivos celulares .....	38
Inducción de estrés con NaAsO <sub>2</sub> .....	38
Extracción de RNA.....	39
Tratamiento con DNasa I .....	40
Transfección de células con oligonucleótidos.....	40
Detección de RNAs pequeños mediante <i>SL-RT-qPCR</i> .....	42
Purificación de vesículas extracelulares de células transfectadas .....	44
Purificación de vesículas extracelulares por ultracentrifugación.....	45
Microscopía confocal de fluorescencia para evaluar la captación de RNAs biotinilados.....	45
Separación de fracciones mediante gradiente de iodixanol (OptiPrep™) .....	46
Electroforesis desnaturalizante y Northern blot .....	47
Experimentos de microarreglo .....	48
Experimentos de RNA-seq.....	49
<b>Resultados</b> .....	<b>51</b>
<b>Capítulo 0: preludio</b> .....	<b>51</b>
Cambios transcriptómicos inducidos por Gly y SCR de 30 nucleótidos .....	51
<b>Capítulo 1: estrés celular</b> .....	<b>54</b>
U-2 OS como modelo celular para estudiar el efecto del estrés oxidativo y la inducción de tRNAs.....	54
Determinación del sistema de inducción de estrés celular en U-2 OS .....	55
Optimización del modelo de estrés celular por tratamiento con NaAsO <sub>2</sub> 500 µM .....	57

Evaluación de los perfiles 5' tRNA-h-GlyGCC intracelulares .....	58
Optimización del método de extracción de RNA.....	58
Evaluación de los niveles de 5' tRNA-h-GlyGCC intracelulares por <i>SL-RT-qPCR</i> .....	60
Evaluación de perfiles 5' tRNA-h-GlyGCC intracelulares por Northern blot .....	62
Leve inducción de 5' tRNA-h-Ala/Glu/iMet luego del tratamiento con ARS .....	64
El estado de fragmentación del RNA puede inducir a resultados artefactuales .....	65
La célula recupera los niveles basales de 5' tRNA-GlyGCC luego del estrés .....	67
<b>Capítulo 2: upregulación de tiRNAs en EVs como consecuencia de estrés .....</b>	<b>69</b>
Generación de 5' tiRNAs mediante metodologías ortogonales .....	70
Evaluación de perfiles 5' tiRNA-GlyGCC intracelulares en U-2 OS $\Delta$ RNH1 .....	71
Evaluación de perfiles 5' tiRNA-GlyGCC vesiculares en U-2 OS $\Delta$ RNH1 .....	72
Efectos de la inducción de estrés a nivel del rRNA .....	75
<b>Capítulo 3: estabilidad y empaquetamiento.....</b>	<b>78</b>
Transfección de RNAs sintéticos en células U-2 OS y MCF-7 .....	79
Puesta a punto del modelo de transfección de RNAs sintéticos.....	80
Efecto del largo de la secuencia de Gly y SCR .....	82
Los RNAs sintéticos son detectables dentro de la célula durante al menos seis horas .....	84
Gly 35 y SCR 35 se empaquetan y se secretan en EVs.....	86
<b>Capítulo 4: captación espontánea de RNA.....</b>	<b>89</b>
¿Podrían Gly y SCR incorporarse espontáneamente dentro de células MCF-7? .....	89
Gly y SCR de 30 nucleótidos son captados espontáneamente por la célula.....	91
<b>Capítulo 5: Transferencia entre células.....</b>	<b>93</b>
La estabilidad intracelular de 5' tiRNAs en célulasceptoras depende de cada línea celular .....	93
GFP se transfiere entre células U-2 OS a través de EVs .....	94
La incorporación de EVs se da, en parte, por endocitosis (probablemente macropinocitosis).....	95
La línea celular U2-OS es inadecuada para el estudio de la transferencia intercelular de RNAs debido a su alto metabolismo del RNA. ....	98
Gly y SCR sintéticos se transfieren entre células MCF-7 mediante EVs.....	99
<b>Capítulo 6 (Epílogo): hacia la identificación de los blancos moleculares de Gly 35 transferido mediante EVs y de Gly 30 captado de forma espontánea del medio extracelular .....</b>	<b>102</b>
Secuenciación de RNA de célulasceptoras incubadas con EVs provenientes de células transfectadas con Gly o SCR de 35 nucleótidos.....	103
Secuenciación de RNA de células incubadas con RNA Gly o SCR de 30 nucleótidos .....	105
<b>Discusión .....</b>	<b>107</b>
<b>Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>121</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>122</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>133</b>

## Glosario

Glosario de términos más utilizados	
tRNA	RNA de transferencia
rRNA	RNA ribosomal
miRNAs	microRNA
sRNA	RNA pequeño no codificante
lncRNA	RNA largo no codificante
siRNA	RNA pequeño de interferencia
snRNA	RNA nuclear pequeño
snoRNA	RNA nucleolar pequeño
pre-tRNA	preRNA de transferencia
pre-miRNA	pre-microRNA
tRFs	fragmento de tRNA generado por corte en "algún" sitio no anticodón
tRNA-h	fragmento de tRNA corte anticodón no inducible por estrés
tiRNA	fragmento de tRNA inducible por estrés
riRNA	fragmento de rRNA inducible por estrés
MCF-7	Línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria
U-2 OS	Línea celular de osteosarcoma de hueso
ANG	Angiogenina
RNH1	Inhibidor de endonucleasas (de angiogenina)
AGO	Argonauta
MVE	Endosoma multivesicular
MVB	Cuerpo multivesicular
EV	Vesícula extracelular
ApoEV	Vesícula extracelular proveniente de cuerpo apoptótico
RNP	ribonucleoproteína (complejo ribonucleoproteico)
Gly	RNA sintético simil 5' tiRNA-GlyGCC (misma sec. Sin modif.)
SCR	Scramble (secuencia aleatoria sintética)

Glu	Glutámico
iMet	Metionina de iniciación
Ala	Alanina
Cys	Cisteína
<i>SL-RT-qPCR</i>	<i>Stem-loop</i> , retrotranscripción, PCR en tiempo real
GFP	Proteína verde fluorescente
Cq	Ciclo de amplificación
ARS	Arsenito de sodio 500 uM
NaAsO <sub>2</sub>	Arsenito de sodio
L3K	Lipofectamina 3000
Clivar	Cortar

## Resumen

El estrés se le puede presentar a la célula de muy diferentes maneras. En esta tesis nos preguntamos si la respuesta celular al estrés puede propagarse entre células a partir de los llamados ARNs extracelulares, y particularmente de las mitades de tRNA. Recurriendo a un modelo de estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio en células de osteosarcoma humano, buscamos en primer lugar determinar qué especies de RNA se generan fruto del estrés, determinando que los fragmentos mayormente generados son las mitades 5' del tRNA de glicina (tRNA-GlyGCC). Contrario a lo que previamente habíamos observado a nivel extracelular, donde predominan las mitades 5' del tRNA-GlyGCC de 30 nucleótidos, los fragmentos que se inducen en estrés tienen un tamaño de 34 o 35 nucleótidos, consistente con el corte endonucleolítico a nivel del anticodón. Posteriormente, demostramos que estas mitades de tRNA se empaquetan en vesículas extracelulares (EVs), recurriendo para ello a un modelo celular donde se silenció el gen del inhibidor de ribonucleasas, RNH1. En tercer lugar, se diseñó RNAs sintéticos para las mitades de tRNA-Gly de 35 nucleótidos, así como un control de secuencia con bases permutadas, y se evidenció su transferencia intercelular a través de EVs, estudiando el efecto de distintas líneas celulares que difieren, entre otras cosas, en su actividad ribonucleasa. Medimos los niveles de RNAs sintéticos en EVs provenientes de células transfectadas con estos RNAs, y luego medimos los niveles en células expuestas a dichas EVs, por técnicas moleculares y de microscopía de fluorescencia. Además, observamos *in vivo* la captación de EVs por parte de las células, sugiriendo que las mismas se captan al menos en parte por macropinocitosis. Curiosamente, también se dejó en evidencia que el RNA incubado con células en ausencia de agentes de transfección tiene la capacidad de entrar espontáneamente dentro de la célula, de forma dependiente del tamaño más que de la secuencia. Esto es relevante a la luz de observaciones previas de nuestro grupo sobre una alta abundancia de mitades de tRNA-Gly fuera de EVs, que bien podrían ingresar a las células por este mecanismo. Por último, se realizó un secuenciado de RNA para medir los cambios transcriptómicos inducidos por la llegada de mitades de tRNA-Gly de 35 nucleótidos a la célula en EVs provenientes de células transfectadas con dicho RNA sintético, o de su control de secuencia. Lo mismo se realizó para un experimento de captación espontánea de mitades de tRNA-Gly no vesiculares, de 30 nt. En su conjunto, esta tesis sienta las bases para terminar de disecar posibles vías de comunicación intercelular mediada por mitades de tRNA, tanto vesiculares como no vesiculares, que sospechamos podrían ser parte de mecanismos moleculares de adaptación al estrés.

# Introducción

## Las vesículas extracelulares

Todo organismo vivo está en constante actividad y para desarrollar sus tareas con eficacia necesita comunicarse con su entorno. Cada célula funciona como entidad y para comunicarse de manera eficiente necesita tanto de células en contacto directo entre ellas o de moléculas que sean secretadas por la célula y viajen a destino para ser receptadas por una célula blanco. A comienzos de este siglo, se comenzó a investigar el modelo por el cual las células se comunican a través de partículas que transporten mensajes de una a otra. Este grupo de nanopartículas producidas por cada unidad mínima de trabajo se llama vesículas extracelulares (EVs, por su sigla en inglés), nomenclatura aceptada por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (Théry et al. 2018).

Para comunicarse, las células por lo general secretan al espacio intercelular nanopartículas lipídicas provenientes del citoplasma celular o de la membrana plasmática a los que llamamos exosomas o microvesículas. Denominación que depende tanto de su tamaño como composición, función, biogénesis y otras características.

En 1946, Chargaff y West descubrieron que, al centrifugar el plasma humano a muy altas velocidades, se generaba un sedimento. Al eliminar este sedimento del plasma, disminuía significativamente su habilidad de coagulación, para lo que ambos científicos no encontraron causa (Chargaff y West 1946). Wolf, ya en 1967, las nombró “polvo de plaquetas” o *platelet-dust* en inglés (Wolf 1967). En 1977, se demostró su presencia, aunque confundida como fragmentos de células de adenoma de recto (De Broe et al. 1977). Ya a partir de 1983 se comenzó a observar su biogénesis como producto de la fusión de endosomas multivesiculares (MVE, por su sigla en inglés) con la membrana plasmática (Harding et al. 1983), hasta que en 2007 se demostró por primera vez que estas partículas eran transportadoras de RNAs reguladores, mensajeros y otras moléculas en su interior, los cuales eran capaces de mantener su función reguladora una vez internalizados por células receptoras (Valadi et al. 2007).

Previo al comienzo del estudio masivo de EVs, se pensaba mayormente que los endosomas eran cuerpos intracelulares donde se comenzaba la descomposición de ciertas moléculas que la célula desecharía luego de su fusión con los lisosomas. Con el surgimiento de técnicas de detección más potentes, entre ellas técnicas de microscopía, se descubrió que se liberan cuerpos intravesiculares de los cuerpos multivesiculares (MVB, por su sigla en inglés) al fusionarse la bicapa lipídica de la célula con el MVB y por tanto secretarse como nanopartículas lipídicas hacia el espacio extracelular, lo que generó determinada controversia en el campo de la biología celular y molecular. Con el paso del tiempo, también se descubrió que estas nanopartículas lipídicas se podrían

secretar por una vasta cantidad de grupos celulares (tales como células dendríticas, epiteliales, adipocitos, células del sistema nervioso, células de Schwann) y se podrían detectar en biofluidos: semen, líquido céfalo-raquídeo, orina, plasma, ascitis tumorales, espacio alveolar, entre muchos otros (Théry et al. 2002; Fevrier et al. 2004; Théry et al. 2006; Raposo and Stoorvogel 2013). En un comienzo, estas partículas se denominaron exosomas (Trams et al. 1891), ya que todo este grupo se pensó como un grupo único de partículas secretadas por la célula. El término EV surgió al comenzar a segregar al grupo inicial por tamaño, composición, función y cargo, como se explicará a continuación.

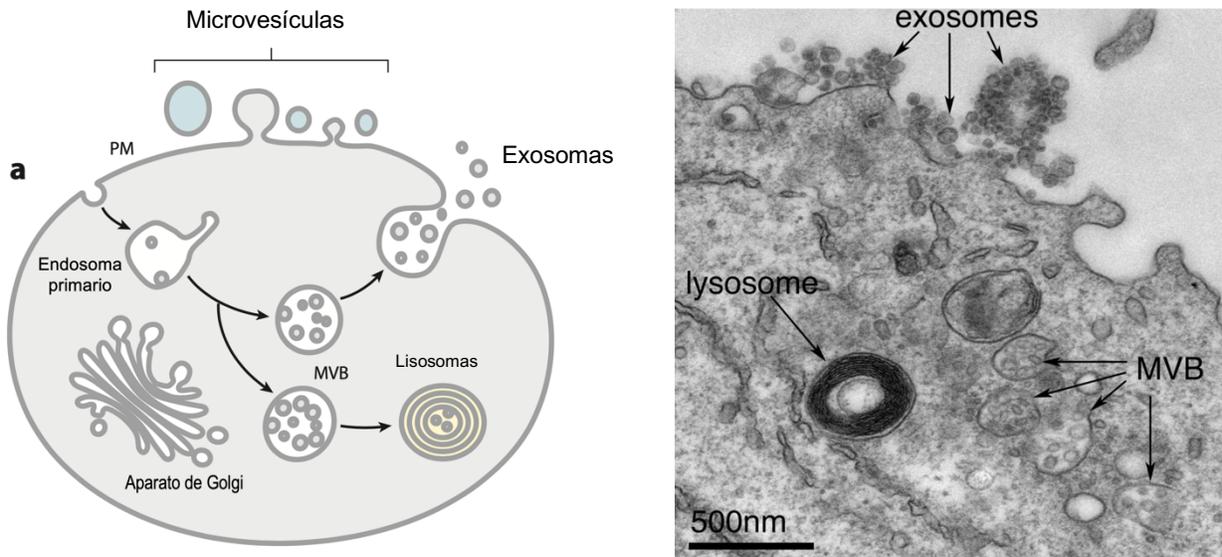
### Tipos de EVs

Existen varios tipos de vesículas extracelulares, aunque en términos generales, estas nanopartículas son vesículas de doble capa lipídica que derivan de la mayoría de tipos celulares, y poseen entre 30 a 5000 nanómetros de diámetro (Chiang y Chen 2019). Las EVs que se originan por protrusión hacia el exterior de la membrana plasmática (Figura 1 A) se denominan microvesículas, también llamadas ectosomas o micropartículas y pueden variar en tamaño desde los 50 hasta los 1000 nanómetros de diámetro (Raposo and Stoorvogel 2013). Presentan una densidad de entre 1.04 y 1.07 g/mL. Tienen también forma redonda y sedimentan en velocidades a partir de los 10.000 x g. Están compuestas por lípidos como la fosfatidilserina o diacilglicerol y sus marcadores principales son las integrinas, selectinas y proteínas de superficie características de la célula que les dio origen.

Los exosomas tienen biogénesis en cuerpos multivesiculares, y son secretados a partir de la fusión entre estos cuerpos y la membrana plasmática durante la diferenciación de reticulocitos (Raposo y Stoorvogel 2013), aunque posteriormente se observó que numerosos tipos celulares son capaces de liberar exosomas en respuesta a una gran cantidad de estímulos diferentes (Figura 1 A). Se sabe también que la producción de estas nanopartículas está dirigida por factores como el tipo celular, las condiciones del cultivo y la salud genómica de las células en general, que regularán su producción *in-vivo* (Mathieu et al. 2019). Estas nanopartículas, diferenciables por su alto contenido en proteínas de la vía endosomal mediante varias metodologías a ser discutidas más adelante, son relativamente más pequeñas en tamaño y su diámetro, en general, se encuentra entre los 40 y 150 nanómetros (Tkach and Théry 2016; Jeppesen et al. 2019). Los exosomas tienen coeficientes de flotación basados en densidad de 1.13 a 1.19 g/ml en gradientes de sacarosa (Raposo et al. 1996; Théry et al. 2009; Momen-Heravi et al. 2013). Estas vesículas extracelulares se presentan en forma de copa o de pasa de uva (ver figura de la carátula), de acuerdo con observaciones de microscopía electrónica y tienden a sedimentar a velocidades mayores a los 100.000 x g. Sin embargo, se ha visto que esta morfología característica es un artefacto técnico en la tinción por contraste

negativo, pues las partículas se presentan como perfectamente esféricas al ser observadas por microscopía electrónica en condiciones cryo. Están mayormente enriquecidos con lípidos como el colesterol, esfingomielinina y ceramidas, y sus principales marcadores son las tetraspaninas, Alix y TSG101 (Théry et al. 2009), aunque la especificidad de algunos de estos marcadores está actualmente en discusión (Kowal et al. 2016; Jeppesen et al. 2019). Se sabe que este tipo de nanopartícula está relacionada en mecanismos de comunicación intercelular. En diferentes experimentos *in-vivo* se ha visto que exosomas pueden entregar diferentes RNAs mensajeros de células donadoras a células receptoras (Ridder et al. 2014; Zomer et al. 2015). Se conoce también que los exosomas presentes en la leche materna contienen miRNAs que tienen diferentes funciones en la respuesta inmune (Foster et al. 2016).

Se ha sugerido que en células con polaridad de membrana se secretan diferentes subpoblaciones de EVs dependiendo del lado de la célula que se analice: el apical o el basal (Klingeborn et al. 2017). De cualquier manera, esto no ha sido estudiado en profundidad y queda mucho por dilucidar antes de considerarlo por hecho. De cualquier manera, aunque la biogénesis de EVs sea una temática aún a comprenderse totalmente, existen mecanismos generales que se conocen y que se han caracterizado, como en la figura 1.



**Figura 1:** Diagrama básico de la biogénesis de EVs en células eucariotas. a: representación esquemática del proceso de biogénesis de EVs. Las microvesículas se producen por protrusión de la membrana plasmática mientras que los exosomas son producto de la fusión entre los cuerpos multivesiculares (MVB) y la membrana plasmática, lo que da lugar a que los cuerpos intravesiculares de los MVBs se liberen. Extraído y adaptado de (Colombo, Raposo, y Théry 2014); b: imagen de microscopía electrónica de transmisión de la fusión de los MVBs con la membrana plasmática, así como de MVBs que llevan contenido al lisosoma. Extraído de (Edgar 2016).

Últimamente se ha comenzado a considerar otras nanopartículas como EVs, lo que causa controversia en el campo debido a su origen. Estas partículas, llamadas EVs derivadas de cuerpos apoptóticos, o ApoEVs por su sigla en inglés, tienen origen a partir de una célula al momento de su muerte. Los cuerpos apoptóticos, de mayor tamaño que los tipos de EV anteriormente mencionados, poseen una densidad de 1.16 a 1.28 g/ml y tienen forma heterogénea. Pueden sedimentar a velocidades bajas de entre 1.200 a 10.000 x g (aunque algunos pueden llegar a sedimentar recién a partir de velocidades de hasta 100.000 x g) y su marcador principal son las histonas (Théry, Ostrowski, y Segura 2009). De cualquier modo, no dejan de causar controversia debido a su origen y a su asignación dentro del grupo de las microvesículas o de los exosomas (Caruso y Poon 2018). Existen una multitud de estudios de EVs secretadas a partir de células sanas y funcionales, y sus efectos inmunomodulatorios en las células que las reciben. También se ha comenzado a estudiar a los cuerpos apoptóticos como vesículas extracelulares capaces de generar efectos de igual o similar magnitud. Se ha propuesto, además, que las funciones de las ApoEVs pueden ser tanto el desmantelamiento de la célula que está terminando su ciclo de vida o un efecto inmunomodulatorio en la comunicación intercelular (Caruso y Poon 2018). Por ejemplo, algún mecanismo de señalización para células vecinas. Se piensa que el desmantelamiento de la célula apoptótica se da en diferentes etapas: por cierre de la membrana, posterior protrusión de la membrana y creación de cuerpos apoptóticos de 1 a 5 micrómetros de diámetro, lo que los hace algo diferenciables entre otras nanopartículas secretadas gracias a su relativamente mayor tamaño. También se pueden secretar vesículas apoptóticas pequeñas de menos de 1 micrómetro de diámetro, aunque estos mecanismos aún no son del todo claros (Caruso y Poon 2018). Esto podría ser fuente de confusiones en la literatura pues implicaría que exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos no podrían ser fácilmente separados entre sí por centrifugación diferencial (Mathieu et al. 2019).

Las denominadas partículas similares a retrovirus (RLPs, por sus siglas en inglés) son otra amplia subpoblación de vesículas extracelulares de entre 90 y 100 nanómetros de diámetro que contienen una población de proteínas retrovirales características. Estas EVs no infecciosas no poseen la totalidad de los genes necesarios para la entrada a la célula blanco y posterior propagación viral. Su biogénesis aún no está del todo dilucidada, pero se piensa que estas vesículas podrían surgir de la transcripción de secuencias retrovirales endógenas humanas, aún en células no infectadas por virus. Derivan de la membrana plasmática, aunque la dinámica de los mecanismos de secreción a través de la membrana es distinta de aquellos mecanismos por los que se forman las otras variedades de EVs (Akers et al. 2013). Además, se piensa que se pueden distinguir debido a que poseen capacidad de sedimentación y coeficientes de flotación diferentes al del resto de las EVs (Shen et al. 2011).

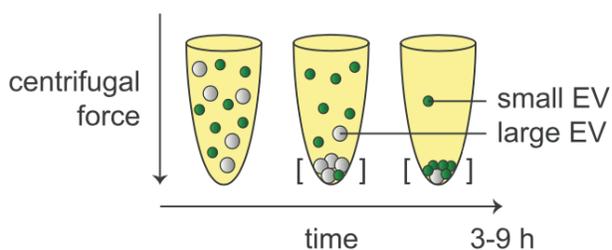
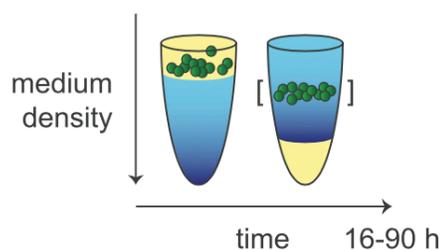
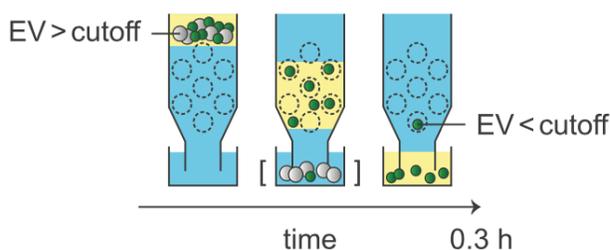
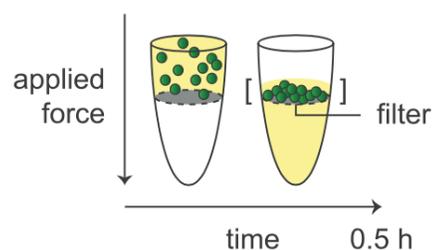
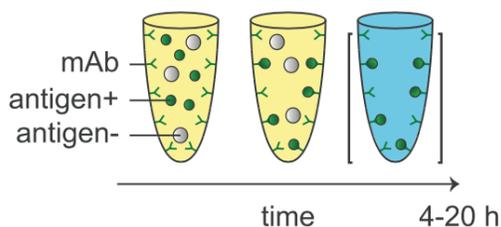
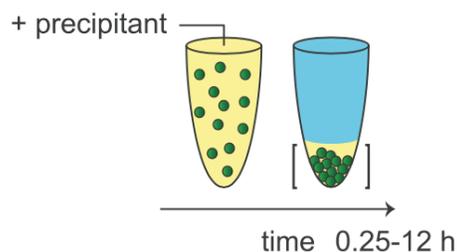
Una vez que las EVs llegan a su célula receptora (destino), pueden inducir una señalización a través de interacciones receptor/ ligando o pueden ser internalizadas a través de mecanismos de fagocitosis y endocitosis. Su habilidad de fusionarse con la membrana plasmática de la célula receptora aún está en discusión. En cualquier caso, parecerían tener la capacidad de liberar su contenido en el espacio intracelular, donde se podría modificar el estado citoplasmático y el microambiente celular (Tkach y Théry 2016). Recientemente se ha visto que diferentes tipos celulares secretan subpoblaciones de exosomas que difieren entre sí en su “carga” y en su composición molecular de superficie (Willms et al. 2016), lo que podría tener efectos específicos según el mensaje que la célula necesite transmitir a su entorno. Esto estaría basado, posiblemente, en la situación en la que la célula se encuentre al momento de la biogénesis de dichas EVs.

### Purificación de vesículas extracelulares

En el estudio de las vesículas extracelulares, la mayoría de los protocolos utilizados para su colección y purificación utilizan centrifugación diferencial/ultracentrifugación, dada su practicidad y eficacia relativa. Esto consiste en una sedimentación corta a bajas velocidades para remover células muertas y remanentes del desmantelamiento de células apoptóticas (incluyendo apoEVs), seguido de centrifugaciones a altas velocidades durante largos períodos de tiempo (Momen-Heravi et al. 2013). Dependiendo de la velocidad de sedimentación se podrán separar las diferentes subpoblaciones de vesículas (Jeppesen et al. 2014). Las vesículas sedimentan de acuerdo con su tamaño y densidad. Esto significa que las vesículas más grandes sedimentan a menores velocidades y a menores ciclos de centrifugación. Por ejemplo, las vesículas más grandes (*large EVs* en inglés) sedimentan a velocidades cercanas a los 10.000 x g y aquellas más pequeñas lo hacen a velocidades cercanas a los 100.000 x g (Théry et al. 2018). De cualquier modo, cabe mencionar que, durante mucho tiempo, aquellas vesículas que sedimentaban a 10.000 x g se denominaron “microvesículas” y aquellas que sedimentaban a 100.000 x g se denominaban “exosomas”. Esto generó problemas de nomenclatura, puesto que la definición original de unas y otras tiene que ver con su mecanismo de biogénesis (Figura 1) y no con su tamaño o velocidad de sedimentación. A raíz de esto, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares decidió reservar el nombre de exosomas y microvesículas exclusivamente para aquellas partículas derivadas de MVBs y de la membrana plasmática, respectivamente, y vesículas grandes y pequeñas (*large and small EVs*) para los distintos pellets obtenidos por centrifugación diferencial (Théry et al. 2018). Nuestro laboratorio se ha suscrito a esta convención, pero no todos los autores la respetan y esto ha sido y sigue siendo fuente de confusión en la literatura científica.

Por un lado, una gran desventaja de la centrifugación de vesículas extracelulares es la pobre capacidad de separación entre exosomas provenientes de MVBs y de microvesículas provenientes de la protrusión de la membrana plasmática (Théry et al. 2018), por tanto, esta metodología no permite su separación por biogénesis. Se ha descubierto, a su vez, que la sedimentación de vesículas extracelulares induce también a su agregación, es decir, se crean conjuntos de EVs de diferentes composiciones y con diferentes marcadores, alterándose su tamaño de forma artefactual. La más importante implicancia de esto es la posible malinterpretación o sesgo en resultados provenientes del análisis de EVs purificadas mediante ultracentrifugación (Jeppesen et al. 2014; Linares et al. 2015).

Por otra parte, otra de las desventajas de esta metodología es la sedimentación de otras moléculas, como agregados de proteínas, que causan una disminución en la pureza de la muestra. Una manera eficaz de abordar esta problemática ha sido generar gradientes de sacarosa, que ayudan a separar vesículas extracelulares en base a sus coeficientes de flotación específicos y densidades (Momen-Heravi et al. 2013). Desde 2008 (pero utilizado más comúnmente de manera reciente), se ha propuesto un protocolo de gradiente modificado en el cual se utiliza un gradiente de iodixanol, comercialmente llamado Optiprep™, en el que se demuestra que la fracción vesicular colectada y purificada contiene solamente EVs (Cantin et al. 2008).

**A** Centrifugación diferencial**B** Centrifugación por gradiente de densidad**C** Cromatografía de exclusión molecular**D** Ultrafiltración**E** Captura directa por inmunofinidad**F** Precipitación por gravedad

**Figura 2:** Diagrama básico de las diferentes metodologías aplicables en el estudio de vesículas extracelulares. (a) representa la centrifugación diferencial (sedimentación). (b) representa la centrifugación por gradiente de densidad. (c) representa la cromatografía de exclusión molecular. (d) representa la ultrafiltración. (e) representa la captura directa por inmunofinidad. (f) representa la precipitación inducida por agentes precipitantes deshidratantes. Las separaciones están determinadas por tamaño, densidad e inmunofenotipo de las EVs. Extraído y adaptado de (Coumans et al. 2017).

Debido a la gran heterogeneidad que existe en relación con las poblaciones de diferentes vesículas extracelulares y la presencia de material proveniente de la fracción no vesicular, se ha comenzado a utilizar el fraccionamiento por gradiente de densidad de alta resolución y captura directa por inmunofinidad. Esto permite separar vesículas extracelulares pequeñas del material no vesicular. Este protocolo permite también una determinación más certera del cargo molecular que compone al exosoma (Jeppesen et al. 2019), lo que tendría amplia aplicabilidad en el campo del estudio de los exosomas como transportadores de biofármacos o en la determinación de biomarcadores asociados a ciertos tipos específicos de EVs.

Existe también la posibilidad de purificar vesículas extracelulares mediante cromatografía de exclusión molecular, aunque esta, así como cualquier otra técnica basada en separación por tamaños (tales como la centrifugación diferencial) no permite separar exosomas de microvesículas (ya que ambas subpoblaciones tienen partículas de tamaños parcialmente solapantes). De cualquier modo, es un método utilizable para separar en función del tamaño y como consecuencia se tendrá una población de partículas grandes (enriquecida en EVs) y otra de pequeñas (enriquecida en proteínas contaminantes u otros complejos macromoleculares) (Taylor and Shah 2015).

Ninguno de estos métodos es perfecto y todos tienen vetas que los hacen beneficiosos de acuerdo con el manejo que se quiera hacer del experimento. El campo de la purificación de vesículas extracelulares está en constante búsqueda de un método universal que permita conciliar precio, calidad de purificación y cantidad de tiempo empleado durante el protocolo, además de la naturaleza de la partícula a estudiar. Este es uno de los cometidos del *NIH Extracellular RNA Communication Consortium* (exRNA.org) en el que nuestro grupo viene participando desde 2019.

#### Composición de las EVs: el cargo

Con anterioridad se ha planteado que las vesículas extracelulares juegan un rol en la comunicación intercelular. Células diferentes que necesiten comunicarse y se encuentren en posiciones diferentes, tanto cercanas como remotas, pueden necesitar de estas nanopartículas lipídicas para enviarse mensajes y señales. Esto introduce la variable composición: el mensaje. Las EVs tienen la capacidad de cargar con un mensaje que de alguna manera influiría el microambiente citoplasmático y el estado celular de la célula que la recibe (Tkach and Théry 2016). Por tanto, este cambio podría ser determinado como “el mensaje” a ser transmitido.

Recientemente, el contenido de las vesículas extracelulares se ha propuesto como posible biomarcador de enfermedad y, a su vez, estas partículas como posibles mediadores o señalizadores en situaciones de falibilidad celular (marcadores de enfermedad). Además, dado que las EVs parecerían tener la capacidad de transferir biomoléculas a ciertas células, esto ha hecho que la industria farmacéutica haya comenzado a mirar a las EVs como posibles transportadores de potenciales biofármacos.

Se ha planteado el uso de EVs, o de macromoléculas contenidas en las EVs, con fines diagnósticos tanto en enfermedades como el cáncer, la obesidad o en enfermedades infecciosas (Théry et al. 2018). Lo que al principio parecía más una idea o hipótesis, se está convirtiendo cada vez más en una realidad empírica: el contenido de las vesículas extracelulares podrían ser un reflejo de aquello a lo que la célula le sucede en el interior,

de su proteoma, transcriptoma y metabolismo, y es por esto que se las idealiza como fuente de biomarcadores (De Toro et al. 2015).

Las EVs se pueden captar por células blanco vecinas o cercanas a la célula que las generó. Además, las EVs pueden terminar en la circulación sanguínea o linfática hasta ser absorbidas por células de algún tejido más lejano. Las EVs contienen proteínas, lípidos, DNA y RNA (tanto RNA mensajero como RNAs no codificantes) capaces de transmitir mensajes entre células (De Toro et al. 2015; Jeppesen et al. 2019). Esto tiene grandes implicaciones, ya que la presencia de RNA mensajero dentro de EVs significa que la traducción se podría realizar fuera de la célula progenitora y dentro de una célula ajena a aquella que lo produjo (De Toro et al. 2015).

### RNA no codificante extracelular asociado a vesículas extracelulares

Se sabe que las EVs contienen RNA como parte de su contenido. Esto indica que funcionan como mediadores intercelulares de información genética. En 2007 se realizó el primer descubrimiento por el que se mostraba cómo las EVs funcionaban como contenedores de RNA. En este estudio, se demostró cómo estas encapsulan tanto RNA mensajero como microRNAs (miRNAs, por su sigla en inglés). El equipo de Jan Lötvall demostró que tanto células MC/9, HMC1 como BMMC (de ratón y humanas) son capaces de producir exosomas, al igual que de cargarlos con diferentes tipos de RNA. También demostraron que estos exosomas tienen la capacidad de ser internalizados por una célula blanco (Valadi et al. 2007). A su vez, observaron que ambas líneas celulares, MC/9 y BMMC, contenían suficiente RNA mensajero proveniente de las EVs como para sintetizar una cantidad detectable de proteína. También demostraron que existen miRNAs que pueden ser transportados dentro de exosomas y transferirse a células blanco. Sus estudios hallaron 121 miRNAs que podrían estar selectivamente cargados dentro de exosomas dado que sus perfiles intracelulares no se correlacionan con los perfiles de estos miRNAs intravesiculares. Esto daría comienzo a una gran batalla conceptual: el proceso de empaquetamiento selectivo contra el no selectivo. Por último, también ellos dieron comienzo a la idea de los exosomas como vehículos para el transporte de biofármacos y su uso en terapia.

Luego del importante descubrimiento del empaquetamiento de RNA mensajero y de RNAs no codificantes como los miRNAs dentro de exosomas, se descubrió también que existía información genética en forma de RNA en EVs provenientes o circulantes en fluidos corporales (Raposo and Stoorvogel 2013). Se descubrió también que las microvesículas provenientes de glioblastoma (un tipo de tumor cerebral maligno) tienen como contenido tanto RNA (mRNA y miRNA) como proteínas (angiogénicas) y que esto promueve el desarrollo del tumor. Por tanto, podrían ser posibles entidades

biológicamente relevantes en el microambiente tumoral (Skog et al. 2008). Y presentes no solo en el microambiente tumoral, sino también en el suero (Hunter et al. 2008). Sin embargo, hasta ese entonces, no se había podido determinar una correlación entre los niveles de RNA exosomal y el estadio de la enfermedad (en este caso adenocarcinoma de pulmón) por la que el paciente transcurre (Rabinowits et al. 2009). Poco más adelante, se vio que las microvesículas transportan RNA que puede ser internalizado exitosamente en las células blanco por fusión de la membrana exosomal con la membrana plasmática de las células pertenecientes al sistema inmune (Mittelbrunn et al. 2011). También se demostró cómo, en ratones, diferentes microRNAs encapsulados dentro de exosomas pueden ser intercambiados entre células dendríticas (Montecalvo et al. 2012).

Recientemente se ha planteado también que los exosomas tienen la capacidad de contener una mayor cantidad de RNA que sus contrapartes microvesiculares y cuerpos apoptóticos. Para llegar a este resultado, Lunavat et al. 2015, estudió el perfil de RNAs en células MML-1 (melanoma humano) y los tres tipos de subpoblaciones de EVs producidos por estas células, mencionados anteriormente. Interesantemente, mediante centrifugación diferencial, se muestra cómo algunas subpoblaciones de EVs, en este caso exosomas – EVs pequeñas si nos ceñimos a la nomenclatura más consensuada – poseen miRNAs característicos, mientras que las microvesículas – EVs grandes – no muestran subpoblaciones de miRNAs diferencialmente enriquecidos respecto a las células parentales (Lunavat et al. 2015). Por ejemplo, los autores observaron que el miR-211-5p se sobreexpresa en las células tratadas con inhibidor de B-Raf (un químico utilizado en tratamientos de melanomas tardíos), lo que podría tener implicancias en el tratamiento de pacientes con dicha patología. Cuando las células son tratadas con inhibidores de B-Raf, el contenido de RNA y proteínas en EVs es mayor, aunque también se visualiza una atenuación en la viabilidad celular. También demuestran que no solamente los exosomas, sino todas las EVs, son capaces de contener tRNAs. Por último, se muestra cómo miR-211 funciona como un interruptor metabólico en melanoma que tiene como blanco a HIF-1a (subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia), lo que podría ser relevante en el caso de los melanomas que sobre-expresan miR-211 (Lunavat et al. 2017). Sin embargo, en reportes más recientes, se ha demostrado que la presencia de miRNAs es muy escasa en EVs, dando lugar al planteamiento de cuán funcional podría llegar a ser la comunicación intercelular mediada por miRNAs. Se ha calculado que, para llegar a encontrar una copia de un miRNA específico muy expresado, deben “contarse” cerca de 1000 EVs (Chevillet et al. 2014; Tosar et al. 2015; Albanese et al. 2020).

En los últimos años y con el advenimiento de las técnicas de secuenciación profunda, se ha podido detectar una cantidad mucho más amplia de RNAs dentro de EVs, mayormente RNAs no codificantes. Entre ellos encontramos secuencias repetidas, RNAs

estructurales, fragmentos y mitades de RNA de transferencia (tRNA), Vault RNAs e Y-RNA (Raposo y Stoorvogel 2013).

Sabemos que las vesículas extracelulares juegan un rol clave en el embarazo, la respuesta inmune, en el cáncer, la generación y progresión de enfermedades neurodegenerativas, en enfermedades cardiovasculares, y demás (De Toro et al. 2015). Ahora que sabemos que las vesículas extracelulares se encuentran circulando por diferentes fluidos corporales, tanto en humanos como en otras especies, que contienen una amplísima variedad de especies de RNA (tanto mensajeros como no codificantes), y que estos RNAs podrían estar funcionando como biomarcadores de enfermedad, parecería que nos encontraríamos frente a una poderosa herramienta de transporte de material genético regulatorio que podría estaría jugando un rol clave en la comunicación intercelular. De cualquier modo, quedan muchas preguntas por responder: ¿cuál es el mecanismo por el que se integra este contenido a la vesícula, si es que hay alguno? ¿tiene el contenido vesicular algún impacto significativo a nivel genómico, transcriptómico y proteómico una vez internalizado por otras células?

### **Tipos de RNAs pequeños en EVs**

Hace más de una década que se sabe que dentro de las vesículas extracelulares existe tanto DNA como RNA, proteínas, lípidos y otras moléculas esenciales para el desarrollo de la vida. A continuación, daremos paso a desarrollar los tipos y características de los RNAs que son transportados dentro de las EVs. Como se ha mencionado anteriormente, dentro de estas nanopartículas se puede encontrar RNA mensajero y RNAs no codificantes (miRNAs, RNA ribosomal, secuencias repetidas, mitades de tRNA (tiRNAs), fragmentos pequeños de tRNA (tRFs), , Vault RNA e Y-RNA ((Tosar et al. 2015) entre otros).

Los RNAs no codificantes pueden dividirse dentro de dos grandes grupos, denominados RNAs no codificantes pequeños (sRNA, por su sigla en inglés) y RNAs no codificantes largos (lncRNAs, por su sigla en inglés). Aquellos RNAs que tengan un largo menor a los 200 nucleótidos (nt) pertenecerán a la familia de los sRNAmientras que aquellos cuyo largo supere los 200 nt se catalogarán como lncRNAs. La realidad es que casi todos los estudios basados en perfiles de sRNA se concentran en la población menor a 40 nt, por lo que los RNAs cuyo tamaño se encuentra entre los 40 y los 200 nt permanecen muy poco estudiados. Hoy en día se sabe que la desregulación de muchos de estos RNAs no codificantes juega un rol en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, lo que los hace blancos de muchos estudios en el campo molecular (Li y Chen 2015).

Desde el descubrimiento de los primeros sRNAs a comienzos de la década de 1990, ha habido una cascada de información al respecto. Las primeras clases de sRNAs identificadas fueron los RNAs asociados a proteínas Piwi (piRNAs), los RNAs de interferencia (siRNAs) y los microRNAs (miRNAs). Entre ellos, presentan varias similitudes y diferencias desde su biogénesis hasta los mecanismos que regulan y los blancos a los que están dirigidos (Ghildiyal y Zamore 2009), aunque a veces pueden actuar de forma sinérgica.. Todas estos tipos de sRNAs tienen en común que su función ocurre por unión a proteínas de la familia Argonauta (AGO), y se originan a partir del corte endonucleolítico de RNAs progenitores más largos (Miyoshi, Miyoshi, y Siomi 2010).

### snRNA y snoRNA

Sin embargo, existen otras familias de RNAs pequeños además de las antes mencionadas. Los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) son RNAs no codificantes relativamente conservados, que presentan una estructura característica (de doble y simple *hairpin*) (Martens-Uzunova, Olvedy, y Jenster 2013) y poseen entre 70 y 240 nt de largo (Fritz et al. 2016). Tienen alta relevancia en la modificación postranscripcional de muchos RNAs (Hasler et al. 2020) y están fuertemente relacionados con los RNAs llamados pre-miRNAs (Tuck y Tollervy 2011), aunque su función principal es la maduración del rRNA en el nucléolo. Los RNAs pequeños nucleares (snRNAs) son RNAs de alrededor de 150 nt de largo que están mayormente relacionados a la modulación de la actividad de la RNA Polimerasa II y con el splicing del RNA mensajero en el núcleo (Fritz et al. 2016).

### RNA interferencia

A fines de la década de 1990 se descubrió, en *C. elegans*, que el RNA de doble cadena es capaz de producir RNAs pequeños doblecatenarios con capacidad de degradar y silenciar mRNAs de secuencia complementaria. A estos pequeños RNAs de doble cadena se los denominó RNAs interferentes pequeños o siRNAs, por sus siglas en inglés (Fire, Xu y Kostas 1998). Más adelante se descubrió que existen siRNAs derivados de agentes endógenos y derivados de agentes exógenos. Los primeros en descubrirse fueron aquellos derivados de agentes exógenos, en donde una doble hélice larga es cortada por la proteína Dicer, lo que da lugar al siRNA de doble hebra de alrededor de 21 nt (20 a 25) con un extremo 5' fosfato y un extremo 3' hidroxilo y con dos nucleótidos que protruyen por el extremo 3'. Una de las hebras se degradará, lo que posteriormente da lugar a que la otra hebra, la hebra guía, actúe como guía para el silenciamiento de un mRNA de secuencia complementaria (Ghildiyal y Zamore 2009). Los siRNAs derivados de agentes endógenos son mayormente estudiados en plantas, aunque también se los

encuentra en animales y tienen una biogénesis relativamente similar, al igual que su *modus operandi* (Ghildiyal and Zamore 2009).

### Micro RNAs (miRNAs)

Los miRNAs provienen de moléculas de RNA precursoras más largas (pri-miRNAs) que son transcritas por la RNA Polimerasa II. Por lo general, son transcritos largos que se pliegan sobre sí mismos por auto-complementariedad de bases, formando estructuras con una estructura de horquilla. La generación de un microRNA necesita de varios pasos clave. En primer lugar, necesita de dos endonucleasas que actúen de forma secuencial en simultáneo con una proteína de unión al RNA de doble cadena (dsRBD por su sigla en inglés). Primero, el pri-miRNA se procesa en el núcleo por acción de la proteína Drosha, que actúa en simultáneo con DGCR8 (dsRBD), para dar lugar a un pre-miRNA de 60-120 nt que, al igual que su precursor, tiene forma de horquilla. Una proteína exportadora, Exportina 5, lleva el pre-miRNA hacia el citoplasma, unida a una GTPasa (Ran), a través de los poros de la membrana nuclear. Ahí, la proteína Dicer y su proteína ayudante dsRBD (TRBP en mamíferos), cortan el pre-miRNA para generar un miRNA de 20-24 nt de longitud. Al igual que los siRNAs, los miRNAs están compuestos por dos cadenas de ARN complementarias con extremos 3' protruyentes, fruto del corte secuencial de Drosha y Dicer. Estos miRNAs son cargados posteriormente en una proteína AGO (Argonauta), lo que generará el complejo miRISC (*miRNA-RNA-induced silencing complex*). Una de las dos hebras del miRNA permanecerá unida a AGO y la otra hebra se degradará, como sucede con los siRNAs (Ghildiyal y Zamore 2009; Martens-Uzunova, Olvedy y Jenster 2013).

Algunas de las funciones de estas moléculas comprenden tanto el control epigenético de la expresión genética, como la degradación del RNA mensajero, la supresión de la traducción en la célula o la activación de receptores de la respuesta inmune, entre otras (Fritz et al. 2016). Alteraciones en niveles fisiológicos de diferentes miRNAs en animales pueden causar cambios fenotípicos, además de alterar muchos procesos en el desarrollo de algunos vertebrados, al igual que contribuir al desarrollo de enfermedades y patologías (cardíacas, reproductivas, entre muchas otras) (Stefani and Slack 2008). Los miRNAs asociados a cáncer son denominados OncomiRs o miRNAs supresores de tumor, dependiendo del tipo de RNA que silencian. miR-21 es un oncomiR por lo general sobreexpresado en la mayoría de los tipos de cáncer (Yan et al. 2008; Li y Chen 2015). También se sabe que los miRNAs están muy fuertemente vinculados a procesos como el desarrollo embrionario, donde funcionan como moléculas de señalización. También en el desarrollo del sistema nervioso, donde tienen una función más relacionada con la diferenciación celular. Están fuertemente relacionados con el desarrollo de muchos

tejidos en el organismo, no solamente humano, sino de muchas otras especies de animales y plantas (Stefani y Slack 2008).

Al día de hoy se sabe que muchos miRNAs están relacionados en varios aspectos del desarrollo del sistema inmune. Por ejemplo, es posible identificar células hematopoyéticas a partir de los niveles de expresión de miR-142, miR-144, miR150, miR-155 y miR-223 (Sinigaglia et al. 2013). Otros linajes celulares también pueden ser reconocidos por su expresión de miRNAs, tales como los eritrocitos, que expresan altos niveles de miR-451, mientras que los linfocitos B y T expresan niveles elevados de miR-223 (Kluiver et al. 2006; Merkerova, Belickova, y Bruchova 2008).

### tRNAs

Estas moléculas son las moléculas principalmente utilizadas en esta tesis por lo que a continuación se procederá a dar detalle de cada una de estas con el fin de poder ubicar autónomamente la intención de cada ensayo experimental.

Los tRNA maduros tienen un extremo 5'-monofosfato y un extremo 3'-CCA. El aminoácido se encuentra agregado sobre el extremo 3' de la molécula, y su estructura 2D se asemeja a una hoja de trébol con bucles internos, el bucle T, el bucle D y el bucle del anticodón. Se sabe además que, si bien son moléculas extremadamente estables, también pueden ser degradados (Martens-Uzunova, Olvedy, y Jenster 2013). Si bien los tRNA están considerados como parte del gran grupo de RNAs pequeños por tener aproximadamente 73 nt de largo, no serán de mayor estudio en esta tesis, aunque si son objeto de estudio en otros proyectos de nuestro laboratorio.

Por otra parte, los fragmentos de RNA de transferencia derivan de los tRNA, moléculas encargadas de entregar aminoácidos al ribosoma durante la traducción para sintetizar proteínas. Los fragmentos de RNA transferencia (tRFs) son moléculas que derivan de los tRNA, mencionados anteriormente. Podemos rastrear su descubrimiento hasta hace ya casi 50 años, momento en el que se consideraban un producto inevitable de la degradación del RNA transferencia, motivo por el que no despertaron mayor interés hasta la era en la que se comenzaron a utilizar metodologías de secuenciación profunda (Borek et al. 1977; Li et al. 2018) (Borek, et al. 1977; Li et al. 2018). De cualquier modo, ya desde 1979, se comenzó a imaginar que estas moléculas, hasta entonces producto de degradación, podrían ser marcadores indicativos de enfermedades como el cáncer (Speer et al. 1979). Tomó alrededor de 30 años poder aislar un fragmento de tRNA por primera vez (Martens-Uzunova et al. 2013).

Los tRFs como las mitades de tRNA (tRNA-h), están reportados en todos los dominios de la vida, desde eucariotas a arqueas, lo que indica que estas moléculas pueden haber estado jugando un rol en la evolución de los diferentes organismos, desde humanos (Lyons, Fay, et al. 2017) hasta protozoarios (Garcia-Silva et al. 2010). Asimismo, parece relativamente probable que los tRFs estuviesen presentes en el camino de la evolución de los tRNA maduros (Kanai 2015). Estos fragmentos se han identificado en numerosas enfermedades donde parecerían estar implicados en procesos relevantes, por ejemplo, en enfermedades neurodegenerativas o en el cáncer (Anderson e Ivanov 2014).

También se encontró conexiones entre varios virus y la producción de diferentes fragmentos de tRNA, como por ejemplo, el virus sincitial respiratorio (VSR) y la producción de tRF-5-GluCTC (Wang et al. 2013).

También se sabe que estos fragmentos están fuertemente correlacionados en diferentes tipos de cánceres. Hay varios RNAs derivados de tRNA dependientes de hormonas sexuales (SHOT-RNAs por su sigla en inglés *sex hormone-dependent tRNA-derived RNAs*) relacionados con cáncer de mama y cáncer de próstata (Honda et al. 2015). Este es uno de los tantísimos ejemplos que se pueden encontrar en *The Cancer Genome Atlas*, un repositorio donde se puede identificar diferentes fragmentos de RNA y su expresión en diferentes tipos de cáncer (Pliatsika et al. 2016; Pliatsika et al. 2018).

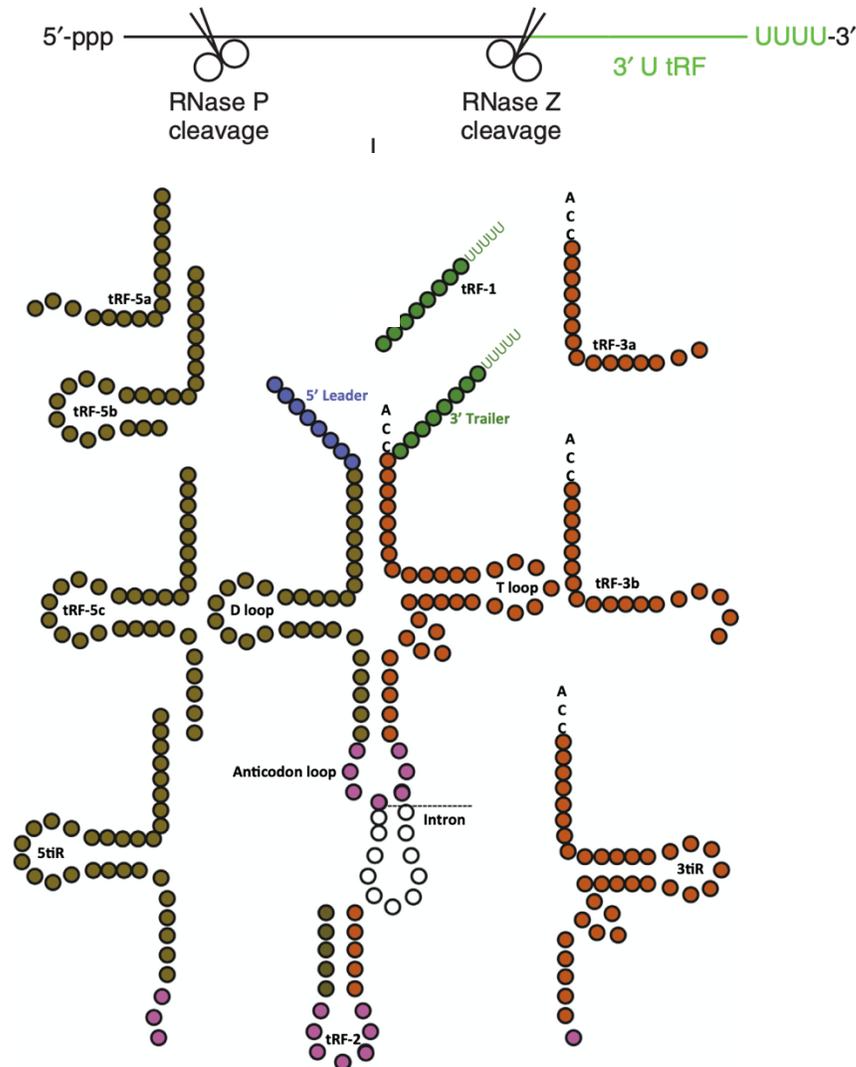
Se piensa que estas moléculas podrían ser parte de un mecanismo de señalización cuando la célula se encuentra en un marco de estrés de algún tipo. Además, se les ha atribuido un potencial biomarcador como señalizador de enfermedades, además de ser agentes terapéuticos (Martens-Uzunova, Olvedy, y Jenster 2013). A continuación se categorizarán según tipo y se denotarán algunas de sus funciones conocidas.

### Fragmentos pequeños de tRNA

Los fragmentos de tRNA están por lo general agrupados según su largo, el dominio de origen y su función, como se puede ver en la figura 3. Pueden ser subdivididos en dos categorías: las mitades de tRNA (tRNA-h) y los fragmentos pequeños de tRNA (tRFs). Los últimos, son fragmentos de aproximadamente 20 nt de largo que pueden derivar tanto del fragmento 3' como del 5' del tRNA progenitor (Martens-Uzunova, Olvedy y Jenster 2013). Comenzaron a despertar mayor interés al encontrarse presentes en diferentes organismos y diferentes tipos celulares gracias a la tecnología de secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación (HTS por su sigla en inglés). De acuerdo con Anderson e Ivanov (2014), los tRFs se clasifican según su biogénesis y pueden derivar tanto de tRNAs maduros como de pre-tRNAs. Se los suele clasificar en tres subespecies: los tRF-3, tRF-5, y los llamados 3' U-tRF (o tRF-1, por otros autores),

que corresponden al 3' *trailer* de los pre-tRNAs, eliminado por la RNasa Z. Se piensa que la biogénesis de los tRF-5 y tRF-3 se debe a un procesamiento específico, ya que su abundancia varía de acuerdo con la línea celular estudiada y también varía en función de cuál sea su tRNA progenitor. Sus extremos están definidos con especial precisión y existen secuencias que son de alguna manera preferidas para el corte o clivaje. Su denominación depende de la porción de la que el fragmento proviene con respecto al tRNA precursor (es decir, de los extremos 5' o 3'). Los tRF-3 derivan del clivaje en el bucle T del tRNA, y poseen entre 13 y 22 nt de largo. Los tRF-5 provienen del clivaje del bucle D del tRNA' y poseen también unos 22 nt de largo. Sin embargo, hay autores que llaman tRF-5 a fragmentos mucho más largos, que pueden llegar hasta los 31 nt (Tuck and Tollervey 2011) aunque, a los efectos de esta tesis, nos referiremos a dichos fragmentos como mitades de tRNA (tRNA-h, ver sección siguiente).

Si bien la mayoría de las revisiones en el tema proponer que la enzima Dicer es la responsable de la generación de los tRF-5 y tRF-3, lo que implicaría una similitud con la biogénesis de los miRNAs, la base experimental que sostiene esta afirmación no es tan clara. Además, ciertos tRFs parecerían surgir con independencia de Dicer, aunque sí tendrían la capacidad de asociarse a proteínas Argonautas y ejercer funciones análogas a las de los miRNAs (Kuscu et al. 2018).

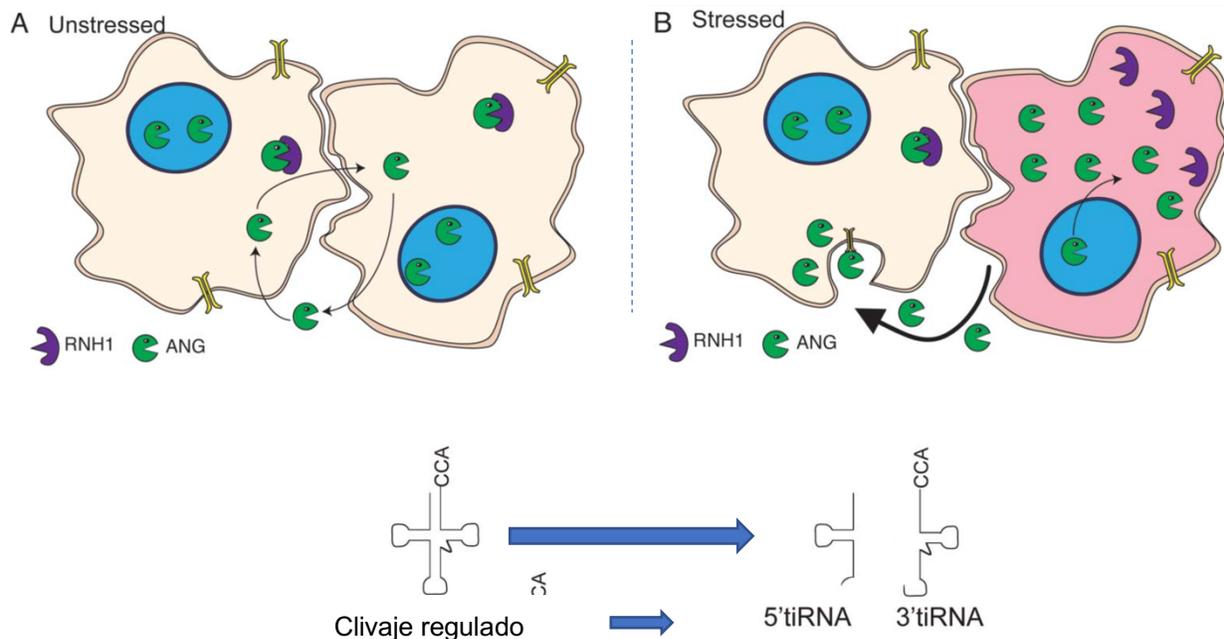


**Figura 3:** Biogénesis de tRFs. Los fragmentos están coloreados de manera que se pueda reconocer su origen y procedencia respecto al tRNA maduro precursor (o pre-tRNA para el caso de los llamados tRF-1). Extraído y adaptado de (Sobala y Hutvagner 2011; Kumar, Kuscu y Dutta 2016).

### Mitades de tRNA (tRNA-h) (y tRNA-h generados por estrés (tiRNAs))

Las mitades de tRNA (tRNA-h) son fragmentos de tRNA cortados específicamente a nivel del anticodón, con el fin de producir 5' tRNA-h de 30 a 35 nt de largo y 3' tRNA-h de 40 a 50 nt de largo. A diferencia de los tRFs, cuya biogénesis no está aún claro si es regulada, las tRNA-h se producen típicamente bajo condiciones de estrés (por ejemplo, estrés oxidativo, nutricional, hipoxia) por Ribonucleasas de la familia A, como la angiogenina (ANG) (Saikia et al. 2012). En consecuencia, las tRNA-h reciben también el nombre de tiRNAs, o *stress-induced tRNA fragments* (la "i" indica que son inducibles por estrés). A los efectos de esta tesis, nos referiremos a las tRNA-h como tiRNAs

únicamente en los casos en que su inducción por estrés esté experimentalmente demostrada. La endonucleasa ANG se encuentra generalmente en situaciones fisiológicas formando un complejo con su inhibidor, RNH1, en el citoplasma (Li and Hu 2012). Bajo situaciones de estrés, ANG se desacopla del inhibidor y corta el tRNA a nivel del anticodón, lo que genera las mitades 5'- y 3'. Se conoce además que, ante situaciones de estrés, la ANG nuclear (que actúa como factor de transcripción de la RNA polimerasa I) se transloca al citoplasma bajo una forma desacoplada de su inhibidor. Esto genera por tanto que el pool de ANG activa y libre en el citoplasma aumente y por tanto los niveles de tiRNAs aumenten en consecuencia (Lyons, Fay, et al. 2017) como se muestra en la figura 4.



**Figura 4:** Generación de tiRNAs y posible rol de ANG en la comunicación intercelular bajo condiciones de estrés. En (a) se ve a ANG localizada principalmente en el núcleo de células en estado fisiológico (sin estrés). La interacción de ANG (en verde) con RNH1 (violeta) hace que esté en estado inactivo. ANG puede ser secretada y captada por una célula vecina a aquella que la secretó. En (b) se ve que durante el estrés (célula en rojo), ANG se desacopla de RNH1 y se transloca del núcleo al citoplasma. Esto aumenta el pool de ANG libre en el citoplasma. Así sucede (c), la generación de tiRNAs, donde ANG corta a nivel del anticodón. Extraído y adaptado de (Lyons, et al. 2017). Como se discutirá más adelante, los autores proponen también que el aumento en el pool de ANG libre en el citoplasma de células estresadas podría implicar mayor liberación de ANG al medio extracelular, y captación de la enzima por células vecinas. Implicando a ANG en una vía de comunicación intercelular mediada por estrés.

Los tiRNAs están reportadas como controladores de la traducción y también cumplen un rol en el silenciamiento del RNA (Fritz et al. 2016). Un claro ejemplo de esto son las

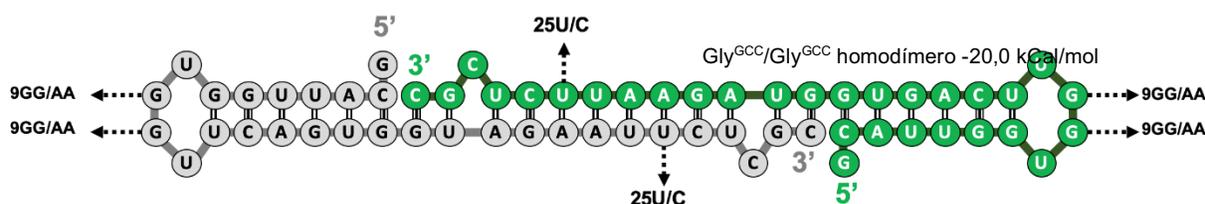
mitades 5'-tiRNA-Cys/Ala, responsables de la inhibición de la iniciación de la traducción (Ivanov et al. 2011) lo que en algunos casos también induce el ensamblado de gránulos de estrés (Emara et al. 2010; Anderson y Ivanov 2014). Están presentes en muchos biofluidos; un claro ejemplo de ello es su circulación por el plasma sanguíneo (Dhahbi et al. 2014), aunque también se los ha detectado en semen, donde podrían ser utilizados como biomarcador para control de calidad en fertilización *in-vitro* (Hua et al. 2019).

Algunos autores han sugerido que, durante la biogénesis de las tRNA-h, primero se remueve el extremo -CCA que está unido al aminoácido y que una vez cumplido este paso recién se puede dar lugar al corte en el bucle del anticodón. Este proceso puede ser revertido si no se llegase a realizar el corte a nivel del anticodón (Kirchner and Ignatova 2015; Lyons, Fay, et al. 2017), ya que la enzima TRNT1 podría reparar el daño una vez que el estrés desapareciera (Lyons, et al. 2017). Sin embargo, un *preprint* de Pavel Ivanov y colaboradores demuestra que el orden de estos sucesos podría no ser así, y que el corte a nivel del CCA y del anticodón ocurre de forma independiente y posiblemente es mediado por diferentes enzimas. Los autores observan, además, que TRNT1 no repara los extremos -CCA *in vivo* luego del corte por la angiogenina (Akiyama et al. 2019). Más aún, la angiogenina parecería ser parcialmente redundante para la generación de tRNA-h, que aún ocurre en ausencia de esta enzima (Su et al. 2019). Al igual que la situación descrita para los tRF-5 y tRF-3, la biogénesis de las tRNA-h o tiRNAs aún no es clara del todo.

En un estudio reciente donde se analiza la función y biogénesis de fragmentos de tRNA durante la maduración de espermatozoides y la fertilización en mamíferos, se encontró que los tiRNAs son escasos en las espermatogonias pero que incrementan su concentración con el avance de la maduración en el epidídimo. Allí, los futuros espermatozoides aceptan RNAs extracelulares proveniente de los epididimosomas, una suerte de EVs liberados por las células del epidídimo. En particular, estos epididimosomas parecen estar enriquecidos en mitades de tRNA de glicina (tiRNA-GlyGCC, molécula central de esta tesis). Dentro del espermatozoide, se encontró que las tiRNA-GlyGCC reprimen genes asociados con el retroelemento llamado MERVL, lo que estaría interfiriendo en la regulación de retroelementos endógenos activos en el embrión preimplantado y en genes ubicados en zonas del genoma adyacentes a estos retroelementos (Sharma et al. 2015). En un estudio realizado en ratones se encontró también que las tiRNA-Gly se veían alteradas en ratones sometidos a excesivo ejercicio físico (correr), lo que podría estar sugiriendo que los niveles de estas mitades en el espermatozoide de estos ratones podrían estar condicionando el fenotipo del comportamiento de la descendencia (Short et al. 2017). Aunque estos resultados son aún controversiales, el posible involucramiento de las mitades de tRNA de glicina en la herencia de los caracteres adquiridos resulta una hipótesis intrigante.

## tiRNA<sup>Gly-GCC</sup>

Nuestro grupo está especialmente interesado en las tiRNA-GlyGCC ya que desde un comienzo se determinó que estas mitades de tRNA eran muy abundantes (Tosar et al. 2015) e intrínsecamente estables (Tosar et al. 2018) en el medio extracelular. Se observó que, de alguna manera, estas mitades sostienen su estabilidad frente a la acción de las ribonucleasas que tenderían a degradarlas, aún cuando se encuentran, mayoritariamente, fuera de las EVs (Tosar et al. 2015). Esto podría deberse tanto a su unión específica con proteínas extracelulares (formando ribonucleoproteínas, o RNPs por su sigla en inglés) y/o con su capacidad de adoptar una configuración tridimensional que las vuelve insensibles a tales moléculas. Se determinó *in-silico* que estas tiRNAs son capaces de generar homodímeros, además de generar heterodímeros con mitades del tRNA-GluCTC (también abundantes a nivel extracelular). Más aún, se validó que las tiRNA-GlyGCC dimerizan espontáneamente en modelos *in-vitro* (Tosar et al. 2018) creando estructuras como la representada en la figura 5. El largo de las secuencias capaces de formar estas estructuras es de 30 o 31 nucleótidos. Este hecho tendrá una importante relevancia en esta tesis, por lo que conviene sea recordado.



**Figura 5:** diagrama *in-silico* de la generación espontánea de homodímeros 5'- tiRNA-GlyGCC resistentes a degradación por ribonucleasas. Adaptado de Tosar et al. 2018.

## Empaquetado de RNA en EVs

El empaquetado de secuencias de RNA, tanto como de proteínas y de otras macromoléculas, es uno de los temas más controversiales en el mundo del RNA extracelular. Por un lado, están aquellos que fervientemente aseguran que el contenido en la fracción vesicular es un reflejo de aquello que se encuentra dentro de la célula, proponiendo sistemas de cargado vesicular no selectivo, dirigido por la concentración de cada macromolécula a nivel intracelular (Tosar et al. 2021a). Por otra parte, están aquellos que se aferran al modelo de secreción selectiva, que propone un aparato de empaquetamiento activo y dependiente de secuencia, y que involucraría proteínas y otras moléculas encargadas de permitir paso hacia el interior de las EV únicamente a aquellos RNAs por los que estas proteínas presenten mayor afinidad.

Lo que sí parece un consenso en el campo es que las EVs estarían sirviendo como vehículo para el cargado y transporte de moléculas que podrían estar funcionando como

mediadores en la comunicación intercelular, en la señalización de enfermedades y como potencial vehículo de entrega de biofármacos.

### Mecanismo de empaquetamiento selectivo

El postulado principal sobre el que se construye este modelo implica que al momento de la biogénesis de la vesícula extracelular existen macromoléculas encargadas de seleccionar y dar paso al interior vesicular únicamente, o al menos preferentemente, a aquellas moléculas que sean requeridas para el transporte y entrega del mensaje para el que la EV estaría destinada. En consecuencia, el perfil de RNAs intravesiculares distaría mucho del perfil de RNAs propios de la célula parental.

Como ya se ha dejado en evidencia anteriormente, existe un mecanismo por el que los miRNAs pueden ser empaquetados dentro de vesículas extracelulares. En algunos trabajos se ha podido ver que los perfiles de miRNAs intracelulares y extracelulares no son proporcionales, es decir, no son un reflejo entre ellos, lo que estaría indicando que existe un mecanismo de selección que permitiría identificar cuáles serán las secuencias que entrarían dentro de las EVs (Valadi et al. 2007). Se han descrito motivos de secuencia que parecerían estar encargadas de proveer el reconocimiento necesario para ello, llamadas EXOmotifs (Villarroya-Beltri et al. 2013), aunque no todos los miRNAs encontrados en EVs contienen dichos motivos. También se ha observado que células T introducen selectivamente ciertos tRFs en MVBs, los cuales serán luego secretados al espacio extracelular en EVs, y que este proceso es necesario para la activación de la repuesta inmune en ratones (Chiou, Kageyama y Ansel 2018).

Debido a este fenómeno, se han propuesto algunos grupos de proteínas que parecerían estar involucradas en el transporte selectivo de miRNAs específicos al interior de las EVs, al igual que en el proceso de selección y de la actividad de los miRNAs en las células de destino: hnRNPA2B1, YBX-1, entre otras (Villarroya-Beltri et al. 2013; Goodarzi et al. 2015; Shurtleff et al. 2016). Se ha observado también que algunos de los miRNAs que se incorporan dentro de exosomas estarían formando complejos ribonucleoproteicos con proteínas de la familia AGO. Más aún, se ha sugerido que los sitios de ensamblado de los complejos AGO/miRNA se dan precisamente a nivel de la membrana de los MVBs, lo que explicaría como estos complejos luego se cargan dentro de las EVs (Jakymiw et al. 2007; Gibbings et al. 2009; Fritz et al. 2016).

La proteína YBX-1 se encuentra entre las preferidas para la selección de macromoléculas en EVs. Un estudio en el que se demuestra de manera clara este proceso se realizó en el laboratorio del Dr. Randy Schekman, premio Nobel de Medicina en 2013, donde los autores aislaron exosomas CD63+ que contenían una serie de

miRNAs altamente enriquecidos en comparación con los perfiles intracelulares. Se encontró que particularmente miR-223 y miR-144 estaban enriquecidos en exosomas y que miR-223 era empaquetado de manera selectiva en exosomas *in-vitro* por medio de la proteína YBX-1. Además, descartaron un rol específico de AGO2 (proteína de la familia AGO) en el empaquetamiento de miR-223, como se había propuesto con anterioridad (Melo et al. 2014; Shurtleff et al. 2017) Un año más adelante, el mismo equipo propuso el mismo rol para esta proteína, pero aplicado ahora a otros pequeños RNAs, tales como tRNAs, Y-RNAs y Vault RNAs (Shurtleff et al. 2017). También se ha propuesto a YBX-1 como regulador de la formación de gránulos de estrés inducidos por 5'-tiRNA-Ala, lo que vincularía a esta proteína en la respuesta celular frente a situaciones de estrés (Czech et al. 2013; Lyons et al. 2016). Por ende, las células estresadas podrían empaquetar ciertos RNAs específicos en sus EVs, contribuyendo así a las vías de comunicación intercelular mediadas por RNAs extracelulares, motivo de estudio de esta tesis.

### Mecanismo de empaquetamiento no selectivo de RNAs en EVs

Como dijimos, el modelo de empaquetamiento selectivo se fundamenta en la observación de que los perfiles de miRNAs u otros RNAs son muy diferentes entre muestras pareadas intra- y extracelulares. Sin embargo, otros estudios, incluidos trabajos de nuestro propio grupo, han observado exactamente lo contrario: los miRNAs más abundantes dentro de la célula son también los más abundantes en las EVs, y viceversa (Turchinovich et al. 2011; Tosar et al. 2015). Lo que estos estudios tienen en común es el uso de medios libres de suero bovino fetal, como se explicará a continuación.

Es muy importante mencionar que recientemente se descubrió que partículas provenientes del suero fetal bovino con el que se complementan los medios para cultivo de células son una fuente importante de miRNAs y otros RNAs contaminantes. Y esto ocurre aún cuando se ultracentrífuga el suero fetal bovino para eliminar sus vesículas extracelulares (Wei et al. 2016). La mayor problemática es que los procesos más habituales de depleción de EVs del suero incluyen ultracentrifugación, lo que no logra remover todas las vesículas extracelulares provenientes del suero, ni mucho menos los complejos ribonucleoproteicos solubles presentes en el mismo. Se demostró que estos RNAs contaminantes están compuestos por miRNAs, snoRNAs, fragmentos de tRNAs y rRNAs, y más del 70% permanece en la muestra incluso luego del proceso de sedimentación. Se encontró que el miR-122, que previamente había sido identificado como enriquecido en EVs, sería un artefacto proveniente del suero fetal bovino, así como el miR-451a, el miR-1246, miR-148a-3p y muchos otros, ya que, al utilizar medio sin complementar con suero fetal bovino, dichos miRNAs desaparecían de contexto (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017).

La contaminación como fuente artefactual de RNAs altamente enriquecidos a nivel extracelular (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017; Auber et al. 2019) dinamita las bases empíricas que sostienen al modelo de secreción selectiva (Tosar et al. 2021a). Además, trabajos previos de nuestro grupo realizados en medio libre de suero mostraron perfiles de miRNAs altamente correlacionados entre muestras intra- y extracelulares (Tosar et al. 2015). Si bien estos son hallazgos importantes en el campo, particularmente para evaluar el tipo y la metodología de los ensayos experimentales que integran procesos de sedimentación, no se descarta de ninguna manera la posibilidad de que el proceso de empaquetamiento selectivo sea una opción posible, o bien que ambos mecanismos de liberación puedan ocurrir en simultáneo (Temoche-Diaz et al. 2019; Tosar et al. 2021a).

### **EVs como método de entrega (“*delivery*”) de macromoléculas**

Todavía no se conoce con claridad si las EVs tienen la capacidad de reconocer un tipo celular en específico o si se internalizan al momento del contacto con la célula blanco adecuada, pero sí se sabe que existen algunos tipos de proteínas de EVs que interactúan con receptores de membrana en células blanco (Mulcahy, Pink y Carter 2014) como por ejemplo integrinas exosomales específicas que redireccionan exosomas a órganos específicos: tropismo exosomal dirigido por ITG $\beta_4$  e ITG $\beta_5$  (Hoshino et al. 2015). Por esto mismo es que uno de los factores clave para la internalización es la integridad estructural tanto de la EV como de la célula que la va a internalizar. La EV puede entrar en contacto con la membrana plasmática de la célula receptora y fusionarse de manera que el contenido se internaliza directamente en el citoplasma (Janas et al. 2015), o bien internalizarse mediante endocitosis mediada por receptor (Janas et al. 2015). Alternativamente, las EVs también podrían quedar conectadas a las células mediante los receptores de membrana y esto podría disparar mecanismos de señalización intracelulares sin necesidad de internalizar su contenido dentro del citoplasma (Feinberg y Hunter 2003). El mecanismo de internalización mediado por endocitosis se puede dar de varias maneras, por ejemplo, endocitosis mediada por clatrina (receptores de lipoproteínas), mediada por caveolinas, mediada por balsas lipídicas, macropinocitosis y fagocitosis, aunque estos tipos de internalización dependen del tipo celular de estudio (Abels y Breakefield 2016).

Se ha visto que un factor importante en la internalización de EVs en células blanco son unas moléculas llamadas heparán sulfato proteoglicanos, presentes en la membrana plasmática de la célula que va a recibir las EVs, ya que si la muestra contiene heparina o se expone a esta, la receptibilidad disminuye significativamente (Atai et al. 2013; Christianson et al. 2013). El pH ácido del microambiente tumoral también favorece la internalización espontánea de EVs en la célula (Parolini et al. 2009). Se ha podido observar también que existen ciertas integrinas que favorecen la captación de EVs

provenientes de células de tumor. Estas EVs podrían estar influenciando de alguna manera la metástasis de un órgano, ya que se demostró que estas integrinas generan organotropismo selectivo y redistribuyen la metástasis. Además, observaron que diferentes integrinas exosomales activan genes S100 y podrían ser utilizadas además como biomarcadores de cáncer (Hoshino et al. 2015).

Los cambios a todo nivel, genómico, transcriptómico y proteómico, que genera el contenido de las EVs al llegar a la célula receptora son un marco de estudio multidisciplinario que recién se está comenzando a abordar.

### **¿Qué sucede en la célula receptora al arribo de los fragmentos de tRNA?**

Parece ampliamente aceptado el hecho de que las EVs podrían ser utilizadas como método de entrega de RNAs terapéuticos. La pregunta ahora consta en dilucidar si los fragmentos de tRNA en vesículas extracelulares podrían ser utilizados, en primer lugar, como biomarcadores de enfermedades y en segundo lugar, comprender la biología que está detrás de un posible mecanismo de transferencia intracelular de mitades de tRNA por EVs. Además, estos estudios podrían ayudarnos a comprender el rol de las EVs como transportadoras de RNAs entre células, lo que podría tener impacto futuro en el desarrollo de biofármacos. Pero la pregunta clave es qué sucede internamente en la célula receptora durante y luego del arribo de tales fragmentos, además de comprender los diferentes mecanismos que permiten que estos cambios sucedan.

Se sabe que en embriones de ratón, los fragmentos de tRNA modulan la expresión de RNAs no codificantes y de histonas, por tanto, tienen capacidades de reorganización de la cromatina, además de afectar la expresión de algunos genes (Sharma et al. 2015; Boskovic et al. 2020).

Se propone también que algunos fragmentos de tRNA dentro de exosomas funcionan de manera parácrina entre células del sistema inmune en respuesta a infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) (Pegtel et al. 2010) aunque aún se conoce poco acerca del rol de estas moléculas en la infección del virus.

Se plantea también que las modificaciones post-transcripcionales en los RNAs pequeños pueden estar jugando un rol crucial también en la manera en la que la célula puede estar interpretando los mensajes, además de jugar un rol en la estabilidad de la molécula, por tanto, conduciendo su propósito por diferentes caminos. También se plantea que estas modificaciones podrían generar un marco de trabajo al momento de diseñar biofármacos con potenciales usos en la industria biofarmacéutica (Zhang et al. 2016).

Hace alrededor de cinco años se realizó el primer metaanálisis de fragmentos de tRNA, lo que reveló que están presentes a través de todos los dominios de la vida. Se observó que están conservados evolutivamente y también que pueden estar asociados a proteínas AGO para cumplir un rol de reconocimiento de blancos de RNA específicos (Kumar et al. 2014).

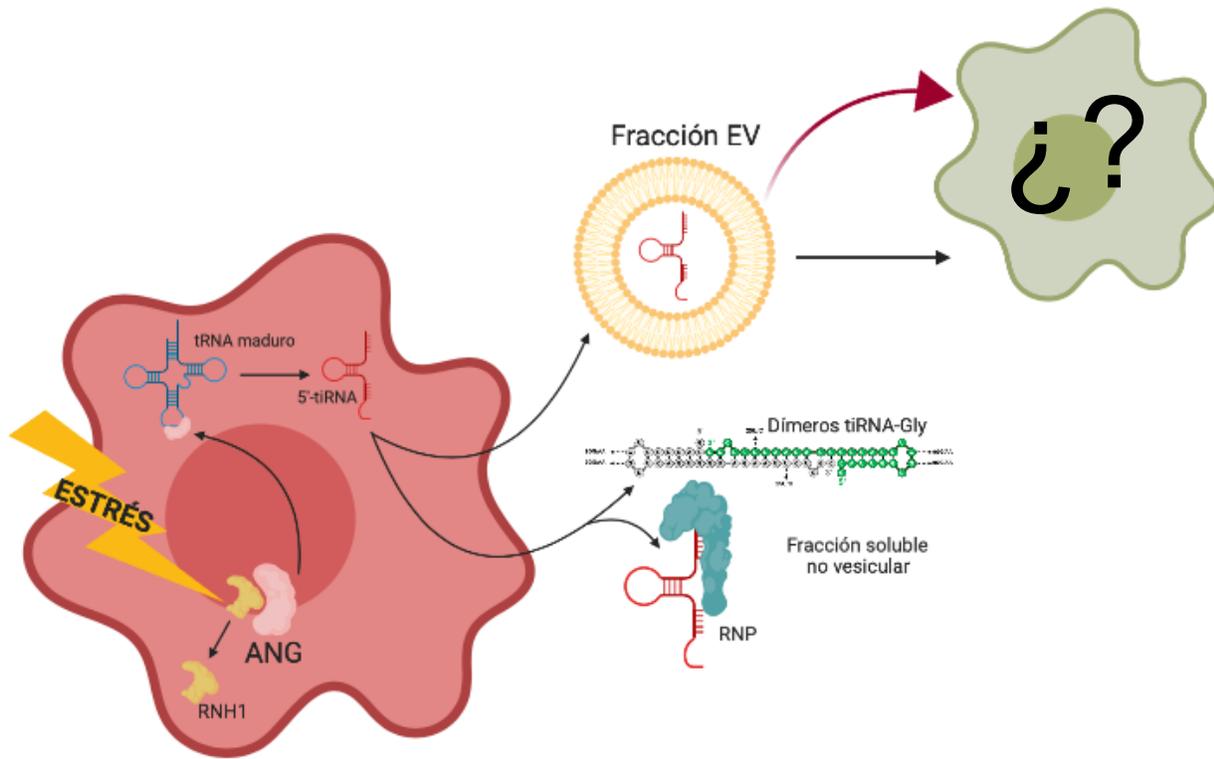
A medida que las tecnologías de secuenciación se perfeccionan, se pueden comenzar a estudiar con mayor profundidad algunas de las funciones de algunos fragmentos de tRNA. En el marco de esta tesis, un aspecto de mayor importancia es entender los mecanismos en los que los tiRNAs se desenvuelven a nivel intracelular, para luego poder evaluar si mecanismos similares se podrían inducir en células blanco frente a la llegada de tiRNAs encapsulados dentro de vesículas extracelulares. Se conoce, como ya se dijo, que al inducir estrés se generan tRNA-h (i.e., tiRNAs) mediante el corte de los tRNA maduros por la proteína angiogenina. Sin embargo, al aumentar la concentración de tiRNAs, los tRNA maduros no disminuyen apreciablemente (Yamasaki et al. 2009; Saikia et al. 2012). Por tanto, esto indicaría que la generación de estas mitades no regula la traducción de proteínas mediante afectación del *pool* de tRNAs traduccionalmente activos, sino que regulan otros procesos específicos de una forma mucho más directa. En otras palabras, los tiRNAs no serían un accidente de un proceso degradativo, sino que serían un producto cuya biogénesis es regulada en respuesta a estímulos. Por ejemplo, se observó que al transfectar células U2-OS humanas con mitades 5' tiRNA-Ala y Cys se inhibe la traducción en reticulocitos de ratón ya que se desacopla el factor eIF4G/A de los RNAs mensajeros (Emara et al. 2010; Ivanov et al. 2011; Lyons et al. 2020). Se sabe también que estas mitades están presentes en procesos como la apoptosis celular. Mediante estrés hiperosmótico, los tiRNAs generados por angiogenina se unen (con mayor o menor afinidad) al citocromo c e inhiben la unión de citocromo c con el factor activador de proteasas apoptótico 1 (APAF1), que es importante para la formación del apoptosoma y el comienzo de la muerte celular (Saikia et al. 2014). Se ha reportado también que los tiRNAs se unen a la proteína Dicer, saturando su sitio de unión por ende reduciendo su habilidad para cortar RNAs de doble hebra (Durdevic et al. 2013). Por otra parte, se piensa que la generación de tiRNAs está conectada a la naturaleza intrínseca del estrés al que se somete a la célula (Mishima et al. 2014). Se conoce también que los tiRNAs generados por el corte de angiogenina también se encuentran en el marco de las respuestas celulares a las infecciones virales, donde la generación de 5' tRNA-GluCTC promueve la replicación del virus sincitial respiratorio en las células infectadas (Wang et al. 2013).

El grupo de Pavel Ivanov y Paul Anderson, con quienes nuestro laboratorio ha estado colaborando desde hace algunos años, observó que las tiRNAs pueden estar relacionadas con el mantenimiento y la regeneración de neuronas (Ivanov et al. 2014).

Observaron también que las células motoras humanas internalizan de manera espontánea las mitades 5' tiRNA-Ala para sobreponerse a la apoptosis inducida por estrés, lo que podría tener grandes implicancias en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El punto general es que los fragmentos de tRNA inducidos por estrés están implicados en varias enfermedades y se han descrito abundantes mecanismos moleculares donde estos fragmentos están directamente implicados. Aquí solo hemos enlistado algunos a modo de ejemplo. Durante cierto tiempo se pensó que estos fragmentos eran el mero producto de la degradación de tRNAs, aunque ahora se acepta su acción como una nueva familia de sRNAs. Sabemos que se producen como respuesta al estrés de diferente índole mediante el corte en sitios específicos del anticodón, o de los *loops* D y T del tRNA. Todo esto sugiere fuertemente que nos encontremos frente a entidades biológicamente relevantes para el control de la expresión génica a nivel intracelular. Lo que en esta tesis nos preguntamos es qué rol podrían tener las mitades de tRNA, particularmente las de glicina, en la comunicación intercelular, a sabiendas de su ubicua presencia y alta abundancia a nivel extracelular (Tosar y Cayota, 2020).

## Hilo conductor de trabajo y antecedentes inmediatos



**Figura 6:** Hipótesis central de este trabajo. Al estresarse la célula “donadora” de EVs (rojo) se desacopla ANG de su inhibidor para generar tiRNAs (tiRNA-GlyGCC será el de mayor interés en este trabajo), los cuáles se empaquetan en EVs o se exportan como complejos RNPs y/o como dímeros de RNA desnudo (Tosar et al. 2018), además de poder generarse en el espacio extracelular a partir del clivaje de tRNAs extracelulares no vesiculares (Tosar et al. 2020). Las EVs son internalizadas por células “aceptoras”, induciendo cambios a nivel transcriptómico en las mismas. Por consiguiente, nos preguntamos ¿Tienen las mitades de tRNA de glicina empaquetadas en EVs la capacidad de actuar como moléculas señalizadoras del estrés celular entre células? ¿Y qué hay de las mitades no vesiculares?

Desde hace ya una década se sabe que los RNAs pequeños tienen la capacidad de regular la expresión génica y que están involucrados en numerosas enfermedades, todo esto expresado anteriormente. Además, se sabe que las tRNA-h se inducen por estrés y regulan además procesos vinculados al control de la expresión génica precisamente en situaciones de estrés, ya sea durante el arresto traduccional temprano como en la posterior reactivación de la traducción cuando las condiciones de crecimiento son más favorables (Ivanov et al. 2014; Kim et al. 2017).

Hace ya algún tiempo, el grupo en el que trabajo, descubrió que células humanas tienen la capacidad de liberar tRNA-h en vesículas extracelulares, así como también liberarlas al medio extracelular en forma de complejos solubles no vesiculares (Tosar et al. 2015).

Sorprendentemente, nuestro grupo observó que la inmensa mayoría de las tRNA-h extracelulares se encontraban fuera de las EVs. Más aún, estas tRNA-h extracelulares no vesiculares poseían un sesgo muy marcado hacia mitades 5' de tRNA de glicina o de ácido glutámico de exactamente 30 o 31 nucleótidos de largo.

En trabajos posteriores, se descubrió que la presencia de tRNA-h-GlyGCC en la fracción extracelular no vesicular se debe, muy probablemente, a su capacidad de formar homodímeros y heterodímeros con otras tRNA-h (Gly-Gly/Gly-Glu), lo que las vuelve resistentes a las acciones de las ribonucleasas extracelulares, como ya se explicó (Tosar et al. 2018). Un detalle importante a los efectos de esta tesis es que la capacidad de formar homodímeros parecería restringirse a los fragmentos de 30 o 31 nucleótidos, que son ligeramente más cortos que los productos surgidos a partir de un corte único a nivel del anticodón (35 nt).

En trabajos posteriores del grupo se observó que la célula en realidad libera tRNAs completos al medio extracelular, tanto dentro como fuera de vesículas. Mientras que los tRNAs completos parecerían ser estables dentro de las EVs, son rápidamente degradados por las RNAsas extracelulares cuando se encuentran fuera de las mismas. Esto provoca una rápida desaparición de los tRNAs completos extracelulares no vesiculares, y el consecuente aumento y acumulación de las tRNA-h-GlyGCC (Tosar et al. 2020), presuntamente a causa de su capacidad de formar dímeros resistentes a la degradación. Prueba de esto es que, mientras que las mitades que se generan inicialmente tienen 35 nucleótidos de largo, solamente se pueden observar los fragmentos de 30 o 31 nucleótidos cuando la actividad RNasa extracelular es alta y no está experimentalmente inhibida. En soporte de esta hipótesis de biogénesis extracelular de las mitades de tRNA, el grupo de Thomas Gingeras en CSHL publicó en paralelo un trabajo en el que se arribó a idénticas conclusiones a partir de una metodología ortogonal (Nechooshtan et al. 2020).

Lo que estos trabajos nos muestran es que el procesamiento extracelular (Tosar et al. 2020; Nechooshtan et al. 2020) acoplado a la estabilidad extracelular diferencial (Tosar et al. 2018, 2020) puede provocar un enorme enriquecimiento de ciertos RNAs específicos a nivel extracelular, sin la necesidad de que intervengan procesos de liberación selectivos. De hecho, las tRNA-h-GlyGCC no parecerían estar liberándose al medio extracelular en calidad de tales. Sumado a los efectos de la contaminación discutidos más arriba, todos estos resultados dan soporte a la hipótesis de liberación no selectiva de los RNAs. Esto sugiere poner una mirada diferente en la comunicación intercelular, pues implica que las variaciones en los niveles de ciertos RNAs a nivel intracelular se verían reflejadas también a nivel extracelular, lo que permitiría a las células

“comunicar” su estado metabólico a las células vecinas de una forma dinámica y eficiente (Tosar et al. 2021a).

En esta tesis, nos propusimos dotar de sustento empírico a este modelo, que hemos dado a llamar “la analogía del interferón” (Tosar et al. 2021a). Brevemente, lo que proponemos es que la célula sometida a estrés sobreexpresaría ciertos tRNA-h, que como consecuencia se empaquetarían en EVs y se transferirían a otras células, las cuales podrían decodificar esta información mediante, por ejemplo, cambios en la tasa global de traducción (efecto demostrado para varios tRNAs, Ivanov et al. 2011 y trabajos posteriores). Esto permitiría a las células montar una respuesta a estrés a partir del sentido, no ya de condiciones de crecimiento adversas, sino de moléculas extracelulares liberadas por células vecinas sometidas a estrés (Figura 6). Podría ser, pues, un mecanismo de preparación frente a condiciones de crecimiento adversas inminentes. Además de la presencia de tRNA-h en EVs, nos cuestionamos si las células muertas – que liberan tRNAs a la fracción no vesicular del medio extracelular, a partir de los cuales se generan dímeros de tRNA-GlyGCC de 30-31 nt (Tosar et al. 2020), podrían estar jugando también un rol en la comunicación intercelular (Figura 6).

En parte, el objetivo de dotar de sostén experimental este modelo de trabajo fue iniciado en la tesis de maestría de la Mag. Fabiana Gámbaro, con quién tuve el gusto de compartir mis primeros meses de trabajo en el laboratorio. En su tesis, Fabiana logró demostrar que la sobreexpresión de tRNA-h-GlyGCC mediante transfección de células MCF-7 provocaba no solo un aumento a nivel intracelular, sino también a nivel de las EVs liberadas por las células transfectadas así como en células sometidas a estas EVs (Gámbaro, 2019; Gámbaro et al. 2019). Más aún, Fabiana demostró que la capacidad de un RNA cualquiera de ser empaquetado en EVs depende no tanto de su secuencia, sino de su estabilidad, pues es la estabilidad la que impacta de forma directa en su concentración intracelular. Mediante estas observaciones brindó evidencia a favor del empaquetamiento no selectivo de RNAs, lo cual constituye uno de los postulados en los que se basa la mencionada “analogía del interferón”, esquematizada en la Figura 6. Sin embargo, las mitades de tRNA utilizadas en su tesis fueron aquellas que en realidad se acumulan en fracciones no vesiculares del medio extracelular, quedando dudas sobre si la transferencia intracelular de tRNA-GlyGCC de 30-31 nt (diméricas) constituyen un modelo adecuado para estudiar la comunicación intercelular en contextos de estrés. Además, los efectos inducidos por estas mitades a nivel de las células receptoras no llegaron a ser estudiados.

## Hipótesis general

La célula, ¿puede comunicarle su estado metabólico a otra célula del organismo con la que no mantenga contacto físico? Sabemos que el estrés produce una serie de fragmentos de RNA de transferencia (tRFs) que son importantes para el control de la expresión génica de la célula estresada (Yamasaki et al. 2009; Garcia-Silva et al. 2010; Ivanov et al. 2011; Goodarzi et al. 2015; Honda et al. 2015; Tosar et al. 2015; Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017; Kim et al. 2017). En esta tesis, nos preguntamos si dichos fragmentos de tRNA inducibles por estrés (tiRNAs) pueden liberarse al medio extracelular, ser captados por otras células, e inducir cambios en la expresión génica de las células que los reciben. Este tipo de modelo, que hemos denominado “la analogía del interferón” por su analogía con la señalización parácrina mediada por interferón en células infectadas por virus (Gámbaro et al. 2019; Tosar and Cayota 2020; Tosar et al. 2021a), sugeriría que una célula es capaz de “advertir” sobre condiciones de crecimiento adversas inminentes a células de su entorno. Esta analogía también propondría que tal mecanismo estuviese mediado por mitades de tRNA (tRNA-h). Este modelo requiere de evidencia experimental que sustente su atractivo para poder homologar la analogía con aquella del interferón. En esta tesis, hemos continuado con trabajos anteriores del grupo para optimizar un modelo de trabajo que permita abordar experimentalmente esta cuestión.

## Objetivo

Determinar con precisión el tipo, tamaño e identidad de las tRNA-h que se sobreexpresan en situaciones de estrés y poner a punto un modelo que permita estudiar su rol en la comunicación intercelular mediada por RNAs extracelulares.

### Objetivos específicos del trabajo

1. ¿Cuáles son los tRFs/tRNA-h más producidos fruto de la inducción de estrés celular?
2. ¿Cuál es la estabilidad intracelular de los tiRNAs más producidos? ¿Cómo impacta en esto el tipo celular en el que se realizan los experimentos? Estos tiRNAs, ¿se pueden empaquetar en EVs?
3. Si los tiRNAs más producidos logran empaquetarse en EVs, ¿se pueden transferir entre células? ¿Cuál es el mecanismo de captación y cuál es la cinética del proceso? ¿Cuál es la estabilidad intracelular de estos tiRNAs en células receptoras?
4. ¿Qué cambios inducen estos tiRNAs en las células receptoras? (como perspectiva hacia trabajos futuros; esta pregunta trasciende los límites específicos de esta tesis).

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo se utilizó células humanas de las líneas MCF-7 (epiteliales de adenocarcinoma de glándula mamaria) (ATCC® HT-B 22), U-2 OS (osteosarcoma de hueso) (obsequio del Dr. Pavel Ivanov; *Harvard Medical School/Brigham and Women's Hospital* en Boston, MA) y U2-OS GFP+, y U2-OS  $\Delta$ RNH1 (de la misma procedencia). Las células se cultivaron bajo atmósfera en control a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> utilizando medio DMEM con alto contenido de glucosa, GlutaMAX y piruvato de sodio (Gibco, ThermoScientific), complementado al 10% con suero fetal bovino (FBS, Gibco), de procedencia: Brasil. Las células  $\Delta$ RNH1 fueron obtenidas mediante edición genómica por CRISPR/Cas9 según se describe en Akiyama et al. 2019. Todas las líneas se cultivaron en ausencia de antibióticos, realizándose controles periódicos para descartar contaminación microbiana, incluyendo *Mycoplasma spp.* (por PCR y microscopía de fluorescencia)

Para el mantenimiento de las líneas celulares, se las dejó llegar hasta un 90% de confluencia en botellas de 75 cm<sup>3</sup> (en adelante, T75) para luego proceder a repicar. Este proceso se realizó con Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco), conteo celular para transferir un número deseado de células a una nueva botella T75 y posterior cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente (siembra: 500.000 células en el caso de U2-OS y un millón en el caso de MCF-7). Para la realización de los distintos ensayos, las células se repicaron 24 horas antes de la realización de los mismos, sembrando el número de células pertinentes para cada experimento.

Cabe recordar la importancia de realizar los ensayos de purificación de RNAs extracelulares con medio de cultivo sin complemento de suero fetal bovino, a efectos de evitar la contaminación con RNAs séricos, según fuera antes descrito (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017). Para ello, se utilizó el medio *Mammary Epitelihal Growth Medium* (MEGM, Lonza), con todos los aditivos incluidos en el kit, a excepción de los antibióticos y el extracto de glándula pituitaria bovina.

### Inducción de estrés con NaAsO<sub>2</sub>

Para realizar ensayos de inducción de estrés sobre células U-2 OS, se creció las células hasta 80% de confluencia en medio completo (DMEM + 10% FBS). Se retiró el medio condicionado y se cambió por medio fresco al que se le adicionó una disolución acuosa de arsenito de sodio (Sigma Aldrich) a 500  $\mu$ M o 2000  $\mu$ M durante dos horas. Cumplidas las dos horas, se retiró el medio condicionado y se lavó tres veces la monocapa celular

con DPBS (Gibco). En ciertos ensayos, se agregó posteriormente medio fresco sin arsenito (con o sin FBS, según el caso) y se incubó a las células por 6 horas adicionales (ensayos de evaluación de recuperación de niveles de fragmentos endógenos inducidos por estrés).

### Extracción de RNA

Se trabajó en todo momento en condiciones “RNase-free”, con reactivos y material de plástico RNase-free certificado.

Las extracciones de RNA se realizaron con TRIzol y TRIzol LS (en el caso de partir de muestras líquidas) (Life/ThermoScientific) y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, con ciertas modificaciones que se describen a continuación. Se agregó 500  $\mu$ L de TRIzol por pocillo en el caso de placas de seis pocillos, 1 mL en botellas T25 o 3 mL en botellas T75. Para extracciones de RNA de EVs, se agregó 500  $\mu$ L a la muestra, tanto para el caso de las fracciones provenientes de gradientes de densidad como para el caso de “pellets” de ultracentrifugación. El TRIzol se incubó con las muestras por cinco minutos a temperatura ambiente o se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la extracción. Se agregó 100  $\mu$ L de cloroformo (por cada 500  $\mu$ L de TRIzol) y se agitó fuertemente hasta que se generara una mezcla relativamente homogénea. Luego, se centrifugó a  $12.000 \times g$  y a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Luego, se extrajo la fase acuosa de la muestra (dejando un pequeño remanente de fase acuosa de unos 5 mm de altura medidos desde la interfase, para retirar la menor cantidad de DNA posible). Se agregó posteriormente 500  $\mu$ L de isopropanol (o 1:1 partes de isopropanol por parte de fase acuosa). Para casos donde se extrajeran cantidades pequeñas de RNA (ej: purificación de EVs o extracción de RNA intracelular partiendo de menos de un millón de células) se adicionó 0.5  $\mu$ L de glucógeno como agente coprecipitante (Glycogen Blue, RNase-free, ThermoScientific). Se agitó vigorosamente y se dejó incubar dos minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se centrifugaron bajo las mismas condiciones que en el caso anterior. Se descartó el sobrenadante y se agregó 500  $\mu$ L de etanol 80%, para luego centrifugar a  $7.500 \times g$  por cinco minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y, solamente para muestras donde el RNA fuera a utilizarse para *SL-RT-qPCR*, se reprecipitó el pellet, agregando 22  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 200  $\mu$ L de etanol frío, incubando la reacción durante 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó, se lavó el pellet con 500  $\mu$ L de etanol 80% y se volvió a centrifugar en las condiciones antes descritas. Luego, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, evitando deshidratarlo, durante un máximo de 30 minutos. La muestra se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de RNasas y se cuantificó utilizando un Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific).

Solamente en el caso de muestras que se fueran a secuenciar, durante la extracción de RNA por TRIzol se agregó 0.25  $\mu\text{L}$  de GlycoBlue Coprecipitant™ (ThermoFisher Scientific) por cada muestra al isopropanol. El pellet final se re-purificó utilizando el Kit T2030L Monarch RNA CleanUp kit (New England Biolabs, NEB), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### Tratamiento con DNasa I

Para los ensayos de RT-qPCR, el RNA extraído se trató con DNasa I recombinante de páncreas bovino, libre de RNasas (Roche). Se realizó alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  a 10 ng/ $\mu\text{L}$ , a las que se les agregó 1  $\mu\text{L}$  de DNasa I y 3  $\mu\text{L}$  del buffer de incubación 10X. Las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se inactivó la enzima por calor durante 5 minutos a 75°C previo al almacenamiento de las muestras tratadas a -20°C. Es importante señalar que este paso de tratamiento no se realizó en caso de muestras analizadas por “Northern blot” por dos razones principales: i) la técnica permite distinguir claramente si se está analizando DNA o RNA a partir de su tamaño y ii) la incubación con la enzima puede provocar una fragmentación del RNA en la muestra, interfiriendo con la interpretación de los resultados (ya que estamos interesados en el estudio de fragmentos de RNA producidos por la célula en condiciones de estrés).

### Transfección de células con oligonucleótidos

Para realizar la detección *in situ* de oligonucleótidos marcados con biotina mediante ensayos de microscopía de fluorescencia, se sembró  $5 \times 10^5$  células MCF-7 en cada pocillo de una lámina para microscopía de 10 pocillos, 24 horas previo al experimento. Posteriormente, se incubó en medio conteniendo 10% FBS a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron transfectadas directamente en el pocillo siguiendo el siguiente protocolo: se lavó cada pocillo con DPBS tres veces y luego de preparar e incubar los mixes de la Tabla 1, se incubó las células en cada pocillo con 100  $\mu\text{L}$  del mix con el RNA de interés. Pasados los 30 minutos de transfección, se lavó tres veces con DPBS y se agregó medio fresco.

En caso de que la transfección se realizara en platillos de 6, 12 o 24 pocillos, el protocolo de lavado y transfección fue el mismo, aunque aumentando los volúmenes para suplir con el volumen total del pocillo.

A continuación se presenta la formulación del volumen de transfección que se agregó: una mezcla de lípidos catiónicos (Lipofectamina 3000, ThermoFisher Scientific) y RNA siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y utilizando los volúmenes indicados en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Preparación del volumen de transfección

Volumen de transfección por reacción	
Mix 1	Mix 2
OptiMem: <u>25</u> $\mu$ L	OptiMem: <u>25</u> $\mu$ L
Lipofectamina 3000: <u>1</u> $\mu$ L	RNA (stock 100 $\mu$ M) [final/400nM]: <u>2</u> $\mu$ L
	P3000: <u>1</u> $\mu$ L

Ambos “mixes” se prepararon por separado y, posteriormente, se los incubó juntos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó a dicha mezcla 445,8  $\mu$ L de OptiMEM y los 500  $\mu$ L totales se agregaron a cada pocillo de las placas de 6 o 12 “wells”. En el caso de las transfecciones en láminas para microscopía, solamente 100  $\mu$ L del volumen total de transfección se agregó por pocillo. Se incubó las células durante 30 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Cumplido el tiempo, se lavó tres veces con DPBS a los efectos de eliminar cualquier resto de RNA que pudiera quedar como remanente en el medio extracelular. Este punto es crítico y la eliminación de dichos remanentes mediante este protocolo fue evaluada rigurosamente y validada durante la tesis de maestría de la Mag. Fabiana Gámbaro (Gámbaro, 2019). Se optimizó el número de células a plaqurear en cada condición para tener la máxima eficiencia de transfección con la menor citotoxicidad posible.

A continuación se presenta una lista de los RNAs sintéticos utilizados en este trabajo, obtenidos de IDT (*Integrated DNA Technologies*). Los oliognucleótidos en cuestión son todos de RNA (2'-OH) y presentan además un grupo 5' fosfato, salvo que se indique lo contrario. Fueron purificados por el fabricante por desalado estándar, y resuspendidos en nuestro laboratorio en agua libre de RNasas, conformando stocks a 100  $\mu$ M, los cuales se almacenaron en alícuotas a -80°C.

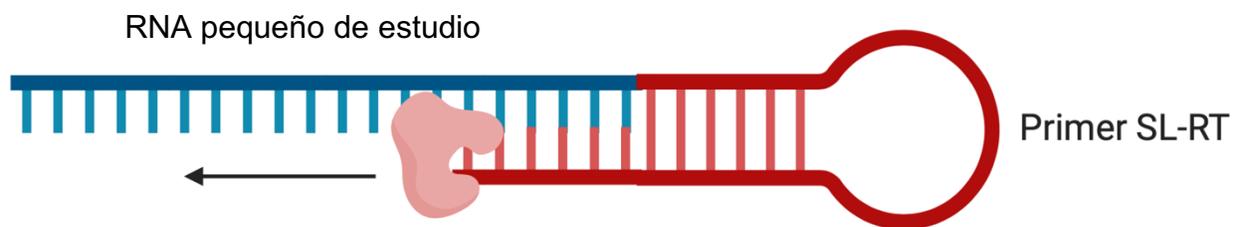
**Tabla 2:** Listado de secuencias de oligonucleótidos de RNA sintéticos utilizados para la transfección de células. Las bases subrayadas son aquellas que no concuerdan con la secuencia original. Para realizar ensayos de microscopía fluoroconfoal, se utilizaron oligonucleótidos con las mismas secuencias pero con un grupo biotina en el extremo 5'. La letra “K” corresponde a bases degenerados G, U (mezcla de ambas en parte iguales).

ID	Largo	Secuencia
5' tiRNA-GlyGCC	30	5' /P/GCAUUGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGC 3'

5' tiRNA-Gly/SCR	30	5' /P/GUAUAGGUGUGUCGGUAGUAGUAUCCUCGC 3'
5' tiRNA-GlyGCC	35	5' /P/GCAUKGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUGCC 3'
5' tiRNA-Gly/SCR	35	5' /P/GUAKAGGUGUGUCGGUAGUAGUAUCCUCGCGCUCC 3'

### Detección de RNAs pequeños mediante *SL-RT-qPCR*

Este proceso cuenta de dos pasos para la detección tanto de los miRNAs que se utilizaron como genes *housekeeping* así como a las tRNA-h sintéticos: la retrotranscripción del RNA a cDNA utilizando una transcriptasa reversa y un cebador (en adelante: *primer*) autocomplementario con estructura de bucle-horquilla (*stem-loop*, en inglés, o SL) y la cuantificación en tiempo real por PCR. Por consiguiente, el método recibe el nombre de *SL-RT-qPCR* (*stem-loop retrotranscription quantitative PCR*, por su sigla en inglés). En el primer paso, el de la retrotranscripción, se utilizó *primers* SL que se hibridaron al extremo 3' de la secuencia de RNA deseada en sus últimas seis bases y se retrotranscribieron con la transcriptasa reversa (Superscript II, ThermoScientific). Se utilizó este procedimiento para la realización de estos experimentos dado que las metodologías de RT-qPCR necesitan de un amplicón de al menos el doble del tamaño de los RNAs pequeños a medir aquí. La estabilidad del bucle del primer SL y sus 6 bases complementarias a las últimas seis bases de la secuencia de interés hacen que no le sea posible aparearse (*annealing*) al pri-miRNA o pre-miRNA presentes en la muestra. Por otro lado, si el extremo 3' está degradado no es capaz de reconocerlo y no lo retrotranscribiría (Chen et al. 2005; Kramer 2011). Del mismo modo, el método también es selectivo para fragmentos de tRNA respecto de los tRNAs precursores (Tosar et al. 2018).



**Figura 7:** Retrotranscripción de la secuencia de RNA pequeño de interés. La secuencia roja es el primer SL unido con las últimas seis bases de del extremo 3' del sRNA (azul) unidos. Transcriptasa reversa (rosado) va en dirección de la flecha.

Al obtener el cDNA como producto de la retrotranscripción, se realizó una reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) en donde el cDNA se amplificó y cuantificó

utilizando una sonda intercalante fluorescente, en este caso, SYBR Green I (incluida en el 2X SYBR Green Master Mix, Roche). En este paso se utilizó dos primers, uno directo, que es exactamente igual a la secuencia de RNA de interés, y uno reverso, que en este caso es universal entre todas las muestras ya que su región de complementariedad se ubica en la región interna de la horquilla del primer SL. Al comienzo de la qPCR, la muestra se desnaturizó a 95°C, lo que causó que la forma de bucle horquilla del SL primer se abriera y expusiera su zona de complementariedad con el primer reverso universal. SYBR Green es una molécula fluorescente que absorbe a los 497 nm y emite a los 520 nm y, al ser un agente intercalante, se coloca entre ambas hebras de ADN luego de cada ciclo de amplificación, donde se lee la intensidad de fluorescencia de la muestra. Cabe señalar que este tipo de moléculas solo fluoresce en un entorno hidrofóbico, que ocurre cuando la molécula se intercala en el ADN doble cadena, y no cuando la molécula se encuentra en fase acuosa luego de la desnaturalización térmica de los amplicones que ocurre al comienzo de cada ciclo de PCR. Por tanto, con cada ciclo, como el DNA doble hebra aumenta de manera exponencial, la intensidad de fluorescencia de cada muestra irá aumentando hasta llegar a un punto conocido como el Ct o umbral de detección. La comparación de los valores de Ct para un mismo RNA entre muestras permite una estimación de la concentración relativa del RNA, la cual se normaliza contra un transcrito de referencia cuya expresión no se ve afectada por la variable de estudio.

El protocolo de *RT-qPCR* constó de los siguientes pasos. Para el mix de retrotranscripción, con un total de 7 uL, se agregó 2 µL de muestra y el primer SL respectivo, previamente plegado mediante un gradiente térmico decreciente<sup>1</sup>, a concentración final de 10 nM (a partir de un *stock* 200 nM). También se adicionaron 18 unidades de la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen), 1X First Strand Buffer, 0,01 M DTT (Invitrogen), dNTPs 10 mM (concentración final 1.1 mM) y 4 unidades de inhibidor de Ribonucleasas (murine RNase inhibitor, NEB).

**Tabla 3:** Listado de cebadores SL utilizados para la retrotranscripción de secuencias de RNAs pequeños mediante el procedimiento SL-RT-qPCR. En rojo: últimas 6 bases, complementarias a las últimas 6 bases del RNA a estudiar. En azul: región de anclaje del primer reverso universal.

ID	Secuencia
SL_Gly_30	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC GCGAGA 3'
SL_SCR_30	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC GCGAGG 3'

<sup>1</sup> Oligo a 100 uM. Ciclado: 10' 95C, 15' 75C, 15' 68C, 15' 65C, 15' 62C, 30' 60C

SL_Gly_34	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC GCAGGC 3'
SL_Gly_35	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC GGCAGG 3'
SL_SCR_35	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC GGAGGC 3'
SL_miR-21-5p	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC GTCAAC 3'

El termociclado de retrotranscripción contó con una etapa inicial de 16°C por 30 minutos (*annealing*), un paso siguiente de 42°C por 30 minutos (extensión) y un paso final de 85°C por cinco minutos (inactivación térmica de la enzima), realizado en un termociclador Veriti de 96 pocillos (AppliedBiosystems).

Para la PCR cuantitativa, se agregó 2 µL de cDNA por pocillo de reacción a una mezcla de (6 µL) del 2X SYBR Green (Roche), un *primer* reverso (0.6 µL) a concentración 14 µM y uno directo (0.6 µL) a concentración 30 µM y agua suficiente para un volumen final de 12 uL. El *primer* directo comprende parte de la secuencia 5' del RNA pequeño.

**Tabla 4:** Cebadores directos y reversos para las SL-RT-qPCR con RNAs pequeños. FWD: cebador directo. Rev\_univ: cebador reverso universal. Las bases en minúscula denotan bases agregadas para aumentar la Tm.

ID	Secuencia
miR-21-5p_FWD	5' gccccgTAGCTTATCAGACTGATGT 3'
Gly_FWD	5' CCGCATTGGTTCAGTGGT 3'
SCR_FWD	5' GGGTATAGGTGTGTCGGTAGTA 3'
Rev_univ	5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3'

El termociclado de cuantificación contó con una etapa inicial de activación de la polimerasa y desnaturalización de 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos compuestos por: 15 segundos a 95°C seguidos de un minuto a 60°C (*annealing* y extensión simultánea), con final de rampa de *melting* para evaluar la formación de amplicons únicos de Tm acorde a lo esperado.

#### Purificación de vesículas extracelulares de células transfectadas

Al finalizar el ensayo de transfección de células con las secuencias de RNAs pequeños de interés, se lavó tres veces con DPBS y se incubó seis horas en 500 µL de medio

definido comercial libre de suero, MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium, Lonza, CC-3150; sin la adición de los antibióticos ni del extracto de glándula pituitaria bovina incluido en dicho kit). Posteriormente, se recolectó el medio y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  luego de centrifugarlo a  $300 \times g$  y luego a  $2,000 \times g$  para eliminar células y detritos celulares, respectivamente. Una vez descongelado, se volvió a centrifugar a  $2,000 \times g$  y se procedió con el protocolo de purificación de vesículas extracelulares mediante ultracentrifugación o mediante separación por gradiente de iodixanol.

#### Purificación de vesículas extracelulares por ultracentrifugación

Luego de coleccionar las EVs producidas por las células transfectadas durante el período de incubación de seis horas post transfección (ver arriba), se centrifugó la muestra a  $2,000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para descartar los agregados de células muertas, ApoEVs y demás complejos pesados de proteínas, como se indicó antes. Se agregó DPBS al sobrenadante, para dar un volumen final de 10 mL, el cual se colocó en un tubo de ultracentrífuga Ultra-Clear de 14 mL (Beckman Coulter). Luego de homogeneizar y equilibrar debidamente los tubos en sus respectivas camisas, las muestras se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por 2,5 horas a  $100,000 \times g$ , utilizando un rotor SW 40 Ti (Beckman Coulter) en una ultracentrífuga Optima XPN (Beckman Coulter), siguiendo buenas prácticas en el manejo de este tipo de equipos. El sobrenadante se descartó y el pellet (generalmente invisible) se resuspendió en  $300 \mu\text{L}$  de MEGM y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Microscopía confocal de fluorescencia para evaluar la captación de RNAs biotinilados

Ya sea que se trate de células donadoras de EVs transfectadas con RNAs sintéticos biotinilados (en adelante: “células donadoras”) o de células incubadas con dichas EVs (en adelante: células “ceptoras”), se removió el medio de cada pocillo, se lavó tres veces con DPBS y se fijó con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 minutos. Luego, las muestras se lavaron una vez con DPBS y se permeabilizaron con Tween20-PBS al 0.03% dos veces durante tres minutos. Posteriormente, se bloquearon con PBS-BSA 5% durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego se lavaron tres veces más con PBS. Las muestras se incubaron luego durante 30 minutos en oscuridad con una disolución conformada por:  $496 \mu\text{L}$  de PBS-BSA 5%,  $3 \mu\text{L}$  de DAPI (a partir de un *stock* a  $300 \mu\text{M}$ ; Santa Cruz Biotech) y  $1 \mu\text{L}$  estreptavidina conjugada a APC (diluciones: 3:500 DAPI y 1:500 S-APC). A continuación se realizaron tres lavados adicionales con PBS y se aplicó Prolong Gold Antifade Reagent (ThermoFisher Scientific), dejando secar por 24 horas a temperatura ambiente. Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio fluoroconfocal Zeiss (LSM 880) con el objetivo 63X de inmersión en aceite. Todos los parámetros de adquisición fueron iguales entre todas las muestras procesadas en un mismo día, y solo

se compararon directamente imágenes obtenidas de esta forma. Las imágenes se analizaron utilizando el programa ImageJ y se les aplicó un filtro gaussiano de una unidad para luego ajustar el contraste y brillo del canal APC (siempre aplicando los mismos parámetros a todas las muestras).

#### Separación de fracciones mediante gradiente de iodixanol (OptiPrep™)

Se incubó células U-2 OS WT y  $\Delta$ RNH1 en botellas T150 hasta alcanzar un 90% de confluencia en medio completo con suero fetal bovino 10%. Se incubó células por 24 horas adicionales en medio fresco al llegar a dicha confluencia. Se recolectó el medio y se centrifugó a 300 x g durante 20 minutos y a 4°C y luego el sobrenadante se centrifugó a 2.000 x g durante 20 minutos adicionales, también a 4°C. Luego el sobrenadante se concentró por ultrafiltración utilizando filtros Vivaspín de 10 kDa de “cut-off”, a 1800 x g durante una hora y a 4°C.

Se formó un gradiente de iodixanol con cinco fracciones de concentración distinta (y, por ende, densidades diferentes): 36, 30, 24, 18 y 12% de iodixanol (*stock*: 60% w/v, Sigma), utilizando PBS como diluyente. La fracción 36% se preparó agregando 1 mL de muestra concentrada y 1,44 mL de iodixanol stock (a 60%). El resto de fracciones se prepararon de la siguiente manera:

**Tabla 5:** Preparación del gradiente de iodixanol

% iodixanol	Volumen stock (mL 60% iod.)	Volumen PBS (mL)
30	1,5	1,5
24	1,2	1,8
18	0,9	2,1
12	0,6	2,4

Se sembró primero la muestra (fracción al 36%) y el resto de fracciones se cargaron en orden de mayor a menor densidad, utilizando un volumen de 2,4 mL de cada fracción por tubo. Las fracciones se cargaron con gran delicadeza, evitando que se mezclaran entre sí, de modo tal de formar un gradiente discontinuo, donde la muestra se incubó en la parte inferior. Formado el gradiente discontinuo, se centrifugó durante 16 horas a 150.000 x g a 4°C, utilizando el rotor SW 40 Ti, con aceleración máxima y desaceleración 8/10 (siendo 10 el mínimo). Posteriormente, se separó el gradiente colectando 12 fracciones de 1 mL, desde la parte superior (la superior nombrada “1” y la inferior “12”).

## Electroforesis desnaturalizante y Northern blot

El Northern blot es una técnica que se utiliza para detectar RNAs en una muestra, luego de separarlos por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, y revelando con una sonda de secuencia complementaria marcada. Es frecuente que dicha sonda esté marcada con fósforo radiactivo (lo que confiere la mayor sensibilidad), pero aquí utilizamos sondas marcadas con digoxigenina (DIG) y revelamos con un anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina.

Para la realización de este ensayo, primero es necesario migrar muestras conteniendo RNA purificado a través de un gel desnaturalizante (urea 7M, Sigma) de poliacrilamida al 10%. Para preparar dicho gel, se utilizó 1 mL de TBE 10X (tampón Tris-Borato-EDTA, Applied Biosystems; concentración final: 0,5X), 6,65 mL de una disolución 29:1 de Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, 8,4 g de urea y agua ultrapura hasta completar 20 mL. Se agregó persulfato de amonio al 1% (200 µL de un *stock* al 10% preparado en agua RNase-free) y TEMED 0.1% (20 µL) y se dejó polimerizar.

Las muestras se prepararon de manera tal que se cargara 1 µg total de RNA (en caso de que la muestra provinieran de RNA intracelular) o el total de RNA contenido en cada fracción (cuando se analizaron las fracciones derivadas de los gradientes de densidad) en 2X RNA Loading Dye (NEB) (volumen total de carga: 8 µL). Las muestras se precalentaron a 65°C durante 5 minutos para que el RNA adquiriera una estructura lineal y migrara de esa manera dentro del gel. El RNA se dejó migrar durante 80 minutos a 160 V en TBE 0,5X. Luego, el gel se incubó en SYBR Gold (ThermoScientific; dilución: 1:10.000 en TBE 0,5X) durante 10 minutos en oscuridad. Se evaluó la corrida en un transiluminador a 405 nm. Posteriormente, se transfirió (por transferencia en condiciones semi-secas utilizando el sistema Trans-Blot Turbo, BioRad) el RNA hacia una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) a 0,3 A durante 30 minutos y se realizó un *crosslinking* por radiación ultravioleta (120.000 µJ/cm<sup>2</sup>) utilizando un entrecruzador UV Appligene Oncor.

Se incubó la membrana en 5 mL de *buffer* de hibridación Dig Easy Hyb (Roche) durante 30 minutos en horno de incubación giratorio a 42°C. Luego se agregó 1 µL de sonda de DNA marcada con DIG y precalentada a 90°C durante dos minutos, y se dejó hibridar toda la noche (16 hs) a 42°C con rotación continua. Las sondas se marcaron previamente con el kit Dig Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante. El kit utiliza la enzima transferasa terminal para agregar largas colas de dATP y dUTP-DIG al extremo 3' de oligonucleótidos de ADN.

**Tabla 6:** Listado de las secuencias de las sondas utilizadas. En todos los casos se partió de oligonucleótidos de ADN adquiridos a través de IDT.

ID	Secuencia
tRNA-Gly 5' GCC	5' CTACCACTGAACCACCCATGC 3'
tRNA-Ala 5'	5' GCACGCGCTCTACCACTGAGCTACA 3'
tRNA-Glu 5'	TAACCACTAGACCACCAG
tRNA-iMet '5 CAU	5' CTTCCGCTGCGCCACTCTGCT 3'
3' rRNA-5.8S	5' AAGCGACGCTCAGACAGGCGTA 3'
5' rRNA-28S	CACGTCTGATCTGAGGTCGC

Luego de la hibridación, se lavó 2 veces con 2X SSC Buffer (buffer salino de citrato de sodio) (ThermoFisher, stock: 20X) conteniendo 0,1% SDS y luego una vez con 1X SSC + 0,1% SDS precalentado a 42°C a los efectos de aumentar la estringencia de los lavados (a menor fuerza iónica y mayor temperatura, mayor estringencia). Se bloqueó en 10 mL de solución de bloqueo 1X (Dig Easy and Block Buffer Set de Roche) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 1 µL (dilución: 1:10.000) de anticuerpo anti-DIG (antidigoxigenina) marcado con fosfatasa alcalina (Roche) a la disolución anterior y se incubó durante 30 minutos adicionales. Luego se lavó dos veces con *buffer* de lavado conteniendo ácido málico y 0,3% Tween-20 durante cinco minutos (Dig Easy and Block Buffer Set de Roche) y se dejó incubar durante tres minutos en *buffer* de detección (Dig Easy and Block Buffer Set de Sigma Aldrich) a los efectos de aumentar el pH para que la fosfatasa alcalina funcione. Se agregó a continuación el sustrato de la enzima (CDP-Star ready-to-use, Roche), se incubó por 5 minutos, y se midió por quimioluminiscencia en un fotodocumentador ImageQuant 800 (GE/Cytiva).

Para rehibridar las membranas, se realizó previamente una limpieza de las sondas ("*stripping*") mediante dos lavados de 15 minutos cada uno a 80°C en 0,1X SSC + 0,5% SDS. El orden de agregado de las sondas post-*stripping* se realizó de modo tal de poder validar la eficiencia del *stripping* en cada ensayo (es decir, se evitó rehibridar con sondas que darían una banda esperada del mismo tamaño que la observada en el ensayo inmediatamente anterior).

### Experimentos de microarreglo

Se incubó células receptoras MCF-7 con EVs provenientes de células transfectadas con 1 µM Gly de 30 nucleótidos sintético o con SCR, en una razón 10:1 (total de EVs liberadas por 10 células donadoras por cada célula receptora). Las EVs se incubaron en MEGM en placas de seis pocillos durante dos horas a 37°C. Las células donadoras MCF-7 se

sembraron con 24 horas de anterioridad. Como control se agregó medio MEGM a un pocillo vacío (sin células) y se agregó la fracción que correspondería a las EVs (siguiendo el mismo protocolo de purificación) a un número equivalente de células receptoras. El objetivo de este control fue exponer a las células a posibles contaminantes incorporados durante el proceso de purificación de las EVs, a excepción de las EVs propiamente dichas.

Luego de la purificación de EVs, se incubó las células receptoras con el medio MEGM conteniendo las EVs purificadas durante 4 horas, se lavó las células tres veces con PBS y se realizó una extracción de RNA con TRIzol. El RNA purificado se reprecipitó durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  en etanol y 0.3 M acetato de sodio pH = 5 con glucógeno libre de RNasas para remover trazas de fenol y otros contaminantes. Luego se resuspendió en agua libre de RNasas. Se evaluó la pureza del el RNA extraído y su concentración por espectrofotómetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific) y por Bioanalyzer Agilent 2100.

El análisis de microarreglo se realizó utilizando Human Gene Expression 4x44K v2 Microarray de Agilent (Design ID 026652) con un diseño a un color. Se retrotranscribió 150 ng de RNA total a cDNA y luego de transcribió a cRNA y marcó con Cy5 utilizando el Kit Low Input Quick Amp de marcado de Agilent Technologies. El cRNA se purificó con Illustra RNAspin Mini Isolation Kit de GE Healthcare (EE.UU.). La calidad de cada muestra de cRNA se verificó por mediciones con espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La hibridación, lavado y escaneo se hicieron de acuerdo con los protocolos del fabricante (Agilent). Las láminas se escanearon con un escáner para microarreglos de Agilent (G2505C). Se utilizó Feature Extraction Software (versión 9.5.1) para extraer la información, realizar controles de calidad de las muestras, filtrado y normalización. Se realizó tres réplicas para cada muestra. El análisis de expresión diferencial se hizo mediante R con paquete Agi4x44PreProcess. Los genes *up* y *downregulados* se identificaron con un test t en base a un p valor ajustado (Benjamini-Hochberg) menor de 0.01 mediante el paquete Limma de R. El análisis de los datos de este experimento fue realizado por Gonzalo Greiff de la Unidad de Biología Molecular del IPMon, quién también prestó asistencia técnica para la realización del ensayo.

### Experimentos de RNA-seq

Se realizaron dos experimentos de secuenciación de RNAs poliadenilados en células MCF-7 receptoras expuestas a: a) EVs provenientes de células transfectadas con: i) mitades de tRNA de glicina de 35 nt (400 nM), ii) sus respectivos controles de secuencia (SCR 35), iii) solo expuestas a lipofectamina; o b) RNAs sintéticos (mitades de tRNA de glicina de 30 nt, sus respectivos controles de secuencia, o buffer) depositados en medio de cultivo MEGM libre de suero a concentración final 400 nM. Cada condición se realizó por triplicado, sumando un total de  $3 \times 3 \times 2 = 18$  muestras. Los detalles experimentales se presentan en la sección de resultados correspondientes.

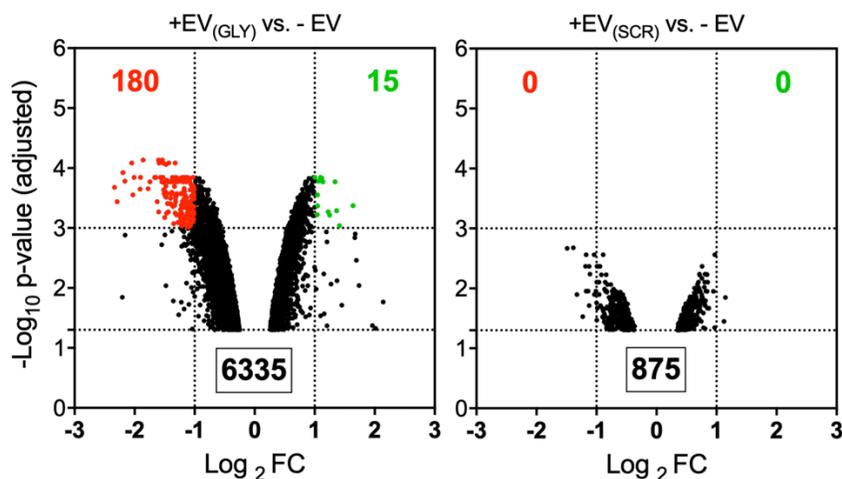
El RNA se extrajo luego de un tiempo de incubación de seis horas en cada experimento, se evaluó su concentración y calidad en nuestro laboratorio, y las muestras se enviaron a Macrogen (Corea del Sur), donde se secuenciaron *paired end* (largo de reads = 151 nt) utilizando un kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) en una plataforma NovaSeq 6000 (Illumina). Una de las muestras (NT, réplica 1, experimento de captación espontánea) no pasó los criterios de calidad de la empresa, por lo que el número total de muestras efectivamente secuenciadas fue 17.

## Resultados

### Capítulo 0: preludeo

#### Cambios transcriptómicos inducidos por Gly y SCR de 30 nucleótidos

En nuestro laboratorio, hasta ya comenzados mis estudios de maestría, se trabajó (en materia de comunicación intercelular) con RNAs sintéticos de 30 nucleótidos: Gly y SCR. Parte de la tesis de la Mag. Fabiana Gámbaro se enfocó en demostrar la transferencia entre células de estas moléculas. Durante la transición de proyectos, entre la finalización de sus estudios de maestría y mi comienzo en el laboratorio, se realizó estudios transcriptómicos de células incubadas con EVs provenientes de células transfectadas con Gly o SCR de 30 nucleótidos. A modo de resumen, se transfectaron concentraciones iguales de Gly y SCR en células MCF-7, colectando las EVs liberadas al medio de cultivo durante un período de 6 horas, e incubando las EVs purificadas con células MCF-7 aceptoras, a razón de 10:1 (el número de células donadoras de las que se purificaron las EVs fue 10 veces superior al número de células donadoras). Luego de dos horas de incubación con las EVs, se extrajo el RNA proveniente de tres tratamientos diferentes: células no expuestas a EVs, células expuestas a EVs provenientes de células transfectadas con Gly y células expuestas a EVs provenientes de células transfectadas con SCR. El estudio transcriptómico se realizó mediante un ensayo de microarreglos de ADN (Agilent Whole Human Genome 4x44K), cuyos resultados principales se presentan a continuación (figura 8).



**Figura 8:** Bioactividad del RNA que llega a células aceptoras en EVs provenientes de células transfectadas con Gly y SCR de 30 nucleótidos. Las gráficas representan genes afectados significativamente ( $p$ -valor ajustado  $< 0.001$ , Benjamini-Hochberg) y con una tasa de cambio mayor a dos veces (rojo: hacia abajo; verde: hacia arriba) por Gly o SCR contra células no tratadas (no expuestas a EVs exógenas). Extraído de Gámbaro y Li Calzi et al. 2020.

Se afectaron cerca de 200 genes diferentes fruto de la llegada de EVs a las células receptoras, cuando estas EVs provenían de células previamente transfectadas con Gly de 30 nucleótidos ( $p$  valor ajustado  $< 0.001$ ) y en la figura 8, estos genes están representados con color rojo y verde en el panel de la izquierda. Es interesante que cuando se incubó células con EVs provenientes de células transfectadas con SCR no se detectaron cambios a nivel de la expresión génica a ese nivel de significancia estadística. En el caso de Gly, la mayoría de los genes afectados se vieron *downregulados*, lo que sugeriría que hubo respuestas tempranas en el marco de la estabilidad de los mRNAs. No es posible saber, en base a estos resultados, si efectivamente Gly está interactuando directamente con estos genes, pero sí es posible afirmar que Gly ejerce cierta presión sobre la célula que se ve reflejada a nivel transcriptómico. Sumado a otra serie de evidencias experimentales (Gámbaro, 2020), estos resultados nos permitieron afirmar que las mitades de tRNA-Gly (sintéticas) no solo pueden transferirse entre células mediante EVs, sino que, además, presentan bioactividad en las células receptoras.

De cualquier manera, se nos presentó una problemática clara, dada la naturaleza de la molécula que se produce en mayor cantidad fruto de la inducción de estrés. Evidencias posteriores de nuestro grupo (ver capítulos siguientes), así como de otros grupos colaboradores, mostraron que los 5' tRNA-GlyGCC más abundantes fruto de la inducción de estrés oxidativo son los de 34 o 35 nucleótidos, no los de 30, aunque por Northern blot la banda de 30 nucleótidos se observa también, pero con mucho menor intensidad. Por tanto, el microarreglo y el análisis de expresión diferencial se realizó utilizando un RNA sintético diferente de aquel que se produce en mayores cantidades frente a una inducción de estrés, que es en definitiva aquello que se desea investigar.

La siguiente problemática que se desprende de los datos de microarreglos y de la naturaleza de los RNAs sintéticos que se utilizaron para realizar el análisis de expresión diferencial consiste en la naturaleza del control de Gly: SCR. Por un lado, se sabe que Gly de 30 nucleótidos tiene la capacidad de formar dímeros (Tosar et al. 2018) que son considerablemente resistentes a la acción de las ribonucleasas, en comparación con su RNA control, SCR. Por tanto, las EVs provenientes de células donadoras transfectadas con Gly e incubadas con células receptoras contendrían una cantidad de Gly de 30 nucleótidos mucho mayor que el SCR que pudiese haber dentro de EVs provenientes de células transfectadas con SCR, ya que SCR no forma dímeros ni es igualmente resistente a la acción de las ribonucleasas. Por tanto, en vez de estar midiendo los cambios transcriptómicos inducidos por la secuencia nucleotídica específica de Gly, en realidad estaríamos midiendo efectos inducidos por la presencia de RNAs sintéticos presentes en gran abundancia dentro de las EVs, ya que careceríamos de un control conteniendo la misma cantidad de RNAs, solo que de secuencia diferente. Esta era la idea detrás de la inclusión de SCR en nuestro diseño experimental, pero la gran

diferencia de estabilidad entre Gly y SCR no nos permite sacar conclusiones categóricas al respecto.

Por tanto, con estas problemáticas en mente, hubo que demostrar qué molécula efectivamente se produce frente a la inducción de estrés celular y, a partir de eso, generar un control de eficiencia que permitiera, ulteriormente, poder comparar los cambios transcriptómicos obtenidos del análisis de expresión diferencial de un ensayo donde a las células les lleguen EVs con concentraciones de Gly y SCR similares. De esta forma, podríamos contribuir a contestar si las mitades de tRNA inducidas por estrés (5' tiRNAs) son moléculas capaces de liberarse al medio extracelular y de transferirse a otras células, induciendo en las mismas una respuesta adaptativa, como ya fue explicado en la introducción.

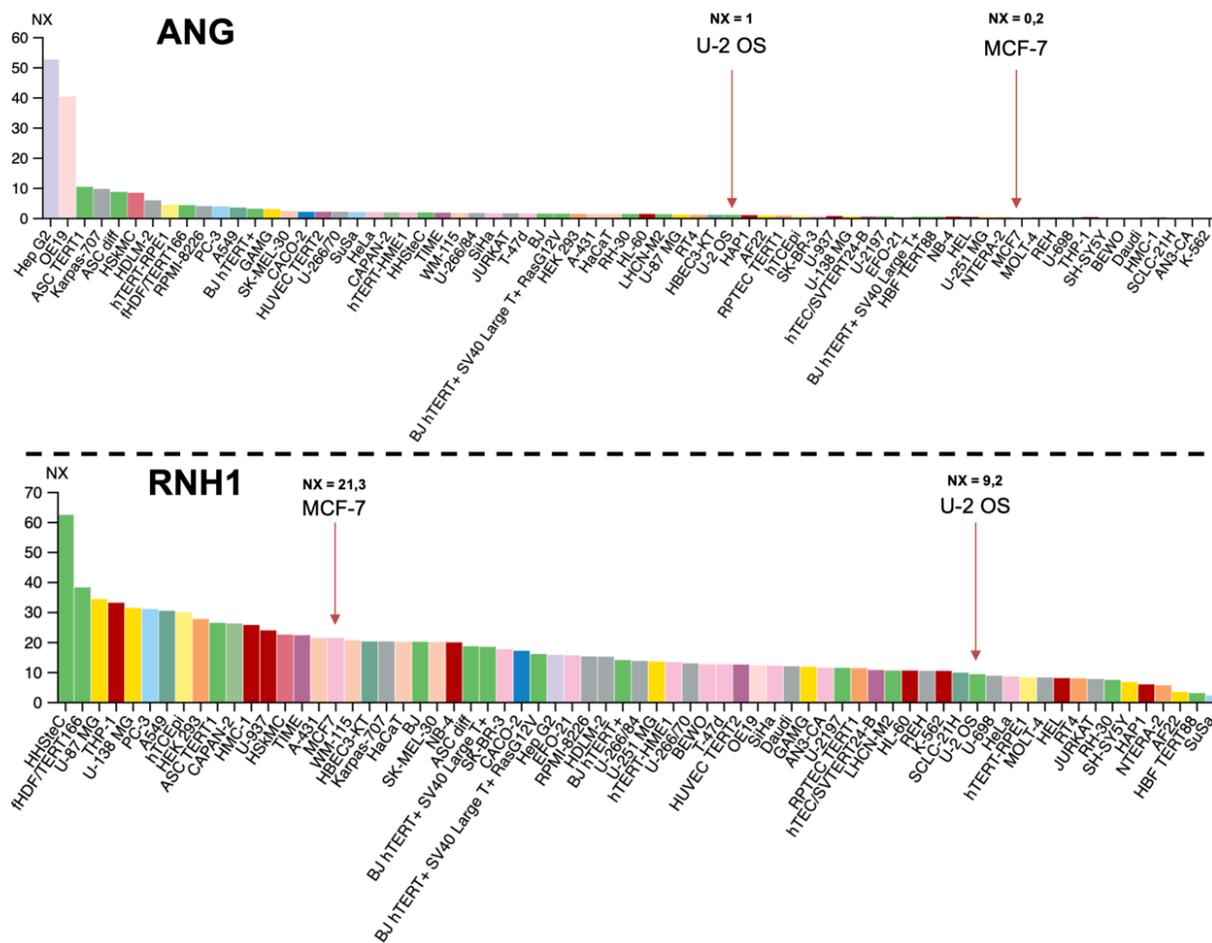
## Capítulo 1: estrés celular

### U-2 OS como modelo celular para estudiar el efecto del estrés oxidativo y la inducción de tiRNAs.

Hasta el momento, en todos los trabajos previos de nuestro laboratorio se venía trabajando principalmente con la línea celular MCF-7, una línea celular aislada de una paciente humana con cáncer de mama en 1970. Por tanto, se optó por realizar este trabajo en dicha línea celular, ya que además de estar muy bien caracterizada en la literatura, se contaba con varias herramientas experimentales ya puestas a punto en este modelo celular. Además, contábamos también con la línea celular U-2 OS, una línea celular aislada en 1964 de osteosarcoma de hueso de una paciente de 15 años. La particularidad de esta línea es que también contábamos con *knock-outs* para el inhibidor de las RNAsas de la familia A, RNH1, así como para RNasa 5 (ANG), construidos sobre el *background* genético de esta línea celular. Además, U-2 OS es una línea celular ampliamente utilizada en ensayos de inducción de estrés a lo largo de la literatura científica y por varios grupos de investigación independientes.

Para conocer mejor nuestro sistema de trabajo, se comenzó por hacer una búsqueda en la literatura de la actividad ribonucleasa endógena de dichas líneas celulares. Para esto se realizó una búsqueda en The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) con el fin de encontrar cuál de las dos líneas expresa mayores niveles de dos de las proteínas claves para la generación de mitades de tRNA inducidas por estrés: ANG y su inhibidor, RNH1 (figura 9).

La expresión normalizada (NX) de RNasa 5 en U-2 OS tiene un valor de 0.7, mientras que el NX para MCF-7 es de 0.0. Por tanto, mediante esta rápida búsqueda se constató que, para estudiar la fragmentación de tRNAs mediante inducción de estrés, lo más indicado sería utilizar la línea U-2 OS ya que parecería expresar ANG en mayores niveles. Además, U-2 OS posee una expresión menor de RNH1, el inhibidor de ANG (figura 9), y una mayor expresión de otras enzimas involucradas en el metabolismo del RNA (XRN1, RNase 1, etc). Esta línea celular es fácil de crecer, con características similares a las células 293T, y el hecho de que posean una actividad ribonucleasa más alta que MCF-7 facilita el trabajo durante el momento de desacoplar a la proteína ANG de su inhibidor, RNH1, mediante la adición de agentes inductores de estrés.



**Figura 9:** Comparativa de expresión de RNasa 5 (ANG) y de RNH1 en diversas líneas celulares, incluyendo U-2 OS y MCF-7. NX: expresión de mRNA normalizada (TMM, (Robinson and Oshlack 2010)). Adaptado de: The Human Protein Atlas.

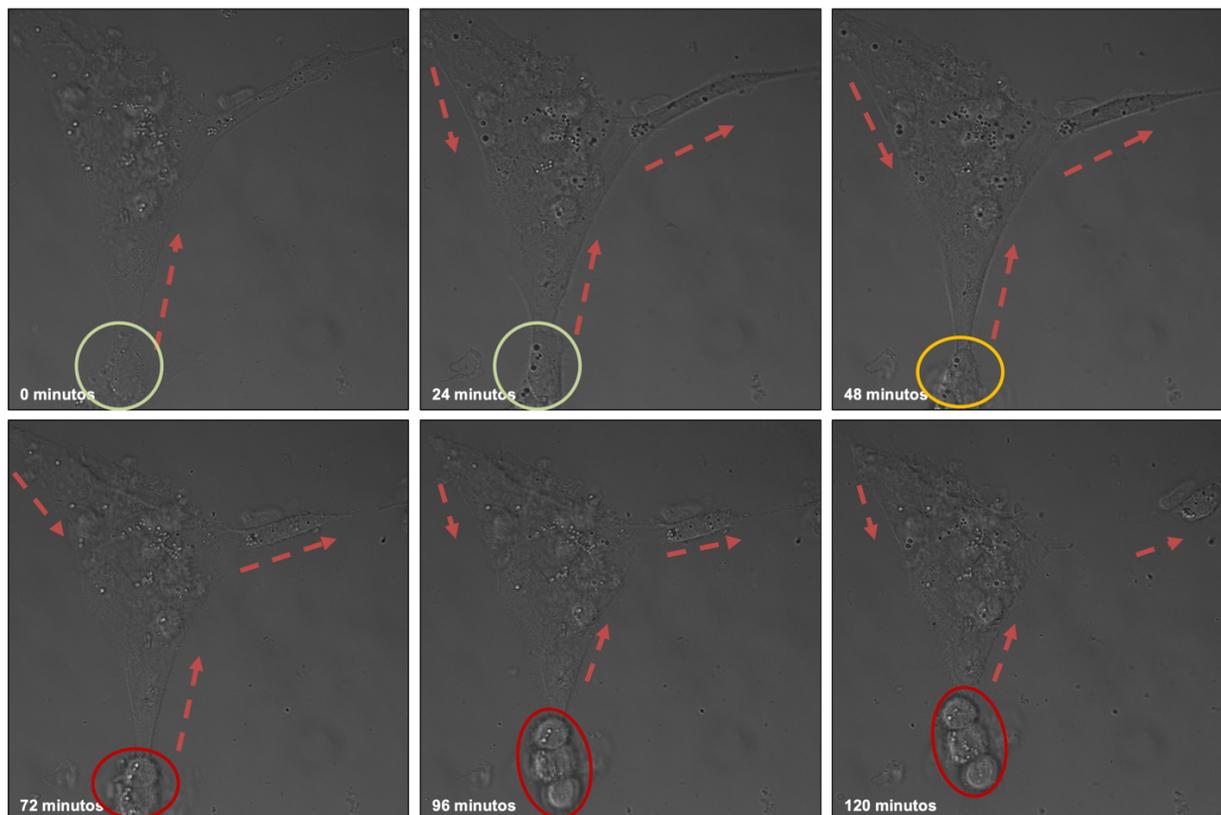
La importancia ulterior de haber realizado este análisis inicial fue clave para la interpretación de los resultados, como se verá en los capítulos posteriores. Una actividad RNasa 5 más potente (tal como parecería ser el caso en U2-OS) es ventajosa para el estudio de los fragmentos de tRNA inducibles por estrés, pero es una desventaja para estudiar la captación de RNAs sintéticos, su empaquetamiento en EVs y su transferencia a otras células, ya que la rápida degradación del RNA atenta contra estos procesos.

### Determinación del sistema de inducción de estrés celular en U-2 OS

#### Evaluación de NaAsO<sub>2</sub> (ARS) como modelo de inducción de estrés

En primer lugar, se expuso células U-2 OS a NaAsO<sub>2</sub> (en adelante, ARS) a 2000  $\mu$ M durante 2 horas en medio conteniendo suero para poder visualizar los cambios celulares fruto de la utilización de arsenito a altas concentraciones. En la figura 10 se muestra

instantáneas extraídas de un video donde se pueden apreciar cambios notorios fruto del tratamiento con arsenito de sodio.



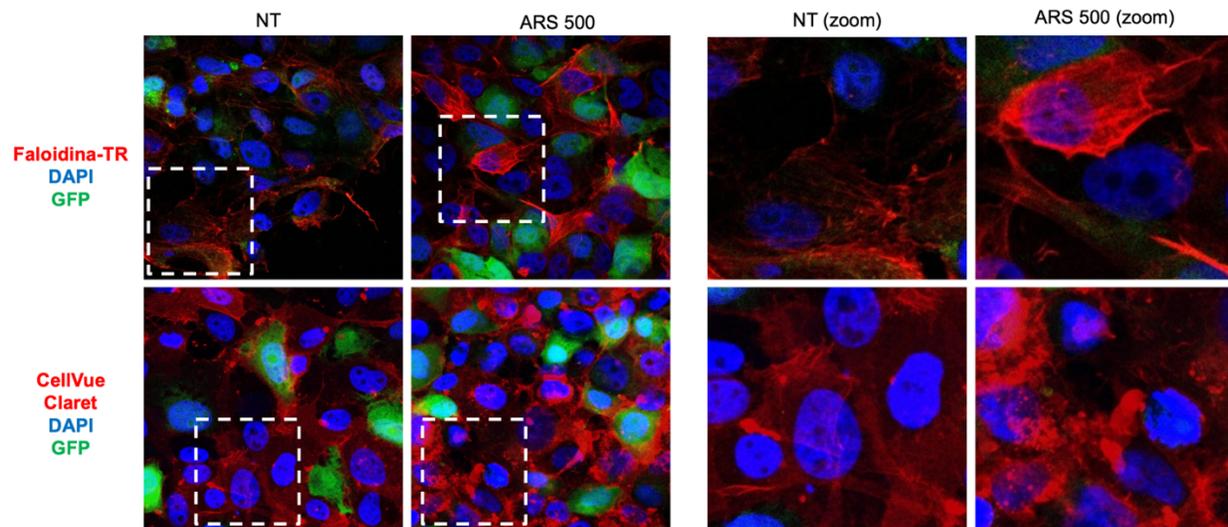
**Figura 10:** Comportamiento celular luego de la inducción de estrés con  $\text{NaAsO}_2$  a  $2000 \mu\text{M}$  durante 2 horas en células U-2 OS. Los cuadros son progresivos en intervalos de 24 minutos desde el tiempo inicial hasta el tiempo final. En verde se señalan células en estado morfológicamente normal que progresivamente comenzaron a notarse deterioradas por la acción del  $\text{NaAsO}_2$  (el círculo rojo pasa a naranja y luego a rojo). A su vez, se notó retracción celular indicada con flechas punteadas, donde pareció notarse una contracción en las proyecciones de las células.

Lo que se pudo observar entre los diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96 y 120 minutos) es que las células comenzaron un proceso de muerte celular o comenzaron a retraer diferentes prolongaciones, como si se estuvieran despegando de la placa. Además, se pudo observar que el movimiento intracelular de diferentes corpúsculos y organelos se detuvo por completo (el largo de las barras rojas es proporcional al dinamismo de los mismos). Por tanto, con todo esto en mente y conociendo que el ARS también condiciona la situación macroscópica de la célula y su integridad citoplasmática y membranal, nos vimos condicionados a buscar un modelo menos agresivo de inducción de estrés. Se constató que, en la literatura, grupos referentes tales como el de Zoya Ignatova en Alemania utilizan protocolos con concentraciones menores de ARS y en pulsos de más corta duración (ejemplo:  $500 \mu\text{M}$ , 1-2 horas) (Czech et al. 2013). Por tanto, se realizó

ensayos en marcos comparables a aquellos que se utilizaron en su laboratorio, reevaluando la viabilidad y morfología celular luego de estos tratamientos.

### Optimización del modelo de estrés celular por tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> 500 µM

Se observó, mediante técnicas de microscopía confocal, el comportamiento celular a nivel del citoesqueleto de actina y de la membrana celular utilizando células U-2 OS GFP+ sometidas o no a ARS (500 µM) durante un período de 2 horas, como se visualiza en la figura 11.



**Figura 11:** Microscopía confocal de fluorescencia de células U-2 OS GFP+ expuestas a ARS 500 µM durante 2 horas. Como control negativo (NT) se utilizaron células a las que no se les indujo estrés. Paneles superiores: se marcaron los núcleos con DAPI (azul), y el citoesqueleto de actina con faloidina conjugada a Texas Red (rojo). Las células GFP+ se muestran en verde. Paneles inferiores: ídem, pero en lugar de la tinción con faloidina se tiñeron las membranas con CellVue Claret (rojo). Nótese que solo algunas de las células expresaron GFP a niveles lo suficientemente elevados como para visualizarse aquí. Los cuatro paneles de la derecha son una representación aumentada de los cuadrados a rayas blancas.

Al comparar las células control con las células expuestas a ARS, se pudo apreciar que en las células donde la marca roja reveló la membrana plasmática (paneles inferiores), hubo claras señales de daño celular y de protrusiones que podrían corresponder a vesículas apoptóticas o ApoEVs. Esto parecería estar indicando que, más que una inducción de estrés reversible, el tratamiento realizado desencadenó procesos irreversibles de muerte celular. El citoesqueleto de actina de las células tratadas parecería verse más fibroso, que no se observan en las células no tratadas, lo que enfatiza los efectos pleiotrópicos fruto del tratamiento con ARS.

Estos datos sugieren que el tratamiento de las células con ARS estaría generando daños a nivel general que se ven reflejados a nivel de la integridad de la célula, aunque se

tendrían que realizar estudios adicionales para poder cuantificar un aumento en el porcentaje de células apoptóticas. El arsenito de sodio podría estar generando cambios pleiotrópicos que afectaran el comportamiento celular a una variedad de niveles. Conscientes de estos efectos, proseguimos de todos modos a evaluar si, en nuestras manos, el tratamiento con ARS también genera una inducción de mitades de tRNA específicas, tal como ha sido ampliamente reportado en la literatura científica (Czech et al. 2013). Y en caso afirmativo, a evaluar cuáles son las mitades de tRNA que presentan una mayor inducción en modelos de estrés inducidos por ARS.

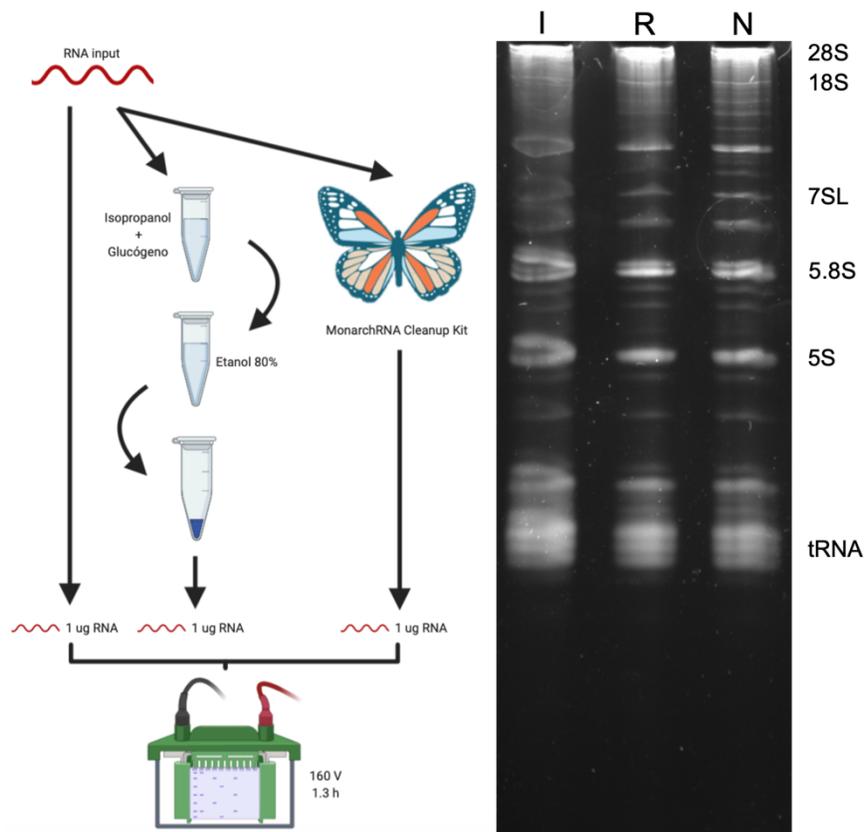
### Evaluación de los perfiles 5' tRNA-h-GlyGCC intracelulares

Se sabe que algunos de los fragmentos de tRNA más encontrados en el ambiente extracelular son aquellos de glicina, como se explicó previamente (Tosar et al. 2015). Con esa información en mano, se decidió realizar mediciones en los perfiles intracelulares de fragmentos 5' de tRNA de glicina (GCC) (de ahora en más 5' tRNA-h-GlyGCC) de 30, 34 y 35 nucleótidos. Los fragmentos de 34 y 35 nucleótidos son las mitades de tRNA propiamente dichas, dado que el corte por ANG en el anticodón se genera entre esos nucleótidos (Fu et al. 2009; Yamasaki et al. 2009; Ivanov et al. 2011). Por otra parte, los fragmentos de 30 nucleótidos son los fragmentos con los que nuestro grupo ha venido trabajando a través de los años, dada su capacidad de ser altamente estables, y por ende muy abundantes en el medio extracelular (Tosar et al. 2018; Gámbaro et al. 2019; Tosar et al. 2020). En una primer instancia, consideramos utilizar el método de *SL-RT-qPCR* para la evaluación de estos fragmentos, ya que dicho método ha sido utilizado en los trabajos anteriores de nuestro grupo.

### Optimización del método de extracción de RNA

Para poder evaluar los niveles de las 5' tRNA-h-GlyGCC se tuvo que, con anterioridad, decidir qué método de extracción de RNA era el más indicado para obtener el mayor rendimiento de RNA con la menor degradación *in vitro* posible. Lo primero que se hizo fue inducir estrés celular por ARS 500  $\mu$ M durante una hora en medio en presencia de suero fetal bovino. Al finalizar la hora, se retiró el medio condicionado, se lavó tres veces con DPBS y se agregó TRIzol. Se procedió a realizar la extracción de RNA como se indica en la sección materiales y métodos. Luego se separaron 4  $\mu$ g del RNA purificado en cuatro alícuotas individuales de 1  $\mu$ g cada una. A la primera, llámese I (input), no se le realizó ningún lavado. A la segunda, llámese R (reprecipitación), se la reprecipitó nuevamente con isopropanol y con etanol 80% como se detalla en el protocolo de extracción de RNA en la sección materiales y métodos. A la tercera, llámese N (*NEB Monarch RNA Cleanup Kit*), se la sometió a lavados y purificación por extracción en fase sólida como indica el fabricante. En la figura 12, a continuación, se presentan los

resultados de la electroforesis desnaturante del RNA repurificado por estos diferentes métodos.

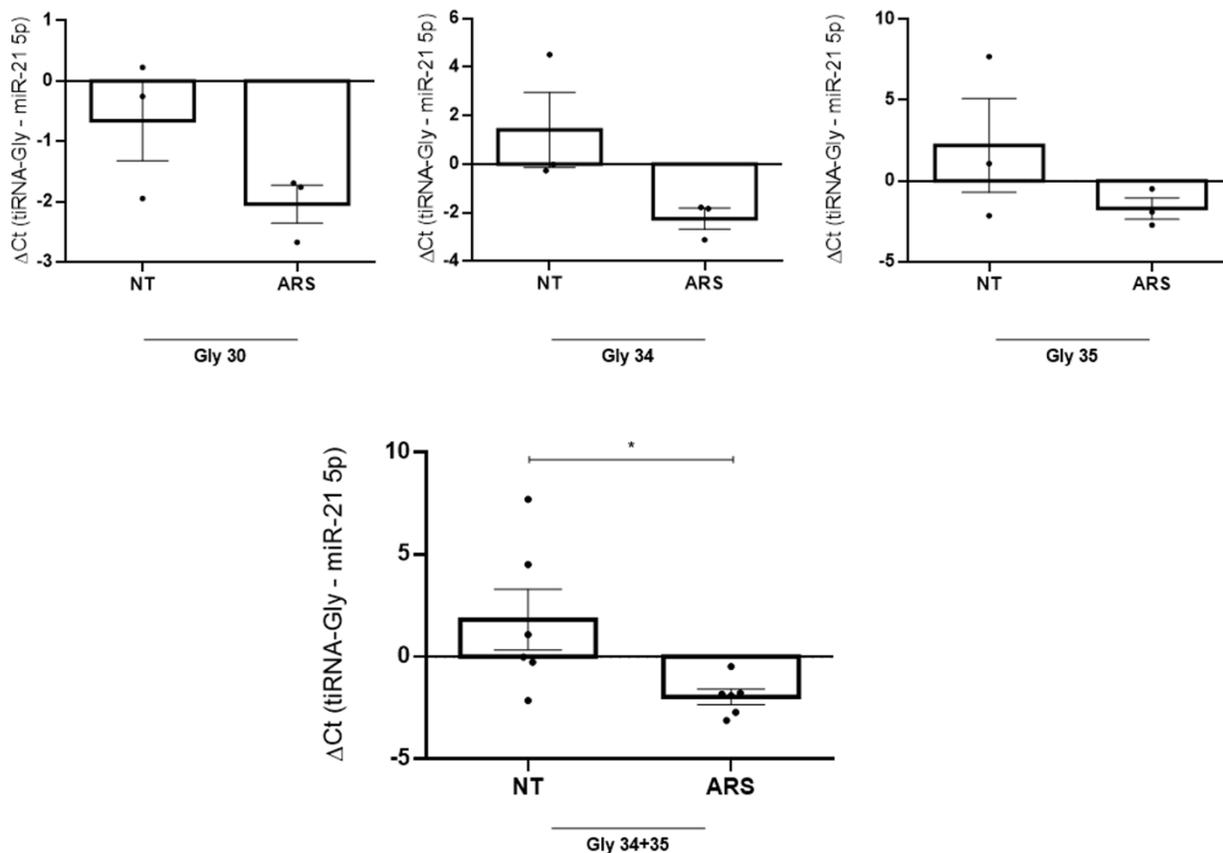


**Figura 12:** Electroforesis desnaturante (7M urea, 10% PAGE) del RNA de células U-2 OS GFP+ sometidas a estrés durante 2 horas. “I” indica RNA extraído pero no reprecipitado. “R” representa RNA extraído y reprecipitado. “N” señala RNA extraído y vuelto a purificar en columnas Monarch RNA Clean Up Kit de NEB. No se apreció grandes diferencias de recuperación de RNA luego de la extracción entre las muestras.

La figura 12 muestra claramente que tanto el RNA reprecipitado con isopropanol como el RNA repurificado por columna tuvo un porcentaje de recuperación cercano al 100%, es decir, que no hubo pérdida de RNA durante estos procesos. Además, es interesante notar que no hubo degradación fruto estos pasos experimentales adicionales. Si se lo compara contra el input (I), el RNA repurificado corre mejor, dando lugar a bandas más definidas. Esto es consistente con espectros de absorción UV mucho más acordes a lo esperable para RNA puro (datos no mostrados). El RNA extraído con Trizol (I) suele presentar absorbancia a 270 nm, correspondiente a la fracción de fenol que permanece soluble en la fase acuosa. Sin embargo, la reprecipitación del RNA (R) ofrece una preparación tan pura y con similar rendimiento al obtenido por columna. Por ende, se decidió utilizar este método para todos los ensayos posteriores, salvo que se indique lo contrario.

### Evaluación de los niveles de 5' tRNA-h-GlyGCC intracelulares por *SL-RT-qPCR*

El siguiente paso fue intentar medir la generación de 5' tRNA-Gly como respuesta al estrés inducido por ARS (es decir: producto del desacoplamiento de ANG de su inhibidor y posterior clivado del tRNA-Gly en el citoplasma). Para ello, sometimos a células U-2 OS a estrés con ARS (500  $\mu$ M) durante una hora. Se utilizó *SL-RT-qPCR* para medir los 5' tRNA-h-GlyGCC de 30, 34 y 35 nt, a la vez que se midió un control endógeno, en este caso, el miRNA miR-21-5p. Se decidió someter a estrés durante una hora y no dos ya que la técnica es muy específica y sensible en comparación con la observación de cambios a grandes rasgos a nivel celular por microscopía (como se hizo en la figura 1). Y precisamente porque dichos resultados mostraron una alteración importante de la morfología celular, que aquí procuramos evitar. Como control se utilizaron células U-2 OS no tratadas (NT) y el experimento se realizó en medio libre de suero MEGM, dado que el uso de suero podría inducir resultados artefactuales producto de RNAs contaminantes en el suero fetal bovino (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017). Además, se optó por realizar estos estudios en MEGM ya que es el medio de cultivo más empleado en trabajos previos de nuestro grupo para coleccionar vesículas extracelulares (que es hacia donde se dirige el flujo de los experimentos). En la figura 13 pueden apreciarse los resultados de este ensayo.



**Figura 13:** Sobreexpresión leve de mitades de tRNA de glicina luego de la inducción de estrés con arsenito de sodio. La sobreexpresión de tRNA-h-GlyGCC fue solamente significativa cuando se combinaron los resultados de las mitades de tRNA de 34 y 35 nt a efectos de tener un mayor número de resultados experimentales, dando así mayor poder estadístico al cálculo en comparación con células control. No fue posible detectar un aumento significativo evaluando simplemente cada tRNA-h por separado, en un experimento hecho por triplicado.

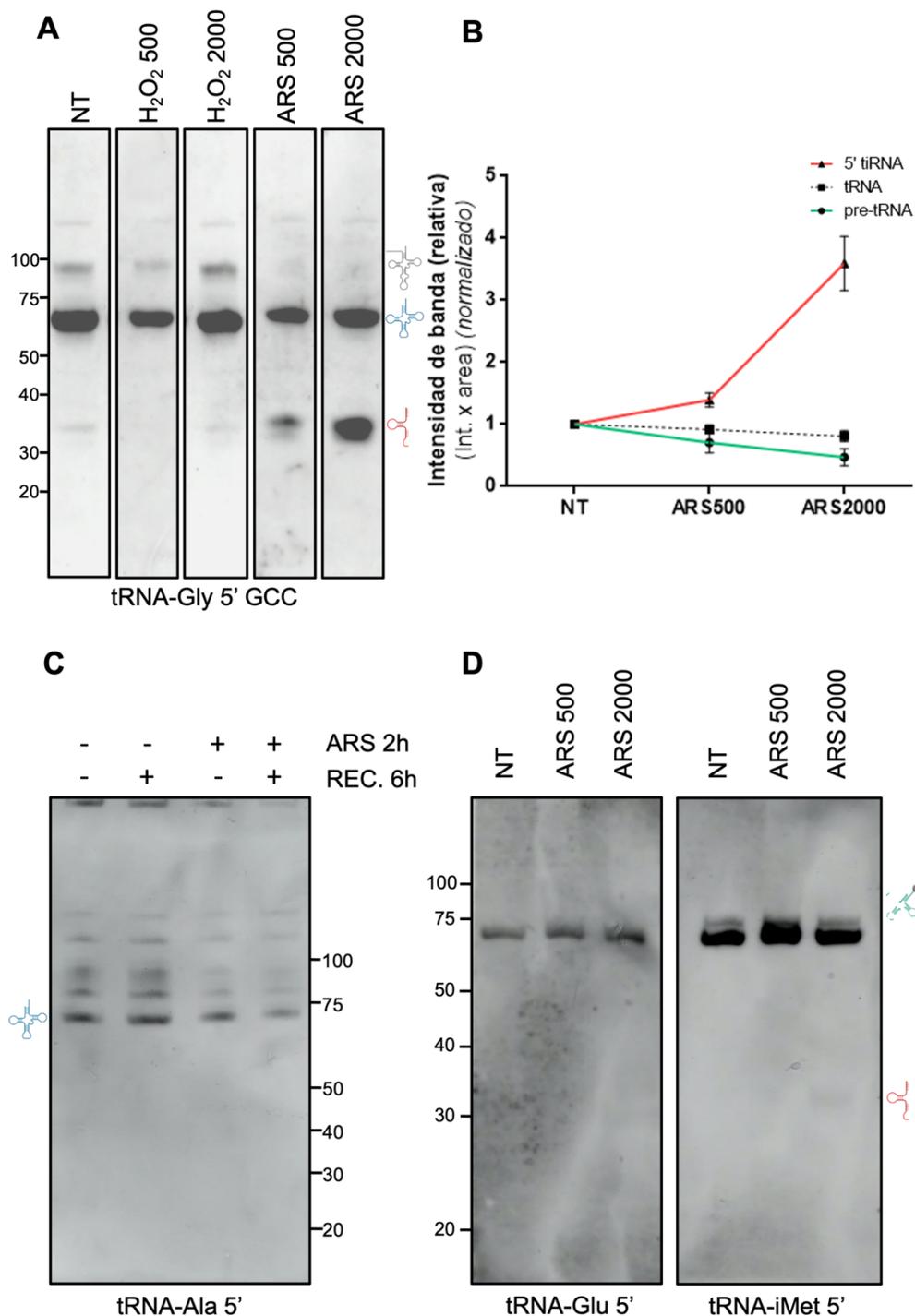
Los resultados graficados mostraron que los niveles intracelulares de 5' tRNA-h-GlyGCC de 30, 34 y 35 nucleótidos no aumentaron significativamente en comparación con el control endógeno al tratar las células con ARS. Los valores en las gráficas muestran la variación en Cq (ciclo de cuantificación), que es el ciclo en el que la fluorescencia (proveniente del agente intercalante SYBR Green) supera un umbral dado mientras el amplicón se va amplificando. Para poder comparar concentraciones relativas entre diferentes secuencias blanco (*targets*), lo que se hace es comparar el valor de Cq entre el *target* de interés y el control endógeno, que se asume no afectado por el tratamiento. Esto permite obtener un valor de  $\Delta Cq$ , que es lo que se graficó. Por tanto, si el valor de Cq de un *target* dado fue mayor al Cq de miR-21 5p para la misma muestra, entonces el valor de  $\Delta Cq$  sería positivo. De lo contrario, sería negativo. En esta tesis, el  $\Delta Cq$  fue definido como el valor de Cq de la secuencia blanco menos el valor de Cq de miR-21 5p. El miR-21 5p es un miRNA que se expresa en la célula de manera abundante y por tanto

es fácilmente detectable y amplificable por *SL-RT-qPCR* y *a priori* no se esperó que sus niveles fueran modulables por estrés.

En ninguna de las tres gráficas (donde se visualiza 5' tRNA-h-Gly 30 nt contra miR-21 5p, 34 nt o 35 nt) se pudo ver un cambio significativo en el  $\Delta Cq$  entre células que fueron expuestas a ARS contra células control. Sin embargo, existe una tendencia clara en los tres casos, que posiblemente hubiera alcanzado significancia estadística de haber incluido mayor número de réplicas. Los niveles de las mitades de tRNA prácticamente se duplicaron, pero esto corresponde a una diferencia de un solo ciclo de PCR, no siendo una cantidad suficiente como para que la diferencia entre muestras sea estadísticamente significativa, dada la variabilidad entre réplicas. Esto hace que esa diferencia no pueda ser medida con robustez mediante *SL-RT-qPCR*. Sin embargo, el poder estadístico aumenta si se toman en conjunto los valores obtenidos de  $\Delta Cq$  para 5' tRNA-h-Gly de 34 y 35 nucleótidos contra los valores de  $\Delta Cq$  obtenidos de células control (figura 13, panel inferior). Por tanto, para poder medir la generación de estos tRNA-h, lo más apropiado es cambiar de técnica.

#### Evaluación de perfiles 5' tRNA-h-GlyGCC intracelulares por Northern blot

En este momento, me encontraba en el casillero número cero nuevamente, ya que sin una técnica que permitiera medir de forma reproducible la generación de mitades de tRNA a nivel intracelular, menos podría evaluar cómo esa variación a nivel de la célula repercute a nivel extracelular. Pensamos entonces que por Northern blot se podría llegar a visualizar un aumento en la generación de fragmentos de 5' tRNA-h-GlyGCC dado que la técnica es más apropiada para ver variaciones pequeñas en los niveles de ciertos RNAs, ya que una duplicación (es decir, una diferencia de un ciclo de PCR; similar a lo observado en la figura 13), no suele dar diferencias estadísticamente significativas por *RT-qPCR* pero sí debería ser suficiente para su visualización por Northern blot. Además, esta técnica tiene el beneficio adicional de que puede monitorearse, a la vez, la generación de fragmentos y los niveles del tRNA precursor. Por tanto, en el siguiente paso (figura 14 A), se volvió a evaluar qué tipo de estrés convendría utilizar, para poder optimizar el modelo de inducción de tiRNAs (fragmentos inducibles por estrés) con agentes oxidantes.



**Figura 14:** Generación de 5' tiRNAs y su evaluación por Northern blot frío. A) Optimización del modelo de inducción de 5' tiRNA-GlyGCC por tratamiento con agentes oxidantes (arsenito de sodio (ARS) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 500  $\mu$ M y 2000  $\mu$ M durante 2 horas). B) Cuantificación de la intensidad relativa de banda para demostrar la correlación negativa entre la generación de 5' tiRNA-GlyGCC y los niveles de 5' pre-tRNA-GlyGCC en réplicas independientes del experimento, realizadas en días distintos, normalizando contra el valor de intensidad de cada banda en las células control (NT). C) Las mitades de 5' tRNA-h-Ala no fueron detectables ni siquiera induciendo estrés oxidativo. D) Los 5' tiRNA-GluCTC no fueron

detectables al inducir estrés oxidativo, mientras que los 5' tiRNA-iMet sí, aunque en niveles casi indetectables.

Las bandas más intensas, aquellas entre el marcador de 50 y 75 pares de bases (figura 14 A, C y D) corresponden a los tRNAs maduros enteros. Las bandas que se encuentran entre el marcador de 30 y 40 pares de bases corresponden a los tiRNAs, aquellos fragmentos inducibles por estrés (generado mediante el tratamiento con ARS) y están marcados por un diseño en rojo a la derecha de la membrana. Se pudo observar que, como consecuencia de la inducción de estrés con ARS tanto a 500  $\mu$ M como a 2000  $\mu$ M, se generaron dos bandas a nivel de los tiRNAs-GlyGCC entre 30 y 40 nucleótidos: la superior (y más intensa) corresponde a los tiRNA-GlyGCC de aproximadamente 34 o 35 nucleótidos y aquella inferior (menos intensa) corresponde a los tiRNA-GlyGCC de aproximadamente 30 o 31 nucleótidos, que presentan una menor abundancia. También se pudo observar que en células control (NT), existió una cierta cantidad de tiRNA-GlyGCC endógenos. Por tanto, se confirmó que las mitades de tRNA de glicina (hasta ahora, referidas como tRNA-h-GlyGCC) se generan fruto de la inducción de estrés en ambas concentraciones utilizadas. Por tanto, a partir de ahora me referiré a ellas como 5' tiRNA-GlyGCC, para enfatizar su carácter de “*stress induced tRNA halves*” (tiRNAs). Se pudo confirmar que el peróxido de hidrógeno no indujo la generación de 5' tiRNAs. Por tanto, se descartó su uso como un agente inductor de estrés a los efectos de esta tesis.

Además, se pudo visualizar una banda inmediatamente superior a la banda de los tRNAs maduros y por debajo del marcador de 100 nucleótidos. Esta banda corresponde a los pre-tRNAs (que son más extensos que los tRNAs maduros ya que contienen la secuencia de los “tráileres” 5' y 3', que son removidos por la RNasa P y RNasa Z, respectivamente). Se pudo observar que hubo una correlación negativa entre la generación de 5' tiRNA-GlyGCC y los niveles de pre-tRNA-GlyGCC, lo que podría indicar que los 5' pre-tRNA-GlyGCC estarían funcionando como sustrato para la generación de los 5' tiRNA-GlyGCC (figura 14 A), o que las mismas RNasas que se activan luego del tratamiento con ARS puedan tener tanto pre-tRNAs como tRNAs maduros como sustrato. Este experimento se repitió tres veces a los efectos de construir una gráfica de intensidad relativa de dichas bandas y poder cuantificar dicha observación (figura 14 B). A modo de resumen, se pudo observar la relación inversa entre el aumento de los 5' tiRNA-GlyGCC y la disminución del 5' pre-tRNA-GlyGCC al aumentar las concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>.

#### Leve inducción de 5' tRNA-h-Ala/Glu/iMet luego del tratamiento con ARS

Durante la inducción de estrés con ARS, se observó también que no hubo bandas a nivel del 5' tRNA-h-Ala. Esto indicaría, en primer lugar, que no se generan 5' tiRNA-Ala a niveles detectables por la técnica aquí utilizada, es decir, que no se podría confirmar

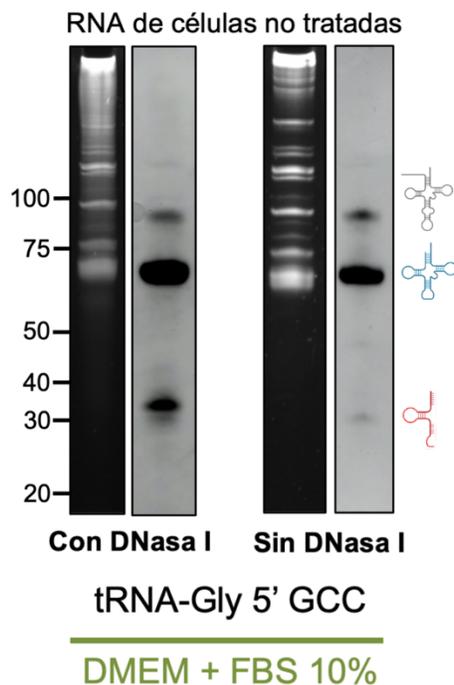
mediante esta técnica si los fragmentos de alanina son inducibles por estrés. Esto es interesante porque en la literatura existen diferentes grupos que los reportan como fragmentos inducibles por estrés. Sin embargo, existen reportes recientes que afirman que al generarse los 5' tRNA-h-Ala, inmediatamente se generan estructuras tetraméricas llamadas G-cuádruplex (G4), que son resistentes a la desnaturalización por urea dentro del gel. Esto haría que, en teoría, su conformación en el espacio y su estructura no permitieran que migraran la misma distancia dentro del gel como el resto de tRNAs. Mediante tinción con N-metil mesoporfirina (NMM), una molécula con alta afinidad reportada para estructuras G4 y que fluoresce con luz UV, reportan poder detectar estructuras G4 que migran más lento dentro del gel, por encima de la banda de los tRNAs maduros (Lyons, Gudanis, et al. 2017). Sin embargo, en la membrana hibridada (figura 14 C), no se encontraron bandas cuya intensidad variara fruto del tratamiento con ARS. Aún si consideráramos alguna de las bandas por encima de la banda del tRNA-Ala como si fuera el 5' tRNA-Ala (en forma de tetrámeros resistentes a la urea presente en el gel), no se encontraron cambios que indiquen un aumento entre la situación control y las células que fueron expuestas a ARS.

También es posible afirmar que ante una inducción de estrés con ARS no se generó 5' tRNA-GluCTC de manera tal que fuera detectable mediante Northern blot frío en nuestras condiciones experimentales. En el caso de 5' tRNA-iMet, se puede afirmar que sí se generan frente al tratamiento con ARS pero en niveles casi indetectables a la sensibilidad de esta técnica. Suponemos que la banda inmediatamente superior al tRNA-iMet es la banda del tRNA-iMet aminoacilado (el peso del aminoácido hace que migre mínimamente más despacio en comparación con el tRNA que no está aminoacilado), aunque esto debería comprobarse por otras técnicas. Con estos resultados en mente, se puede comprender el por qué del uso de 5' tRNA-GlyGCC como nuestro “caballo de batalla” para el estudio de la comunicación intercelular mediada por RNA, ya que como se ve en la figura 14 A, Estos fragmentos se generan en abundancia en respuesta a estrés, lo que permite estudiar cómo el estrés afecta su génesis, liberación al medio extracelular, y transferencia a otras células.

### El estado de fragmentación del RNA puede inducir a resultados artefactuales

Una de las preguntas que se plantearon al ver los resultados plasmados en las membranas de Northern blot es hasta qué punto los tRNA-h que se vieron en bandas de entre 30 y 40 nucleótidos en la situación control (células no tratadas) corresponden a tRNA-h generados de manera endógena debido a una actividad basal de endonucleasas como la angiogenina, entre otras, o hasta que punto puedan llegar a ser un artefacto fruto de la fragmentación *in vitro* del RNA purificado. Además, se solió ver bandas (tenues) no esperadas, por encima de la banda de los pre-tRNAs y del marcador de 100

nt (Figura 12A). Estas bandas podrían corresponder a restos de DNA genómico presente en la muestra como contaminante. Por tanto, para intentar entender este problema, se extrajo el RNA de células no tratadas y se realizó una electroforesis desnaturalizante de 1,5 µg de RNA no tratado y de una segunda alícuota idéntica de 1,5 µg incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de DNasa I (libre de RNasas, certificada, Roche) . Los resultados se muestran en la figura 15.



**Figura 15:** Generación artefactual de tRNA-h. Se generó tRNA-h artefactuales *in vitro* como consecuencia de exposición de RNA a temperatura ambiente durante 30 minutos, durante la incubación con DNasa I.

Se puede apreciar una degradación del RNA fruto de la exposición del mismo durante 30 minutos a temperatura ambiente, debido al protocolo de tratamiento con DNasa I. Esto parecería estar generando RNA fragmentado *in vitro*, que se distingue al evidenciar que la banda que representaría a los 5' tRNA-GlyGCC en la membrana de la izquierda (con DNasa) desapareció en la de la derecha (sin DNasa), aunque en ambos casos, el RNA migrado fue exactamente el mismo (figura 15). Si bien este resultado debió haberse repetido en ausencia de DNasa I a los efectos de distinguir si fue el tratamiento con la enzima o la incubación a temperatura ambiente lo que provocó la generación de las mitades de tRNA, nos indica el cuidado que debe tenerse para estudiar este tipo de fenómenos. Debido a que los tRNAs se generan dentro de la célula por acción de RNasas de la familia A, que tienden a ser los contaminantes ambientales más frecuentes, resulta imposible distinguir la generación real de la generación artefactual de tRNAs si no se toman todas las medidas y se introducen todos los controles pertinentes.

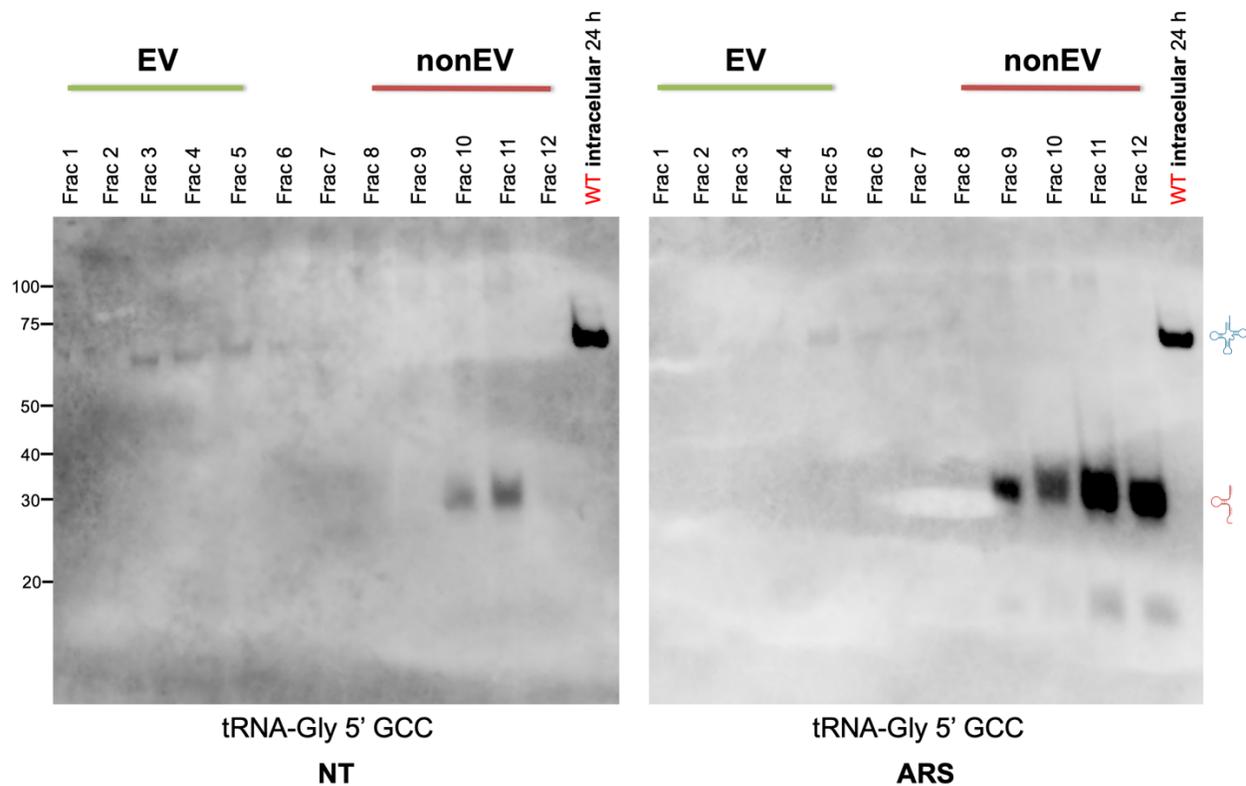


Más allá de lo anterior, también se pudo observar que los 5' tiRNA-GlyGCC volvieron a sus niveles basales transcurridas las 6 horas luego de la finalización del tratamiento con ARS (figura 16 derecha). Si comparamos la banda del 5' tiRNA-GlyGCC luego de las 2 horas de tratamiento contra la banda del 5' tiRNA-GlyGCC luego de 6 horas de recuperación, la última es comparable en intensidad con aquellas de los fragmentos endógenos para las células que no fueron tratadas (control).

Por tanto, con estos datos en mente, uno debe preguntarse, ¿a dónde se dirigieron estos fragmentos generados por estrés, luego de superado el mismo? Podría ser que los mismos se estén simplemente degradando a nivel intracelular. Alternativamente, podría ser que la célula los esté empaquetando en EVs y así secretando como desecho, y que ese desecho funcione como señalizador de estrés. Esta segunda posibilidad es consistente con la hipótesis central de nuestro trabajo, y decidimos seguir explorándola. Si la homeostasis en los niveles de RNAs inducidos por estrés se consigue mediante, en parte, la liberación de los mismos hacia el medio extracelular: deberíamos poder ser capaces de evidenciar un aumento en sus niveles en EVs luego del estrés.

## Capítulo 2: *upregulación* de tiRNAs en EVs como consecuencia de estrés

Uno de los objetivos fue evidenciar, una vez conocidos qué 5' tiRNAs se generaron en mayor medida fruto del tratamiento con ARS, si dichos fragmentos podrían secretarse en EVs. Por tanto, con los datos del capítulo 1 en mente, se intentó inducir estrés tratando células con ARS para poder detectar 5' tiRNA-GlyGCC en EVs por Northern blot. Se incubaron células U-2 OS y se las trató con ARS para luego dejarlas incubando en medio en presencia de suero durante 6 horas y poder coleccionar las EVs que se produjeran en ese lapso. Se separó por gradiente de iodixanol (12 – 36 %) las diferentes fracciones extracelulares del medio condicionado y los resultados del Northern blot revelado con una sonda complementaria al extremo 5' del tRNA-GlyGCC se presentan en la figura 17. De estudios anteriores de nuestro grupo (Tosar et al. 2020), sabemos que las fracciones 1 a 5 corresponden a fracciones vesiculares (positivas para marcadores como CD9 y CD81) mientras que las fracciones 8 a 12 corresponden a complejos ribonucleoproteicos libres de vesículas, o RNAs solubles.



**Figura 17:** La mayoría de los tiRNAs extracelulares están presentes en la fracción no vesicular. Separación en gradiente de iodixanol (12 – 36 %, preparado en PBS) de un concentrado de medio de cultivo condicionado. Las muestras fueron sembradas en el fondo del gradiente y se las ultracentrifugó toda la noche, flotando en función de su densidad. F1: fracción menos densa (12 %), F12: fracción más densa (36 %). De estudios anteriores de nuestro grupo (Tosar et al. 2020), sabemos que las fracciones 1 a 5 corresponden a fracciones vesiculares (positivas para marcadores como CD9 y CD81) mientras que las fracciones 8 a 12 corresponden a complejos ribonucleoproteicos libres de vesículas, o RNAs solubles. No

se observó 5' tiRNA-GlyGCC en fracciones vesiculares fruto del tratamiento con ARS. El panel izquierdo indica las fracciones 1 a 12 y fracción intracelular para células no tratadas con ARS, mientras que el panel derecho corresponde a células tratadas con ARS.

En la Figura 17 (izquierda), se pudo detectar a los tRNAs maduros dentro en las fracciones vesiculares (fracción 3 a 5). En concordancia con resultados anteriores de nuestro grupo (Tosar et al. 2020) se detectaron además niveles elevados de 5' tRNA-h-GlyGCC en fracciones extravesiculares que no están presentes en extractos intracelulares (carril lateral derecho). Esto indicaría que, o los fragmentos se generaron y rápidamente se exportaron al medio de cultivo desde dentro de la célula, o su biogénesis es directamente extracelular (seguramente consecuencia de la alta actividad RNasa extracelular y de la liberación de tRNAs maduros (Tosar 2020)). En la figura 17 (derecha), se volvió a observar tRNAs maduros en las fracciones vesiculares. Se observó un aumento importante en la cantidad de 5' tiRNA-GlyGCC de 30-35 nucleótidos en las fracciones extravesiculares y además se observó la aparición de fragmentos más pequeños (cerca de los 20, que corresponderían a 5'-tRFs). En células no tratadas, la fracción 12 no presentó una presencia contundente de fragmentos, mientras que en células tratadas con ARS, sí. Esto podría deberse a que, por algún mecanismo molecular que se desconoce, la célula modificó los fragmentos de tal manera que su densidad y coeficiente de flotación se afectaron fruto del estrés y por tanto se movieron entre fracciones de diferente densidad. También puede deberse a variaciones a la hora de coleccionar las fracciones en el gradiente.

De cualquier manera, no se pudo observar que a las seis horas se generaran fragmentos en cantidades suficientes en EVs como para ser detectados por esta técnica. Posiblemente, debido a que los medios condicionados por seis horas no llegan a poseer una concentración suficiente de EVs como para poder realizar este tipo de estudios. Por tanto, se necesitaría incubar células durante un mayor lapso (por ejemplo 24 horas) para poder coleccionar una mayor cantidad de EVs y así poder medir su presencia, en caso de que estuvieran efectivamente presentes en EVs.

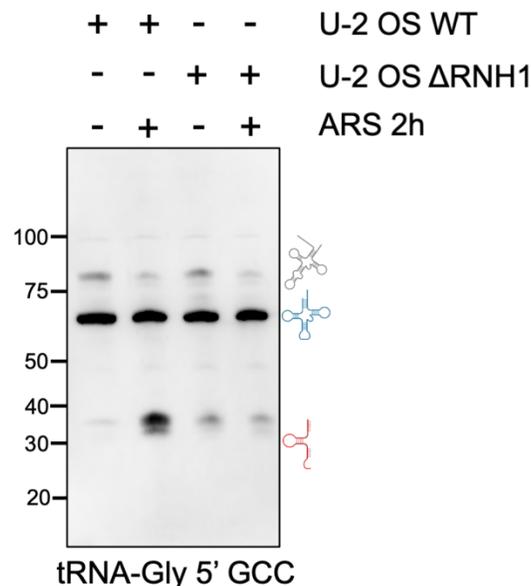
### Generación de 5' tiRNAs mediante metodologías ortogonales

La gran problemática que se presenta a continuación es que no es posible tratar células con ARS durante 24 horas sin esperar que se generen efectos pleiotrópicos nocivos para la célula. El modelo de inducción de estrés con ARS no es un modelo perfecto en el sentido que no deja de ser un “bombardeo” a nivel celular con arsenito: una molécula que genera muerte celular (Jha et al. 1992). Como se pudo observar en la figura 10 y 11, la inducción de estrés genera ciertos cuerpos apoptóticos que por lo general se observan con mucho menor frecuencia en células que no están expuestas a ARS.

Para poder resolver esta problemática, se necesitó encontrar un modelo que no comprometiera la integridad celular y la formación de las EVs, compatible con la obtención de medios condicionados por períodos de tiempo cercanos a las 24 horas, y generando una sobre-expresión de mitades de tRNA a nivel intracelular sin compromiso de la viabilidad celular. Para ello, se utilizó células *knock out* para el inhibidor de endoribonucleasas de la familia A: RNH1. Estas células, diseñadas mediante edición génica con tecnología CRISPR-Cas9 (Akiyama et al. 2019), permiten a las endonucleasas, como la angiogenina, estar libres en el citoplasma cortando cualquier tRNA que se le presente. Aunque debe considerarse que este tipo de células corresponden a clones viables, que suelen poseer cambios adaptativos secundarios a la mutación/delección introducida, por lo que la actividad de ciertas RNasas esté posiblemente reducida también en estas células. Por tanto, al utilizar este tipo celular *knock out* se podría observar 5' tiRNAs sin inducir estrés ni tratar las células con ARS. Es decir, simulando los efectos del estrés a nivel de los tiRNAs pero sin el daño estructural a nivel celular (Akiyama et al. 2019).

#### Evaluación de perfiles 5' tiRNA-GlyGCC intracelulares en U-2 OS $\Delta$ RNH1

Se quiso ver qué sucede a relativamente corto plazo dentro de la célula al inducir estrés, pero esta vez, comparándose entre células U-2 OS WT y  $\Delta$ RNH1 (Figura 18).



**Figura 18:** Generación de 5' tiRNA-GlyGCC en células  $\Delta$ RNH1. Análisis por Northern blot donde se evaluó la generación de 5' tiRNA-GlyGCC en células U-2 OS WT y  $\Delta$ RNH1 luego de 2 horas de tratamiento con ARS contra células control.

Como ya se observó en la Figura 14 A, el tratamiento de las células *wild-type* con ARS induce un aumento en la generación de 5' tiRNA-GlyGCC. Además, se pudo comprobar

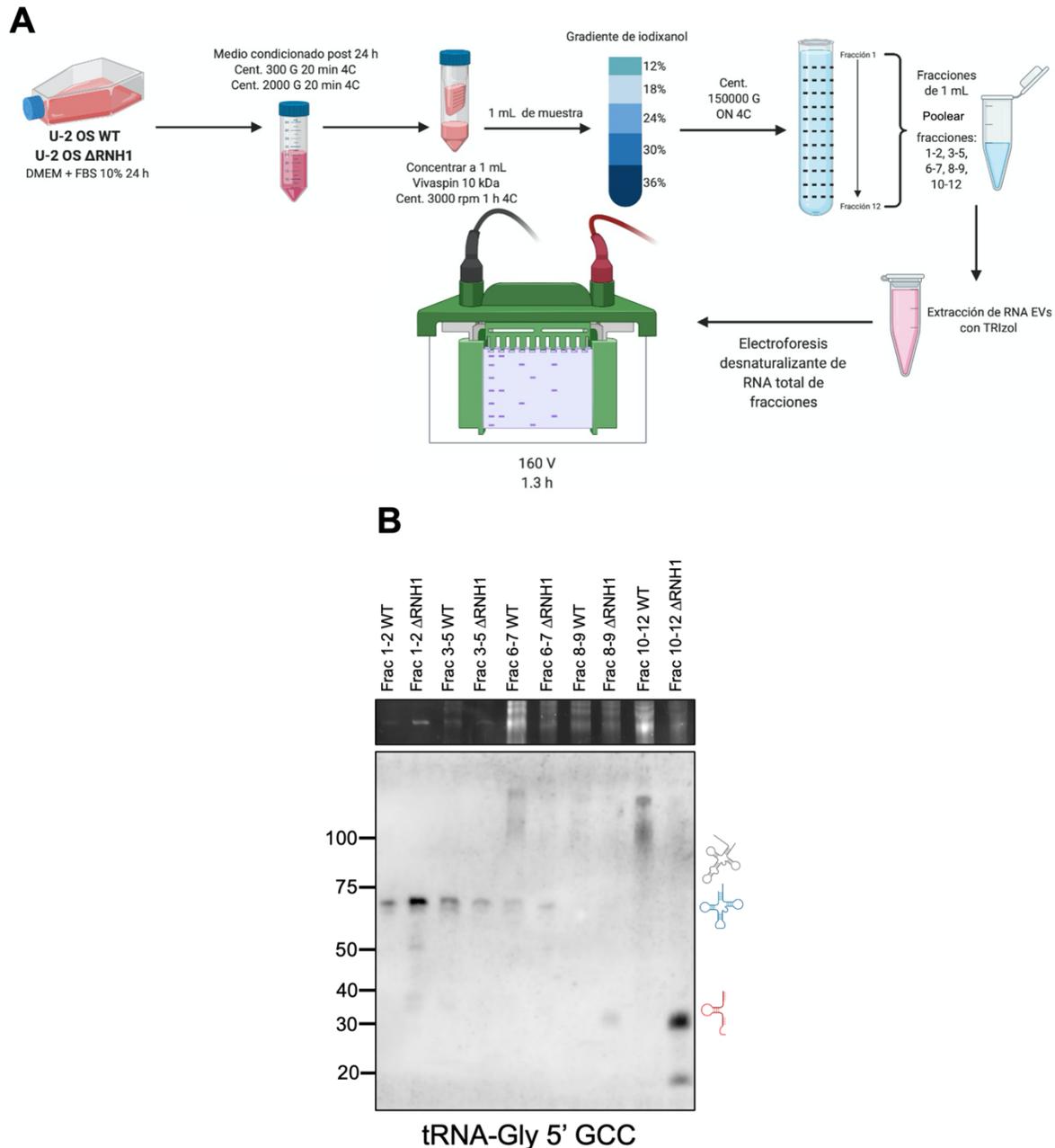
otra vez más la disminución a nivel del 5' pre-tRNA-GlyGCC al inducir estrés. Sin embargo, cuando comparamos este fenómeno en células WT contra lo que sucede en células  $\Delta$ RNH1, se reprodujo la disminución a nivel del pre-tRNA, pero no se observó un aumento claro a nivel de los fragmentos 5' del tRNA-GlyGCC. Por tanto, la hipótesis de que los pre-tRNAs puedan ser el sustrato preferencial para la generación de tiRNAs parecería no encontrar sustento aquí. La cantidad de tRNA entre réplicas fue similar, por tanto, las fluctuaciones a nivel de pre-tRNA y de tiRNA no se deben a una carga diferencial durante la electroforesis.

Evidentemente, se volvió a dejar en claro que los 5' tiRNA-GlyGCC se generan fruto del tratamiento con ARS en células WT (como ya se observó en capítulos anteriores). Por otra parte, también se observó que estos fragmentos están presentes en células  $\Delta$ RNH1 no sometidas a estrés, y en cantidades más abundantes que en células WT no estresadas. Sin embargo, no se pudo observar que el ARS tenga algún efecto sobre la generación de 5' tiRNA-GlyGCC en estas células.

El concepto fundamental que emana de este resultado es que las células  $\Delta$ RNH1 muestran una presencia constitutiva de tiRNAs en ausencia de estrés. Además, el tratamiento con ARS no indujo una nueva generación de fragmentos. Todo esto corrobora lo observado por Akiyama et al. 2019 y demuestra que las células  $\Delta$ RNH1 podrían ser el modelo adecuado para lograr lo que estábamos buscando: células con mayores niveles de tiRNAs en el ambiente intracelular que nos permitan evaluar, en cierta medida, cómo se ve eso reflejado a nivel extracelular (vesicular).

#### Evaluación de perfiles 5' tiRNA-GlyGCC vesiculares en U-2 OS $\Delta$ RNH1

Para poder evidenciar que efectivamente los 5' tiRNA-GlyGCC se podrían empaquetar en EVs fruto del estrés (o en su defecto, de la ausencia del inhibidor de endonucleasas), se incubó células U-2 OS WT y  $\Delta$ RNH1 durante 24 horas y luego se colectó el medio condicionado en el que se las incubó y realizó un gradiente de iodixanol para separar las fracciones vesiculares y no vesiculares mediante ultracentrifugación. En la figura 19 se muestra un protocolo de la metodología acompañado de los resultados del Northern blot del RNA vesicular y no vesicular.



**Figura 19:** Empaquetamiento de 5' *tiRNA-GlyGCC* en vesículas extracelulares provenientes de células U-2 OS WT y  $\Delta$ RNH1. A) Modelo experimental para colección del RNA proveniente de la fracción vesicular y de la fracción extravesicular, separado por gradiente de iodixanol y electroforesis desnaturalizante (7M urea, 10% PAGE) del RNA obtenido de la extracción. B) Análisis por Northern blot del RNA utilizando una sonda complementaria a la región 5' del tRNA-GlyGCC. El extracto del gel teñido con SYBR Gold se corresponde a la región de banda de tRNAs en la membrana revelada.

Estos resultados confirmaron la presencia de 5' *tiRNA-GlyGCC* en vesículas extracelulares provenientes de células  $\Delta$ RNH1 (fracciones 1 y 2), aunque debe reconocerse que la banda obtenida es bastante tenue. Estas células simularían la

situación de inducción de estrés con ARS en lo que a inducción de tiRNAs se refiere, y es llamativo que puedan apreciarse mayores niveles de tiRNAs en las mismas. Se pudo evidenciar también la presencia de tRNAs enteros en las fracciones vesiculares (1-7) que desaparecieron definitivamente en las fracciones no vesiculares (8-12). Esto se debe a que dentro de EVs, los tRNAs se encuentran mayormente protegidos de la acción de las RNasas, por tanto, no se degradarían (en concordancia con los resultados de la Figura 17). Fuera de EVs, en las fracciones no vesiculares, y en presencia de medio con suero donde hay RNasas, los tRNAs no sufrieron el mismo destino y se degradaron de manera rápida, lo que nos permitió ver la banda a nivel de los 5' tiRNAs en las fracciones 10-12. Estos resultados corroboraron lo publicado recientemente por nuestro grupo (Tosar et al. 2020) respecto a la biogénesis extracelular de las mitades de tRNA no vesiculares, y la presencia de tRNAs completos en EVs.

También se pudo observar una banda de cerca de 50 nucleótidos en la fracción 1-2 de las células  $\Delta$ RNH1. No se conoce exactamente la secuencia, pero se supone que estos fragmentos se clivaron a nivel del T-loop (calculando su tamaño y considerando que se están utilizando sondas complementarias a la región 5' del tRNA). Llama la atención que esta banda es prácticamente indetectable a nivel intracelular (Figura 18 y Figura 19 B). Esto podría estar indicando dos cosas: o la liberación selectiva de estos fragmentos de 50 nt en EVs, o una preselección para secreción de tRNAs fruto de sus bases modificadas, y que luego, dentro de las EVs, sean estas bases modificadas las que permitan que, por algún mecanismo aún no reportado, se clive el tRNA a nivel del T-loop para dar lugar a este fragmento de 50 nucleótidos. Cabe mencionar que este fragmento 5' de 50 nucleótidos se observó sistemáticamente en EVs cuando se repitieron ensayos de este tipo (datos no mostrados). Existen reportes que sugieren que pueda haber procesamiento endonucleolítico de RNAs dentro de las EVs (Melo et al. 2014; Chakraborty et al. 2015) así como un empaquetamiento diferencial de tRNAs con modificaciones postranscripcionales particulares (Shurtleff et al. 2017). Por ende, se amerita profundizar en el futuro en este resultado inesperado, aunque de momento no constituye el foco principal de esta tesis.

Como ya se sugirió, es posible que el número de EVs proveniente de células  $\Delta$ RNH1 fuera mayor que el número proveniente de células WT. Eso se pudo deducir a partir de la intensidad de la banda de los tRNAs completos en EVs (alternativamente: podría haber mayor empaquetamiento de tRNAs en EVs en células  $\Delta$ RNH1). Este experimento también debería ser presentado junto con una alternativa donde se normaliza el número de EVs de partida, lo que requiere de disponer de técnicas de cuantificación de estas nanopartículas. Para realizar esto, se necesita equipamiento que no está al alcance para la realización de esta tesis pero que en el futuro cercano esperamos tener. Alternativamente, se podría normalizar los niveles de la banda de tRNA completo en las

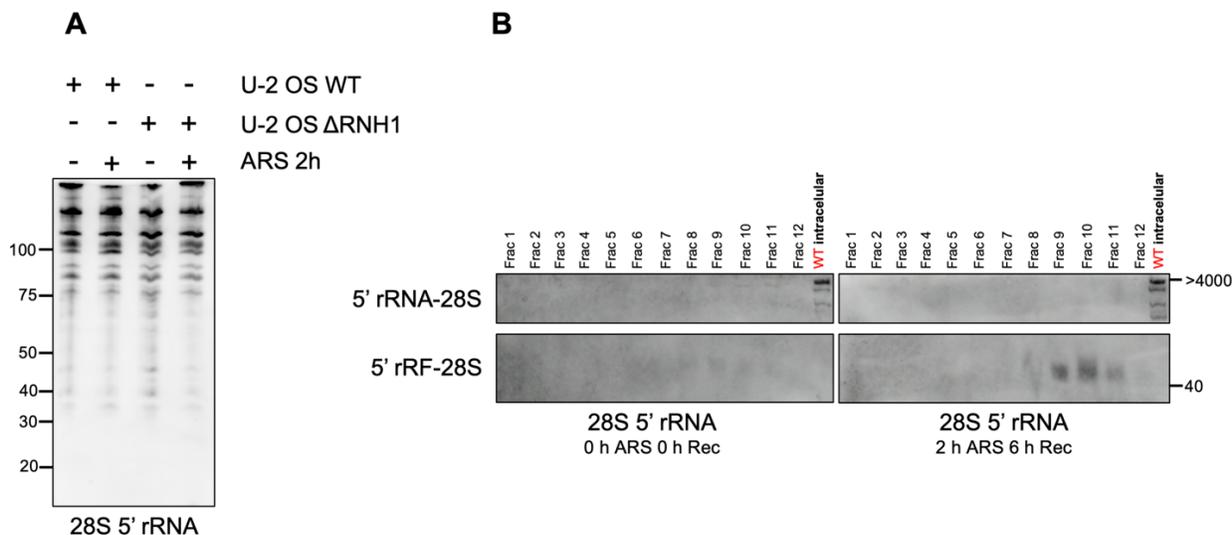
fracciones de EVs, y ver qué sucede con las mitades de tRNA. Es decir, si bien estos resultados apoyan nuestra hipótesis central (que una sobreexpresión de tiRNAs a nivel intracelular trae aparejado mayores niveles en EVs), tendríamos que repetir este análisis normalizando el número de EVs por fracción antes de poder dar una respuesta contundente.

Se observaron también restos de DNA genómico en las fracciones 6 a 7 y 10 a 12 de las células WT (figura 19 B). En estudios previos de nuestro grupo, se sabe que cuando existe DNA genómico a nivel extracelular, este presenta un patrón escalonado (lo que sugiere que deriva de células que sufrieron muerte celular) y se marca con las sondas debido a la presencia de los genes de tDNA distribuidos a lo largo del genoma. En apoyo de esto, el análisis a nivel intracelular de estas mismas células a las 24 horas (es decir, una vez finalizado el experimento) mostró presencia de mitades de tRNA, enfatizando que las incubaciones largas – aún en medio con 10% FBS – pueden ser de por sí una fuente de estrés para estas células (datos no mostrados). Una posible solución es disminuir los tiempo de incubación o trabajar a densidades celulares menores, de tal manera que este efecto se minimice.

Por último, en la figura 19 B, llamó la atención que los niveles de 5' tiRNA-GlyGCC y 5' tRFs en las fracciones no EV fueran mucho mayores en las células  $\Delta$ RNH1. Esto podría sugerir que la liberación de RNH1 (activa o pasivamente a partir de células que ya sufrieron su muerte), juega un rol en la regulación de la fragmentación extracelular del RNA no vesicular. Esto abre la puerta para una investigación más a fondo pero que no será parte del foco de esta tesis.

### Efectos de la inducción de estrés a nivel del rRNA

Con todo esto en mente, es difícil no preguntarse lo siguiente: ¿el estrés celular induce mecanismos intracelulares que clivan tRNAs de manera específica o se está frente a un mecanismo de degradación del RNA a nivel general dentro de la célula? Se sabe por los resultados que se presentaron hasta ahora que tanto al inducir estrés con ARS como al utilizar células *knock out* para RNH1, existe una mayor generación de tiRNAs y en especial de tiRNA-GlyGCC. Por tanto, surge la pregunta de si únicamente este clivaje sucede a nivel de tRNAs o si es un mecanismo que ataca indiscriminadamente al RNA intracelular. Para responder esta pregunta se utilizaron ambos modelos de estrés: el de inducción con ARS y el modelo con células  $\Delta$ RNH1. En el caso del modelo que utiliza ARS, se incubó células U-2 OS WT con ARS a 500  $\mu$ M durante 2 horas y luego se extrajo el RNA tanto intracelular como el RNA de las fracciones vesiculares y no vesiculares, separadas mediante un gradiente de iodixanol (figura 20 A y B).



**Figura 20:** Efectos de la inducción de estrés a nivel del rRNA. A) Northern blot en células U2-OS WT o  $\Delta$ RNH1 tratadas o no con ARS, revelando con una sonda complementaria al extremo 5' del rRNA 28S. B) Northern blot de fracciones extracelulares separadas en un gradiente de iodixanol 12 – 36 %, provenientes de células U2-OS WT no tratadas (izquierda) o tratadas con arsenito de sodio durante 2 horas, seguido de seis horas de incubación en medio sin arsenito. Se reveló con una sonda complementaria al extremo 5' del rRNA 28S. Se muestra la región superior de la membrana (correspondiente al rRNA completo, no detectable), y la región correspondiente a los 40 – 50 nt.

La primera observación a destacar (figura 20 A) es que no parecería que se generaran fragmentos de RNA ribosomal 28S fruto de la inducción de estrés, más allá de la gran cantidad de fragmentos 5' que pueden detectarse en la situación basal. Sí, por resultados presentados anteriormente, sabemos que el 5' tiRNA-GlyGCC es inducible por estrés, pero aplicando la misma metodología en las mismas células, no se pudieron replicar los resultados para el rRNA 28S. Tampoco se pudo observar que se generaran fragmentos de rRNA 28S en mayor cantidad o de diferente tamaño al utilizar células  $\Delta$ RNH1. Por tanto, no parecería haber un efecto estrés-específico o RNH1-dependiente en la generación de fragmentos 5' del rRNA 28S, a diferencia de lo que ocurre con los tiRNAs.

Por otra parte, en la Figura 20 B, si se pudo observar la presencia de fragmentos de rRNA 28S (5' rRF-28S) en células WT a las que se trató con ARS durante 2 horas y se las dejó incubar con medio durante 6 horas post tratamiento. Más aún, estos fragmentos fueron detectados exclusivamente en las fracciones no vesiculares. Con los resultados de la Figura 20 A en mente, podríamos especular que estos no son fragmentos inducibles por estrés, sino que muy seguramente, estos fragmentos se estén generando por degradación del rRNA en el medio extracelular, proveniente de ribosomas enteros liberados a partir de células que murieron. Esta hipótesis va de la mano con los datos de secuenciación presentados en Tosar 2020, donde se observó un enriquecimiento en fragmentos 5' de 40 nt provenientes del rRNA 28S en fracciones no vesiculares del medio extracelular.

Como conclusiones de estos resultados, se destaca que los fragmentos 5' del rRNA 28S no serían inducibles en estrés, aunque pueden detectarse en condiciones basales. Sin embargo, su presencia en las fracciones extravesiculares nos lleva a cuestionarnos si, como ya hemos demostrado para las mitades de tRNA (Tosar et al. 2020) la presencia de fragmentos de rRNA podría ser consecuencia de una biogénesis extracelular a partir de ribosomas enteros liberados al medio extracelular, y rápidamente degradados por las RNasas del suero. Más aún, estos resultados muestran que no solamente las mitades de tRNA de glicina parecieran ser altamente resistentes a la degradación, sino que lo mismo podría decirse de los fragmentos 5' de 40 nt provenientes del rRNA 28S. Estos resultados, pues, amplían el abanico de moléculas de RNA que, sin estar empaquetadas en vesículas, resisten la degradación mediada por RNasas del suero, y tienen un enorme potencial como biomarcadores de enfermedad, aunque esto escapa los alcances de esta tesis<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Por más información, ver Tosar, 2021. *Die-hard: resilient RNAs in the blood. Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Tosar, 2021b).

### Capítulo 3: estabilidad y empaquetamiento

Hasta el momento se pudo comprobar que, frente a una situación de estrés inducida por tratamiento con ARS, las células U2-OS tienden a producir 5' tiRNA-GlyGCC mayoritariamente. El tamaño de los fragmentos producidos, a partir de su estimación por Northern blot, fue de 34 o 35 nucleótidos. Es decir, coincidente con un corte endonucleolítico luego de la segunda o tercera posición del anticodón. Sin embargo, trabajos previos de nuestro grupo han mostrado que, a nivel extracelular, las 5' tiRNA-GlyGCC predominantes son más cortas, y llegan únicamente hasta la posición 30 o 31 (Tosar et al. 2015). Posiblemente esto se deba a un sesgo de supervivencia (Tosar et al. 2021a) a raíz de la mayor estabilidad de estos fragmentos debido a su capacidad de formar estructuras diméricas altamente resistentes a la degradación (Tosar et al. 2018, 2020). Por tanto, para estudiar su estabilidad intra y extracelular así como su capacidad de empaquetamiento para secreción, se decidió trabajar tanto con los 5' tiRNA-GlyGCC de 30 nt (abundantes en muestras extracelulares) como con los 5' tiRNA-GlyGCC de 34 o 35 nucleótidos (que son las especies directamente inducidas por estrés, ver capítulo 2).

Hasta ahora el modelo experimental tenía sus bases en el uso de una línea celular que expresara moderadamente RNasa 5 (ANG) y niveles proporcionalmente bajos de RNH1: U-2 OS. Sin embargo, para estudiar la estabilidad de los fragmentos y su secreción al medio extracelular mediante, en parte, técnicas de microscopía confocal que permitieran visualizar los RNAs sintéticos marcados dentro de la célula, una línea con actividad relativamente alta de ribonucleasas sería un tanto contraproducente, ya que se estipula que, debido a dicha acción, los fragmentos producidos serían más fácilmente degradados y por tanto su estudio se dificultaría. Si se refiere a la Figura 8 se puede ver que existen otras líneas celulares con menor expresión de RNasa 5 y mayor expresión de RNH1, como la MCF-7, que previamente se venía utilizando por el grupo para el estudio de estabilidad intracelular de diferentes RNAs. Por tanto, se decidió incluir también a las células MCF-7 (de cáncer de mama) en esta fase del trabajo, a los efectos de poder evaluar modelos con distinta actividad RNasa intracelular.

A continuación se describen varios ensayos relativamente similares a los que se realizaron en la tesis de maestría de la Mag. Fabiana Gámbaro. En dicho caso, la diferencia con esta tesis es que aquellos ensayos se realizaron con Gly sintéticos de 30 nucleótidos (el RNA 5' tiRNA-GlyGCC sintético cuya secuencia se presenta en materiales y métodos y de ahora en más, al referirse a la variante sintética, se nombrará como "Gly 30"), donde la diferencia de estabilidad entre dicho RNA y su control de secuencia, SCR, era muy grande (Tosar et al. 2018). Además, Gly de 30 nucleótidos no refleja, a la luz de los resultados que se presentaron previamente, que fuera la especie que se produce más abundantemente durante el tratamiento con ARS (inducción de estrés). Por lo tanto, hubo

que volver a poner a punto y repetir ciertos resultados con secuencias de 34 y 35 nucleótidos, y se esperó además poder tener un control que tenga una estabilidad intracelular comparable con el RNA sintético Gly.

### Transfección de RNAs sintéticos en células U-2 OS y MCF-7

Hasta el momento de comenzar este trabajo, en nuestro laboratorio se venía utilizando Lipofectamina 2000 (L2K) como agente de transfección. Sin embargo, decidimos pasarnos al uso de Lipofectamina 3000 (L3K) ya que, de acuerdo con el fabricante, no habría razón para utilizar L2K si la L3K posee mejores eficiencias de transfección en múltiples modelos celulares. Por tanto, nos vimos obligados a reoptimizar todos nuestros ensayos de transfección, aprovechando la oportunidad para comenzar a utilizar el RNA sintético de 34 y 35 nucleótidos. Ambos reactivos funcionan con una lógica similar, creando nanopartículas sintéticas de lípidos catiónicos que ayudan al RNA a penetrar la membrana plasmática y entrar en la célula. Sin embargo, de acuerdo con el fabricante, la eficiencia de transfección de la L3K aumenta significativamente dada la asistencia de un aditivo comercializado bajo el nombre de P3000 (P3K), que no solamente ayuda a acortar los tiempos de exposición de la Lipofectamina a las células, sino que también ayuda en la incorporación de la micela con la membrana plasmática.

Para poder medir la estabilidad intracelular y el empaquetamiento de ciertas mitades de tRNA, se diseñó dos modelos. El primero consistió en la utilización de Gly sintéticos con un extremo 5' biotina. Estos RNAs marcados permitieron la posterior conjugación con estreptavidina conjugada al fluorocromo APC, lo que permitió su visualización mediante técnicas de microscopía confocal. Esta misma aproximación experimental había sido utilizada ya en trabajos previos<sup>3</sup> de nuestro grupo (Tosar et al. 2018, Gámbaro et al. 2020). Además, los mismos RNAs se sintetizaron sin el extremo 5' biotina (sustituido por un 5' monofosfato), a los efectos de medir su presencia en diferentes condiciones mediante *SL-RT-qPCR*. Principalmente, se transfectó células con los diferentes RNAs sintéticos para poder medir su estabilidad intracelular, su empaquetamiento y presencia en EVs y su posible transferencia entre células mediante las técnicas antes explicadas. Como control del proceso, se sintetizó una secuencia conteniendo las bases del Gly pero con algunas bases que diferían entre secuencias (referirse a materiales y métodos), que llamaremos SCR (por su sigla en inglés: *scramble*). Estas secuencias SCR se adquirieron para todos los largos correspondientes (30, 35). Este RNA no posee la capacidad de formar homodímeros (Tosar et al. 2018) y por tanto, como posee algunas de sus bases alteradas con respecto a Gly, no estaría protegido estructuralmente de la

---

<sup>3</sup> *Considérense que Gámbaro et al. RNA Biology, 2020 es en parte un trabajo previo a esta tesis (pues recoge los resultados de la tesis de Fabiana Gámbaro) y en parte una de las producciones de esta tesis (pues recoge también resultados realizados durante la primera fase de mi maestría).*

acción de las ribonucleasas (a diferencia de Gly 30). Esto nos permitió poder medir su degradación intracelular en comparación con aquella del RNA intrínsecamente estable y, a la vez, evaluar si el empaquetamiento y la liberación del RNA al medio extracelular fue dependiente de ciertos motivos de secuencia.

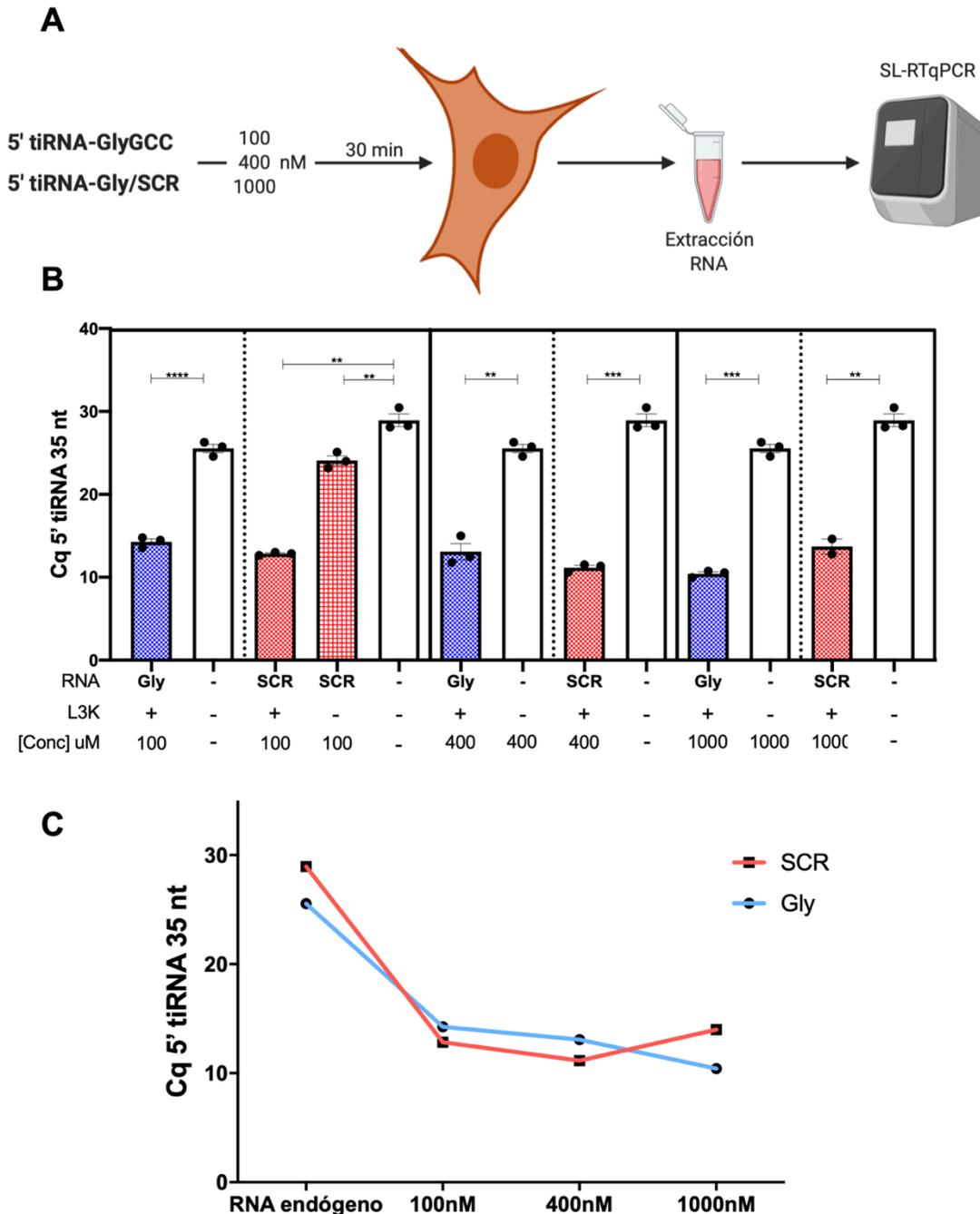
### Puesta a punto del modelo de transfección de RNAs sintéticos

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue demostrar la transferencia de RNAs producidos fruto del estrés entre células. Para que esto se pueda llevar a cabo, la integridad de la célula debió ser prácticamente similar a su integridad en situaciones fisiológicas. Por tanto, se debió comprobar que ninguno de los agentes utilizados para transfectar los RNAs sintéticos induciría compromiso estructural evidente a nivel de la membrana plasmática. En dicho caso, la liberación de los RNAs podría corresponder a Apo-EVs y no a exosomas o microvesículas, distorsionando el modelo de estudio. Por tanto, hubo que demostrar que el agente de transfección a utilizar (L2K o L3K, ThermoFisher) no tenía efectos citotóxicos a nivel celular. Algunos trabajos de otros grupos, como el de Rakesh Veedu en Australia, demuestran que la utilización de diferentes tipos de lípidos catiónicos comerciales pueden afectar la viabilidad de las células MCF-7 (Wang et al. 2018). Sin embargo, lo más correcto fue testearlo sobre nuestro modelo celular para poder estar seguros de que la integridad de membrana no se vería afectada, al igual que la capacidad de la célula de formar y liberar EVs. Además, se necesitó encontrar qué confluencia celular era la óptima para poder realizar los ensayos de transfección de manera tal que la cantidad de Lipofectamina no dañara la integridad celular ni cambiara, a grandes rasgos, la morfología general de las células que se transfectaron.

En datos no presentados en esta tesis, se optimizaron los volúmenes del agente de transfección así como del aditivo P3000, y se determinó que las células deberían alcanzar un 80% de confluencia para realizar los ensayos. De lo contrario, la relación L3K vs células era demasiado alta y la citotoxicidad de la combinación L3K - P3K pasaba a hacerse notoria.

Una vez puesto a punto el protocolo de transfección de células con RNAs sintéticos marcados, se evaluó la posibilidad de medir también RNAs con un grupo 5' monofosfato (es decir, no marcados con biotina) por SL-RT-qPCR. La ventaja es que, además de ser una técnica mucho más sensible, los RNAs que se utilizarían en los siguientes ensayos no deberían estar marcados para evitar fenómenos artefactuales inducidos por el grupo 5' biotina.

En una primer instancia, se transfeció células U-2 OS con Gly de 35 nucleótidos, ya que es el fragmento que más se produce fruto del estrés (Figura 14 A), y con su control SCR correspondiente, como se detalla en la figura 21 A. Se midió la presencia de los RNAs sintéticos (en este caso no marcados con biotina) en las células mediante *SL-RT-qPCR*, a tiempo 30 minutos luego del comienzo de la transfección (llamado t = 0 horas). La transfección se realizó a diferentes concentraciones: 100, 400 y 1000 nM.



**Figura 21:** Optimización del modelo de transfección de células U-2 OS para medir eficiencia de transfección y determinar concentración óptima de transfección. A) Diagrama del

procedimiento desde la transfección a diferentes concentraciones (100, 400 y 1000 nM) durante 30 minutos en células U-2 OS hasta la posterior extracción de RNA intracelular y determinación de la presencia de RNA sintético mediante *SL-RT-qPCR*. B) Los niveles de Gly y SCR de 35 nucleótidos dentro de células fueron significativamente más altos en las tres condiciones (transfección a 100, 400 y 1000 nM) en comparación con sus controles (sin L3K y/o RNA). C) Comparación de los niveles de Gly y SCR endógenos (control) contra niveles intracelulares de RNA sintético incorporado a la célula fruto post transfección. Nótese que en el caso de SCR los “niveles endógenos” en realidad corresponden a un producto de amplificación inespecífica, posiblemente a causa de la hibridación de los *primers* contra las mitades de tRNA-Gly. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; prueba Welsh no paramétrica a dos colas. Válido para esta y las siguientes figuras (hasta que se indique otra cosa).

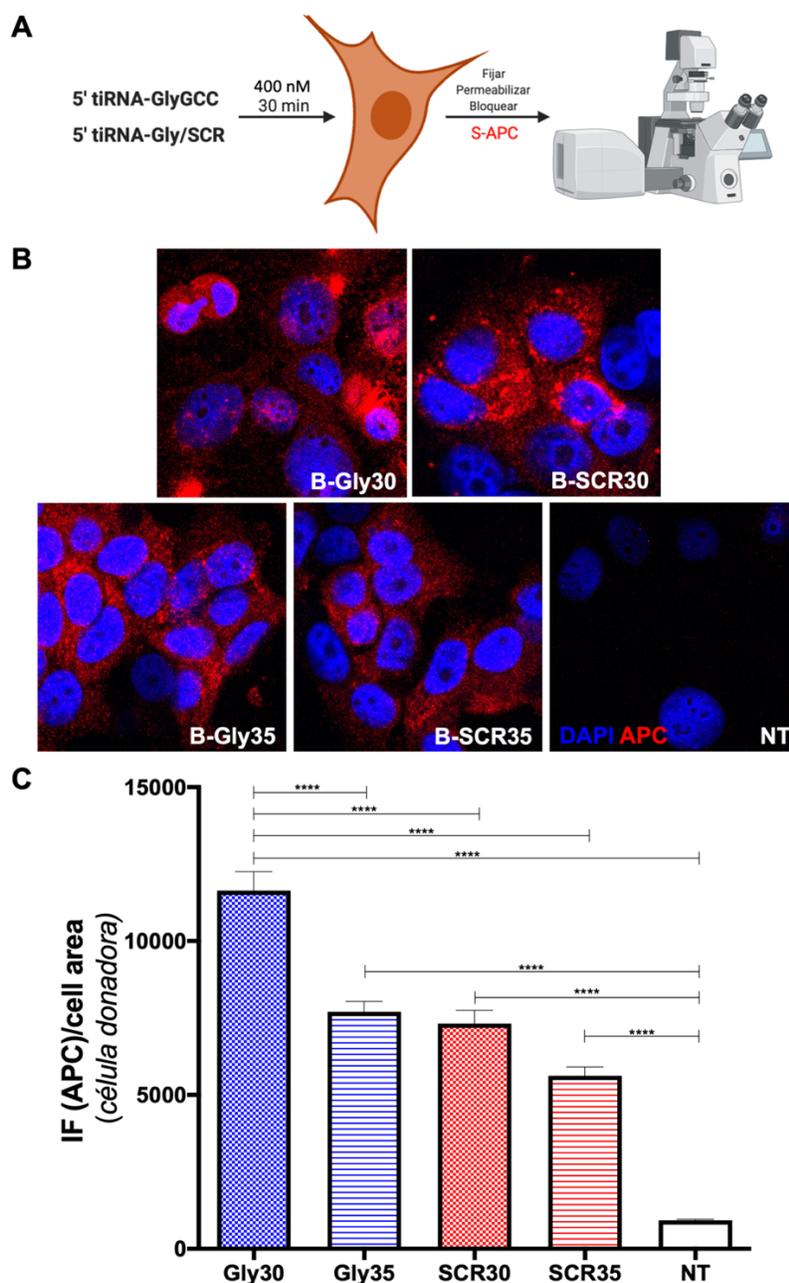
Independientemente de la concentración de RNA sintético a la que se expuso las células, se desprende de la Figura 21 B y C que el RNA sintético se incorporó dentro de las mismas ya que se pudo observar una disminución amplia entre el ciclo de amplificación del RNA en cuestión y su respectivo control (correspondiente a los niveles endógenos de los respectivos tRNAs u otros transcritos intracelulares con sitios complementarios a los *primers* utilizados). Por tanto, se determinó que más allá de la moderada acción de las RNasas intracelulares en esta línea celular (figura 8), la técnica *SL-RT-qPCR* permitió detectar RNAs que serían indetectables mediante microscopía confocal de fluorescencia, ya que, en otra experiencia que se detallará más adelante, se transfectó células U-2 OS con RNAs sintéticos biotinilados de 35 nucleótidos y no se los pudo detectar (ver capítulo 5). Además, se puede ver cómo a 100 nM también se incorporó el SCR sin necesidad de L3K ( $p$ -valor = 0.0067), lo que podría indicar que existe cierto grado de *uptake* espontáneo (ver capítulo 4). Claramente los niveles son ampliamente inferiores que al comparar con el RNA sintético que ingresó asistido por L3K. Sin embargo, esta parecería ser también una clara vía de ingreso a la célula que será explorada con mayor detalle en capítulos posteriores de esta tesis.

Los niveles de Gly endógenos fueron amplia y significativamente inferiores que los niveles al transfectar la célula con RNA sintético. Hay cerca de 13 ciclos de PCR de diferencia entre los niveles de Gly al transfectar a 100 nM en comparación con sus niveles endógenos (unas 8000 veces más RNA). No varió más que en tres ciclos de PCR entre la transfección a 100 y a 1000 nM (unas ocho veces más RNA a 1000 nM), lo que es consistente con el hecho de estar agregando 10 veces más RNA (Figura 21 C). Para los siguientes ensayos, se eligió utilizar una concentración intermedia (400 nM).

### Efecto del largo de la secuencia de Gly y SCR

Lo siguiente fue evaluar cómo se comportó el RNA al ser incorporado dentro de la célula mediante microscopía confocal de fluorescencia, como ya había sido hecho antes para Gly 30 (Tosar y Gámbaro et al. 2018, Gámbaro y Li Calzi et al. 2020), pero comparando ahora las distintas combinaciones de RNA sintéticos. Para esto, se transfectó células

MCF-7 con Gly y SCR marcados con 5' biotina de 30 y 35 nucleótidos a 400 nM para poder ver su incorporación en el citoplasma a tiempo 0 horas post transfección y la cuantificación de los resultados se puede observar en la figura 22.



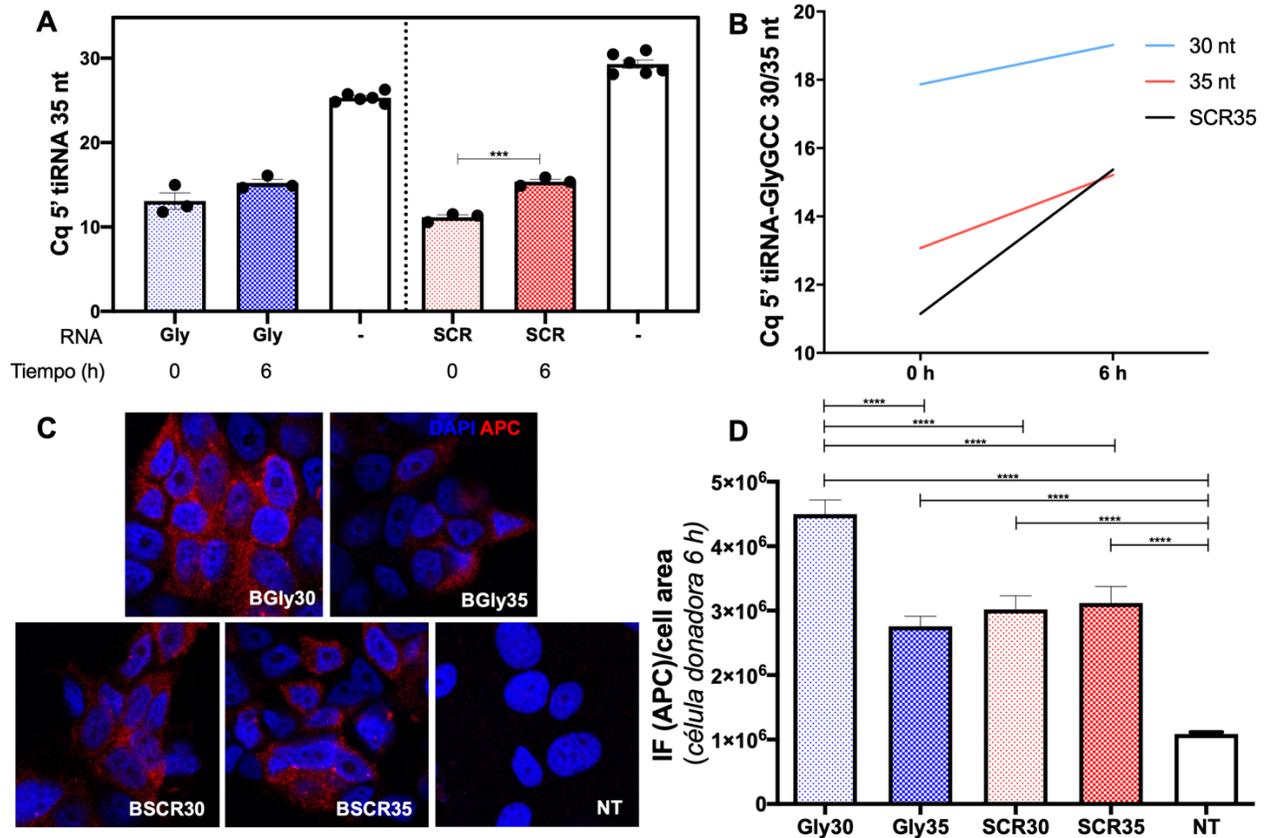
**Figura 22:** Cuantificación de los niveles de los distintos RNAs a tiempo 0 post transfección. A) Modelo de transfección y de preparación de las células para microscopía confocal de fluorescencia. B) Imágenes representativas de diferentes transfecciones, con RNAs sintéticos Gly y SCR de 30 y 35 nucleótidos. Los núcleos están representados por marca azul (DAPI) y los RNAs sintéticos por marca roja (estreptavidina-APC). C) Comparación de los niveles intracelulares de cada RNA sintético fruto de la transfección a 400 nM y su comparación relativa contra células que no fueron tratadas (control) medido en intensidad de fluorescencia de la marca roja (APC) por área de célula.

Claramente se vio que todos los RNAs sintéticos son fácilmente detectables a tiempo cero (es decir, luego de 30 minutos de incubación con los complejos de RNA / lípidos). Coincidente con resultados anteriores de nuestro grupo (Tosar et al. 2018) la eficiencia de transfección de Gly 30 parecería ser más alta que la de SCR 30 y la de todos los demás RNAs testeados (Figura 22 C). Nuestra interpretación es que esto no se debe a una mayor eficiencia de transfección en sí, sino a la mayor estabilidad de Gly 30 (por su capacidad de formas homodímeros resistentes a la degradación) que ya comienza a ponerse de manifiesto incluso a tiempos tan cortos como en este caso. De cualquier manera, todos los RNAs fueron detectables a tiempo 0 horas en comparación con las células control (la diferencia fue siempre estadísticamente significativa).

En conjunción con los resultados que se presentaron en el capítulo 1, se podría entonces concluir que los RNAs sintéticos de 35 nucleótidos son las moléculas idóneas para seguir trabajando porque son aquellas que se producen en estrés inducido por tratamiento con ARS y además no se evidenciaron diferencias tan grandes de estabilidad entre Gly de 35 nucleótidos y su respectivo control, SCR de 35 nucleótidos. En cambio, como puede verse en la Figura 22 C, hubo una diferencia en concentración intracelular muy pronunciada entre Gly y SCR de 30 nucleótidos, lo que los hace moléculas que no podrían, *a priori*, compararse entre sí adecuadamente dada la altísima diferencia de estabilidad entre ambas moléculas.

#### Los RNAs sintéticos son detectables dentro de la célula durante al menos seis horas

El siguiente paso fue visualizar, mediante la misma, técnica la estabilidad intracelular de los RNAs sintéticos de 35 nucleótidos (que hasta el momento fueron considerados como “comparables entre sí”) en células donadoras a las 6 horas post transfección para poder determinar por cuánto tiempo son detectables dentro de la célula, como se muestra en la figura 23 D. Una de las motivaciones para realizar este estudio fue determinar un tiempo relativamente adecuado para la obtención de EVs, ya que no tendría sentido coleccionar EVs en tiempos para los cuales el RNA intracelular ya pasaría a ser indetectable, pues eso implicaría obtener EVs desprovistas del RNA de interés.



**Figura 23.** Estabilidad intracelular de las mitades de tRNA de glicina en células MCF-7. A) Los niveles de Gly y SCR de 35 nucleótidos dentro de células son significativamente más altos en las dos condiciones (a 0 horas como ya se había evidenciado en Figura 21 y a 6 horas luego de la transfección) en comparación con los niveles medidos en células no transfectadas. B) Comparación del valor de Cq para Gly 35 (rojo), SCR 35 (negro) o Gly 30 (azul), en células transfectadas con Gly 35 (azul y rojo) o SCR 35 (negro). Estos resultados demuestran que Gly 35 no funciona como sustrato del fragmento de 30 nucleótidos. C) Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia de diferentes transfecciones con RNAs sintéticos Gly y SCR de 30 y 35 nucleótidos, 6 horas luego de la transfección. Los núcleos están representados por marca azul y los RNAs sintéticos por marca roja, según fue descrito en figuras anteriores. D) Cuantificación de las imágenes de (C), comparable a lo mostrado en la Figura 25 C, pero a las 6 horas post transfección.

Se pudo observar con claridad que la marca intracelular (APC) para Gly (35 nt) no varió significativamente dentro de las primeras 6 horas luego de la transfección (figura 23 A) en comparación con las células control, en donde lo que realmente se midió fue los niveles intracelulares de dicho fragmento endógeno. Algo relativamente similar sucedió con el RNA SCR, ya que si bien la diferencia entre muestras fue estadísticamente significativa entre las 0 y 6 horas ( $p$ -valor = 0.0005), también lo fue en comparación con las células control. A las 6 horas luego de la transfección hubo una menor concentración de RNA (tanto Gly como SCR) dentro de la célula, pero lo importante es que el RNA transfectado siguió siendo detectable a dicho tiempo, tanto por microscopía confocal de fluorescencia (Figura 23 D) como por *SL-RT-qPCR* (Figura 23 A). Al igual que lo observado a tiempo 0, los niveles de Gly 35 y SCR 35 parecerían ser similares a las seis

horas, sin diferencias de estabilidad evidentes, enfatizando las ventajas de este par frente al par Gly 30 / SCR 30 (Figura 23 D).

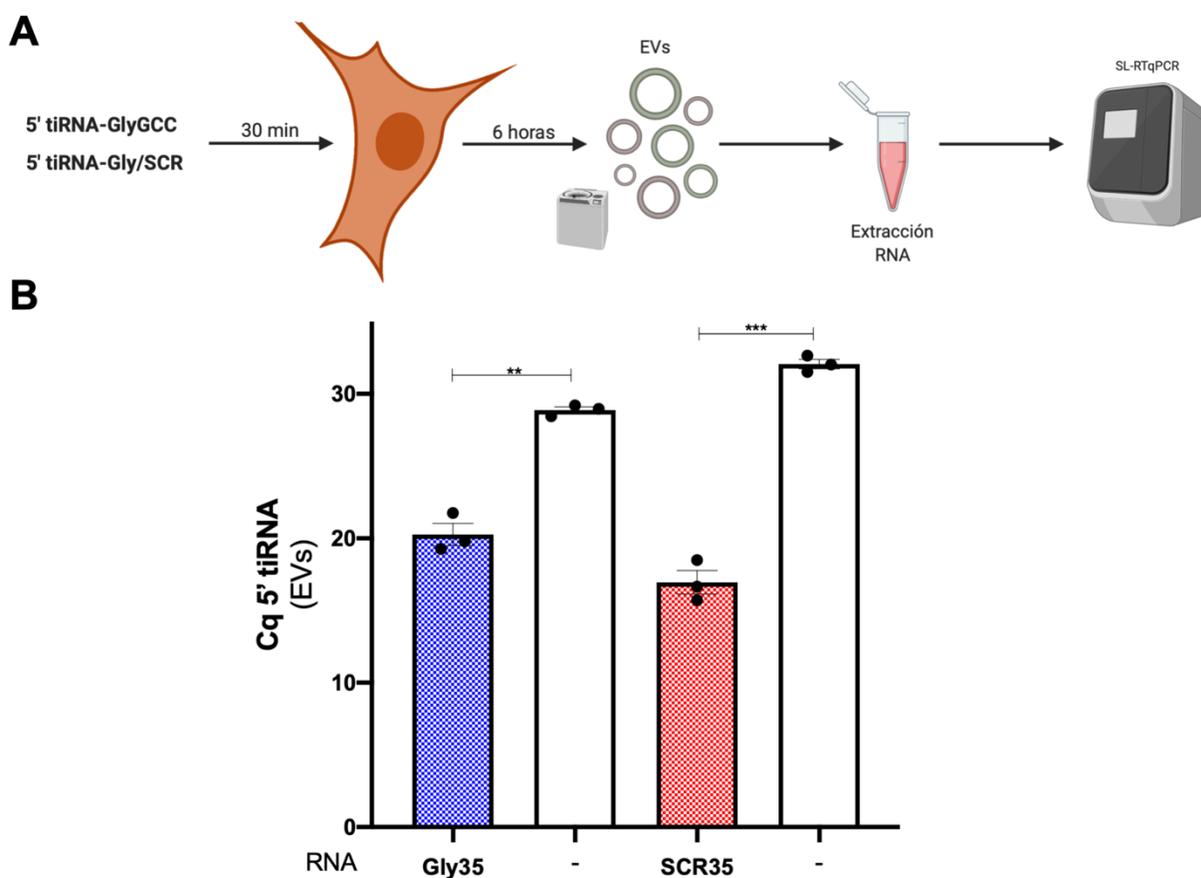
También se quiso observar si los fragmentos de 35 nucleótidos podrían funcionar como sustrato (parcial o totalmente) en la generación de los fragmentos de 30 nucleótidos (figura 23 B). Para esto lo que se hizo fue una *SL-RT-qPCR* del RNA proveniente de células transfectadas con Gly de 35 nucleótidos, utilizando cebadores tanto para Gly 30 y como para Gly 35. Si los de 35 nt fueran sustrato de los de 30 nucleótidos (por degradación endo o exonucleolítica), entonces Gly 35 disminuiría en concentración mientras que Gly 30 aumentaría proporcionalmente. De ser así, se habría esperado un gráfico con forma de tijera o de equis entre las curvas roja y azul (figura 23 B), pero esto no se observó. Ambos fragmentos tuvieron pendientes prácticamente similares (figura 23 B), lo que indica que Gly de 35 probablemente no funcione como sustrato del de 30 nucleótidos. La detección de Gly de 30 a un Cq de 18 en células transfectadas con Gly 35 muestra las inespecificidades propias del sistema de *SL-RT-qPCR*, pues la detección de ambos se realiza con el mismo *forward primer*, y la especificidad viene dada únicamente por las últimas seis bases del SL *primer*. Con todo, hay una diferencia de 4 ciclos de PCR entre lo observado con el set de primers adecuado (Gly 35) y el inespecífico (Gly 30, en este caso), lo que igualmente permite sacar conclusiones. Si bien la tasa de degradación de SCR de 35 nucleótidos fue más pronunciada (pendiente mayor), las diferencias de estabilidad son mucho menores que para el caso Gly 30 / SCR 30, como ya fue explicado.

Al transfectar con Gly y SCR de 30 y 35 nucleótidos y evaluar su estabilidad intracelular mediante microscopía confocal de fluorescencia, se vio que los patrones de marca de los RNAs (APC en rojo Figura 23 C) cambiaron en comparación con aquellos patrones de marca a tiempo 0 horas (figura 22 B). En este caso, todos los tratamientos presentaron un marcado homogéneo en vez de patrones con zonas de mayor presencia de marca, y la marca se presentó difuminada a lo largo y ancho de todo el citoplasma.

#### Gly 35 y SCR 35 se empaquetan y se secretan en EVs

Dado que los tRNAs (Gly y SCR) más inducibles por estrés fueron aquellos de 35 nucleótidos, además de ser los más similares entre sí en cuanto a estabilidad intracelular a lo largo del tiempo, se utilizaron estos RNAs para establecer su capacidad de empaquetarse dentro de EVs. Esto fue importante ya que dio un dato intermedio en la pregunta original de la transferencia de RNAs en EVs entre células. Demostrar su presencia en EVs nos acercó un paso más hacia el modelo de comunicación intercelular propuesto.

Para evaluar la presencia de RNAs sintéticos dentro de EVs, se transfectaron células U-2 OS con Gly y SCR de 35 nucleótidos, como se detalla en la figura 24 A. Luego de la transfección, las células se incubaron en medio sin suero durante 6 horas para colectar las EVs producidas en esa ventana de tiempo (que en teoría contendrían los RNAs dentro). Posteriormente, se purificaron EVs mediante ultracentrifugación y se extrajo el RNA de dentro de las EVs para evaluar los perfiles de Gly y SCR de 35 nucleótidos mediante *SL-RT-qPCR*. Estos ensayos fueron realizados en células U2-OS a raíz de los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 21 a nivel intracelular, y debido a que nuestro plan original era realizar los estudios de comunicación intercelular en esta línea celular, pues allí habíamos puesto a punto el modelo de estrés y la caracterización de los tRNAs en EVs (Capítulo 2). Como se verá más adelante, esta fue una elección desafortunada, pero en este momento no teníamos forma de saberlo.



**Figura 24:** Evaluación de los perfiles de Gly y SCR de 35 nucleótidos en EVs. Dichos RNAs están presentes en EVs. A) Diagrama de instancias, desde la transfección de células, incubación de EVs y purificación por ultracentrifugación y posterior extracción de RNA vesicular para evaluación de perfiles mediante *SL-RT-qPCR*. B) Las secuencias de Gly y SCR de 35 nucleótidos están presentes y son estables dentro de EVs durante un mínimo de 6 horas de incubación luego de la transfección. Se compararon los niveles de RNA dentro de EVs de células que se transfectaron contra células control (con RNA endógeno empaquetado por la célula).

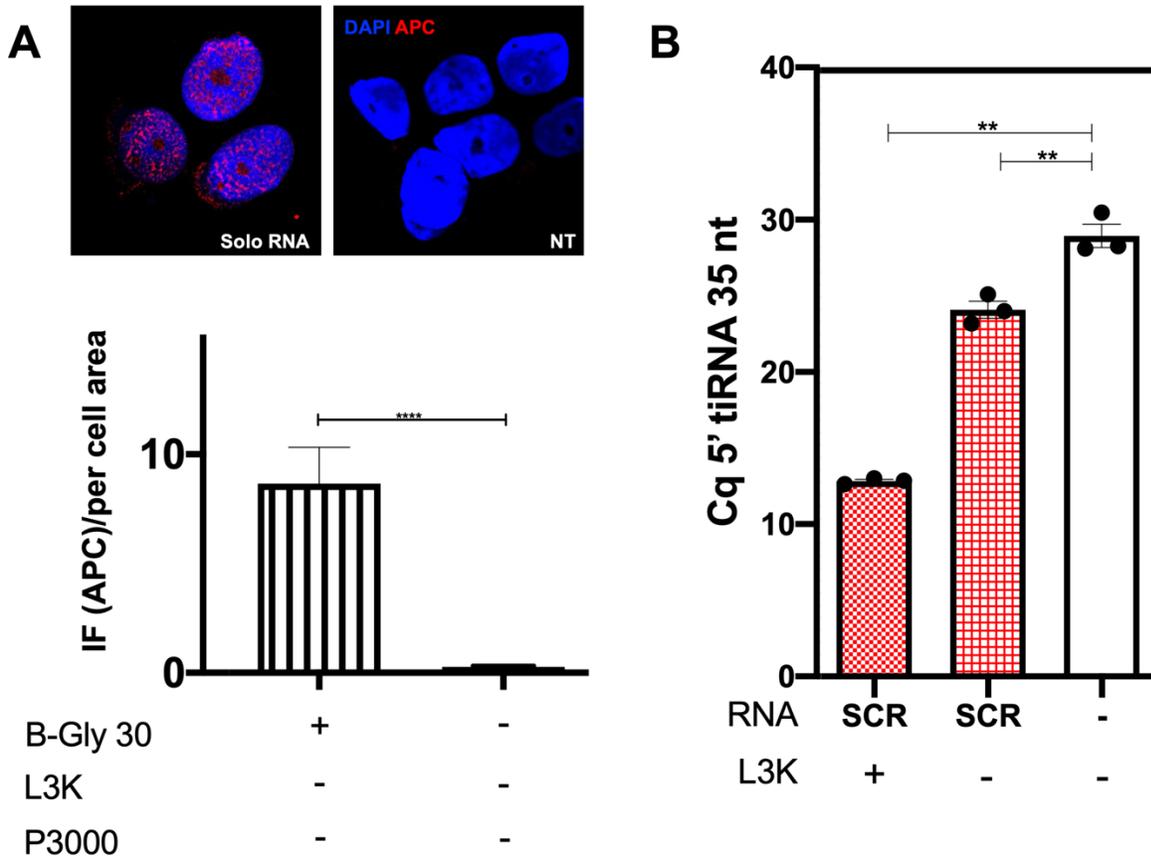
Como conclusión, cabe mencionar que el RNA transfectado es capaz de empaquetarse dentro de EVs y es estable dentro de estas nanopartículas durante al menos seis horas.

Para evaluar si las EVs tendrían en teoría la capacidad de actuar como mediadoras en la comunicación intercelular, el paso siguiente fue estudiar si estas EVs se pueden internalizar dentro de otras células (ceptoras) y entregar su contenido, lo que será el motivo de estudio en el capítulo 5. Pero antes debemos abrir un paréntesis para hablar de la captación espontánea de RNAs no vesiculares.

## Capítulo 4: captación espontánea de RNA

### ¿Podrían Gly y SCR incorporarse espontáneamente dentro de células MCF-7?

Durante los primeros ensayos de transfección de RNAs sintéticos en células MCF-7, en la realización de experimentos de puesta a punto de los ensayos de transfección, se incluyó controles donde el RNA sintético se incubó sin L3K con las células. Contrario a lo que cabría esperarse, se observó con claridad que el RNA sí se incorporaba de manera espontánea en las células (Figura 25). La marca parecería concentrarse en el núcleo y la zona perinuclear, aunque la intensidad de fluorescencia fue significativamente más baja que la de las células expuestas a RNA sintético biotinilado con L3K, como es lógico. Las células no expuestas a RNA no presentaron marca, descartando que se tratara de un artefacto ocasionado por autofluorescencia o por problemas de lavado de la estreptavidina-APC, siendo la diferencia entre muestras expuestas y no expuestas al RNA estadísticamente significativa. Potencialmente, este resultado fue nuestra primera aproximación a que el RNA podría llegar a ingresar espontáneamente dentro de la célula (es decir, sin la necesidad de agentes de transfección como lípidos catiónicos) y en este caso particular, dirigirse al núcleo (Figura 25 A). Sin embargo, este resultado no se reprodujo al repetir el experimento, y por casi un año no seguimos investigando en la temática por considerarlo un resultado artefactual.

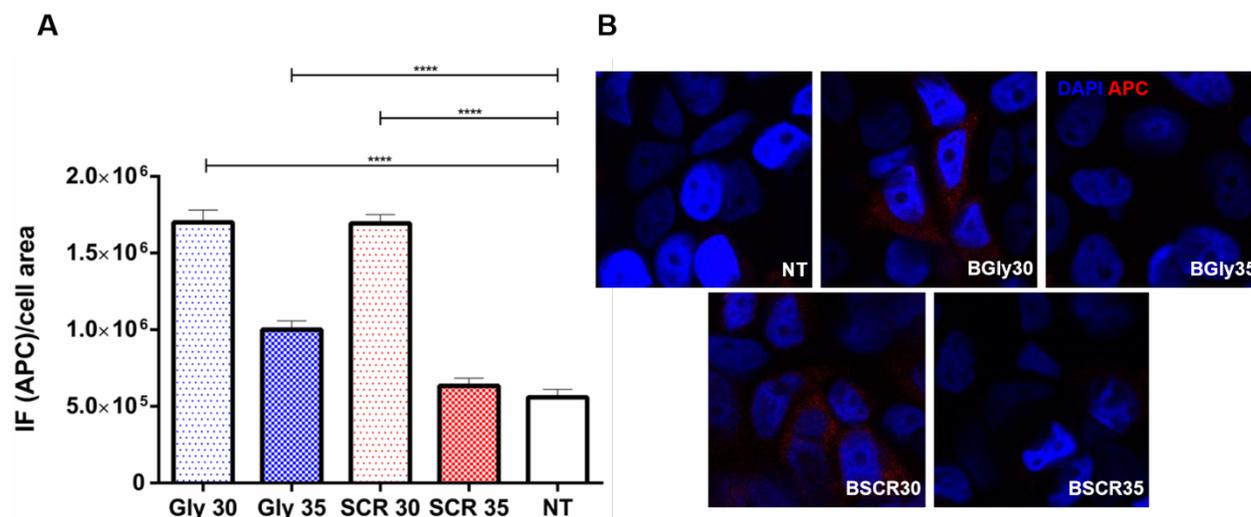


**Figura 25:** Primera aproximación al uptake espontáneo de RNA en células. El RNA podría estar ingresando dentro de la célula de manera espontánea. A) Gráfica de intensidad de fluorescencia (APC) por área celular. Muestra que el RNA biotinilado ingresó a las células a niveles significativamente mayores a las células control. B) *SL-RT-qPCR* de RNA extraído de células demostró que SCR de 35 nucleótidos también se incorpora espontáneamente (adaptado de la Figura 21, B).

Un año después, al volver a incluir un control sin L3K en uno de nuestros experimentos de transfección, esta vez en células U2-OS y midiendo por *SL-RT-qPCR*, se volvió a observar que incorporación espontánea del RNA SCR 35 (Figura 21 B, y detalle en la Figura 25 B). La diferencia entre el Cq de SCR en células incubadas sin L3K y el Cq de SCR en células control (no expuestas a RNA) fue estadísticamente significativa. Claramente, se volvió a repetir el hecho de que los niveles de incorporación fueron abundantemente inferiores al de células transfectadas (+L3K), pero esto no debería sorprender. No obstante, esta vía de internalización comenzó a captar nuestra atención, por lo que decidimos comenzar a investigarla con mayor detalle. En definitiva, si la captación de estos RNAs cortos ocurre de forma espontánea (¿por endocitosis?) esto podría tener implicancias en la función biológica de los RNAs extracelulares no vesiculares, que venimos desde hace un buen tiempo estudiando (Tosar et al. 2015, 2018, 2020).

### Gly y SCR de 30 nucleótidos son captados espontáneamente por la célula

Dados los resultados preliminares antes descritos, se incubó Gly y SCR de 30 y 35 nucleótidos a 400 nM durante 30 minutos con células MCF-7. Utilizamos esta línea celular ya que, debido a su baja expresión de ribonucleasas (figura 9), se facilitaría la visualización de los RNAs marcados mediante microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados se presentan a continuación en la figura 26.



**Figura 26:** Efecto del largo de secuencia en la eficiencia de captación espontánea de Gly y SCR mediante microscopía confocal de fluorescencia. A) Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de la estreptavidina-APC por área celular. Tanto Gly como SCR de 30 nucleótidos parecerían ingresar a la célula de manera espontánea sin ayuda de agentes de transfección. B) Imágenes representativas utilizadas para construir el gráfico anterior. Parámetros de marcaje y adquisición igual que en las imágenes anteriores.

El análisis de las imágenes de la Figura 26 permite observar que tanto Gly de 30 nucleótidos como SCR de 30 nucleótidos pueden ser detectados intracelularmente a niveles similares y significativamente superiores al del control no expuesto a RNA ( $p$ -valor  $< 0.0001$  y  $p$ -valor = 0.0002, respectivamente). El hecho de que hayan cantidades similares de Gly y de SCR de 30 nucleótidos podría deberse a que solamente los monómeros, y no los dímeros, de Gly 30 logran ingresar a la célula, por lo que dejaría de observarse la diferencia de estabilidad entre Gly 30 y SCR 30 previamente observada (Figuras 22 y 23). De cualquier manera, el RNA captado fue significativamente menor que cuando se utilizó L3K (y por eso la marca apareció relativamente tenue), lo que fue de esperarse. Se observó un patrón de marcaje de carácter difuminado, en vez de concentrarse la señal en forma de cúmulos. Estos resultados reproducen parcialmente los resultados previos obtenidos por microscopía confocal de fluorescencia (Figura 25 A), aunque en esta ocasión no pudimos reproducir la marcación a nivel nuclear. También son estos resultados concordantes con los obtenidos en U2-OS mediante *SL-RT-qPCR*

(figura 21 B y 25 B), aunque la incorporación de SCR 35 parecería ser aquí mucho más baja, e indistinguible del control.

Cabe señalar que estudios anteriores ya habían mostrado la capacidad de ciertas mitades de tRNA de ser incorporadas espontáneamente por las células (Ivanov et al. 2014). Sin embargo, se creyó que esta propiedad era exclusiva de las mitades de tRNA-Ala y de tRNA-Cys debido a su capacidad de formar estructuras estabilizadas por G-cuádruplex. Nuestros resultados, en cambio, apuntan a una generalización en la captación de este tipo de secuencias, incluyendo la de SCR que es una secuencia fabricada que no tiene correlato a nivel endógeno.

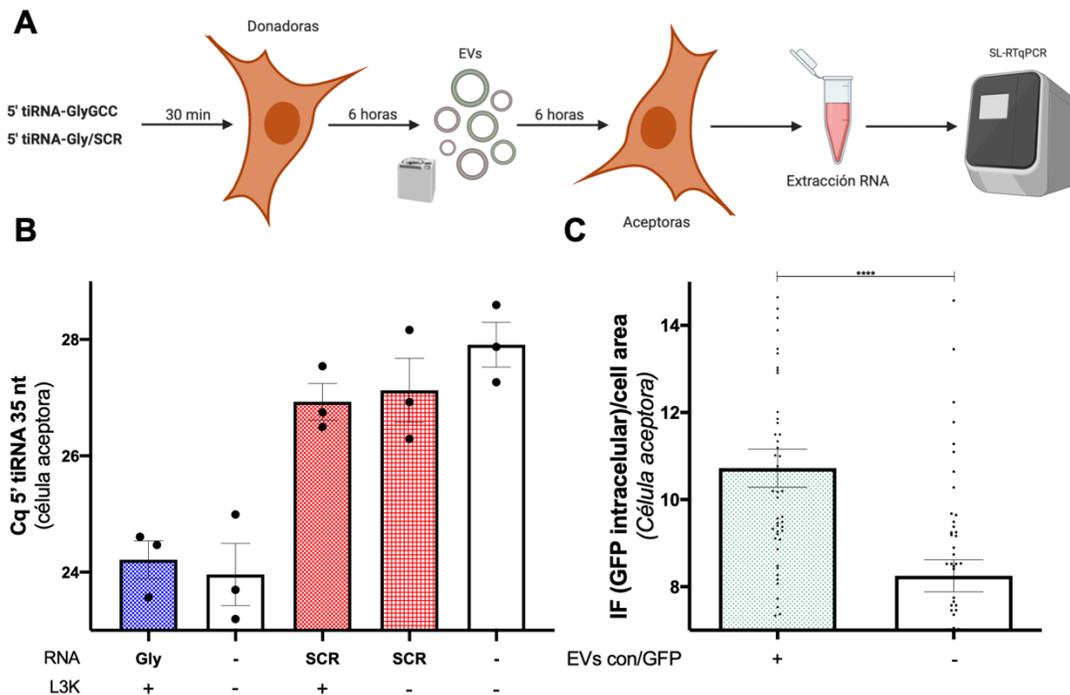
Tal vez el resultado más sorprendente de la Figura 26 es la posibilidad de que la captación espontánea esté restringida a RNAs cortos. Lo observado para Gly 30 y SCR 30 no pudo reproducirse con Gly 35 y SCR 35, cuyos niveles intracelulares no distaron significativamente del control. Esto podría deberse a una mayor densidad de cargas negativas que dificulten el transporte a través de la membrana plasmática, o a las especificidades de un receptor de superficie no identificado, que esté favoreciendo la captación espontánea de ciertos RNAs, con restricciones a nivel del tamaño y/o estructura (por ejemplo, por endocitosis mediada por receptor). Estudios posteriores deberán ahondar en estas posibilidades, pero la posibilidad de una captación espontánea de ciertos RNAs provenientes del medio extracelular puede llegar a ser potencialmente muy importante. La captación espontánea de mitades de tRNA de glicina de 30 nt es una observación muy llamativa, pues estos son los fragmentos más abundantes en la fracción no vesicular del medio extracelular (Tosar et al. 2015, 2018, 2020). Las implicancias potenciales de esto se discutirán más adelante.

## Capítulo 5: Transferencia entre células

Luego del paréntesis abierto durante el capítulo 4, retomamos aquí el estudio de la incorporación de RNAs presentes en EVs. En este capítulo se estudió la transferencia efectiva de fragmentos de tRNA sintéticos dentro de EVs, tanto en células MCF-7 como U2-OS, y por metodologías completamente ortogonales, como *SL-RT-qPCR* y microscopía confocal de fluorescencia. A diferencia del capítulo 4, se volvió a trabajar aquí con Gly y SCR de 35 nucleótidos, por las razones discutidas en profundidad durante el capítulo 2.

### La estabilidad intracelular de 5' tiRNAs en células receptoras depende de cada línea celular

En primer lugar, se estudió la transferencia de Gly y SCR de 35 nucleótidos en células U-2 OS. Para ello, se transfectaron células “donadoras” con dichos RNAs sintéticos a 400 nM y se purificaron las EVs provenientes del medio condicionado luego de 6 horas de incubación. Además, sabiendo que el RNA se capta e incorpora a la célula también de manera espontánea (capítulo 4), se intentó conocer si la sensibilidad de la técnica permitiría detectar la transferencia a través de EVs de RNAs captados de forma espontánea por las células donadoras. Las EVs se purificaron mediante ultracentrifugación y se incubó dichas EVs purificadas con células U-2 OS “receptoras” durante 6 horas adicionales (figura 27 A).



**Figura 27:** La *transferencia mediada por EVs de Gly y de SCR de 35 nucleótidos no es observable en células U-2 OS WT*. A) Representación gráfica del modelo que se utilizó para evaluar los niveles del RNA sintético transferido entre células U-2 OS. B) Transferencia de Gly y SCR de 35 nucleótidos entre células U-2 OS C) Transferencia de GFP desde células U-2 OS GFP+ a células U-2 OS WT mediante EVs.

No se pudo observar una transferencia efectiva de fragmentos de tRNA-GlyGCC de 35 nucleótidos en EVs mediante SL-RT-qPCR entre células U-2 OS donadoras y receptoras (figura 27 B). Considerando este resultado, fue de esperarse que el RNA que se incubó sin L3K con las células donadoras tampoco lograra medirse en células receptoras. Nuestra interpretación es que la línea celular U2-OS posee una actividad endonucleasa intracelular relativamente alta, en comparación con las células MCF-7 (Figura 9). Por tanto, el tiempo que dichos RNAs se mantienen en el ambiente intracelular (6 horas) en células donadoras mientras se liberan las EVs y las 6 horas que se incuban las EVs con células receptoras podrían ser un factor clave que haga que no se esté visualizando una transferencia efectiva de RNA. Además, Gly de 35 nucleótidos no es igual de estable que su “primo” de 30 nucleótidos, ya que no formaría homodímeros estructuralmente resistentes a las ribonucleasas, facilitando su degradación dentro de las células. Aunque estas no son las únicas razones que podrían estar haciendo que no se viera una transferencia de RNAs entre células. También podría ocurrir que la L3K esté afectando estructuralmente la membrana plasmática de la célula donadora y esto afecte la composición de las EVs y su posibilidad de ser internalizadas. Esto significaría que podría haber problemas de captación de EVs por parte célula receptora dada la integridad estructural de las EVs o podría ser simplemente que las EVs no tienen la capacidad de ser internalizadas por motivos y mecanismos que se desconocen, en oposición de ciertos reportes anteriores - incluidos los nuestros – (Gámbaro et al. 2020), pero en apoyo de algunos *pre-print* recientes (Albanese et al. 2020; Somiya y Kuroda 2021).

#### GFP se transfiere entre células U-2 OS a través de EVs

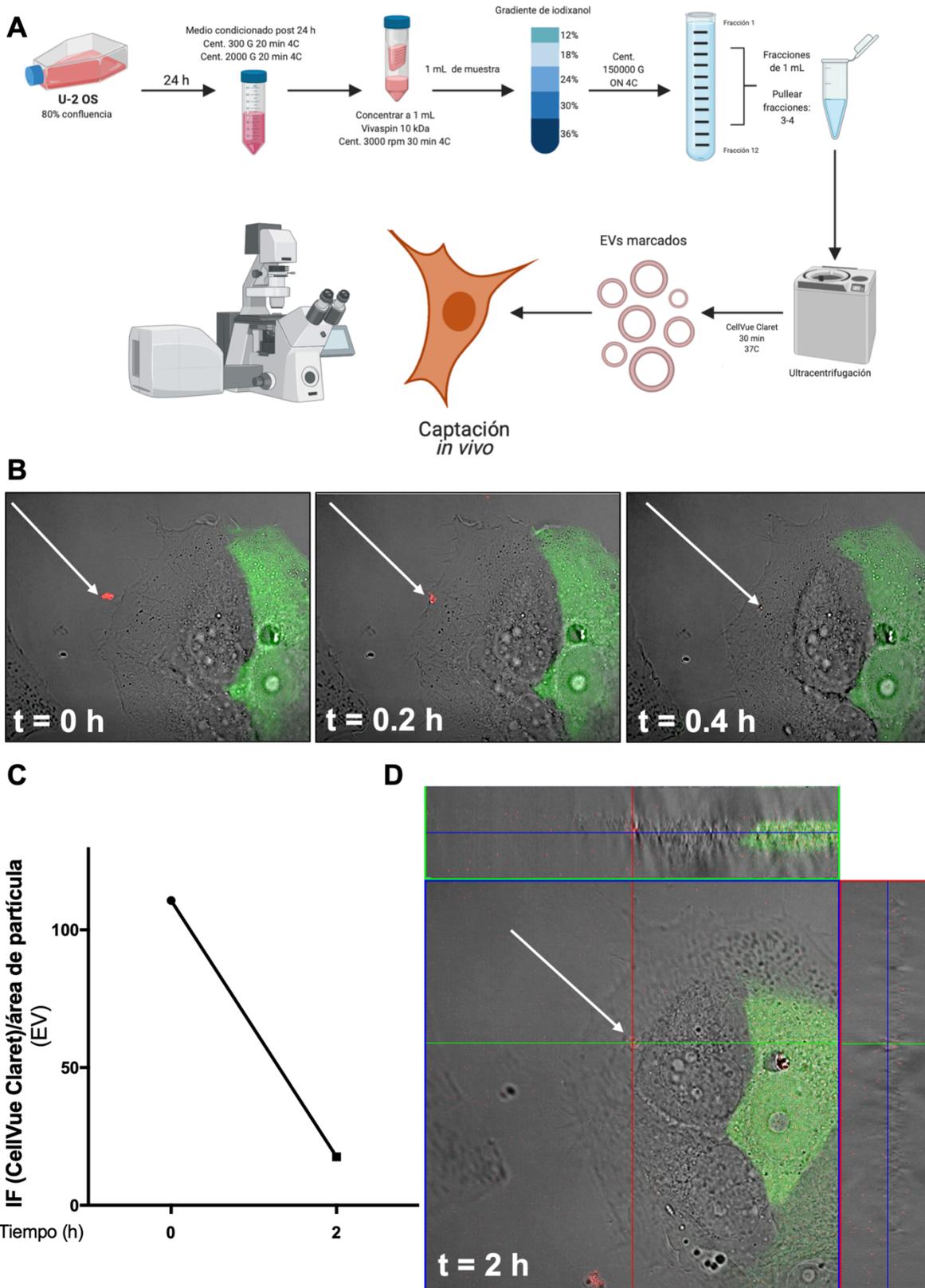
Para resolver el problema de la captación, se realizó un ensayo mediante el cual se intentó evidenciar la transferencia de la proteína verde fluorescente (GFP) como manera alternativa para evidenciar transferencia de partículas entre células mediada por EVs. Para esto, se incubó células U-2 OS GFP+ y se purificaron EVs producidas por estas células durante 24 horas. Dichas EVs se purificaron por ultracentrifugación y se incubaron con células U-2 OS WT (que no expresan GFP) en una razón 4000:1. Es decir, el producto en EVs de 4000 células U-2 OS GFP+ por cada célula receptora U-2 OS WT. Esta razón es muchísimo mayor a la utilizada en los ensayos de transferencia de RNA (4:1), pero consideramos necesitar un número elevado de proteínas fluorescentes dentro de cada célula receptora para poder distinguir esta señal de la autofluorescencia celular. Los resultados dejaron en evidencia que posiblemente hubo transferencia de GFP entre células, a juzgar por niveles significativamente mayores de fluorescencia en el canal

verde para las células incubadas con EVs provenientes de células GFP+ (figura 27 C) ( $p$ -valor  $< 0.0001$ ), aunque la intensidad de fluorescencia se encuentra cercana a la fluorescencia de fondo (*background*). Un control oportuno que se podría haber incluido en este caso sería incubar células WT con EVs provenientes de células WT, para descartar que el aumento de la fluorescencia no se deba a una variación en la autofluorescencia celular fruto de la incubación con EVs. Con todo, este resultado preliminar sugiere que las EVs sí pueden actuar como vehículos para la transferencia de macromoléculas entre células U2-OS, debiendo buscar explicaciones alternativas para los resultados negativos de la Figura 27, B.

#### La incorporación de EVs se da, en parte, por endocitosis (probablemente macropinocitosis)

Se decidió que una de las maneras más adecuadas de dejar en evidencia la internalización de EVs por la célula aceptora sería seguir a la EV en su trayectoria desde el medio extracelular hacia el ambiente intracelular por técnicas de microscopía confocal de fluorescencia *in vivo* o en tiempo real (*live cell imaging*). Esto es importante, también, para entender si la fusión de EVs (con su correspondiente cargo) con la célula que la recibe es un proceso prácticamente instantáneo, donde la EV libera su contenido al fusionarse con la membrana plasmática, o si este proceso requiere de cierto tiempo y de mecanismos intracelulares que ayuden en la internalización del cargo. Poseer este tipo de información cinética puede ser crucial para establecer el marco temporal más apropiado para los siguientes experimentos.

Para poder visualizar EVs mediante microscopía confocal fue necesario purificar EVs provenientes de células U-2 OS a partir de medios condicionados durante 24 horas. Dichas EVs se purificaron mediante gradiente de iodixanol, ya que esta metodología permite separar lo vesicular de lo extravesicular, como agregados ribonucleoproteicos, que podrían incorporar parte del *dye* utilizado para marcar EVs, dificultando la interpretación de los resultados, además de que las EVs se aglutinan al ser colectadas sobre el fondo de un tubo de ultracentrífuga (Linares et al. 2015), lo que podría alterar su captación por célulasceptoras. Se tomó las fracciones vesiculares (F3 – F4) y se marcó EVs con un marcador lipídico (CellVue Claret), que permitió generar una tinción fluorescente de la membrana vesicular. Las EVs luego se incubaron con células U-2 OS GFP+ para poder estudiar su captación e internalización al microscopio confocal *in vivo*, en una cámara de temperatura y CO<sub>2</sub> controlados de modo tal de poder tomar videos de larga duración. El protocolo se detalla claramente a continuación en la figura 28 A y las imágenes en la Figura 28 B.



**Figura 28:** Captación *in vivo* de EVs marcadas en células U-2 OS. Las EVs son captadas e internalizadas por las células. A) Modelo gráfico de incubación de EVs, purificación mediante

gradiente de iodixanol, marcación con tinción lipídica CellVue Claret e incubación de EVs marcadas con células *in vivo*. B) Trayectoria de un cúmulo de EVs desde el medio extracelular hacia el interior de una célula GFP- a través de la membrana plasmática, durante 2 horas de adquisición del video. La luz transmitida está representada en escala de grises (contraste de fases por interferencia diferencial, luz transmitida), el citoplasma de células GFP+ en verde y las EVs marcadas con CellVue Claret se visualizan en el canal rojo. C) Representación gráfica de la diferencia de intensidad de fluorescencia del cúmulo de EVs (partícula roja) a tiempo 0 horas y 2 horas en el plano focal. D) Imagen del plano focal a tiempo final (2 horas) del punto de deposición de la partícula (cúmulo de EVs). Las imágenes en el lateral superior y derecho muestran cortes ortogonales del apilado en el eje zeta. El cúmulo de EVs efectivamente se encuentra dentro de la célula y no apoyado sobre su superficie.

Ya establecido el protocolo para marcar EVs de manera efectiva fue sencillo poder seguir su trayectoria desde el medio extracelular y hacia el ambiente intracelular. Se visualizó que el cúmulo de EVs<sup>4</sup> encontrado originalmente en el medio extracelular (figura 28 B y D, señalado con una flecha blanca) se dirige hacia el interior de la célula, luego de ser endocitado mediante un mecanismo que parece estar vinculado a la macropinocitosis (video disponible en la nube: [t.ly/7n45](https://t.ly/7n45)). Este pequeño cúmulo de vesículas marcadas se dirigió a través de la membrana plasmática y continuó hacia el interior celular, con trayectoria directa hacia la zona perinuclear. Sobre el frente izquierdo de la célula, por el que ingresa el cúmulo de EVs, se vieron protrusiones de la membrana (se asemejan a dedos y corresponden probablemente a filipodios) que englobaron al cúmulo y lo internalizaron rápidamente (en cuestión de menos de 10 minutos). En los videos puede apreciarse que, luego del contacto, ocurre una retracción de estos filipodios que ejerce tracción y atrae el cúmulo de EVs hacia la membrana plasmática, sugiriendo una captación activa de los mismos. Al ingresar en la célula, el cúmulo de EVs rápidamente se dirigió por el citoplasma en dirección al núcleo, lo que lo hizo cambiar de plano focal (figura 28 B). La pérdida de fluorescencia observada durante el video puede estar dada porque las EVs cambiaron de plano focal y el microscopio utilizado no permite realizar ajustes en zeta durante la adquisición de videos. Además, la fluorescencia del fluoróforo pudo decaer por estar estimulándose durante mucho tiempo (*photobleaching*). Por último, pudo ocurrir en algún momento una fusión entre las membranas de las EVs que forman el cúmulo y la membrana endosomal, diluyendo la señal en una membrana ahora de mayor tamaño. Por tanto, se pudo estar perdiendo marca de tinción en el momento de la internalización y *a posteriori* fruto del contacto de ambas membranas. Para evitar el efecto debido al cambio en el plano focal, la intensidad de fluorescencia de la partícula se adquirió en el nuevo plano focal una vez finalizadas las dos horas de adquisición del video (Figura 28 C). Por tanto, se obtuvo el decaimiento real de la intensidad de fluorescencia de la partícula (por alguno de los mecanismos ya expresados). La célula que internaliza el cúmulo de EVs no expresaba GFP, mientras que una célula vecina sí lo hacía (figura 28 D). Esta heterogeneidad a nivel de la expresión de GFP en las células

---

<sup>4</sup> Consideramos que EVs únicas y aisladas no poseen suficiente marca como para poder identificarse por esta técnica

U-2 OS GFP+ fue sin embargo beneficiosa para este ensayo, ya que no tuvimos problemas de “derrame” del canal verde al canal rojo para la célula de interés, mientras que la célula verde de la derecha nos sirvió para estimar la altura celular en el plano Z y confirmar que la marca que se visualizó dentro de la célula GFP- se encontraba efectivamente en el interior de la célula y no posada sobre su superficie.

Los controles para este experimento fueron células expuestas a EVs marcadas que se trataron con NP 40 al 1% del volumen total previo a realizar el gradiente de iodixanol. Este detergente debería romper la integridad de la membrana de las EVs, y por tanto, no se separarían dentro del gradiente de igual manera que las EVs enteras. Como consecuencia, podríamos descartar que el cúmulo de EVs observado en el experimento anterior se debiera a fenómenos de agregación en micelas de estos “dyes” lipofílicos (Simonsen, 2019). Además, se incubó células con un volumen idéntico de CellVue Claret en PBS, pero sin EVs, por el mismo motivo. En ninguno de estos dos casos control se observaron partículas fluorescentes en el medio de cultivo. Por tanto, con estos resultados se pudo concluir que las EVs derivadas de células U-2 OS poseen todas las características necesarias para ser internalizadas por células receptoras y que poseen la capacidad de ser endocitadas hacia el interior de la célula, en donde liberarían su carga. Tomados en su conjunto, los resultados de estos dos últimos capítulos sugieren que los resultados (negativos) obtenidos en la Figura 27 A tienen que tener su explicación en lo que sucede con el RNA una vez incorporado por la célula, y no con la posibilidad de internalización de las EVs. También podrían haber efectos a nivel del escape endosomal, lo que necesariamente debería ocurrir para poder obtener RNAs marcados distribuidos en el citoplasma de las células.

#### La línea celular U2-OS es inadecuada para el estudio de la transferencia intercelular de RNAs debido a su alto metabolismo del RNA.

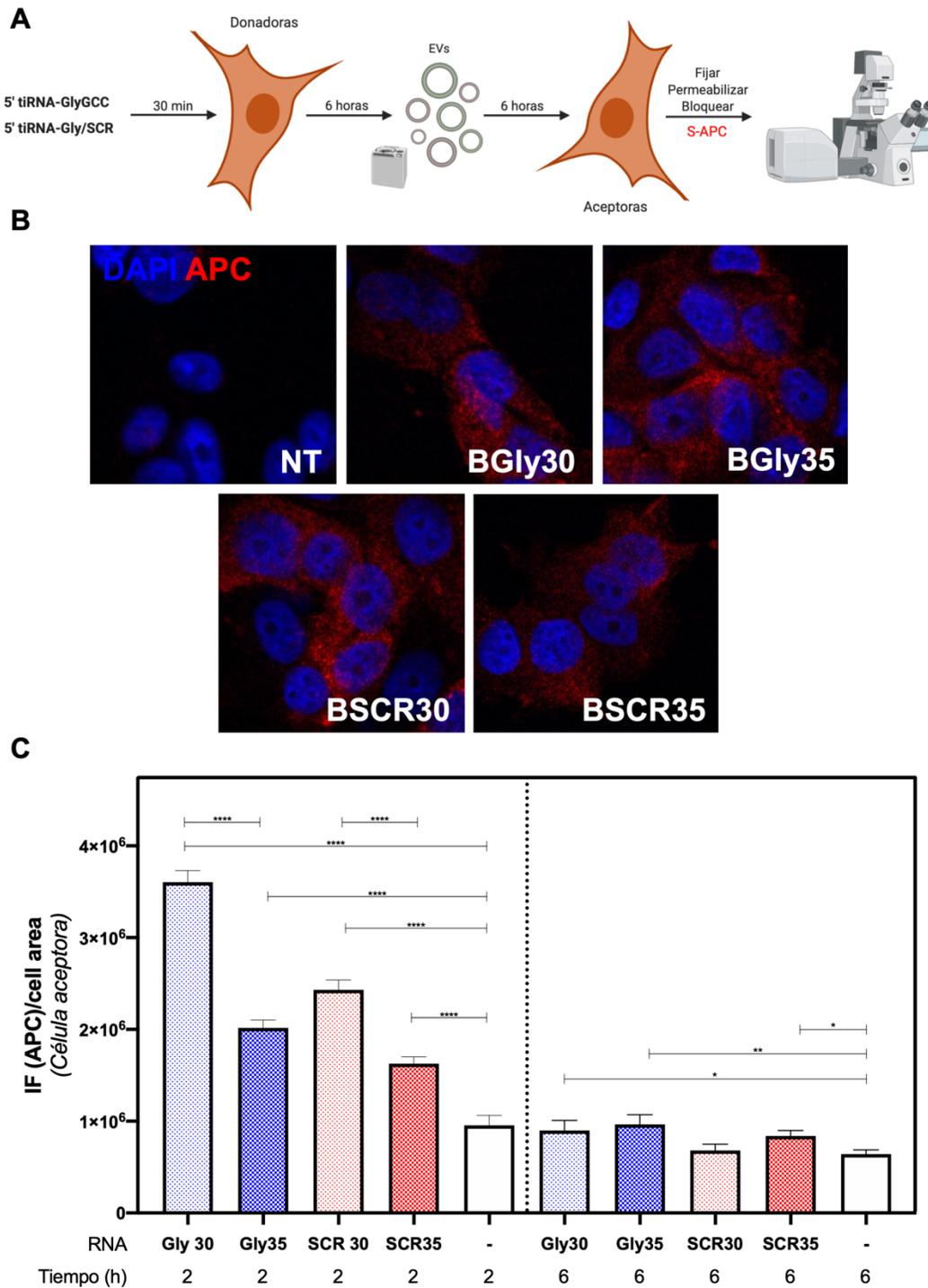
Se realizó un experimento en donde se transfectó Gly y SCR biotinilados de 35 nucleótidos en células U-2 OS WT y no se pudo detectar la marca (leída mediante estreptavidina-APC) mediante microscopía confocal de fluorescencia (datos no mostrados). Más tarde, se repitió el mismo experimento con los mismos RNAs sintéticos biotinilados pero ahora de 30 nucleótidos, y tampoco se logró obtener una señal apreciable para SCR 30. Si bien Gly 30 sí pudo ser detectado – consecuente con su mayor estabilidad intracelular – la señal fue de todos modos mucho más baja que en los experimentos realizados en células MCF-7 (datos no incluidos). En consecuencia, se decidió que los estudios de transferencia intercelular se harían en células MCF-7, tanto en calidad de células donadoras como receptoras de EVs.

### Gly y SCR sintéticos se transfieren entre células MCF-7 mediante EVs

Hasta este momento, no sabíamos<sup>5</sup> si los RNAs sintéticos podrían transferirse entre células y, en base a los datos presentados hasta aquí, se optó por alterar el modelo celular para intentar detectar los RNAs en células receptoras por microscopía confocal de fluorescencia. Considerando que la expresión y posiblemente la actividad endonucleolítica en células U-2 OS es considerablemente más alta que en MCF-7 (Figura 9), y los resultados desalentadores obtenidos en U-2 OS, donde no fue siquiera posible visualizar los RNAs biotinilados en las células transfectadas, se utilizaron células MCF-7 para realizar estos ensayos. Se transfectaron células MCF-7 con Gly y SCR biotinilados de 30 y 35 nucleótidos. Se purificaron por ultracentrifugación las EVs producidas por estas células durante las primeras 6 horas luego de la transfección, para luego incubarlo con células MCF-7 receptoras durante 2 y 6 horas. Los resultados se presentan a continuación en la figura 29. Así, además de evaluar la capacidad de captación e internalización de estos RNAs por células MCF-7 mediante microscopía confocal de fluorescencia, se evaluó también su estabilidad intracelular en células receptoras luego de la internalización.

---

<sup>5</sup> En realidad, contamos con los datos ya publicados en Gámbaro et al. 2020, pero los mismos están restringidos a las mitades de tRNA de glicina de 30 nt, y algunas otras secuencias del mismo largo.



**Figura 29:** Captación y estabilidad de RNAs sintéticos en células MCF-7 receptoras de EVs. A) Representación gráfica del modelo experimental para demostrar captación de RNAs sintéticos transferidos entre células mediante EVs. B) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células MCF-7 receptoras incubadas con EVs, durante 2 horas, provenientes de células transfectadas a 400 nM con RNAs sintéticos marcados con biotina. C) A las dos horas, todos los RNAs sintéticos transfectados en la célula donadora, empaquetados en EVs y transferidos entre células son detectables en las células receptoras a niveles significativamente superiores en comparación con células control (incubadas con EVs)

provenientes de células no transfectadas). Para las columnas que representan un tiempo de incubación de 6 horas, solamente Gly de 30 y 35 nucleótidos permanecen ligeramente por encima de los valores hallados en las células control.

A diferencia de los resultados obtenidos en células U-2 OS, todos los RNAs probados pudieron ser detectados de forma fiable a las 2 horas luego de la incubación con EVs. Además, se obtuvo una marca difusa en el citoplasma de las células, sugiriendo que los RNAs incorporados lograron escapar de los endosomas y así evitar su degradación lisosomal. Llamativamente, el perfil intracelular en células receptoras de todos los RNAs sintéticos en cuestión luego de 6 horas de incubación cambia drásticamente en comparación con lo que ocurre a las 2 horas. En esta ventana de tiempo, pareció ser que el RNA se degradó lo suficiente como para volverse casi indetectable por esta técnica. No todas las células mostraron marca de estreptavidina-APC (rojo): muchas aparecieron sin marca mientras que a las 2 horas, una cantidad superior al 90% de las células presentaban marca roja en su interior.

Finalmente, con estos resultados, se dio por concluido que el RNA sintético transfectado en células donadoras puede ser empaquetado en EVs y luego transferido hacia células receptoras, donde las EVs serían internalizadas mediante algún tipo de endocitosis, cuyo detalle molecular será abordado en trabajos futuros. El RNA no pareció dirigirse a una localización subcelular en particular, tal como los lisosomas, sino que se observó un patrón de diseminación homogéneo a las 2 horas de incubación de EVs con células receptoras, sugiriendo que, de algún modo, lograron escapar tanto de las EVs como de la membrana endosomal. Por tanto, la siguiente pregunta es clara: el RNA sintético transfectado en células donadoras y transferido hacia células receptoras, ¿es capaz de interactuar con alguna proteína o RNA y así alterar la expresión génica de las células receptoras? ¿Cuáles son, en dicho caso, sus blancos moleculares? Y ¿Serán estos eventuales efectos dependientes de la secuencia nucleotídica específica de Gly, o será que la respuesta no es dependiente de secuencia y se observa también en el caso de SCR?

## **Capítulo 6 (Epílogo): hacia la identificación de los blancos moleculares de Gly 35 transferido mediante EVs y de Gly 30 captado de forma espontánea del medio extracelular**

A modo de conclusión de esta tesis, es importante mencionar que se realizó el secuenciado de RNA de células incubadas con EVs provenientes de células transfectadas con los RNAs sintéticos de 35 nucleótidos: Gly y SCR, o con EVs de células no transfectadas (NT). Cabe recordar que se encontró que el 5' tiRNA-GlyGCC de 35 nucleótidos es aquel, entre las diferentes especies de Gly que se producen en estrés, que se genera en mayor medida. Además, se encontró que dichas moléculas se pueden empaquetar en EVs fruto del estrés (figura 19 B). Se demostró la transferencia efectiva entre células MCF-7 de Gly 35 sintético y de SCR 35 y se demostró que es detectable al menos dos horas después de comenzada la incubación de las células con las EVs provenientes de células transfectadas con estos RNAs (figura 29 C). Por tanto, llegamos al punto de inflexión entre el trabajo realizado y las perspectivas del mismo: todos los esfuerzos anteriores convergen en realizar un secuenciado del RNA de las células receptoras para ver qué cambios transcriptómicos se generaron fruto de la llegada de EVs cargadas con Gly y SCR de 35 nucleótidos (vs EVs provenientes de células no transfectadas). Esto sería como sembrar una gran red de pesca por el océano para intentar “atrapar” alguno de los efectos que ocurrirían río abajo de la llegada de tiRNAs en EVs, y a partir de ello, poder generar nuevas hipótesis y continuar con los estudios del laboratorio. Aunque la realización de este análisis y ensayos siguientes trasciende los límites de esta maestría. Pero al menos sabemos que traemos datos suficientes como para pensar en las siguientes etapas.

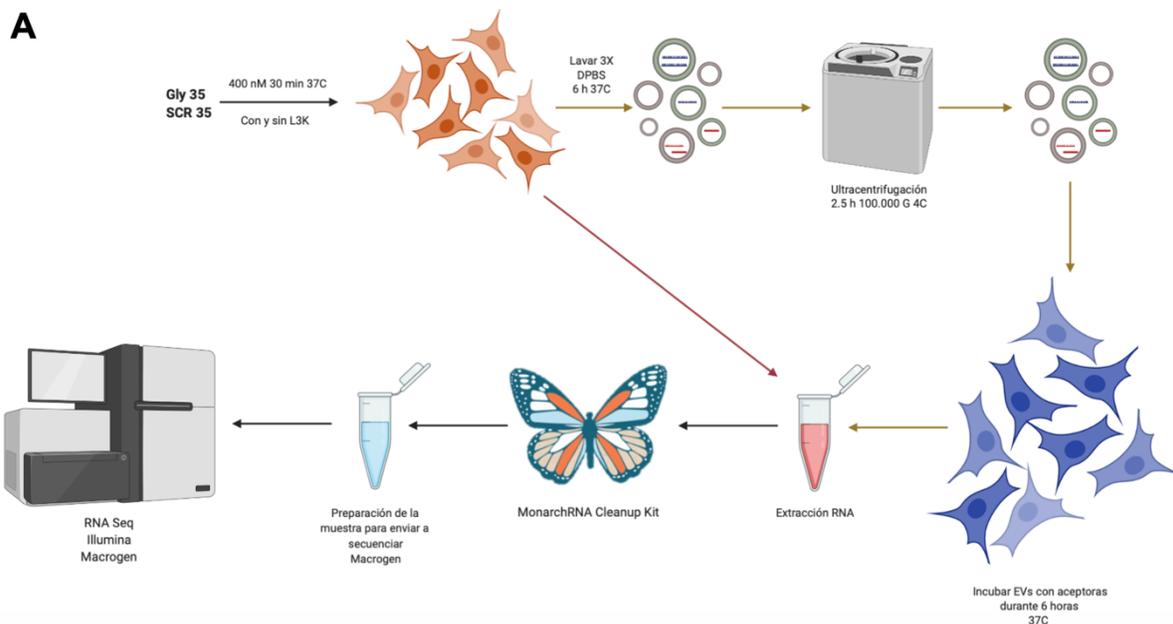
En los microarreglos presentados en el prelude de este trabajo de maestría, las EVs llegaban cargadas con RNA (Gly de 30) o prácticamente sin RNA en el caso del experimento control, o en mucho menores cantidades (SCR 30). Como se dijo, eso trajo aparejado algunos problemas de interpretación. En este trabajo se demostró que el 5' tiRNA-GlyGCC más abundante es el de 35 nucleótidos y no el de 30. Por ende, los microarreglos se realizaron utilizando una molécula que, si bien se produce, lo hace en menor medida durante el estrés. La problemática con este experimento, ya explicada en el capítulo 0 de los resultados, fue que Gly de 30 nucleótidos tiene la capacidad de formar dímeros (Tosar et al. 2018) resistentes a la degradación y por lo tanto, las EVs provenientes de células donadoras transfectadas con Gly e incubadas con células receptoras contendrían una cantidad de Gly de 30 nucleótidos mucho mayor que el SCR que pudiese haber dentro de EVs provenientes de células transfectadas con SCR. Por tanto, estaríamos midiendo efectos inducidos por la presencia de RNAs sintéticos presentes en gran abundancia dentro de las EVs, pero no podríamos afirmar si dichos efectos se deben a la secuencia específica del tiRNA-GlyGCC ya que careceríamos de un control conteniendo la misma cantidad de RNAs, solo que de secuencia diferente.

Esta era la idea detrás de la inclusión de SCR en nuestro diseño experimental, pero la gran diferencia de estabilidad entre Gly y SCR no nos permite sacar conclusiones categóricas al respecto.

#### Secuenciación de RNA de célulasceptoras incubadas con EVs provenientes de células transfectadas con Gly o SCR de 35 nucleótidos

En los capítulos anteriores demostramos que la secuencia de Gly de 35 y SCR de 35 son detectables a similar nivel dentro de las células transfectadas, en EVs y luego de transferirse entre células. Por tanto, en este caso donde se utilizó SCR de 35 nucleótidos como control de Gly de 35, las células estarían recibiendo, en teoría, una cantidad similar de Gly y de SCR. Esto nos permitiría medir no solo los cambios inducidos por la llegada de EVs con cargo extra de RNAs monofosforilados en el extremo 5' (comparando contra EVs de células no transfectadas), sino también los cambios inducidos por la secuencia específica de Gly (comparando Gly 35 vs SCR 35).

Para poder medir los cambios transcriptómicos inducidos por Gly de 35 nucleótidos, se transfectó células MCF-7 (que presentan una baja actividad RNasa intracelular) con los RNAs sintéticos de 35 nucleótidos. Al grupo de células control, en este caso células NT, se les agregó la solución de transfección con L3K pero sin adición de RNA, para no introducir a la presencia o no de L3K como una variable. Se purificó EVs mediante ultracentrifugación y se las incubó durante 6 horas con célulasceptoras para luego extraer el RNA. Se evaluó su concentración y calidad en nuestro laboratorio, y las muestras se enviaron a *Macrogen* (Corea del Sur), donde se secuenciaron *paired end* (largo de reads = 151 nt) utilizando un kit *TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit* (*Illumina*) en una plataforma *NovaSeq 6000* (*Illumina*). Los resultados se presentan en la figura 30, a continuación.



**B**

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
EV_Gly_35_rep1	5,509,536,094	36,486,994	59.85	40.15	97.9	94.34
EV_Gly_35_rep2	4,929,015,386	32,642,486	60.38	39.62	97.82	94.24
EV_Gly_35_rep3	4,329,567,130	28,672,630	60.71	39.29	98.01	94.59
EV_NT-P_rep1	4,690,414,246	31,062,346	60.24	39.76	97.95	94.44
EV_NT-P_rep2	4,721,453,806	31,267,906	60.15	39.85	97.74	94.08
EV_NT-P_rep3	5,394,855,822	35,727,522	58.83	41.17	97.84	94.17
EV_SCR_35_rep1	4,605,139,714	30,497,614	60.69	39.31	97.89	94.36
EV_SCR_35_rep2	4,947,559,394	32,765,294	59.12	40.88	97.81	94.2
EV_SCR_35_rep3	4,388,578,534	29,063,434	60.96	39.04	97.9	94.38

**C**

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
Gly_30_rep1	4,266,988,200	28,258,200	59.03	40.97	97.92	94.36
Gly_30_rep2	4,475,803,080	29,641,080	59.74	40.26	97.89	94.25
Gly_30_rep3	4,440,342,844	29,406,244	59.16	40.84	97.91	94.32
NT-N_rep2	6,149,431,512	40,724,712	59.18	40.82	97.8	94.08
NT-N_rep3	4,643,804,472	30,753,672	58.17	41.83	97.76	94.07
SCR_30_rep1	5,111,006,022	33,847,722	59.47	40.53	97.91	94.34
SCR_30_rep2	4,697,895,088	31,111,888	59.49	40.51	97.95	94.39
SCR_30_rep3	5,119,631,746	33,904,846	59.78	40.22	97.85	94.21

**Figura 30: resultados del secuenciado para cada muestra.** A) Representación gráfica de ambos experimentos de secuenciado. Las flechas de color amarillo representan la aproximación experimental para la secuenciación del RNA de células incubadas con EVs provenientes de células transfectadas con Gly y SCR de 35 nucleótidos. La flecha roja indica

la variación en el diseño experimental para la secuenciación de RNA de células incubadas con los distintos RNA sintéticos (de 30 nt) sin L3K. Luego de la extracción de RNA, los pasos experimentales fueron los mismos. B) Información acerca del número total de *reads* obtenidos por muestra, y de ciertos parámetros de calidad (ej: % de *reads* con calidad mayor igual a 20 o a 30, % AC y GC), para el experimento basado en transferencia de RNAs mediante EVs C) Ídem, para el experimento basado en “*uptake*” espontáneo.

### Secuenciación de RNA de células incubadas con RNA Gly o SCR de 30 nucleótidos

En un segundo experimento (Figura 30 A, flechas rojas, Figura 30 C), focalizado ahora en la pregunta del *uptake* espontáneo de RNAs extracelulares no vesiculares, se incubó células MCF-7 con Gly 30 (400 nM), SCR 30 (400 nM) o con idéntico volumen de PBS, durante 30 minutos a 37°C, en medio de cultivo libre de suero. La razón por la cual se eligió estas secuencias de 30 nt es porque Gly 30 es por lejos la especie más abundante en la fracción no vesicular del medio extracelular (Tosar et al. 2015), probablemente a causa de su alta estabilidad frente a la degradación (Tosar et al. 2018), y con un origen posiblemente vinculado a la muerte celular (Tosar et al. 2020). También es una secuencia que puede ser detectada en suero sanguíneo, también libre de EVs (Dhahbi et al. 2013). Además, las secuencias de Gly y SCR de 30 nt pueden ingresar a la célula de forma espontánea, a diferencia de las secuencias de 35 nt (esta tesis, capítulo 4).

Luego de incubar a las células con los distintos RNA sintéticos, las mismas se lavaron con medio de cultivo, y se incubaron por seis horas antes de proceder a extraer el RNA de las mismas.

¿Será que las mitades 5' del tRNA-GlyGCC de 30 nt se generan por fragmentación extracelular del tRNA-GlyGCC liberado en situaciones de muerte celular (Tosar et al. 2020), y pueden luego ingresar a otras células y “alertarlas” de esta situación? Este segundo experimento busca arrojar datos que nos permitan terminar de consolidar este modelo hipotético y evaluar qué grado de correlato tiene con la realidad.

El motivo de este capítulo no es introducir los resultados del análisis de ambos estudios transcriptómicos, sino demostrar que este estudio resultó en una cantidad voluminosa de datos que requerirán un análisis profundo, tal vez a nivel de una futura tesis doctoral. Por muestra, el secuenciado arrojó un total de entre 30 y 40 millones de *reads* totales, con alto grado de calidad. En todas las muestras, el porcentaje de los reads que pudieron mapearse al genoma fue mayor al 90% (datos no mostrados). Estos resultados preliminares acerca de la calidad del RNA y riqueza de datos dan un cierre necesario a esta tesis y abren una nueva etapa.

Si bien podríamos haber hecho un experimento de estas características en cualquier momento de la tesis, bastando para ello nada más que contar con los fondos suficientes,

es el camino transitado aquí lo que, en definitiva, le terminará dando sentido a estos datos. Esta tesis arrancó, en su capítulo 0, con un estudio transcriptómico con ciertos problemas de diseño fruto de que aún no comprendíamos del todo el sistema de trabajo. Y termina allí donde empieza. Pero esperando que el camino sea lo que marque la diferencia. Y podamos, finalmente, comprender un posible rol de los tRNAs en la comunicación intercelular en contextos de estrés.

## Discusión

Ya desde la década de 1950, durante la carrera por la primera descripción completa de una molécula de tRNA, se comenzó a caracterizar los primeros fragmentos de tRNA aunque sin saber que se trataba de fragmentos de tRNA y considerados como desecho (Hoagland et al. 1958). En 2005 se caracterizó los primeros fragmentos de tRNA fruto del corte a nivel del anticodón en respuesta a privación nutricional (Lee y Collins 2005). En el transcurso de los quince años posteriores se fue consolidando el concepto de que dichos fragmentos tienen la capacidad de transferir información genética entre diferentes células mediante EVs, lo que fue mostrado por diferentes técnicas y en organismos diferentes (Garcia-Silva et al. 2010; Gámbaro et al. 2019; Pawar et al. 2020).

Como todo tema de investigación relativamente joven, el campo de estudio de las mitades o fragmentos de tRNA como sRNAs reguladores no está exento de problemas sin resolver. El primer problema claro es el de la nomenclatura de estos fragmentos. Existen tantos grupos de investigación a lo largo del planeta que se encuentran actualmente trabajando con dichas moléculas que su nomenclatura se ha vuelto un problema que, de no estar atentos, podría inducir a errores de interpretación. El mismo fragmento de tRNA podría estar denominado con diferentes nombres en diferentes publicaciones. Desde mediados de la década del 2000, se comenzó a observar la biogénesis de los fragmentos pero aún se desconocían sus funciones y aún quedaba (y queda) un largo trecho por recorrer para comprenderlas. Sin embargo, como se observó que muchos de estos fragmentos se generaban fruto de la inducción de estrés celular (Lee and Collins 2005; Thompson et al. 2008; Fu et al. 2009; Yamasaki et al. 2009; Garcia-Silva et al. 2010), se los denominó tiRNAs (por “*stress induced tRNA-derived fragments*”,) (Yamasaki et al 2009). Sin embargo, no son solamente producidos debido a procesos de estrés celulares, lo que más adelante continuó complejizando la nomenclatura de estas moléculas. Además, los RNAs involucrados con el comienzo de la transcripción, que poco tienen que ver con los fragmentos de tRNA inducibles por estrés, ya tenían el término “tiRNA” acuñado para sí (Taft et al. 2009; Taft et al. 2010). En diferentes publicaciones también se utilizan los términos “tsRNAs” para “fragmentos pequeños derivados de tRNAs” (Pekarskya et al. 2016), “tDRs” para “RNAs derivados de tRNAs” (Selitsky et al. 2015) o “SHOT-RNAs” para “RNAs pequeños derivados de tRNAs dependientes de hormonas sexuales” (Honda et al. 2015), entre muchos otros términos. Sin embargo, una lectura crítica de estos trabajos sugiere que en realidad se refieren todos al mismo tipo de moléculas. Esto es motivo de mucha confusión. Por tanto, actualmente se está buscando un consenso para poder cerrar la brecha de discrepancias que existe en la literatura y la falta de reproducibilidad debido a ciertos errores de interpretación. Estos errores están también dados por limitaciones en los sistemas que se utilizan para estudiar estos RNAs, como la secuenciación de nueva generación (NGS),

en donde muchos tRFs pasan desapercibidos por modificaciones nucleosídicas en sitios específicos.

Un segundo aspecto de relevancia para este trabajo es la transferencia de RNAs en EVs. Este tema ha movilizó tanto a la academia como a la industria. Este año se produjo un auge de la transferencia de RNAs mediante nanopartículas lipídicas sintéticas a raíz de la pandemia por covid-19 y la masificación de las vacunas de mRNA. Vacunas como las desarrolladas por las empresas Moderna y Pfizer/BioNTech utilizan un mecanismo de nanopartículas lipídicas sintéticas (primas sintéticas de las EVs) para inyectar mRNA dentro de las células y así crear una respuesta inmune que proteja al individuo contra la enfermedad. En etapas preclínicas, otros grupos de investigación están explorando el uso de EVs para estos fines, además de una variedad de usos terapéuticos de EVs cargadas con RNAs (por ejemplo: siRNAs) que ya se encuentran en etapas clínicas. De cualquier manera, si bien se comenzó a describir dichos mecanismos de transferencia de RNA entre células, aún no se conocen por completo los mecanismos tanto de liberación de RNAs al medio extracelular como de captación de EVs, internalización de los RNAs encapsulados en EVs ni los efectos que dichos RNAs inducen en las células receptoras.

En nuestro laboratorio, desde el año 2008 se trabaja con RNAs pequeños no codificantes (Marton et al. 2008). Ya desde 2010, María Rosa García y colaboradores observaron que en *Trypanosoma cruzi*, fruto del estrés, la célula corta tRNAs a nivel del anticodón (Garcia-Silva et al. 2010). Lo mismo se observó en células de mamíferos (Yamasaki et al. 2009) y en otros organismos incluyendo levaduras (Thompson et al. 2008). Estudios posteriores de nuestro grupo mostraron que *T. cruzi* es capaz de liberar estos fragmentos de tRNA al medio extracelular, en vesículas extracelulares, y de transferirlo a otras células, incluyendo otros parásitos o células del hospedador (Garcia-Silva et al. 2014). Posteriormente, nuestro grupo se focalizó en estudiar estos fenómenos de comunicación intercelular mediados por mitades de tRNA extracelulares en células humanas (Tosar et al. 2015, 2018, 2020; Gámbaro et al. 2020) y así enlazarlos con resultados publicados por otros grupos. Con todo esto en mente, es imposible no hipotetizar que el corte de tRNAs a nivel del anticodón no sea una respuesta conservada a lo largo de todos los dominios de la vida, pues la función de las anti-codón nucleasas está también muy bien caracterizada en bacterias (Tomita et al. 2000). De hecho, por su rol de adaptadores entre el material genético y el mundo de las proteínas, las moléculas de tRNA son sumamente ancestrales y posiblemente fueron actores fundamentales en el llamado "RNA world" (Bernhardt 2012), previo a la aparición de los límites celulares tal como los entendemos hoy día. En consideración de esto, pensamos que los fragmentos de tRNA extracelulares juegan un rol relevante en la comunicación intercelular, ya sea entre células vecinas o distantes, y ya sea que estos fragmentos viajen protegidos de la acción

degradadora de las ribonucleasas extracelulares dentro de las EVs, o fuera de ellas bajo forma de dímeros, oligómeros y/o complejos ribonucleoproteicos.

Así es como llegamos a la analogía de la transferencia del interferón: Durante la respuesta inmune frente a una infección viral, algunas células del sistema inmune liberan interferón para alertar a otras células presentes en el mismo microambiente que la célula en cuestión está siendo infectada, además de los efectos autócrinos característicos de dicha molécula. Como consecuencia, las células vecinas comienzan a generar una activación de defensas antivirales, aún antes de sentir las señales del patógeno (De Andrea et al. 2002). Planteamos aquí una analogía con este modelo y nos preguntamos si los fragmentos de tRNA inducibles por estrés podrían funcionar como moléculas señalizadoras entre células y, al igual que el interferón, preparar a células vecinas frente a condiciones desfavorables de crecimiento inminentes. Esto ya había sido planteado por uno de nuestros grupos colaboradores para la proteína Angiogenina, que es una ribonucleasa de secreción (Yamasaki et al. 2009; Lyons, Fay, et al. 2017), pero creemos que esta analogía puede extenderse también a los tRNAs (Gámbaro et al. 2020; Tosar et al. 2021a).

Como mencioné con anterioridad, el corte de los RNAs de transferencia (tRNA) funciona como una respuesta conservada en momentos en los que la célula se encuentra frente a situaciones de estrés, como por ejemplo, estrés nutricional (Garcia-Silva et al. 2010), o diversos tipos de estrés oxidativo (Thompson et al. 2008). También se ha observado que los fragmentos de tRNA (tRFs) regulan la expresión génica en mamíferos, por ejemplo, inhibiendo la iniciación de la traducción (Yamasaki et al. 2009; Ivanov et al. 2011). También se conoce que regulan la biogénesis de ribosomas (Kim et al. 2017), regulan la estabilidad de diferentes RNAs mensajeros (Goodarzi et al. 2015) o inciden en la proliferación celular (Honda et al. 2015), entre muchas otras actividades reportadas en la literatura. Como los RNAs dentro de la célula tienden a ser fácilmente degradados por acción de ribonucleasas intracelulares (Vallee et al. 1985; Ivanov et al. 2011), tuvimos la necesidad empírica de encontrar un balance entre características internas y estructurales de los RNAs con los que trabajaríamos y la actividad ribonucleasa de las células, que nos permitiera poder detectar el RNA por tiempos suficientes como para permitir su empaquetamiento en EVs y transferencia a otras células.

En 2018, en nuestro laboratorio se realizó la transición entre la tesis de maestría de la Mag. Fabiana Gámbaro y el comienzo de mis estudios de posgrado. Nuestro experimento “de transición” fue el presentado en la figura 8: los estudios transcriptómicos realizados mediante microarreglos. Allí, se pretendió estudiar qué efectos tendría la llegada de Gly de 30 nucleótidos en EVs provenientes de células transfectadas con dicho RNA sintético. Entre varias problemáticas que surgieron tanto en el diseño como en el

análisis de los datos de este experimento, las dos principales forjaron el curso del resto de mi tesis de maestría. En primer lugar, nosotros pretendíamos estudiar el rol del 5' tiRNA-GlyGCC extracelular en condiciones de estrés, y para ello, necesitábamos confirmar la secuencia exacta de los fragmentos que se producían fruto de la inducción de estrés en la célula. Por estudios preliminares que posteriormente se confirmaron en esta tesis (figura 14 A), sabíamos que los 5' tiRNA-GlyGCC mayormente producidos durante el tratamiento con ARS corresponden a aquellos de 34 o 35 nucleótidos, no a los de 30. Por tanto, los efectos que estábamos viendo fruto del análisis de expresión diferencial en el mencionado ensayo de microarreglos carecía de un correlato o contexto biológico fuerte. Nuestra intención era entender cuáles son los efectos del 5' tiRNA-GlyGCC que llega a las células en EVs provenientes de células estresadas y para ello necesitábamos utilizar RNAs sintéticos que reprodujeran lo más fielmente posible lo que ocurre en una situación de estrés, más allá de la limitante obvia de la ausencia de bases modificadas. Además, como demostramos en esta tesis, Gly de 30 nucleótidos posee una capacidad de resistencia a las ribonucleasas altamente mayor que el resto de los oligonucleótidos sintéticos utilizados (su control, SCR 30, así como Gly y SCR de 35 nucleótidos). Por tanto, la gran problemática del ensayo de microarreglos es que nos enfrentamos a una situación en la que las células, por un lado, recibieron EVs provenientes de células transfectadas con Gly, es decir, EVs con RNAs sintéticos monofosforilados en su interior, y por otro lado, células que recibieron EVs con una carga mucho menor de RNAs sintéticos, dado que SCR se degradaría más rápido y no tendría la capacidad de empaquetarse en iguales cantidades (figura 22 C, figura 23 D). Como consecuencia, no podíamos saber si los efectos observados se debían a la presencia de Gly o a la llegada de un RNA exógeno en EVs, debido a la ausencia de un control adecuado. Tan es así que pasé los primeros seis meses del inicio de esta tesis intentando validar los blancos derivados del mencionado ensayo de microarreglos, transfectando células con Gly y SCR de 30 nucleótidos, sin poder reproducir los cambios en la expresión génica observados previamente (datos no mostrados por cuestión de espacio).

Con todo esto en mente, decidimos primero ir a buscar qué mitades o fragmentos de tRNA se producen efectivamente por estrés (tiRNAs). Para esto, decidimos optimizar un modelo de inducción de estrés por tratamiento con agentes oxidantes tales como el arsenito de sodio. Lo primero que hicimos fue intentar ver si 5' tiRNA-Gly se producía en células U-2 OS fruto de estrés mediante *SL-RT-qPCR*. Si bien se observó un aumento de estos fragmentos, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 13). Esto no debería sorprender considerando el bajo número de réplicas empleado, la variabilidad entre réplicas de los experimentos, y las limitaciones inherentes de la qPCR para registrar cambios de expresión más bien pequeños. Por tanto, decidimos comprobar dicho aumento mediante la técnica semicuantitativa de Northern blot, que tiene una respuesta más lineal a los cambios de abundancia. Y además, nos permite evaluar el

tamaño de la especie medida, y detectar en paralelo otras especies que compartan la misma secuencia, pero que sean más largas o más cortas. Esto resulta ideal para estudiar fenómenos de fragmentación del RNA.

Además, en este trabajo, al igual que en trabajos recientes de nuestro grupo (Tosar et al. 2020), encontramos que los fragmentos 5' tiRNA-GlyGCC pueden sobre todo detectarse en la fracción no vesicular del medio extracelular, incluso en presencia de suero, rico en RNasa A (figura 17 y 19 B). Más aún, nuestros resultados parecerían indicar que cuando tenemos una generación muy alta de tiRNAs de 30 nucleótidos – los fragmentos de 35 no son casi detectables en las fracciones no vesiculares del medio extracelular (Tosar et al. 2020) – también se ve la formación de fragmentos de menos de 20 nucleótidos (es decir, 5' tRFs), que no habíamos observado en nuestros trabajos anteriores. Más llamativo aún, observamos que al utilizar células  $\Delta$ RNH1 (figura 19 B), se generan fragmentos de 50 nucleótidos que pueden ser detectados dentro de las EVs, pero no dentro de las células que les dieron origen. Desconocemos si estos fragmentos se producen por un corte a nivel del *T-loop* del tRNA maduro dentro de la célula y luego son liberados como fragmentos o si se generan dentro de las EVs a partir del procesamiento intravesicular de los tRNAs completos. Reanalizando datos provenientes de trabajos anteriores del grupo (Tosar et al. 2020) nos dimos cuenta que estos mismos fragmentos pueden observarse también en EVs provenientes de células WT, por lo que no serían una particularidad de las células  $\Delta$ RNH1. La presencia de un RNA que pueda ser marcador de cierto tipo de EVs, o de EVs en general, puede tener importantes implicancias para este campo de estudio y es un hallazgo que deberá ser explorado en el futuro.

En este trabajo se comprobó que dentro de la célula y fruto del estrés oxidativo inducido por tratamiento con ARS se produce un aumento claro de tRNA-h-GlyGCC, al que comenzamos a llamar 5' tiRNA-GlyGCC una vez corroborado su aumento en estrés (figura 14 A). Además, observamos que existe una correlación negativa entre la generación de 5' tiRNA-GlyGCC y los niveles del pre-tRNA-GlyGCC (figura 14 B). Es notorio y reproducible que a mayor generación de fragmentos, la banda representativa de los pre-tRNAs en Northern blot pierde intensidad hasta incluso desaparecer. Esta observación amerita una mayor discusión. Por un lado, la banda representativa de los tRNAs maduros es demasiado intensa en comparación con la banda de los pre-tRNAs y aquella de los tiRNAs, y esto hace muy difícil evaluar si, al igual que la banda de los pre-tRNAs, los tRNAs decaen con la misma cinética. Lo que decae en intensidad la banda de los pre-tRNAs parecería en su totalidad trasladarse hacia la generación de fragmentos. Viendo esto, cabría preguntarse si los pre-tRNAs no podrían actuar como sustratos preferenciales, en vez de los tRNAs maduros, para la generación de los tiRNAs. Esto puede tener grandes implicancias a la hora de predecir las bases modificadas

presentes en los tiRNAs, algo que recién se está comenzando a estudiar. Sin embargo, esto podría no ser así; los tRNAs maduros bien pueden ser sustratos para la generación de tiRNAs (que es lo que en general se considera) sólo que su disminución en estrés puede ser proporcionalmente demasiado baja como para notarla, dada su alta expresión intracelular. Para esclarecer- o complicar - esta problemática no resuelta, el grupo de Tavazoie en la Universidad de Rockefeller en Nueva York publicó pocos días antes de la culminación de esta tesis un artículo donde se demuestra que para generar 5' tiRNA-TyrGUA mediante la inducción de estrés oxidativo, la célula utiliza el pre-tRNA-TyrGUA, y la caída del pre-tRNA termina afectando los niveles del tRNA-TyrGUA y, en consecuencia, la traducción de genes relacionados con el crecimiento ricos en codones de Tyr (Huh et al. 2020). Lo más importante de estas observaciones es que la formación de fragmentos puede tener efectos fisiológicos como la supresión parcial o total de la traducción, ya sea mediada por los mismos fragmentos (Ivanov et al. 2011 y trabajos posteriores) o mediante alteraciones del *pool* de pre-tRNAs y por ende de ciertos tRNAs, alterando la relación oferta/demanda entre codones y anticodones (Gingold et al. 2014).

Por otra parte, se comprobó que no todos los tRNAs forman fragmentos frente a una inducción de estrés con ARS, al menos en niveles detectables por nuestra técnica. Tanto los tRNA-h-Ala como Glu no fueron detectables mediante Northern blot. Si bien pudimos observar fragmentos derivados del tRNA- iMet, los niveles fueron muy bajos (figura 14 C y D). Esto no es un dato menor, porque sugiere especificidad en la formación de 5' tiRNA-GlyGCC como moléculas de respuesta a estrés. Esto apoyaría la hipótesis de que estos fragmentos podrían haber estado sometidos a una presión selectiva que haya hecho que se transformaran en moléculas señalizadoras o de alarma entre células, que es parte de lo que con esta tesis se quiso investigar. En dicho supuesto caso ¿fueron seleccionados para tal hipotética función por su alta estabilidad y abundancia extracelular, o su estabilidad es precisamente consecuencia de esta función señalizadora? Es parte del dilema del huevo y la gallina, aplicado en este caso a los fragmentos de tRNA.

También observamos que la célula tiene la capacidad de recuperarse relativamente rápido del estrés infringido sobre ella, en cuanto a mitades de tRNA se refiere. A las seis horas de retirado el ARS, las células mostraron niveles idénticos a los basales para el 5' tiRNA-GlyGCC (figura 16, panel derecho). Nuestra interpretación es que los fragmentos se degradan completamente o se exportan al medio extracelular de modo tal que luego de seis horas de producido el estrés, la célula retorna a sus niveles endógenos "normales". Interesantemente, pudimos comprobar que parte del *pool* de fragmentos generados se exportan en EVs (figura 19 B), aunque no podemos descartar que otra parte sea degradado. Sería importante saber cómo exactamente funciona este mecanismo para poder entender las funciones que estos tiRNAs podrían tener en el ambiente intracelular de la célula que los produjo y así entender también sus funciones

en células vecinas. Existen algunos ejemplos similares en la literatura. Por ejemplo, las células T empaquetan en EVs y liberan ciertos tRFs durante su activación, como forma de deshacerse rápidamente de estas moléculas y así evitar la represión de ciertos mRNAs involucrados en el proceso de activación linfocitaria (Chiou, Kageyama, y Ansel 2018).

Como se explicó en el capítulo de resultados, nos encontramos frente a la necesidad de utilizar un modelo experimental de inducción de estrés que no implicara solamente la utilización de ARS o algún otro tipo de reactivo citotóxico. Si bien diferentes grupos utilizan esta aproximación experimental para la inducción de estrés oxidativo y para el estudio del rol de las mitades de tRNA, lo hacen con tiempos de tratamiento relativamente cortos, de 30 min a dos horas. Sin embargo, es clave entender que el ARS actúa como inductor de estrés porque es un veneno para la célula, que no solamente se involucra en el arresto de la iniciación de la traducción, sino que silencia una multitud de procesos (Flora 2015). Pero el problema radica en que, para obtener un número de EVs suficientes a los efectos de medir los RNAs intravesiculares, requerimos tiempos de incubación relativamente largos. Esto implicaría alejarnos de un estrés reversible, sino que aquello a lo que llamaríamos estrés pasaría a ser el comienzo de la muerte celular, o incluso fases más avanzadas de muerte celular con liberación de ApoEVs. Por tanto, nos vimos frente a la necesidad de utilizar un modelo experimental no basado en drogas, como el modelo propuesto con células  $\Delta$ RNH1, que carecen del inhibidor de endonucleasas y que por tanto tendrían una generación de fragmentos basal a nivel citoplasmático, lo que pudo constatar. Esto nos permitió ver, por un método ortogonal, que los fragmentos sí tienen la capacidad de exportarse dentro de EVs cuando se expresan dentro de las células (figura 19 B). Por tanto, la secreción de estos RNAs no es un efecto estrictamente vinculado a la inducción de estrés oxidativo, sino que es una respuesta a la generación de estos fragmentos, consecuente con el modelo de secreción no selectiva de RNAs que nuestro grupo ha venido explorando (Tosar et al. 2021a). Una curiosidad es que los niveles de tRNAs en células  $\Delta$ RNH1 no son indiscriminados, sino que parecerían estabilizarse en un cierto nivel y no aumentar mucho más con el tiempo ¿Será que no aumentan indefinidamente fruto de una liberación constante en EVs, tal como sugieren nuestras hipótesis y muchos de nuestros resultados? ¿Será que la liberación al medio extracelular es, junto con la síntesis y la degradación, la manera de mantener los niveles de estado estacionario de los distintos transcritos?

Estudiar la fragmentación del RNA tiene sus complicaciones. Por ejemplo, se observó que el estado de fragmentación del RNA post extracción puede inducir a resultados artefactuales (figura 15). Lo importante es poder definir de dónde vienen los fragmentos: ¿vienen de un clivaje intracelular fruto de la acción de las ribonucleasas celulares o se produjeron durante el proceso de extracción del RNA, es decir, *in vitro*? Y, el medio en

el que se incuban las células, ¿podría estar generando fragmentos fruto de estar induciendo estrés sobre la célula? Efectivamente, se encontró que dependiendo de cómo se trate el RNA extraído y en qué medio se incubaron las células, el perfil de RNAs obtenidos reflejaba el estado de fragmentación del RNA post extracción (figura 15). Estos resultados son extremadamente importantes en el estudio de los fragmentos como moléculas señalizadoras porque se necesita un modelo en donde la aproximación experimental no interfiera con la interpretación de los resultados. No se puede permitir una generación de fragmentos *in vitro* porque esto sesgaría completamente el entendimiento de los mecanismos de generación, empaquetamiento y secreción de tiRNAs. Esto se ve especialmente agravado por el hecho de que los fragmentos generados de forma regulada dentro de la célula en respuesta a estrés son los mismos que se generan *in vitro* por acción de las RNAsas “ambientales”. Conscientes de esto, en esta tesis se puso especial énfasis en optimizar la metodología para minimizar estos efectos artefactuales.

Una vez determinado que los 5' tiRNA-GlyGCC de 35 nucleótidos son los fragmentos mayormente generados producto del estrés, elegimos trabajar con ellos en un modelo de empaquetamiento y transferencia de estos fragmentos entre células. También se compararon los resultados contra los fragmentos de 30 nt debido a que: i) también se inducen por estrés, aunque en menor grado (nótese la doble banda en los Northern blot correspondientes), ii) son la especie mayoritaria a nivel extracelular y iii) permiten estudiar el efecto del largo de secuencia y de la estabilidad frente a la degradación.

Como la actividad ribonucleasa del tipo A en células U-2 OS es relativamente superior a la actividad ribonucleasa en células MCF-7 (juzgado a partir de los niveles de expresión tanto de las RNAsas de la familia A como de RNH1), decidimos utilizar las segundas para poder realizar estos estudios. Para decidir si el 5' tiRNA-GlyGCC puede ser transferido entre células, lo primero fue poner a punto un modelo de transfección. Se transfectó células con RNAs sintéticos (con la secuencia de 5' tiRNA-GlyGCC de 30 y 35 nucleótidos, o con sus respectivos controles SCR) a una concentración de 400 nM. Observamos que, en concordancia con nuestros resultados anteriores (Tosar et al. 2018), Gly 30 es el RNA más estable dentro de las células, mientras que Gly 35, SCR 30 y SCR 35 presentaron estabilidades intracelulares comparables (figura 22 C y 23 D). Como la especie de Gly más producida en estrés es la de 35 nucleótidos, fue positivo el haber encontrado un control SCR con secuencia no idéntica pero estabilidad comparable, a los efectos de poder evaluar en qué medida los efectos observados sobre la expresión génica (capítulo 6) son o no dependientes de secuencia.

Además, quisimos ver si las mitades de Gly sintéticas efectivamente se empaquetan dentro de vesículas extracelulares. Esto ya había sido realizado en la tesis de maestría

de Fabiana Gámbaro pero para Gly 30, que como hemos dicho, tiene muchas particularidades. Aquí comprobamos que tanto Gly como SCR de 35 nt también se detectan de manera significativa en EVs en comparación con las EVs de células no transfectadas (figura 24). En este trabajo se dejó en evidencia que, al menos con las especies de RNA sintético con las que se trabajó y a altos niveles de sobreexpresión, el mecanismo de selección para empaquetamiento es dependiente de su abundancia intracelular pero independiente de secuencia, como ya hemos sugerido en nuestras publicaciones anteriores (Gámbaro et al. 2020). Sin embargo, hay estudios en la literatura que demuestran que esto podría no ser necesariamente así para las mitades de tRNA endógenas. Se ha observado que hay 5' tiRNAs específicos, derivados por ejemplo de ValCAC, ValAAC, GlyGCC, HisGUG y GluCTC, encontrados en EVs provenientes de HMDMs (macrófagos M1 humanos) mientras que su presencia es mucho menor en las células que las produjeron. También han reportado que estas 5' tRNA-h se pueden transferir entre HMDMs (Pawar et al. 2020). El empaquetamiento selectivo y secuencia-específico de ciertas mitades de tRNA también ha sido sugerido en otros estudios (Chiou et al. 2018). Por tanto, existe cierta controversia sobre si el empaquetamiento de tiRNAs en EVs es solamente dependiente de su abundancia intracelular (modelo no selectivo) o también depende de su secuencia (modelo selectivo). Controversias similares existen también para el empaquetamiento de miRNAs, aunque nuestro grupo ha insistido en que hay ciertos artefactos que exacerban una visión de estos fenómenos como estrictamente selectivos (Tosar et al. 2017, 2021). Independientemente del caso, lo importante para esta tesis fue demostrar que los 5' tiRNAGlyGCC de 35 nt, inducidos por estrés, pueden liberarse al medio extracelular, tanto a nivel de RNAs sintéticos altamente sobre-expresados, como a nivel de las mitades de tRNA producidas de forma constitutiva en las células  $\Delta$ RNH1.

El siguiente paso fue evidenciar si existía o no una transferencia efectiva de Gly sintético entre células. Para ello, incubamos exosomas, que se purificaron por ultracentrifugación, provenientes de células MCF-7 donadoras, transfectadas con Gly de 30 y 35 nucleótidos, con células MCF-7 receptoras que no habían sido expuestas a estos RNAs previamente. Luego, medimos tanto por *SL-RT-qPCR* como por microscopía fluoroconfocal su transferencia y estabilidad intracelular una vez recibidas por las células receptoras. Observamos que efectivamente los Gly de 30 y 35 nucleótidos pueden ser transferidos entre células y son estables dentro de las células receptoras por al menos dos horas (figura 29 C). Estos resultados son ampliamente importantes al contextualizarlos con trabajos previos de nuestro grupo. Habíamos reportado con anterioridad que los tiRNAs sintéticos biotinilados que llegan a células receptoras a través de EVs forman cúmulos en puntos específicos dentro de la célula (Gámbaro et al. 2020) e hipotetizado que inducirían la formación de gránulos de estrés o similares. Sin embargo, en este trabajo, llegamos a la conclusión de que dichos cúmulos eran un artefacto producto de la ultracentrifugación

de EVs como técnica de purificación. En solución, las EVs se encuentran separadas las unas de las otras, pero a tan altas velocidades, se acumulan y se aglutinan. En el proceso de resuspensión, no logran separarse del todo y quedan formando cúmulos (Linares et al. 2015). Tal es así, que durante la puesta a punto de los experimentos de captación de EVs *in vivo*, nos encontramos con estos cúmulos de EVs marcados con tinción lipídica. Para nuestra sorpresa, estos cúmulos llegaban a la célula y se depositaban sobre la membrana plasmática. Sin embargo, dependiendo de su tamaño, observamos que aquellos cúmulos de EVs de tamaños desproporcionadamente grandes (>10% del tamaño de la célula) no eran internalizados, pero sí permanecían depositados sobre la célula por al menos dos horas (*stack* en formato video en link al pie de página<sup>6</sup>). Por tanto, en ensayos de transferencia de RNAs utilizando EVs colectadas mediante ultracentrifugación, se encontró que dichos cúmulos previamente observados por nosotros como *hot-spots* intracelulares de acumulación de marca eran en realidad agregados vesiculares que se encontraban sobre, y no dentro, de la célula. Esto es importante porque cambia la interpretación y teorización de posibles mecanismos de acción de los tRNAs y sus funciones en células receptoras. Este problema fue fácilmente constatable al hacer apilados en zeta de las imágenes tomadas, en cocultivos de células GFP positivas y negativas, lo que nos ayudó a interpretar mejor los límites celulares (figura 28). En este trabajo, corregimos estos efectos de dos maneras. Por un lado, purificamos EVs por gradientes de densidad para realizar los ensayos de captación en tiempo real de EVs marcadas con tinturas lipídicas, demostrando que existe verdadera internalización por endocitosis de las vesículas (figura 28). Por otro lado, cuando se purificaron EVs por ultracentrifugación para los ensayos con RNAs biotinilados, se vortexearon vigorosamente luego de su resuspensión, a los efectos de minimizar la formación de agregados. De esta manera, en las imágenes tomadas en este trabajo, nos encontramos con un patrón de marcaje homogéneo dentro del citoplasma de las células receptoras, en vez del patrón puntiforme y discreto observado con anterioridad, y situado en la superficie celular. Esto sugiere que el RNA es capaz de escapar de los endosomas y difundir luego por el citoplasma celular.

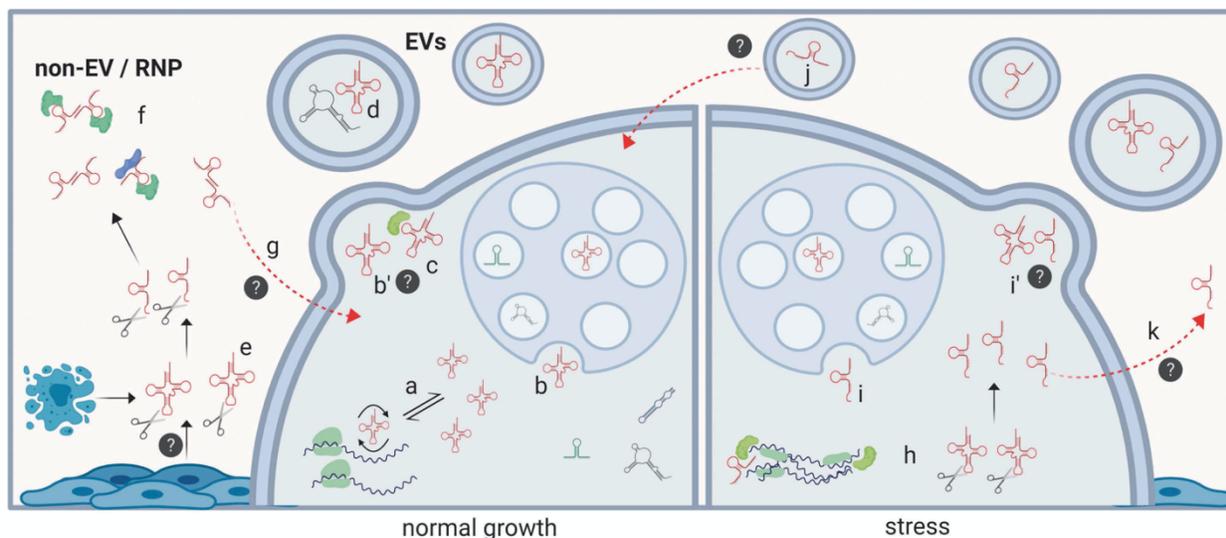
Lo que surgió como un control de los experimentos de transfección, donde simplemente se incubó el RNA sin la utilización de L3K, fue evolucionado a lo largo del tiempo hasta convertirse en uno de los capítulos importantes de este trabajo. Para nuestra sorpresa, pudimos evidenciar que los RNAs sintéticos de 30 nt pueden ser incorporados por las células MCF-7 de forma espontánea cuando los mismos son adicionados al medio de cultivo, en ausencia de reactivos de transfección (Figura 26). Curiosamente, este efecto parecería ser mucho menos eficiente cuando se trata de RNAs de 35 nt, sugiriendo algún tipo de especificidad en la captación.

---

<sup>6</sup> [t.ly/QFwD](https://t.ly/QFwD)

Estos resultados agregan datos a una historia que comenzó ya hace más de cinco años en nuestro laboratorio, donde en primer lugar, se observó a las mitades 5' del tRNA-GlyGCC (de 30 o 31 nt) como las especies mayormente presentes en el medio extracelular de las células MCF-7 (Tosar et al. 2015). Más aún, la inmensa mayoría de estas tRNA-h se encontraban en la fracción no vesicular. Esto resultó un tanto desconcertante, ya que los RNAs no vesiculares estarían muy expuestos a las RNAsas extracelulares. La respuesta a esta interrogante llegó unos años después, cuando se comprobó que la razón principal por la que las 5' tRNA-h-GlyGCC son tan estables es debido a su capacidad de formar homodímeros, y estas estructuras de dsRNA los vuelven resistentes a la degradación por endonucleasas de RNA simple hebra (Tosar et al. 2018). En aquel momento, como se consideró que los RNAs de doble hebra no pueden ingresar en la célula de manera espontánea, no se exploró en profundidad la opción de la captación espontánea de estos RNAs por la célula. Sin embargo, en esta tesis pudimos evidenciar que esto sí puede ocurrir, y que los RNAs de 30 nt parecerían ser captados con alta eficiencia, al menos por células MCF-7. Más adelante se observó que el origen de estos RNAs no vesiculares probablemente se deba a la fragmentación extracelular de tRNAs liberados a causa de situaciones de muerte celular (Tosar 2020). Por tanto, hipotetizamos que esos fragmentos se generan en el medio extracelular y su concentración aumenta en situaciones de muerte celular, y que, ingresando a células vecinas, pueden actuar como señales de alerta de que algo sucede en la vecindad de las células que los captan.

En la figura 31 se representan las dos grandes hipótesis en las que esta tesis ha querido avanzar, y ha contribuido a formar. En el panel de la izquierda vemos el procesamiento extracelular de los tRNAs no vesiculares, la generación de mitades de tRNA, y su internalización por *uptake* espontáneo. En el panel de la derecha vemos la incorporación de tRNAs en EVs provenientes de células estresadas, y la captación de estas EVs por células de su entorno. En ambos casos, las mitades de tRNA-GlyGCC serían protagonistas, y sus tamaños (30 vs 35 nt) podrían ser claves para que las células distingan un proceso del otro y respondan de una manera o de otra. Desde luego, necesitamos ahora del análisis de los datos de RNA-Seq descritos en el capítulo 6 para seguir profundizando en esta historia, que sigue teniendo mucho de conjetura.



**Figura 31:** representación del modelo de señalización de alerta entre células tanto de tRNA-h no vesiculares fragmentados en el medio extracelular como de tiRNAs empaquetados en EVs provenientes de células sometidas a estrés. Adaptado de Tosar y Cayota 2020.

Recapitulando, en esta tesis se presentó resultados que sugieren una posible captación espontánea de RNAs extracelulares no vesiculares.. Se realizaron ensayos de secuenciación en los cuales se secuenció el RNA proveniente de células incubadas con RNAs sintéticos (en ausencia de L3K) y los resultados, aún en proceso de análisis, presentan características prometedoras dada la alta calidad y cantidad de *reads* obtenidos, su alto porcentaje de mapeo al genoma, reproducibilidad entre réplicas, etc. Por tanto, de aquí en más queda explorar la alternativa de que tal vez la llegada de RNAs a la célula por diferentes vías pueda tener efectos diferentes, independientemente de que se trate de la misma secuencia, aunque con ligeras variaciones en su tamaño (30 vs 35 nt, Figura 31).

Nuestros ensayos obtenidos por técnicas de microscopía confocal *in-vivo* sugieren además que al menos uno de los mecanismos por los cuales las células internalizan al RNA encapsulado dentro de vesículas extracelulares (EVs) es el conocido como macropinocitosis. Si bien otros grupos, como el de Pieter Vader, ya lo había evidenciado en 2017 (Costa Verdera et al. 2017), nosotros lo dejamos en evidencia en nuestro laboratorio por primera vez y utilizando técnicas de marcado de EVs diferentes. El papel de los filipodios presentes en la superficie celular contactando cúmulos de EVs y ejerciendo tracción mecánica para “empujar” o encapsular a dichos cúmulos sobre la membrana plasmática resulta evidente en algunos de los videos que hemos podido realizar<sup>7</sup> (enlace en nota al pie).

<sup>7</sup> t.ly/QFwD

Es momento de señalar algunas limitaciones de nuestro estudio. Si bien en el capítulo 2 pudimos demostrar la liberación de tiRNAs endógenos en EVs, los resultados sobre transferencia intercelular mostrados en el capítulo 3 parten de RNAs sintéticos expresados en concentraciones que no son fisiológicas dentro de la célula. Por ende, los efectos que los tiRNAs puedan llegar a tener en células vecinas fruto de su empaquetamiento y transferencia en EVs luego de una situación de estrés pueden ser muy distintos de los efectos que pueda llegar a tener la llegada de RNAs sintéticos cargados en EVs a concentraciones mucho más altas. Tampoco estamos evaluando los efectos de las bases modificadas o de las sinergias con otros componentes de las EVs provenientes de células estresadas (Haraszti et al. 2019). Sin embargo, esta problemática no desbarata todo nuestro sistema, ya que sabemos que los 5' tiRNA-GlyGCC sí se empaquetan en EVs fruto del estrés, y por tanto, podrían estar funcionando como moléculas señalizadoras, más allá de la concentración en la que se encuentren en la célula donadora. Por tanto, la búsqueda de posibles blancos moleculares en las células receptoras sigue teniendo sentido aún en este modelo experimental, ya que los mismos bien pueden ser validados en ensayos futuros en sistemas fisiológicamente más relevantes. Cabe mencionar que la posibilidad de que las células estresadas (o  $\Delta$ RNH1) generan un clivaje de tRNAs dentro de las propias EVs (figura 19 B) complicaría un poco la interpretación de nuestros resultados, por lo que eso deberá ser constatado más adelante.

Si bien planteamos nuestros ensayos transcriptómicos comparando células receptoras expuestas a EVs provenientes de células no transfectadas vs. EVs provenientes de células transfectadas con Gly 35 o SCR 35, es posible que parte de los efectos no sean dependientes de secuencia (es decir: que se vean tanto en Gly 35 como en SCR 35). De hecho, esto es lo que sugiere el análisis preliminar de estos datos. Y esto en absoluto debería considerarse como un problema. Durante el proceso de respuesta generado por el sistema inmune innato, los *Toll-like receptors* (TLRs) detectan patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) e inician respuestas protectoras (Kawai and Akira 2010; Pawar et al. 2020). Los TLR7, por ejemplo, reconocen RNAs de simple hebra presentes dentro de vesículas endosomales, sensando particularmente nucleótidos de U. De hecho, esta es una de las razones por las cuales las vacunas de mRNA sustituyen todas las U por N1-metil-pseudouridina. Si bien este tipo de receptores generalmente se estudian en el contexto de infecciones con patógenos, se sabe que también responden a señales endógenas (patrones moleculares asociados a daño, DAMPs) Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que algunos tiRNAs activan TLR7, cuando son transferidos mediante EVs de una célula infectada (es decir, estresada) a otra (Pawar et al. 2020). ¿Podría esto ser un mecanismo evolutivamente diseñado para que la célula detecte RNAs provenientes de células estresadas o infectadas con patógenos y así alertar al resto de células vecinas de una inminente amenaza? Los ligandos de los TLRs

son generalmente ácidos nucleicos (Heil et al. 2013; Kawasaki and Kawai 2014). Se conoce que tanto miRNAs como otros RNAs de simple hebra, además de los RNAs provenientes de patógenos, son capaces de activar estos receptores una vez captados mediante EVs (Fabbri et al. 2012; Xiao et al. 2020). Otros proyectos en nuestro laboratorio, tales como la tesis doctoral del Mag. Mauricio Castellano, están orientados precisamente al estudio de estos RNAs extracelulares sobre células y receptores del sistema inmune innato.

## Conclusiones y perspectivas

Recapitulando, el clivaje de tRNAs es una respuesta conservada al estrés en células eucariotas de diferentes reinos (Lee and Collins 2005; Jöchli et al. 2008; Li et al. 2008; Yamasaki et al. 2009; Garcia-Silva et al. 2010). Además, las tRNA-h o tiRNAs también regulan la expresión génica en mamíferos, a nivel de la inhibición de la traducción (Ivanov et al. 2011), de la protección contra la apoptosis inducida por estrés (Saikia et al. 2014), de la proliferación inducida por hormonas (Honda et al. 2015), de la formación de gránulos de estrés (Lyons et al. 2016), de la génesis de ribosomas (Kim et al. 2017), entre muchos otros mecanismos. También vimos que estas tRNA-h o tiRNAs se pueden liberar al medio extracelular dentro de EVs, tanto fruto del estrés (figura 19 B) como luego de su internalización por transfección (figura 22 C y 23 D). Si el mecanismo de liberación de estos RNAs es selectivo (Villarroya-Beltri et al. 2013; Chiou et al. 2018) o no selectivo (Tosar et al. 2015, Gámbaro et al. 2020, Tosar et al. 2021a) en realidad no altera demasiado el modelo sobre el que se basó este trabajo: la analogía del interferón. El mecanismo selectivo propone que las moléculas secretadas necesitan poseer ciertos motivos de secuencia para salir al espacio extracelular. Nosotros proponemos que, al menos en parte, esto sucede en función de la concentración de esas moléculas en el citoplasma, más allá de su secuencia específica (Gámbaro et al. 2020). Cualquiera sea el mecanismo, lo importante es que aquí vimos que: a) existe un aumento en los niveles de ciertos RNAs fruto del estrés, b) la célula rápidamente elimina estos tiRNAs una vez superado el estrés, y al menos en parte, lo hace mediante su liberación al medio extracelular y en EVs, c) estas EVs pueden mediar una transferencia efectiva de estos tiRNAs entre células. Aunque nos queda pendiente averiguar qué efectos pueden inducir estos tiRNAs en las células receptoras, ya hemos obtenido una gran cantidad de datos de secuenciado de buena calidad como para poder contestar esta última pregunta en una siguiente etapa de doctorado.

## Bibliografía

- Abels ER, Breakefield XO. 2016. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 36(3):301–312. doi:10.1007/s10571-016-0366-z.
- Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 113(1):1–11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8.
- Akiyama Y, Lyons S, Fay MM, Abe T, Anderson P, Ivanov P. 2019. Multiple ribonuclease A family members cleave transfer RNAs in response to stress. *bioRxiv.* doi:10.1101/811174.
- Albanese M, Chen Y-FA, Hüls C, Gärtner K, Tagawa T, Mejias-Perez E, Keppler O, Göbel C, Zeidler R, Shein M, et al. 2020. Micro RNAs are minor constituents of extracellular vesicles and are hardly delivered to target cells. doi:10.1101/2020.05.20.106393.
- Anderson P, Ivanov P. 2014. tRNA fragments in human health and disease. *FEBS Lett.* 588(23):4297–4304. doi:10.1016/j.febslet.2014.09.001.
- De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. 2002. The interferon system: An overview. *Eur J Paediatr Neurol.* doi:10.1053/ejpn.2002.0573.
- Andrew Fire, SiQun Xu MKM, Steven A. Kostas SED& CCM. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806–811. doi:10.1016/S0140-6736(02)87196-3.
- Atai NA, Balaj L, Van Veen H, Breakefield XO, Jarzyna PA, Van Noorden CJF, Skog J, Maguire CA. 2013. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *J Neurooncol.* 115(3):343–351. doi:10.1007/s11060-013-1235-y.
- Auber M, Fröhlich D, Drechsel O, Karaulanov E, Krämer-Albers EM. 2019. Serum-free media supplements carry miRNAs that co-purify with extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* doi:10.1080/20013078.2019.1656042.
- Bernhardt HS. 2012. The RNA world hypothesis: the worst theory of the early evolution of life (except for all the others)a. *Biol Direct.* 7:1–10. doi:10.1186/1745-6150-7-23.
- Boskovic A, Bing XY, Kaymak E, Rando OJ. 2020. Corrigendum: Control of noncoding RNA production and histone levels by a 5' tRNA fragment. *Genes Dev.* 34(5–6):462. doi:10.1101/gad.336958.120.
- De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. 1977. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta.* 81(3):237–245. doi:10.1016/0009-8981(77)90054-7.
- Cantin R, Diou J, Bélanger D, Tremblay AM, Gilbert C. 2008. Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods.* 338(1–2):21–30. doi:10.1016/j.jim.2008.07.007.
- Caruso S, Poon IKH. 2018. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris. *Front Immunol.* 9(JUN). doi:10.3389/fimmu.2018.01486.
- Chakraborty SK, Prakash A, Nechooshtan G, Hearn S, Gingeras TR. 2015. Extracellular vesicle-mediated transfer of processed and functional RNY5 RNA. *Rna.* 21(11):1966–1979. doi:10.1261/rna.053629.115.
- Chargaff E, West R. 1946. THE SIGNIFICANCE OF THE PROTEIN OF BLOOD \* The activators of blood clotting present ' in mammalian tissue , i . e . the agents responsible

for the conversion of prothrombin to thrombin, have been shown to be lipoproteins of a very high particle weight ( *J Biol Chem.*(166):189–197.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, et al. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33(20):1–9. doi:10.1093/nar/gni178.

Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, et al. 2014. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* doi:10.1073/pnas.1408301111.

Chiang CY, Chen C. 2019. Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level Tse-Hua Tan. *J Biomed Sci.* 26(1):1–10. doi:10.1186/s12929-019-0502-4.

Chiou NT, Kageyama R, Ansel KM. 2018. Selective Export into Extracellular Vesicles and Function of tRNA Fragments during T Cell Activation. *Cell Rep.* 25(12):3356–3370.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.073.

Christianson HC, Svensson KJ, Van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. 2013. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(43):17380–17385. doi:10.1073/pnas.1304266110.

Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30(1):255–289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. 2017. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release.* 266(July):100–108. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.019.

Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, Emanuelli C, Gasecka A, Hendrix A, Hill AF, et al. 2017. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res.* 120(10):1632–1648. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309417.

Czech A, Wende S, Mörl M, Pan T, Ignatova Z. 2013. Reversible and Rapid Transfer-RNA Deactivation as a Mechanism of Translational Repression in Stress. *PLoS Genet.* 9(8). doi:10.1371/journal.pgen.1003767.

Dhahbi JM, Spindler SR, Atamna H, Boffelli D, Martin DIK. 2014. Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5' tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer. *Biomark Cancer.* 6:BIC.S20764. doi:10.4137/bic.s20764.

Durdevic Z, Mobin MB, Hanna K, Lyko F, Schaefer M. 2013. The RNA methyltransferase dnmt2 is required for efficient dicer-2-dependent siRNA pathway activity in *Drosophila*. *Cell Rep.* doi:10.1016/j.celrep.2013.07.046.

Edgar JR. 2016. Q & A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol.* doi:10.1186/s12915-016-0268-z.

Emara MM, Ivanov P, Hickman T, Dawra N, Tisdale S, Kedersha N, Hu GF, Anderson P. 2010. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem.* doi:10.1074/jbc.M109.077560.

Ernest Borek, B. S. Baliga, Charles W. Gehrke, C. W. Kuo, Sidney Belman, Walter Troll and TPW. 1977. High Turnover Rate of Transfer RNA in Tumor Tissue. *Cancer Res.* 37(9):3362–3366.

- Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, et al. 2012. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(31). doi:10.1073/pnas.1209414109.
- Feinberg EH, Hunter CP. 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* (80- ). 301(5639):1545–1547. doi:10.1126/science.1087117.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(26):9683–9688. doi:10.1073/pnas.0308413101.
- Flora SJS. 2015. *Handbook of Arsenic Toxicology*.
- Foster BP, Balassa T, Benen TD, Dominovic M, Elmadjian GK, Florova V, Fransolet MD, Kestlerova A, Kmiecik G, Kostadinova IA, et al. 2016. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. doi:10.1080/10408363.2016.1190682.
- Fritz J V., Heintz-Buschart A, Ghosal A, Wampach L, Etheridge A, Galas D, Wilmes P. 2016. Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation. *Annu Rev Nutr*. 36(1):301–336. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-050711.
- Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. 2009. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett*. 583(2):437–442. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.043.
- Gámbaro F, Li Calzi M, Fagúndez P, Costa B, Greif G, Mallick E, Lyons S, Ivanov P, Witwer K, Cayota A, et al. 2019. Stable tRNA halves can be sorted into extracellular vesicles and delivered to recipient cells in a concentration-dependent manner. *RNA Biol*. doi:10.1080/15476286.2019.1708548.
- Gámbaro F 2019. Mecanismo de secreción de mitades 5' de tRNAGly a través de vesículas extracelulares. 2018. UdelaR, Facultad de Ciencias. M.Sc. defensa.
- Garcia-Silva MR, Cura Das Neves RF, Cabrera-Cabrera F, Sanguinetti J, Medeiros LC, Robello C, Naya H, Fernandez-Calero T, Souto-Padron T, De Souza W, et al. 2014. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitol Res*. 113(1):285–304. doi:10.1007/s00436-013-3655-1.
- Garcia-Silva MR, Frugier M, Tosar JP, Correa-Dominguez A, Ronalte-Alves L, Parodi-Talice A, Rovira C, Robello C, Goldenberg S, Cayota A. 2010. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol Biochem Parasitol*. 171(2):64–73. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.02.003.
- Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat Rev Genet*. 10(2):94–108. doi:10.1038/nrg2504.
- Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. doi:10.1038/ncb1929.
- Gingold H, Tehler D, Christoffersen NR, Nielsen MM, Asmar F, Kooistra SM, Christophersen NS, Christensen LL, Borre M, Sørensen KD, et al. 2014. A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation. *Cell*. 158(6):1281–1292. doi:10.1016/j.cell.2014.08.011.
- Goodarzi H, Liu X, Nguyen HCB, Zhang S, Fish L, Tavazoie SF. 2015. Endogenous

- tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2015.02.053.
- Haraszti RA, Miller R, Dubuke ML, Rockwell HE, Coles AH, Sapp E, Didiot MC, Echeverria D, Stoppato M, Sere YY, et al. 2019. Serum Deprivation of Mesenchymal Stem Cells Improves Exosome Activity and Alters Lipid and Protein Composition. *iScience*. 16:230–241. doi:10.1016/j.isci.2019.05.029.
- Harding C, Heuser J, Stahl P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 97(2):329–339. doi:10.1083/jcb.97.2.329.
- Hasler D, Meduri R, Bık M, Lehmann G, Heizinger L, Wang X, Li ZT, Sement FM, Bruckmann A, Dock-Bregeon AC, et al. 2020. The Alzami Syndrome-Associated Protein LARP7 Guides U6 Small Nuclear RNA Modification and Contributes to Splicing Robustness. *Mol Cell*. 77(5):1014–1031.e13. doi:10.1016/j.molcel.2020.01.001.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2013. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. 303(5663):1526–1529.
- HOAGLAND MB, STEPHENSON ML, SCOTT JF, HECHT LI, ZAMECNIK PC. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem*. doi:10.1016/S0021-9258(19)77302-5.
- Honda S, Loher P, Shigematsu M, Palazzo JP, Suzuki R, Imoto I, Rigoutsos I, Kirino Y. 2015. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1510077112.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, 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(7578):329–335. doi:10.1038/nature15756.
- Hua M, Liu W, Chen Y, Zhang F, Xu B, Liu S, Chen G, Shi H, Wu L. 2019. Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for in vitro fertilization. *Cell Discov*. 5(1). doi:10.1038/s41421-019-0087-9.
- Huh D, Passarelli MC, Gao J, Dusmatova SN, Goin C, Fish L, Pinzaru AM, Molina H, Mcmillan EA, Goodarzi H, et al. 2020. A stress-induced Tyrosine tRNA depletion response mediates codon-based translational repression and growth suppression. *Laboratory of Systems Cancer Biology, The Rockefeller University, New York, NY, USA Department of Biochemistry & Biophysics, Unive*.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee MLT, Schmittgen TD, et al. 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 3(11). doi:10.1371/journal.pone.0003694.
- Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P. 2011. Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.022.
- Ivanov P, O'Day E, Emara MM, Wagner G, Lieberman J, Anderson P. 2014. G-quadruplex structures contribute to the neuroprotective effects of angiogenin-induced tRNA fragments. *Proc Natl Acad Sci*. doi:10.1073/pnas.1407361111.
- Jakymiw A, Pauley KM, Li SL, Ikeda K, Lian S, Eystathioy T, Satoh M, Fritzler MJ, Chan EKL. 2007. Erratum: The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing (*Journal of Cell Science* vol. 120 (1317–1323)). *J Cell Sci*. 120(9):1702. doi:10.1242/jcs.03452.
- Janas Teresa, Janas MM, Sapoń K, Janas Tadeusz. 2015. Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett*. 589(13):1391–1398. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.036.

- Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, Liebler DC, Ping J, Liu Q, Evans R, et al. 2019. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 177(2):428-445.e18. doi:10.1016/j.cell.2019.02.029.
- Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B, Boysen AT, Whitehead B, Dyrskjøt L, Ørntoft TF, Howard KA, Ostenfeld MS. 2014. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles*. 3(1):1–16. doi:10.3402/jev.v3.25011.
- Jha. 1992. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells \*. 284:215–221.
- Jöchl C, Rederstorff M, Hertel J, Stadler PF, Hofacker II, Schrettl M, Haas H, Hüttenhofer A. 2008. Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkn123.
- Juan Pablo Tosar KW, Cayota A. 2021. Revisiting Extracellular RNA Release, Processing, and Function. *Cell Press J*.
- Kanai A. 2015. Disrupted tRNA genes and tRNA fragments: A perspective on tRNA gene evolution. *Life*. 5(1):321–331. doi:10.3390/life5010321.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11(5):373–384. doi:10.1038/ni.1863.
- Kawasaki T, Kawai T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 5(SEP):1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- Kim HK, Fuchs G, Wang S, Wei W, Zhang Y, Park H, Roy-Chaudhuri B, Li P, Xu J, Chu K, et al. 2017. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature*. doi:10.1038/nature25005.
- Kirchner S, Ignatova Z. 2015. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat Rev Genet*. doi:10.1038/nrg3861.
- Klingeborn M, Dismuke WM, Skiba NP, Kelly U, Stamer WD, Bowes Rickman C. 2017. Directional Exosome Proteomes Reflect Polarity-Specific Functions in Retinal Pigmented Epithelium Monolayers. *Sci Rep*. doi:10.1038/s41598-017-05102-9.
- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A. 2006. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia*. doi:10.1038/sj.leu.2404387.
- Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1521230113.
- Kramer MF. 2011. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol*.(SUPPL. 95):1–15. doi:10.1002/0471142727.mb1510s95.
- Kumar P, Anaya J, Mudunuri SB, Dutta A. 2014. Kumar\_2014\_Meta-analysis\_of\_tRFs\_reveals\_conservation\_and\_target\_association. :1–14. doi:10.1186/s12915-014-0078-0.
- Kumar P, Kuscu C, Dutta A. 2016. Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends Biochem Sci*. 41(8):679–689. doi:10.1016/j.tibs.2016.05.004.
- Kusku C, Kumar P, Kiran M, Su Z, Malik A, Dutta A. 2018. tRNA fragments (tRFs) guide Ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner. *CSHL Press*. DOI: 10.1261/rna.066126.118.

- Lee SR, Collins K. 2005. Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.M510356200.
- Li C, Chen Y. 2015. Small and Long Non-Coding RNAs: Novel Targets in Perspective Cancer Therapy. *Curr Genomics*. 16(5):319–326. doi:10.2174/1389202916666150707155851.
- Li S, Hu GF. 2012. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol*. 227(7):2822–2826. doi:10.1002/jcp.23051.
- Li S, Xu Z, Sheng J. 2018. tRNA-derived small RNA: A novel regulatory small non-coding RNA. *Genes (Basel)*. 9(5). doi:10.3390/genes9050246.
- Li Y, Luo J, Zhou H, Liao JY, Ma LM, Chen YQ, Qu LH. 2008. Stress-induced tRNA-derived RNAs: A novel class of small RNAs in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkn596.
- Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. 2015. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 4(1). doi:10.3402/jev.v4.29509.
- Lunavat TR, Cheng L, Einarsdottir BO, Bagge RO, Muralidharan SV, Sharples RA, Lässer C, Gho YS, Hill AF, Nilsson JA, et al. 2017. BRAFV600 inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(29):E5930–E5939. doi:10.1073/pnas.1705206114.
- Lunavat TR, Cheng L, Kim DK, Bhadury J, Jang SC, Lässer C, Sharples RA, López MD, Nilsson J, Gho YS, et al. 2015. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol*. 12(8):810–823. doi:10.1080/15476286.2015.1056975.
- Lyons SM, Achorn C, Kedersha NL, Anderson PJ, Ivanov P. 2016. YB-1 regulates tRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkw418.
- Lyons SM, Fay MM, Akiyama Y, Anderson PJ, Ivanov P. 2017. RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA Biol*. 14(2):171–178. doi:10.1080/15476286.2016.1272746.
- Lyons SM, Gudanis D, Coyne SM, Gdaniec Z, Ivanov P. 2017. Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs. *Nat Commun*. doi:10.1038/s41467-017-01278-w.
- Lyons SM, Kharel P, Akiyama Y, Ojha S, Dave D, Tsvetkov V, Merrick W, Ivanov P, Anderson P. 2020. eIF4G has intrinsic G-quadruplex binding activity that is required for tRNA function. *Nucleic Acids Res*. 48(11):6223–6233. doi:10.1093/nar/gkaa336.
- Martens-Uzunova ES, Olvedy M, Jenster G. 2013. Beyond microRNA - Novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. *Cancer Lett*. 340(2):201–211. doi:10.1016/j.canlet.2012.11.058.
- Marton S, Garcia MR, Robello C, Persson H, Trajtenberg F, Pritsch O, Rovira C, Naya H, Dighiero G, Cayota A. 2008. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia*. 22(2):330–338. doi:10.1038/sj.leu.2405022.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. doi:10.1038/s41556-018-0250-9.
- Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E,

- Perelman LT, Melo CA, et al. 2014. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.005.
- Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. 2008. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol*. doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01111.x.
- Mishima E, Inoue C, Saigusa D, Inoue R, Ito K, Suzuki Y, Jinno D, Tsukui Y, Akamatsu Y, Araki M, et al. 2014. Conformational change in transfer RNA is an early indicator of acute cellular damage. *J Am Soc Nephrol*. doi:10.1681/ASN.2013091001.
- Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2(1). doi:10.1038/ncomms1285.
- Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. 2010. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: Non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*. 284(2):95–103. doi:10.1007/s00438-010-0556-1.
- Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, Soria CE, Oquin S, Bonebreak CM, Saracoglu E, et al. 2013. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem*. 394(10):1253–1262. doi:10.1515/hsz-2013-0141.
- Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, et al. 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 119(3):756–766. doi:10.1182/blood-2011-02-338004.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 3(1):1–14. doi:10.3402/jev.v3.24641.
- Nechooshtan G, Yunusov D, Chang K, Gingeras TR. 2020. Processing by RNase 1 forms tRNA halves and distinct y RNA fragments in the extracellular environment. *Nucleic Acids Res*. 48(14):8035–8049. doi:10.1093/nar/gkaa526.
- Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, et al. 2009. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 284(49):34211–34222. doi:10.1074/jbc.M109.041152.
- Pawar K, Shigematsu M, Sharbati S, Kirino Y. 2020. Infection-induced 5'-half molecules of tRNA<sup>His</sup>GUG activate Toll-like receptor 7. *PLoS Biol*. 18(12). doi:10.1371/journal.pbio.3000982.
- Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, De Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(14):6328–6333. doi:10.1073/pnas.0914843107.
- Pekarskya Y, Balatti V, Palamarchuk A, Rizzotto L, Veneziano D, Nigita G, Rassenti LZ, Pass HI, Kipps TJ, Liu CG, et al. 2016. Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1604266113.
- Pliatsika V, Loher P, Magee R, Telonis AG, Londin E, Shigematsu M, Kirino Y, Rigoutsos I. 2018. MINTbase v2.0: A comprehensive database for tRNA-derived fragments that includes nuclear and mitochondrial fragments from all the Cancer Genome Atlas projects. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkx1075.
- Pliatsika V, Loher P, Telonis AG, Rigoutsos I. 2016. MINTbase: A framework for the interactive exploration of mitochondrial and nuclear tRNA fragments. *Bioinformatics*.

doi:10.1093/bioinformatics/btw194.

Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. 2009. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 10(1):42–46. doi:10.3816/CLC.2009.n.006.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C V., Melief CJM, Geuze HJ. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 183(3):1161–1172. doi:10.1084/jem.183.3.1161.

Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 200(4):373–383. doi:10.1083/jcb.201211138.

Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J, Del Turco D, Starmann J, Macas J, Karpova D, Devraj K, et al. 2014. Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of Genetic Information between the Hematopoietic System and the Brain in Response to Inflammation. *PLoS Biol*. doi:10.1371/journal.pbio.1001874.

Robinson MD, Oshlack A. 2010. Deseq2论文附录. *Genome Biol*. 11(3).

Saikia M, Jobava R, Parisien M, Putnam A, Krokowski D, Gao X-H, Guan B-J, Yuan Y, Jankowsky E, Feng Z, et al. 2014. Angiogenin-Cleaved tRNA Halves Interact with Cytochrome c, Protecting Cells from Apoptosis during Osmotic Stress. *Mol Cell Biol*. doi:10.1128/MCB.00136-14.

Saikia M, Krokowski D, Guan BJ, Ivanov P, Parisien M, Hu GF, Anderson P, Pan T, Hatzoglou M. 2012. Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. *J Biol Chem*. 287(51):42708–42725. doi:10.1074/jbc.M112.371799.

Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, et al. 2015. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep*. doi:10.1038/srep07675.

Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Kucukural A, Serra RW, Sun F, Song L, et al. 2015. sharma2015\_sperm tRNA. 6780(December):1–9.

Shen B, Wu N, Yang M, Gould SJ. 2011. Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J Biol Chem*. 286(16):14383–14395. doi:10.1074/jbc.M110.208660.

Short AK, Yeshurun S, Powell R, Perreau VM, Fox A, Kim JH, Pang TY, Hannan AJ. 2017. Exercise alters mouse sperm small noncoding RNAs and induces a transgenerational modification of male offspring conditioned fear and anxiety. *Transl Psychiatry*. 7(5):e1114-12. doi:10.1038/tp.2017.82.

Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis K V., Ri S, Schekman R. 2016. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*. doi:10.7554/eLife.19276.

Shurtleff MJ, Yao J, Qin Y, Nottingham RM, Temoche-Diaz MM, Schekman R, Lambowitz AM. 2017. Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1712108114.

Simonsen J. 2019. Pitfalls associated with lipophilic fluorophore staining of extracellular vesicles for uptake studies. *JEV*. doi.org/10.1080/20013078.2019.1582237.

Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, Venkateswaran S, Manganelli R, Barzon L. 2020. Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers. *Cells*. doi:10.3390/cells9102160

- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 10(12):1470–1476. doi:10.1038/ncb1800.
- Sobala A, Hutvagner G. 2011. Transfer RNA-derived fragments: Origins, processing, and functions. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2(6):853–862. doi:10.1002/wrna.96.
- Somiya, Kuroda. 2021. 5 6 7 8.
- Speer J, Gehrke CW, Kuo KC, Waalkes TP, Borek E. 1979. tRNA breakdown products as markers for cancer. *Cancer.* doi:10.1002/1097-0142(197912)44:6<2120::AID-CNCR2820440623>3.0.CO;2-6.
- Stefani G, Slack FJ. 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3):219–230. doi:10.1038/nrm2347.
- Su Z, Kuscu C, Malik A, Shibata E, Dutta A. 2019. Angiogenin generates specific stress-induced tRNA halves and is not involved in tRF-3-mediated gene silencing. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.RA119.009272.
- Taft RJ, Glazov EA, Cloonan N, Simons C, Stephen S, Faulkner GJ, Lassmann T, Forrest ARR, Grimmond SM, Schroder K, et al. 2009. Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. *Nat Genet.* doi:10.1038/ng.312.
- Taft RJ, Simons C, Nahkuri S, Oey H, Korbie DJ, Mercer TR, Holst J, Ritchie W, Wong JJJ, Rasko JEJ, et al. 2010. Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. *Nat Struct Mol Biol.* doi:10.1038/nsmb.1841.
- Taylor DD, Shah S. 2015. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods.* 87(March):3–10. doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.019.
- Temoche-Diaz MM, Shurtleff MJ, Nottingham RM, Yao J, Fadadu RP, Lambowitz AM, Schekman R. 2019. Distinct mechanisms of microRNA sorting into cancer cell-derived extracellular vesicle subtypes. *bioRxiv.*:1–34. doi:10.1101/612069.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 30(1):3.22.1-3.22.29. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 9(8):581–593. doi:10.1038/nri2567.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, 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(1). doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. 2002. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2(8):569–579. doi:10.1038/nri855.
- Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R. 2008. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *Rna.* 14(10):2095–2103. doi:10.1261/rna.1232808.
- Tkach M, Théry C. 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell.* 164(6):1226–1232. doi:10.1016/j.cell.2016.01.043.
- Tomita K, Ogawa T, Uozumi T, Watanabe K, Masaki H. 2000. A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(15):8278–8283. doi:10.1073/pnas.140213797.
- De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in

- normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol.* 6(MAY):1–12. doi:10.3389/fimmu.2015.00203.
- Tosar JP, Witwer K, Cayota A. 2021a. Revisiting Extracellular RNA Release, Processing, and Function. *TiBS.* doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.008.
- Tosar JP. 2021b. Die hard: resilient RNAs in the blood. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5008:41580. doi:10.1038/s41580-021-00355-9.
- Tosar JP, Cayota A. 2020. Extracellular tRNAs and tRNA-derived fragments. *RNA Biol.* 00(00):1–19. doi:10.1080/15476286.2020.1729584.
- Tosar JP, Cayota A, Eitan E, Halushka MK, Witwer KW. 2017. Ribonucleic artefacts: are some extracellular RNA discoveries driven by cell culture medium components? *J Extracell Vesicles.* doi:10.1080/20013078.2016.1272832.
- Tosar JP, Gámbaro F, Darré L, Pantano S, Westhof E, Cayota A. 2018. Dimerization confers increased stability to nucleases in 5' halves from glycine and glutamic acid tRNAs. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gky495.
- Tosar JP, Gámbaro F, Sanguinetti J, Bonilla B, Witwer KW, Cayota A. 2015. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkv432.
- Tosar JP, Segovia M, Castellano M, Gámbaro F, Akiyama Y, Fagúndez P, Olivera Á, Costa B, Possi T, Hill M, et al. 2020. Fragmentation of extracellular ribosomes and tRNAs shapes the extracellular RNAome. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkaa674.
- Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Heine U. 1981. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta.* [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5).
- Tuck AC, Tollervey D. 2011. RNA in pieces. *Trends Genet.* 27(10):422–432. doi:10.1016/j.tig.2011.06.001.
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39(16):7223–7233. doi:10.1093/nar/gkr254.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 9(6):654–659. doi:10.1038/ncb1596.
- Vallee BL, Riordan JF, Lobb RR, Higachi N, Fett JW, Crossley G, Bühler R, Budzik G, Breddam K, Bethune JL, et al. 1985. Tumor-derived angiogenesis factors from rat Walker 256 carcinoma: an experimental investigation and review. *Experientia.* doi:10.1007/BF02005853.
- Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. 2013. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* doi:10.1038/ncomms3980.
- Wang Q, Lee I, Ren J, Ajay SS, Lee YS, Bao X. 2013. Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection. *Mol Ther.* doi:10.1038/mt.2012.237.
- Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN. 2018. Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides. *Molecules.* doi:10.3390/molecules23102564.
- Wei Z, Batagov AO, Carter DRF, Krichevsky AM. 2016. Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Sci Rep.*

doi:10.1038/srep31175.

Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KEM, Sadik M, Alaarg A, Smith CIE, Lehtiö J, El Andaloussi S, et al. 2016. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep.* 6(September 2015):1–12. doi:10.1038/srep22519.

Wolf P. 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 13(3):269–288. doi:10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.

Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. 2018. S100 proteins as an important regulator of macrophage inflammation. *Front Immunol.* 8(JAN):1–11. doi:10.3389/fimmu.2017.01908.

Xiao Y, Driedonks T, Witwer KW, Wang Q, Yin H. 2020. How does an RNA selfie work? EV-associated RNA in innate immunity as self or danger. *J Extracell Vesicles.* 9(1). doi:10.1080/20013078.2020.1793515.

Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P. 2009. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.200811106.

Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY. 2008. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Rna.* 14(11):2348–2360. doi:10.1261/rna.1034808.

Zhang X, Cozen AE, Liu Y, Chen Q, Lowe TM. 2016. Small RNA Modifications: Integral to Function and Disease. *Trends Mol Med.* 22(12):1025–1034. doi:10.1016/j.molmed.2016.10.009.

Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schäfer R, Beerling E, Schiffelers RM, De Wit E, Berenguer J, Ellenbroek SIJ, et al. 2015. In vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2015.04.042.

## Agradecimientos

El teólogo alemán Meister Eckhart, influenciado por Santo Tomás de Aquino, dijo en el 1300 que si en la vida lo único que se dice es “gracias”, ya eso es suficiente.

Estos últimos dos años en el IPMon fueron realmente positivos en muchos sentidos, en particular el académico. Estudiar y experimentar la naturaleza de esta manera y guiado por dos de los mejores tutores que podría haber pedido fue realmente una de las cosas que me van a quedar para siempre. Fueron dos años de crecimiento personal, profesional, de aprender autonomía intelectual, de entender el mundo desde un punto de vista crítico y sobre todo, de crecimiento humano, siempre guiado por Juan Pablo y por Alfonso. Por eso, no me queda más que decir gracias. Espero que, como dijo Eckhart, gracias sea suficiente, porque no tengo cómo más expresar mi profundo respeto por ellos. Tengo que sumar a mi padre, madre y hermana que me apuntalaron desde los mismos frentes. Tal vez no desde un punto de vista científico, pero sí desde un punto de vista humano. Siempre que las cosas se volvían difíciles, ellos estaban para dar ánimo, soporte y apoyo. Para ellos, mi más profunda admiración. Y a Juan, que siempre estuvo.

En segundo lugar tengo que dar las gracias a mis compañeros: Fabiana, Tania, Mauri, Vale, Bruno, Sergio, Rosa, Pablo y todos los que trabajan en GF, que siempre estuvieron para aportar y nunca para restar. Siempre tuvieron una sonrisa, una palabra de aliento y ganas de colaborar. Las salidas, las opiniones, las risas. Todo siempre sumó, y ellos hicieron que el laboratorio fuera más que una mesada y que se transformara en un lugar de comunión. A ellos también, mi más profundo respeto. Acá también quiero sumar a los chiquilines que siempre están/estaban en la salita: Clau, Colo, Flor, Fede, Martín, Joaco, Nati O., Nati I., Nicky, Vero, Mariana, Juan. Otras personas que fueron muy importantes en mi camino por la maestría en el Pasteur: Vale P., Marcela D., Marcela V., Sabina, Amparo, Angimar, Cata, Julia. Gracias a todos ellos por los lindos momentos y por hacerme sentir parte de la comunidad desde el primer día. A los chicos de la cantina: Bruno, Lu, Lety. Sin ellos sería todo tantísimo más difícil.

Gracias a todas las personas que me instruyeron en los cursos. En la UdelaR se hace ciencia de la buena. Gracias a Leonel Malacrida y José Badano por todas sus enseñanzas durante mi pasantía en la UBA.

Gracias a la Dra. Geisinger, Dra. Duhagón y Dra. Boccaccio por formar parte de mi tribunal. Es un honor poder ser juzgado por figuras tan respetadas en el área.

Gracias al Institut Pasteur, a la Facultad de Ciencias (UdelaR), a la ANII y al NIH por los fondos para poder realizar todo este trabajo.