



Tesina de Graduación

Licenciatura en Bioquímica

“Obtención, purificación y análisis de distintas fracciones extracelulares como vehículos de secreción celular de pequeños ARNs reguladores”

Fabiana Gámbaro

Tutor: Mag. Juan Pablo Tosar

Co-tutor: Dr. Alfonso Cayota

Montevideo, Julio 2015

INDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
Palabras claves	6
Introducción	
1. Cáncer.....	8
2. ARNs pequeños reguladores.....	10
2.1. MicroARNs.....	12
2.1.1. Biogénesis.....	12
2.1.2. MicroARNs y cáncer.....	13
2.2. Fragmentos de ARNt.....	15
2.2.1. tRF-1.....	16
2.2.2. tRF-3 y tRF-5.....	16
2.2.3. tiRNA.....	17
3. ARNs circulantes: “secretoma de ARN”	22
3.1. Vesículas extracelulares: biogénesis y caracterización.....	23
3.2. Función de las vesículas extracelulares.....	26
3.3. Aplicación de las vesículas como biomarcadores.....	27
4. El secretoma de pequeños ARNs de la línea celular MCF-7 en distintas fracciones extracelulares.....	29
Objetivo	
1. Objetivos específicos.....	32
Materiales y métodos	
1. Cultivos celulares.....	33
2. Purificación de las vesículas extracelulares y fracción ribonucleoproteica.....	34
3. Obtención del ARN.....	35
4. Obtención de las proteínas.....	37
5. Tinción negativa mediante microscopia electrónica de transmisión de las vesículas extracelulares.....	39
6. Caracterización de las vesículas mediante análisis de seguimiento de Nanopartículas.....	40
7. <i>Western Blot</i> de marcadores exosomales: tsg101, CD9	41
8. <i>Western Blot</i> del marcador exosomal CD63.....	42
9. RT-qPCR para la detección de mitades de ARNt y microARNs....	42
10. Análisis del ARN mediante Bioanalyzer.....	47
11. Análisis estadístico.....	47

Resultados

1. Obtención y caracterización de las poblaciones vesiculares.....	48
1.1 Cultivo de células.....	49
1.2 Caracterización de las poblaciones vesiculares.....	49
1.2.1 Caracterización mediante microscopia electrónica de transmisión y NTA.....	51
1.2.2 Caracterización mediante <i>Western blot</i>	54
2. Caracterización de la fracción s100.....	62
3. Evaluación por SL RT-qPCR la expresión de ARNs pequeños.....	65
Discusión.....	75
Conclusión.....	81
Bibliografía.....	83

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente:

Al Dr. Alfonso Cayota por haberme dado la oportunidad y confianza de realizar la pasantía de grado en su laboratorio.

A Juan Pablo Tosar por aceptar dirigir este trabajo; por la dedicación y enseñanza brindada y por su gran disposición.

A mis compañeros del laboratorio, Braulio Bonilla y Julia Sanguinetti por todo su apoyo diario, compañerismo y por generar un ambiente tan agradable en el laboratorio.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico para poder llevar a cabo la pasantía de grado a través de la Beca de Iniciación a la Investigación.

RESUMEN

Los pequeños ARNs reguladores cumplen un rol fundamental en la regulación de la expresión génica. Esta familia de pequeños ARNs reguladores se encuentra en continua expansión y su desregulación ha sido asociada a distintos procesos patológicos en medicina. Además de su rol regulatorio intracelular, los pequeños ARNs son secretados al medio extracelular por las células a través de vesículas como exosomas y microvesículas, o en forma de complejos ribonucleoproteicos. De esta forma los ARNs pequeños son componentes naturales del medio extracelular con capacidad de circular por distintos fluidos corporales. Recientemente se demostró que las vesículas extracelulares pueden ser transferidos a otras células transfiriendo los pequeños ARNs con mantenimiento de su funcionalidad y capacidad regulatoria una vez internalizados, por lo que podrían modular la expresión génica de la célula receptora. Por este motivo, a partir de este descubrimiento, el estudio de secreción de las vesículas extracelulares (vectores) y ARNs circulantes ha suscitado gran interés por su rol en la comunicación célula-célula y en particular en el contexto de la biología tumoral dado que las células tumorales suelen secretar grandes cantidades de vesículas extracelulares y porque las mismas suelen modular al ambiente circundante en su propio beneficio.

Si bien los microARNs son la clase más estudiada de ARNs pequeños,, otras familias como las mitades de ARNt (tiRNAs) han despertado mayor interés últimamente, por su abundancia en el medio extracelular asociado a complejos proteicos.

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de las vesículas extracelulares secretadas por la línea celular MCF-7 mediante diversas técnicas: microscopía electrónica de transmisión (TEM), *Western Blot*, dispersión dinámica de luz (DLS) y análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Por otro lado, se validó mediante *SL-RT-qPCR* la abundancia en el medio extracelular de dos tiRNAs: tiRNA^{Gly} y tiRNA^{Glu}, predichos como las especies más abundantes en la fracción ribonucleoproteica extracelular. Estos estudios ponen de manifiesto un rol de los tiRNAs en el medio extracelular y se abren preguntas sobre el rol de estas especies en la comunicación intercelular

PALABRAS CLAVE

ARNm - ARN mensajero

ARNt - ARN de transferencia

miARN - microARN

sARN - ARN pequeño

siARN – ARN interferente

piARN – pequeño ARN asociado a proteínas piwi

tiRNA - mitades de ARNt

tiRNA^{Glu} – mitades 5' del isoceptor glutámico

tiRNA^{Gly} – mitades 5' del isoceptor de glicina

tRF-1 – fragmentos de ARN de transferencia reguladores del tipo 1

tRF-3 - fragmentos de ARN de transferencia reguladores del tipo 3

tRF-5 - fragmentos de ARN de transferencia reguladores del tipo 5

ARNr – ARN ribosomal

ARNpno – pequeños ARN nucleolares

ARNpn – pequeños ARN nucleares

ARNv – vault ARN

Ago – Argonauta

EXO - exosomas

MV – microvesículas

ANG – angiogenina

APC – células presentadoras de antígeno

MHC I – complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

MHC II - complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

EGFR VIII - receptor de factor de crecimiento epidérmico variante III

INTRODUCCION

1. Cáncer

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades caracterizadas por una expresión anormal y descontrolada de la expresión génica. Esto puede suceder debido a mutaciones que provocan la pérdida o ganancia de función en genes claves para el mantenimiento de la homeostasis celular. Típicamente se observa una alteración en los niveles de expresión de un oncogén y/o gen supresor de tumores.

El cáncer puede ser hereditario producto de mutaciones que afectan uno o ambos alelos de las células germinales, o esporádico producto de mutaciones espontáneas y de la acción de agentes carcinógenos ambientales (radiaciones o sustancias químicas).

A medida que las células normales van evolucionando hacia un estado tumoral, estas sufren una serie de cambios o alteraciones fenotípicas que resultan ineludibles en el proceso de transformación. Esta serie de alteraciones pueden resumirse en: la capacidad de autosuficiencia en el desarrollo de señales de crecimiento y mantenimiento de señales de proliferación, evasión de las señales antiproliferativas, activación y adquisición de capacidad invasiva (local y metástasis), desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal, inducción de la angiogénesis y resistencia a la muerte celular (Figura 1) [1]

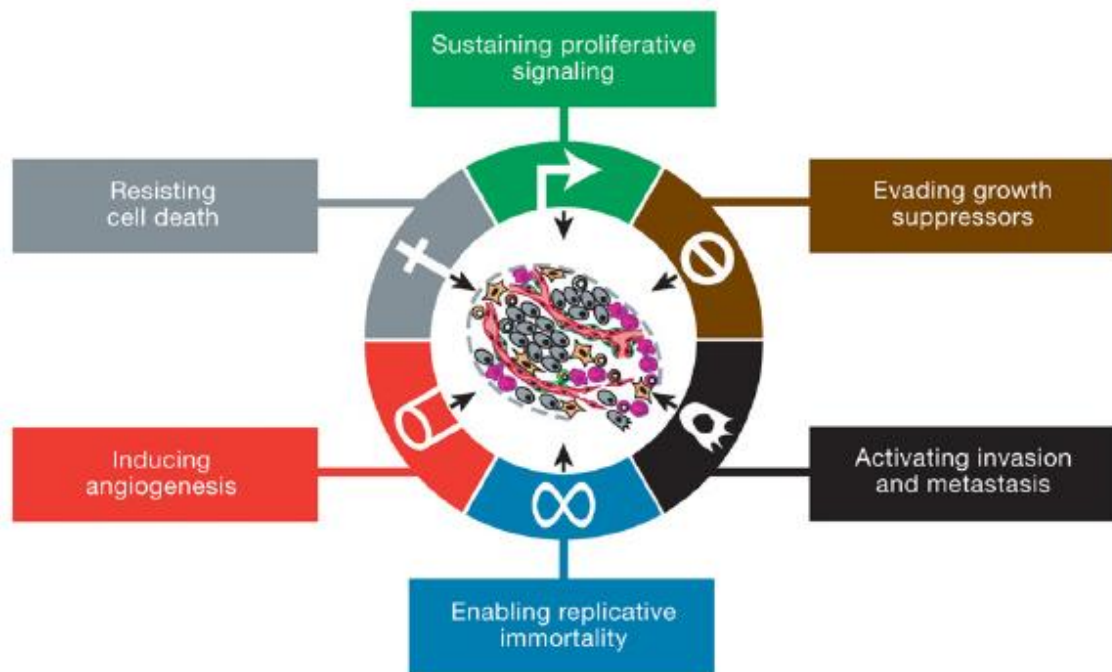


Figura 1: Esquema que resume las diferentes alteraciones que debe experimentar una célula normal en el desarrollo del cáncer [1].

Por lo tanto, el desarrollo del cáncer es un proceso que requiere varias etapas mediante las cuales las células van adquiriendo distintas características que en última instancia conducen a las mismas a su conversión en células cancerosas (transformación celular). Muchos obstáculos se deben superar para que esta conversión se dé a lugar, como por ejemplo la supervivencia en ambientes hostiles. De hecho, se sabe que la comunicación entre las células tumorales y el microambiente circundante es esencial para que las células superen este tipo de obstáculos, se dé lugar a la formación de tumor, y que las células transformadas se establezcan en sitios lejanos (metástasis).

Estudios recientes han reconocido a las vesículas extracelulares (microvesículas y exosomas) como importantes mediadores de comunicación intercelular dado que estos portan lípidos, proteínas, ARNm y en particular ARNs pequeños, los cuales pueden ser transferidos a células receptoras [2]. En el contexto del cáncer, se ha visto como a través de este tipo de comunicación se podría dar lugar a la transferencia de una célula a otra de un fenotipo pro-oncogénico estimulando la progresión tumoral [3]. Si bien en este panorama las vesículas extracelulares actuarían como vectores de transferencia de contenido celular capaz de promover la transformación, para que estas células receptoras evolucionen hacia un estado neoplásico es necesario que ocurran alteraciones génicas adicionales que promuevan el fenotipo tumoral.

Dado todo lo anterior, este novedoso mecanismo de intercambio de información genética entre células así como el tipo de información transferida, en particular los ARNs pequeños, ha despertado gran interés en el estudio de la biología tumoral.

2. ARNs pequeños

De la totalidad del genoma, solamente el 1- 2% del mismo codifica para proteínas y el resto era antes denominado ADN basura por su carácter no codificante. Hoy se sabe que a partir de esta región se codifica para

precursores de ARNs reguladores de diverso tipo, aunque sigue habiendo regiones del genoma sin función conocida.

Los ARNs reguladores se clasifican en grandes y pequeños según su tamaño, y nos centraremos en adelante en estos últimos. Diversas familias de pequeños ARNs no codificantes han sido identificadas en la mayoría de los organismos eucariotas como los principales reguladores de la expresión génica. Los mismos se caracterizan por su corta secuencia (20-35 nucleótidos) y su asociación con miembros de la familia Argonauta (Ago/Piwi) de proteínas. Basados en su origen, el subtipo de proteína Argonauta asociada, su biogénesis y mecanismos de acción, han sido agrupados en 3 principales familias: microARNs (miARNs), pequeños ARN de interferencia (siARNs) y ARNs asociados a proteínas Piwi (piARNs) [4]

En los últimos tiempos, con el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva se han identificado nuevas clases de pequeños ARNs por lo que esta familia se está ampliando constantemente. Dentro de los mismos encontramos fragmentos de ARNs derivados de ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), pequeños ARNs nucleares (ARNpns), pequeños ARNs nucleolares (ARNpnos), Y RNAs y vaultARNs (ARNv) [5]. Estos fragmentos de ARNs han despertado gran interés debido a que se asemejan en función a los miARNs, se encuentran asociados en algunas ocasiones con proteínas de la familia Argonauta [6] y porque, además, los distintos fragmentos son generados

por clivaje post-transcripcional de distintas clases de ARN mediante endonucleasas. En general poseen una función distinta a aquella del ARN parental, o compiten con los mismos por la maquinaria proteica asociada.

2.1 MicroARNs

Dentro de esta gran familia de ARNs pequeños, los miARNs son de los más estudiados dado que se ha estimado que regulan entre un 30 – 60% de los genes que en humanos codifican para proteínas

Los miARNs son pequeñas moléculas endógenas de ARN de entre 19 y 22 nucleótidos. Tienen la función de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante inhibición de la traducción y/o degradación de ARNs mensajeros (ARNm) blanco, uniéndose mediante apareamiento de bases a secuencias nucleotídicas [7]. El sitio de unión de los miARNs se encuentra generalmente en la región 3' UTR de los ARNm; este apareamiento miARN/ARNm no es perfecto y además suele abarcar una región de 6-7 bases denominada “semilla”. El bajo grado de complementariedad permite que los miARNs sean moléculas reguladoras sumamente versátiles dado que un mismo miARN puede silenciar varios mensajeros diferentes [8].

2.12 Biogénesis

Los genes de los miARNs son generalmente transcritos por la ARN polimerasa II para dar lugar a un transcripto primario (pri- miARNs). Luego la enzima RNasa III nuclear Drosha y su co-factor DGCR8 procesan a

este pri- miARN para dar lugar a un precursor de 60 nucleótidos aproximadamente, el pre- miARN. Estos son luego exportados al citoplasma y es así que estos pre- miARNs son procesados en miARNs dúplex de aproximadamente 21 – 25 nucleótidos por la enzima DICER, otra endonucleasa ARNasa III. Luego, una helicasa abre el dúplex de ARN y solamente una de las hebras es cargada en un complejo proteico ahora denominado miR-RISC, el cual es el responsable de la parte efectora del silenciamiento y está formado por una proteína de la familia Argonauta [9]. Este complejo regula la expresión de sus genes diana mediante represión transcripcional o degradación, valiéndose de una de las hebras del miARN como guía.

2.13 MicroARNs y cáncer

Muchos de los genes blancos de los miARNs son genes implicados en la regulación transcripcional, proliferación celular y apoptosis, esto implica que la expresión aberrante de miARNs podría contribuir con el inicio y/o progresión del cáncer así como el de otras enfermedades. Los primeros miARNs que fueron asociados al cáncer fueron miR15 y miR16. Estos miARNs en células normales tienen como gen blanco el factor anti apoptótico BCL2 [10] y se encuentran codificados en la región del cromosoma 13q14, la cual se encuentra deletada en la mayoría de los pacientes con leucemia linfoide crónica [11].

De esta forma, miARNs como miR15 y miR16 que presentan como genes blancos protooncogenes y que tienen efectos importantes en el silenciamiento de un oncogén se comportan como supresores tumorales. Asimismo, miARNs que regulan la expresión de genes supresores de tumores se encuentran por lo general sobre expresados en células tumorales y se comportan como oncogenes. Por consiguiente, una alteración en la expresión de microARNs puede provocar la sobre-expresión de un oncogén o el silenciamiento de un supresor tumoral, y así contribuir al desarrollo o el mantenimiento de la progresión tumoral. De hecho, hay evidencias de que distintos miARNs pueden actuar en las distintas etapas de la carcinogénesis: desarrollo, invasión, metástasis y resistencia a tratamientos como quimioterapia y radioterapia [12].

La expresión aberrante de miARNs es un hecho muy frecuente en el cáncer, tan así que estudios donde se comparan la expresión de diferentes miARNs entre tejidos cancerosos y tejidos normales demuestran una disminución global en la expresión de estos miARNs en tejidos tumorales con respecto a aquellos normales. Además, existe una relación directa entre la expresión de miARN y el tejido de origen de modo que cada tipo de cáncer presenta un perfil de expresión específico. Como consecuencia, distintos tipos de cáncer humanos pueden ser clasificados por medio de sus perfiles de microARNs [13].

Diferentes fenómenos pueden atribuirse como causas de la alteración de la expresión de miARNs tales como, un cambio en el número de copias

del gen, mutaciones o polimorfismos en el miARN o en el sitio de unión del mismo en el ARNm blanco o modificaciones epigenéticas. Dentro de estas últimas, el silenciamiento de miARNs que actúan como supresores tumorales mediante hipermetilación del ADN es un hecho frecuente en células tumorales [12] al igual que la hipometilación de miARNs que actúan como oncogenes lo que resulta en una sobre expresión del mismo. Por ejemplo, el promotor del gen let-7a se encuentra desmetilado en cáncer de pulmón y metilado en células normales [14].

2.2 Fragmentos de ARN de transferencia

Muchos de los ARNs no codificantes sufren procesamiento nucleolítico post-transcripcional para dar lugar a fragmentos más pequeños de ARN con funciones bien distintas y en muchos casos, aún desconocidas. En particular, distintos pequeños ARN reguladores derivan del procesamiento constitutivo o inducido de los ARN de transferencia (ARNt) maduros. A partir del procesamiento constitutivo de los ARNt se da lugar a los fragmentos de ARNt reguladores (tRFs) de 20-22 nt los cuales son clasificados según su origen como tRF-1, tRF-3 y tRF-5 [15]. Por otro lado, y especialmente en condiciones de estrés, a partir de ARNt maduros se originan mitades de ARNt denominadas “*tRNA-derived stress-induced small RNAs*” (tiRNAs). Estos corresponden a fragmentos de 30 y 40 nucleótidos de longitud que derivan de las mitades 5’ de ARNt (5’ tiRNAs) y mitades 3’ de ARNt (3’ tiRNAs) respectivamente [16] (Figura 2).

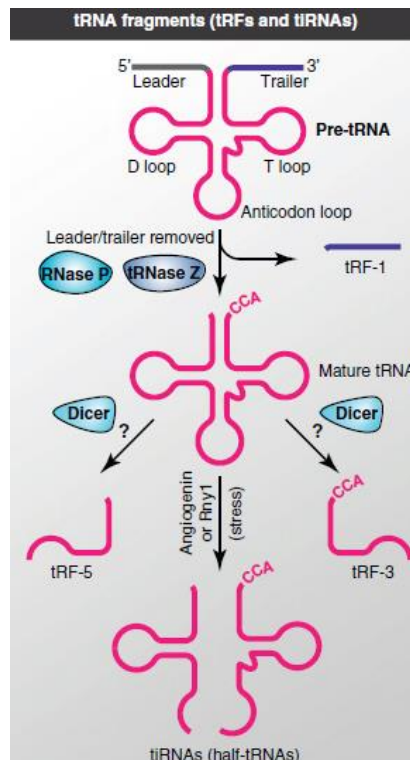


Figura 2: Esquema que resume el procesamiento de los ARNt [5]. A partir del procesamiento de las colas 5' y 3' de los pre-ARNt mediante la acción de la *tRNasa Z* se da lugar a los tRF-1. Luego a partir del clivaje de los ARNt a nivel del D- *loopy*T-loop se obtienen los fragmentos denominados tRF-5 y tRF-3 respectivamente. Y por último, el procesamiento por parte de la Angiogenina a nivel del *loop* del anticodon de los ARNt da lugar a las mitades de ARNt (tiRNAs) [5].

2.2.1 tRF-1

Los fragmentos tRF-1 corresponden a las colas 3' del pre- ARNt. Estos se generan por acción de la *tRNasa Z* como parte del procesamiento de maduración de los ARNt. Estas especies son citoplasmáticas, pero dado que la maduración de los pre-ARNt ocurre en el núcleo, esto sugiere que los tRF-1 son rápidamente exportados al citosol. Los tRFs se asocian con proteínas argonauta, pero en lugar de dirigir las mismas hacia blancos

específicos, parecerían actuar más bien como competidores de los miARNs [17]. En enfermedad proliferativas como el cáncer, los ARNt se encuentran sobre-expresados y los perfiles de miARNs perturbados. En particular se sabe que el tRF-1001, correspondiente a la cola 3' de un pre-tARN aceptor de serina, promueve la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon [15].

2.2.2 tRF-3 y tRF-5

Los fragmentos tRF-3 y tRF-5, son fragmentos de 13 – 22 nucleótidos de longitud que derivan del clivaje de ARNt maduros a nivel del T-loop y D-loop respectivamente [6]. Estudios demuestran su semejanza con los miARNs dado que su procesamiento es dependiente de DICER, [6, 18] se asocian con proteínas argonautas y además porque los tRF-3 pueden promover el silenciamiento de genes blanco [17].

2.2.3 Mitades de ARNt (tiRNAs)

Las mitades de ARNt (tiRNAs) son fragmentos de ARNt cuya biosíntesis es promovida por la ribonucleasa angiogenina (ANG) en humanos [17] y RNY1 en levaduras [18], las cuales clivan el ARNt maduro a nivel del loop del anticodon en condiciones de estrés nutricional, biológico o fisicoquímico. Este fenómeno de clivaje de ARNt bajo condiciones de estrés se ha visto en diversos organismos como *Trypanosoma cruzi* [19], *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens* [20].

En las células de mamífero, como respuesta al estrés por lo general se inhibe la síntesis proteica a nivel global mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α , con el fin de preservar la energía para dedicarla a la reparación del daño celular inducido. Recientemente se ha reportado la existencia de otro mecanismo de inhibición de la traducción independiente de la fosforilación de eIF2 α y este mecanismo es mediado principalmente por las mitades de ARNt. Hoy en día se sabe que, bajo situaciones de estrés celular, la angiogenina secretada por las células ingresa a las mismas y a las células vecinas mediante endocitosis mediada por receptor y cliva a los ARNt lo cual resulta en la producción de 5' tiRNA y 3'tiRNA. Los 5' tiRNA en estas condiciones, son capaces de inhibir la síntesis proteica global, inducir una re programación de la síntesis proteica que estimula la reparación de los daños y la sobrevivencia de la célula [19] y promover la formación de los gránulos de estrés [14, 23]. Los mismos están compuestos en gran cantidad por complejos de pre-iniciación, lo que sugiere que la maquinaria traduccional es el blanco de los tiRNAs.

Si bien el mecanismo por el cual los tiRNAs inhiben la traducción no ha sido por completo elucidado, un trabajo reciente demuestra que los tiRNA^{Ala} y tiRNA^{Cys}, los cuales tienen la particularidad de poseer un *track* de cuatro o cinco residuos de guanosina consecutivos en sus extremos 5', son capaces de inhibir la traducción ya que promueven el desplazamiento de los factores de inicio de la traducción eIF4E/G/A y eIF4G/A para los

mensajeros con y sin cap5' respectivamente, colaborando de esta forma con el proteína inhibidora de la traducción YB-1 [16].

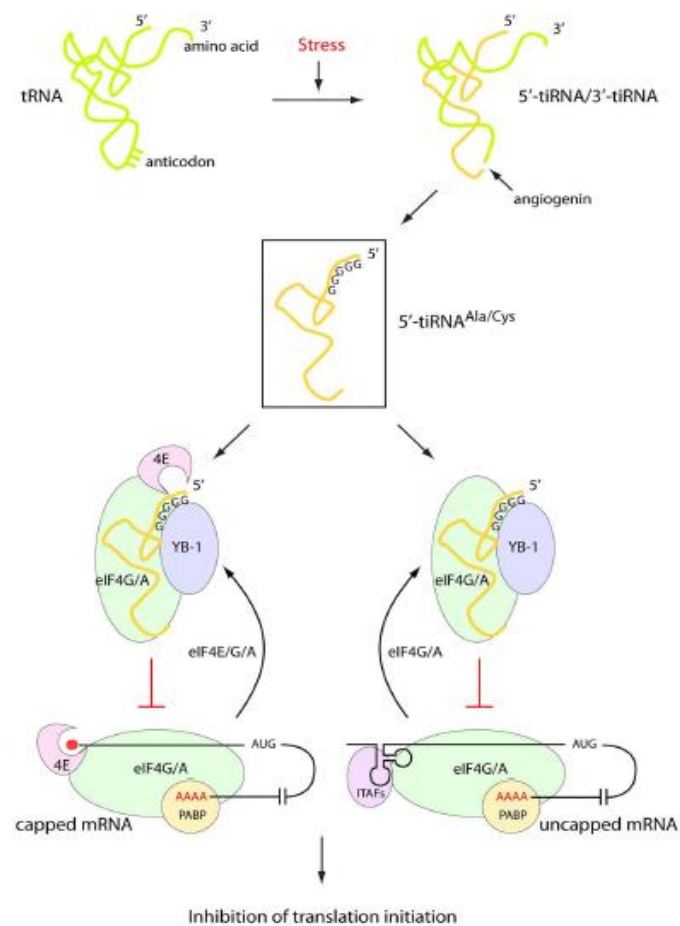


Figura 3: Mecanismo de inhibición traduccional en respuesta al estrés dependiente de tiRNA. Los tiRNA^{Ala} y tiRNA^{Cys} son capaces de promover el desplazamiento de los factores de inicio de la traducción eIF4E/G/A y eIF4G/A para los mensajeros con y sin cap5' respectivamente [16].

3. ARNs circulantes: “el secretoma de ARN”

Además de su rol biológico intracelular, los ARNs pequeños son secretados por la célula. Estudios recientes demuestran que los mismos pueden ser secretados dentro de vesículas, asociados a complejos ribonucleoproteicos o también asociados a complejos lipoproteicos de alta densidad (*HDL*) [20]. Se han encontrado la presencia de vesículas extracelulares en fluidos biológicos como saliva, sangre u orina. Se sabe también que estas vesículas extracelulares pueden ser captadas e internalizadas por células vecinas, y así los ARN pequeños pueden afectar la expresión génica de las células receptoras [2]. De esta forma, una célula sería capaz de provocar cambios significativos en una célula vecina o distante. Este proceso implica un mecanismo de transferencia horizontal célula a célula de la información genética, con importantes consecuencias en la biología y la patología humana, en particular en patologías como el cáncer. Este descubrimiento de secreción de macromoléculas incluidos ARNm, ARNs pequeños y proteínas como mecanismo de comunicación entre células ha adquirido gran importancia en el estudio del cáncer dado que las células tumorales suelen secretar grandes cantidades de vesículas extracelulares mediante las cuales podrían modular la función y el comportamiento de las células vecinas con el fin de facilitar su propia expansión y metástasis [21].

3.1 Vesículas extracelulares: biogénesis y caracterización

La mayoría de los tipos celulares secretan al espacio extracelular vesículas incluyendo células endoteliales, células epiteliales, neuronas, adipocitos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos B [22].

En primera instancia se creía que estas vesículas tenían la función de eliminar proteínas y otro tipo de moléculas no deseadas. Sin embargo, en años recientes, las mismas surgieron como importantes mediadores de comunicación intercelular en procesos fisiológicos normales tales como respuesta inmune y en el desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas y cáncer, por ejemplo [23].

Dependiendo de su origen, las vesículas extracelulares se clasifican en: microvesículas o ectosomas, exosomas o cuerpos apoptóticos (Figura 4) [20, 21].

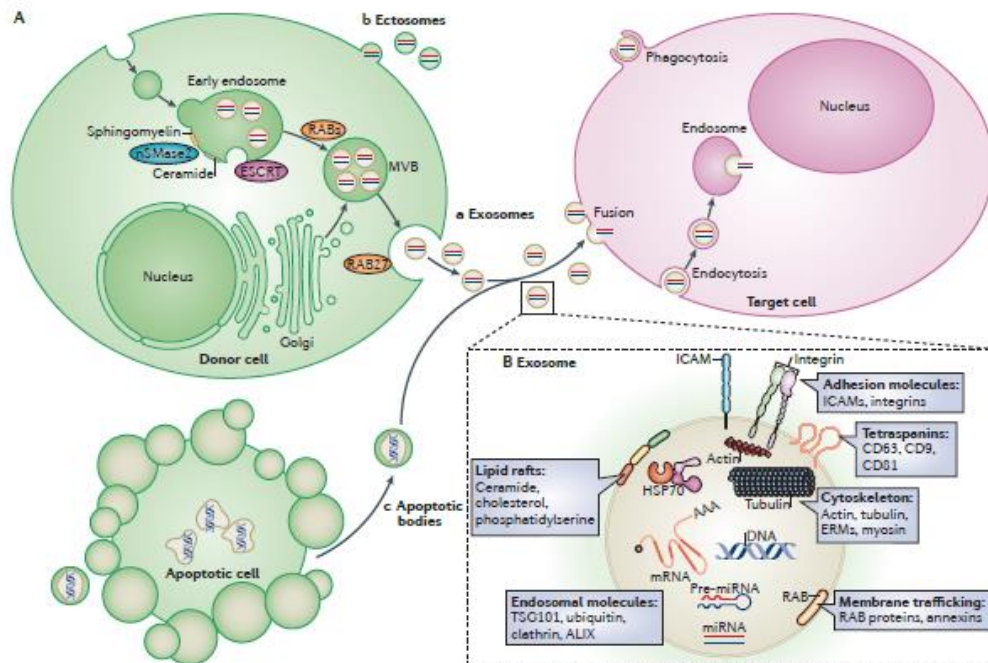


Figura 4: Transferencia de material genético entre células mediante vesículas extracelulares. Las vesículas se generan por tres mecanismos: Aa) mediante fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática dando lugar a los exosomas; Ab) mediante protrusión de la membrana plasmática originando las microvesículas o ectosomas; Ac) a partir de células en apoptosis generando los cuerpos apoptóticos. B) las vesículas extracelulares contienen ADN, ARN, ARNs pequeños y proteínas y son secretados al espacio extracelular y pueden ser captados por células receptoras mediante endocitosis mediada por receptor o fagocitosis.

Los ectosomas son vesículas que poseen un diámetro de 100 – 1000nm y se originan por una protrusión hacia el exterior de la membrana plasmática. En cambio, los exosomas son pequeñas vesículas de 40-100nm de diámetro, originadas por la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Los cuerpos apoptóticos por otro lado, son de mayor tamaño que los ectosomas (mayor a 1µm en diámetro) y se originan a partir de las células en apoptosis.

A continuación, en la tabla 1 se resumen las características fisicoquímicas y bioquímicas que diferencian a los tres tipos de vesículas extracelulares.

Tabla 1: Características fisicoquímicas de las vesículas extracelulares [24]

	Características
Exosomas	Tamaño: 50–100nm Forma: Forma esférica regular Sedimentación: 100.000g Marcadores: CD63,CD9, tsg101, ESCRT Lípidos: Colesterol, esfingomielina, ceramida, balsas lipídicas, fosfatidilserina Origen: Multivesicular
Ectosomas	Tamaño: 100 – 1000nm Forma: Irregular Sedimentación: dependiendo del tamaño 10.000 – 100.000g Marcadores: CD40, integrinas Lípidos: fosfatidilserina Origen: Membrana plasmática
Cuerpos apoptóticos	Tamaño: mayor a 1000nm Forma: Heterogénea Sedimentación: 2000g Marcadores: Histonas Lípidos: No determinados Origen: Membrana plasmática

3.2 Función de las vesículas extracelulares

En primera instancia se creía que el rol principal de las vesículas extracelulares era remover desechos de la célula. Sin embargo hoy se sabe que también actúan como mediadores en la comunicación célula-célula y por ende participan en una gran variedad de procesos biológicos.

Cada vez son mayores las evidencias de que los exosomas participan en la estimulación o supresión del sistema inmune, en la progresión y desarrollo de diversas patologías como enfermedades

neurodegenerativas, cáncer, enfermedades infecciosas e incluso se ha visto que los exosomas tienen importantes funciones durante la gestación [25].

Numerosos estudios han confirmado que los exosomas que derivan de células presentadoras de antígeno (APC) como las células dendríticas expresan en su superficie complejos de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y de clase II (MHC II) y moléculas co-estimuladoras, lo que le permite a los mismos activar de forma directa a células T CD8+ y CD4+, induciendo así una fuerte respuesta inmunogénica[26, 27]. También se vio como otras células del sistema inmune como las células NK liberan vesículas cargadas de perforina y granzima B, las cuales son capaces de llevar a cabo funciones anti-tumorales in vitro e in vivo [28].

Se ha visto que la transferencia del ligando FAS (FASL) de células tumorales a linfocitos T activos mediante vesículas induce la apoptosis en estos últimos [29]. Esto mismo constituye a su vez un mecanismo a través del cual las vesículas extracelulares pueden proteger las células tumorales del sistema inmune; al remover ligandos como Fas, TRAIL o MICA de la membrana disminuyen su expresión en las células neoplásicas y evitan así el reconocimiento inmunitario de las mismas. Se ha sugerido además un rol inmunosupresor de las vesículas extracelulares debido a que estas pueden suprimir la activación de los linfocitos T y las células NK [30]. Además, recientemente se ha demostrado un intercambio de miARNs mediado por vesículas

extracelulares entre células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos T durante la sinapsis inmunológica [31].

Los exosomas han sido reportados también como mediadores de comunicación intercelular durante el desarrollo y actividad normal del sistema nervioso así como en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson. En el marco de esta enfermedad, se demostró que exosomas transportan la proteína mutada α -sinucleína (proteína asociada al desarrollo de la enfermedad). Posteriormente estos exosomas pueden ser internalizados por células vecinas, esparciendo así la enfermedad entre las células del cerebro [32].

En infecciones virales también se ha verificado la participación de vesículas, en particular exosomas, en varios mecanismos dependientes del tipo de virus, su ciclo viral y el tipo de células infectada [25]. Evidencia reciente sostiene que los virus de la Hepatitis B, C y E (*HBV*, *HCV* y *HEV* respectivamente) también utilizan la vía de comunicación mediante exosomas como mecanismo de dispersión viral. Es más, se ha aislado de suero de pacientes con infección crónica de *HCV* exosomas que contienen el genoma de *HCV*. De este modo, el virus utiliza la vía de comunicación intercelular mediada por exosomas como mecanismo de diseminación [33].

Además, dentro del grupo del laboratorio se demostró de forma reciente que exosomas liberados a partir de *Trypanosoma cruzi* eran capaces de

inducir cambios epigenéticos en células susceptibles a infección por el mismo. Es más, se pudo determinar que las moléculas responsables de la inducción de estos cambios eran las mitades de ARNt. Para ello, se llevó a cabo una transfección de células *Hela* con cuatro tRNAs sintéticos: tRNA^{Leu}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Glu} y tRNA^{Arg} y con sus controles respectivos los cuales constituían oligonucleótidos con la misma secuencia pero desordenada (*scrambled*). Como resultado de este ensayo se vio la alteración de la expresión de varios genes celulares. Esto resalta la importancia de las vesículas y su contenido como mecanismo de comunicación entre agente patógeno y hospedero, y más aún como mecanismo de transferencia de material genético de parásitos a mamíferos [34].

Para el desarrollo del cáncer se conoce que debe existir una comunicación directa entre las células y el ambiente tumoral. Esta comunicación puede ser mediada por exosomas, los cuales pueden inducir la formación de un microambiente pro-tumoral y regular la respuesta inmune estimulando la progresión tumoral [25].

En el contexto del cáncer se ha propuesto que las vesículas extracelulares son capaces de remodelar y educar el entorno tumoral con el objetivo de crear un nicho favorable para el crecimiento del tumor, invasión y metástasis [35]. Hay varias evidencias que sostienen esto mismo. Por ejemplo, vesículas extracelulares provenientes de células de cáncer de pulmón pueden activar en células del estroma adyacentes la

expresión de factores pro- angiogenicos como IL-8 y VEGF, remodelando así el ambiente circundante para que la metástasis pueda llevarse a cabo [36]. También otros estudios demuestran que las vesículas extracelulares son capaces de viajar por la circulación, llegar a órganos específicos e incluso distantes e iniciar la metástasis.

Por otro lado, cuando las vesículas secretadas se fusionan con células blanco, estas le transfieren componentes de membrana incluyendo ligandos y receptores específicos. Por ejemplo, en los gliomas humanos, solo una fracción de las células presenta la forma truncada del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII) la cual se asocia con la desregulación de la proliferación de dichas células. Se comprobó la transferencia de la oncoproteína EGFRvIII desde células de glioma humano que expresaban dicho receptor a células que no expresaban el mismo mediante vesículas extracelulares[37]. Luego de la transferencia las células expresaban EGFRvIII. De esta forma, mediante la transferencia de moléculas mediada por vesículas hay una colaboración entre las células del tumor.

3.3 Aplicación de vesículas extracelulares como biomarcadores

El estudio de los ARNs circulantes, en particular aquellos asociados a vesículas extracelulares, se ha incrementado en los últimos tiempos

debido a su potencial uso como biomarcadores para la detección y caracterización de enfermedades como el cáncer.

Esto es debido a propiedades que presentan los exosomas que los hacen propicios para el uso como biomarcadores: constituyen vectores estables para el transporte de moléculas como los pequeños ARNs, pueden aislarse a partir de la sangre de los pacientes y lo más importante, reflejan las propiedades de las células cancerosas.

De hecho, un estudio reciente demostró que los niveles de siete miARNs (let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, and miR-23a) presentes en exosomas extraídos del suero de pacientes con cáncer colon rectal era sustancialmente mayor con respecto a los niveles presentes en individuos en estadios más tempranos de la enfermedad e individuos sanos. También estos miARNs eran mayormente secretados por líneas celulares de cáncer de colon que por líneas celulares normales derivadas del colon [38].

De este modo, los perfiles de ARNs pequeños asociados a exosomas podrían proveer información sobre el estado y grado de avance de la enfermedad. Correlacionando estos biomarcadores con características moleculares y parámetros clínicos, se habla incluso de los exosomas circulantes como una forma de “biopsia líquida”.

De todos modos, uno de los mayores inconvenientes que tiene el uso de vesículas extracelulares como biomarcadores es que estas no solo son secretadas por las células cancerosas sino que por otros tipos celulares asociados a la sangre periférica como son los linfocitos, plaquetas y células endoteliales, por lo que su uso como biomarcadores ya implica el aislamiento de poblaciones vesiculares específicas a partir del plasma sanguíneo.

4. El secretoma de pequeños ARNs de la línea celular MCF-7 en distintas fracciones extracelulares

En el marco de las principales líneas de investigación del orientador de esta tesina se estudiaron los pequeños ARNs secretados por líneas celulares mamarias benignas (MCF-10A) y malignas (MCF-7), en distintas fracciones extracelulares que incluyen vesículas extracelulares y complejos ribonucleoproteicos. Para ello se llevaron a cabo estudios por secuenciado masivo del contenido de ARNs pequeños a nivel intracelular y a nivel de las fracciones extracelulares para cada una de las líneas celulares. Las distintas fracciones extracelulares fueron obtenidas mediante centrifugación diferencial en medios libres de suero. Según este protocolo se lograrían aislar dos poblaciones vesiculares denominadas microvesículas y exosomas y una tercera fracción soluble denominada fracción ribonucleoproteica que incluye complejos ribonucleoproteicos.

Sin embargo, como hasta el momento no se había realizado una caracterización de las poblaciones obtenidas, se optó por nombrar a las fracciones microvesículas, exosomas y fracción ribonucleoproteica como p16 (*pellet* obtenido durante la centrifugación a 16.000g), p100 (*pellet* obtenido durante la centrifugación a 100.000g) y s100 (sobrenadante de la centrifugación a 100.000g), respectivamente.

Dentro de los resultados más sobresalientes del secuenciado masivo se encuentra el hecho que tanto para la línea MCF-7 como MCF-10 A, a nivel intracelular predominaban en abundancia los miARNs mientras que a nivel extracelular, en particular a nivel de la fracción s100 predominaban en abundancia los tiRNAs.

Además de demostrar que la abundancia relativa de los tiRNAs era sustancialmente mayor en las fracciones extracelulares que en la fracción intracelular, se observó que en la fracción s100 existía una selección en la naturaleza y el tamaño de los tiRNAs secretados, siendo los más abundantes las mitades derivadas de $\text{tRNA}^{\text{Glu}}_{\text{CUC}}$ y $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{GCC}}$. Estos resultados resaltaron la importancia de estas mitades de ARNt cuyo significado biológico es desconocido al momento actual.

En el marco de este proyecto, uno de los objetivos de la presente tesina de grado fue la caracterización de las fracciones extracelulares hasta el momento denominadas p16, p100 y s100. Además, como consecuencia de los resultados obtenidos a través del secuenciado masivo, la

relevancia biológica de las mitades de ARNs de transferencia es uno de los temas centrales de investigación del laboratorio. Por ende, en marco de este trabajo también se quiso validar la abundancia de estos tiRNAs en la fracción s100 mediante PCR en tiempo real.

OBJETIVOS

Obtención, caracterización y análisis de las fracciones extracelulares (ectosomas, exosomas y complejos ribonucleoproteicos) y ARNs pequeños secretados por la línea celular mamaria maligna MCF-7.

Objetivos específicos

1. Obtención y purificación de las vesículas extracelulares y fracción ribonucleoproteica.
2. Caracterización morfolobiométrica de las poblaciones vesiculares por microscopia electrónica de transmisión análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y dispersión dinámica de luz (DLS).
3. Caracterización bioquímica de exosomas por Western Blot, utilizando diversos marcadores exosomales.
4. Evaluación de los niveles de tRNAs a nivel intracelular y de la fracción ribonucleoproteica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celulares

Los cultivos de la línea MCF-7 se realizaron en atmósfera controlada de CO₂ (5%) y a 37°C, en medio EMEM (ATCC) suplementado con 0.01 mg/mL de insulina recombinante humana y 10% de suero bovino fetal (Gibco), hasta que se obtuvo el número de células deseado. Las células fueron disgregadas mediante una solución de Tripsina – EDTA (Gibco) y repicadas en frascos de cultivos de 75cm² a una densidad de un millón de células por frasco. Luego de 24hs de cultivo en condiciones estándar, se cambió el medio de las células a medio definido libre de suero, el cual consistía en EMEM suplementado con 3.8 µg/mL de insulina humana recombinante, 0.8 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 5 µg/mL de transferrina sérica humana, 475 pg/mL de prostaglandina F2α y 20 µg/mL de fibronectina. Todos los suplementos fueron obtenidos de Sigma.

Cumplido un primer periodo de adaptación de 48 horas, se retiró el medio, se lavó las células con PBS y se agregó nuevo medio definido. Luego de 48 horas más de incubación - las células se encontraban cerca de un 70% de confluencia - se recolectó el medio y las células fueron lisadas en Trizol (Sigma).

En todos los casos, el porcentaje de células muertas cuando estas eran crecidas en medio definido fue menor del 5%, según ensayos de viabilidad celular realizados mediante tinción con azul tripán.

Si bien la mayoría de las líneas celulares requieren de suero fetal bovino como fuente de nutrientes y factores de crecimiento, a efectos de nuestros estudios el suero implica un problema dado que dentro de los diversos componentes presentes podrían existir vesículas extracelulares y complejos ribonucleoproteicos conteniendo ARNs pequeños. Por este motivo, se trabaja con cultivo de células MCF-7 en ausencia de suero, el cual es parcialmente sustituido por una composición definida de factores tróficos.

2. Purificación de vesículas extracelulares y fracción ribonucleoproteica

A partir de los medios definidos (t=48hs) obtenidos de los cultivos de la línea celular MCF-7 se realizó una purificación de las distintas fracciones extracelulares mediante centrifugación diferencial. Dicho protocolo consiste en una centrifugación inicial a 300g para sedimentar células no adheridas y otra centrifugación a 2.000g para eliminar detritos celulares y cuerpos apoptóticos. El sobrenadante fue centrifugado a 16.000g durante media hora a 4°C para sedimentar las microvesículas. El pellet, al cual llamaremos fracción p16, se lavó dos veces y se resuspendió en PBS. El sobrenadante fue centrifugado a 100.000g durante dos horas y media a

4°C para sedimentar los exosomas. El pellet, al cual llamaremos fracción p100, se lavó y resuspendió en PBS. El sobrenadante de esta última centrifugación consiste en la fracción ribonucleoproteica, a la que denominaremos S100, y se concentró a un volumen final de 250 µL mediante dispositivos de ultrafiltración (Vivaspin 20; MWCO 10KDa).

3. Tinción negativa mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) de vesículas extracelulares

La caracterización de las vesículas extracelulares por microscopia electrónica se realizó mediante tinción negativa utilizando acetato de uranilo al 2%.

La tinción negativa es una técnica que permite contrastar las muestras ya que se utilizan sustancias contrastantes electrón densas como el acetato de uranilo o fosfotungstato de potasio que “opaca” a los electrones. La muestra se adsorbe a una grilla metálica y luego se incuba con la sustancia electrón-densa por un breve período de tiempo. . De este modo, la muestra no es teñida sino que es rodeada por el contrastante. Como resultado de lo anterior, la muestra aparece en contraste negativo, es decir electrón-lúcida en contraste con un fondo electrón-denso.

Para realizar la tinción negativa se colocó en una rejilla de carbono muestras de p16 y p100 durante 5 minutos con el objetivo de que las

vesículas se adsorbieran sobre la superficie. Luego, se dejó flotar la rejilla con las muestras en dos gotas de acetato de uranilo 2% durante 30s.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM-1010 (Facultad de Ciencias, Universidad de la República) o un microscopio electrónico Hitachi 7600 (Hospital Jhons Hopkins, EEUU).

4. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA) y Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

La caracterización de las muestras p16 y p100 por Análisis de Seguimiento de Nanopartículas se llevó a cabo en Hospital Jhons Hopkins, EEUU utilizando un equipo NanoSight NS500 (Malvern Instruments).

A través del NTA se puede obtener una distribución del tamaño de las partículas presentes en una suspensión. Esto se obtiene mediante el análisis de la dispersión de la luz y el movimiento browniano de las partículas. El instrumento utilizado para el análisis es el Nanosight y lo que hace es pasar un rayo de luz láser a través de la muestra, entonces las partículas presentes en la misma desvían el rayo de luz a medida que estas se mueven bajo el movimiento browniano, y la luz dispersada es enfocada por un microscopio y queda registrada en un video. A través del equipo se lleva un registro del movimiento de cada una de las partículas y luego se relaciona la velocidad del movimiento de cada partícula con su

radio hidrodinámico siguiendo la ecuación de Stokes – Einstein. De esta forma se puede obtener una distribución del tamaño de cada partícula con alta definición. Además, dado que el Nanosight realiza un registro individual de cada partícula, no solo se puede conocer su tamaño con precisión sino que también la cantidad de partículas en la muestra.

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión.

La técnica consiste en una fuente de luz láser monocromática que incide sobre la muestra y un fotómetro, el cual se encuentra dispuesto a un ángulo fijo y conocido con respecto al laser, que colecta la luz dispersada por las partículas. De esta forma es posible medir la intensidad de luz dispersada en tiempos muy breves, de tal forma que puede detectarse el movimiento browniano de las partículas emisoras y esta información puede ser utilizada para la determinación del coeficiente de difusión de las partículas y de su radio hidrodinámico.

5. Obtención de proteínas

Se extrajeron las proteínas a partir del Trizol de las fracciones intracelular, p16, p100 y s100 respectivamente. Para ello, en primer lugar se agregó a la fase orgánica de cada muestra que fue conservada durante la extracción del ARN, 0,3 ml de etanol absoluto y se centrifugó durante 5

minutos a 2000g a 4°C con el fin de precipitar el ADN. Se conservó el sobrenadante obtenido y se le agregó 1,5ml de isopropanol y se centrifugó durante 10 min a 12000g a 4°C. Luego se lavó el pellet de proteínas y para ello se agregó 1 ml hidrocloreuro de guanidina 0,3M en etanol 95%, se dejó incubar 20 minutos, se les dio un vortex suave y después se centrifugó 5 min a 7500g a 4°C. Este paso se repitió 3 veces. Por último, se lavó el pellet con 1ml de etanol absoluto, se centrifugó 5 min a 7500g a 4°C, se dejó secar bien el etanol y las muestras se resuspendieron en *buffer* de lisis RIPA (750mM NaCl, 5.0%,detergente no iónico Nonidet P-40, 2.5% deoxicolato de sodio, 0.5% SDS y 2 50mM Tris-Cl, pH=8). A cada muestra se agregó inhibidor de proteasas (Sigma, Cocktail sin EDTA). Las muestras se almacenaron a -20°C.

La cuantificación de las muestras se realizó mediante el método del ácido Bicinconínico (BicinchoninicAcid Kit, Sigma-Aldrich). En una placa de 96 pocillos, se preparó por duplicado una curva estándar a partir de seroalbúmina bovina (BSA) 1mg/ml en RIPA1x; las muestras a cuantificar se agregaron con sus diluciones correspondientes en RIPA1x y el volumen final de cada muestra fue de 10 µl. Luego se agregó a cada pocillo 80µl del reactivo BCA el cual consiste en 50 partes de Ácido bicinconínico y 1 parte de sulfato de cobre. Se incubaron las muestras durante 15-30 minutos a 60°C y luego se midió la absorbancia a 562nm.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se construyó una curva de calibración utilizando el estándar de BSA, se llevó a cabo una regresión

lineal y así a partir de los valores de absorbancia para cada muestra, se obtuvo la concentración de proteínas de cada muestra.

6. Western Blot de tsg101 y CD9

Las distintas muestras de proteínas fueron preparadas con *buffer* de carga en condiciones reductoras y pre calentadas a 95°C para luego ser sometidas a electroforesis en gel de poli-acrilamida 12%, en *buffer* tris-glicina-SDS. Posteriormente el material fue transferido a membranas de PVDF (AmershamHybond-P PVDF Membrane, GE Healthcare) mediante transferencia húmeda, a 40V y 9°C toda la noche, en *buffer* Tris-glicina + 10% etanol (*buffer* de transferencia: 25mM Tris-Cl pH 8,3, 192mM glicina, 0,03% SDS). Para verificar la eficiencia de la transferencia, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y las membranas con solución rojo Ponceau (0,1% Ponceau S, 5% ácido acético).

Las membranas se bloquearon con PBS – leche al 5%, durante 1hr a 37°C. Luego, se lavaron con 0,05% Tween-20 en PBS y se siguió con la incubación de los anticuerpos monoclonales anti-tsg101 (4A10; Abcam) y anti-CD9 (clon C-4; sc-13118; Santa Cruz Biotechnologies). La incubación de los anticuerpos primarios fue realizada en PBS – leche al 0,5%, Tween-20 al 0,05% y en una dilución 1/1000 y 1/300 para Tsg101 y CD9, respectivamente y toda la noche a 4°C. . El exceso de anticuerpo primario se lavó con 0,1% Tween-20 en PBS, 3 veces durante 5 minutos. Como

anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa; diluido 1/10.000 en 0,05% Tween, y PBS; durante 1hr a temperatura ambiente, con agitación. El exceso de anticuerpo se lavó con 0,1% Tween-20 en PBS, 3 veces durante 5min. Para el revelado se utilizó sustrato quimio-luminiscente (ECL-Signal, ViVoScience) y film fotográfico (Amersham® Hyperfilm® ECL™, GE Healthcare).

7. Western Blot de CD63

Para la detección de CD63 mediante Western blot se debió trabajar en condiciones no reductoras por lo que las muestras para el mismo fueron preparadas en *buffer* de carga no reductor (50mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 12,5mM EDTA, 0,02% azul de bromofenol) para luego ser sometidas a electroforesis en gel de poli-acrilamida al 12%. El resto de las condiciones se mantuvieron igual con respecto al western de Tsg101 y CD9 a excepción de las condiciones de incubación del anticuerpo primario las cuales fueron las siguientes: PBS – leche al 0,5%, Tween-20 al 0,05% y anticuerpo anti-CD63 1/200.

8. Obtención de ARN

Se llevó a cabo la extracción de ARN de las tres fracciones purificadas p16, p100 y s100 utilizando Trizol LS (Invitrogen, Life Technologies) de

acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregó $\approx 750\mu\text{l}$ de Trizol por cada $250\mu\text{l}$ de muestra, se agitó las muestras de forma vigorosa y se las dejó incubando 15 minutos. A continuación se agregó $200\mu\text{l}$ de cloroformo y se centrifugó las muestras 15 minutos a 4°C a 12.000g . Se alicuotó la fase acuosa en un eppendorf libre de nucleasas procurando no tomar de la interfase, y la fase orgánica fue conservada para realizar más tarde la extracción de proteínas de dichas muestras. A la fase acuosa se le agregó $\approx 1\text{ml}$ de isopropanol, se incubó durante 10 minutos y luego las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12.000g a 4°C . Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet agregando 1 ml de etanol 80% y centrifugando 5 minutos a 7.500g a 4°C . Por último el pellet se resuspendió en $8\mu\text{L}$ de agua libre de ARNasas y se almacenaron las muestras a -80°C .

La cuantificación del ARN extraído se realizó por Nanodrop (ThermoScientific). El Nanodrop es un espectrofotómetro UV-visible que permite obtener espectros de absorbancia a partir de uno o unos pocos microlitros de muestra. El Nanodrop no es un método de cuantificación específico, mide absorbancia en el espectro UV, por lo que la presencia de contaminantes suele afectar la cuantificación del ARN. En nuestro caso en particular, debido al método de extracción de ARN utilizado, nuestras muestras contienen cantidades no despreciables de fenol, ya que este se reparte entre las fases orgánica y acuosa. El fenol posee un máximo de absorbancia a 270nm mientras que los nucleótidos absorben a

260nm. Dado que absorben a longitudes de ondas muy próximas, esto provoca que los picos se solapen y que se sobreestime la concentración del ARN. Por lo tanto, para evitar esto, la medida de cantidad de μg de ARN obtenida mediante el Nanodrop es “normalizada” utilizando parámetros de corrección obtenidos mediante medidas realizadas por Qubit, los cuales ya se tienen estandarizados en el laboratorio.

El Qubit es un método fluorimétrico que permite una cuantificación específica de los ácidos nucleicos ya que se basa en el uso de fluorocromos que se unen de modo específico a su blanco (ADN o ARN) y emiten señal solamente una vez que se hayan unido al mismo. Esto disminuye notoriamente los efectos de los contaminantes. Si bien, es un método con claras ventajas en relación a la cuantificación por absorbancia en el UV, es un método más costoso.

Entonces, para obtener los parámetros de corrección a partir de varias medidas de cuantificación de ARN por Nanodrop y Qubit se obtuvo una relación de la sobre estimación de la cuantificación de ARN por Nanodrop en comparación con la medida obtenida por Qubit. De esta forma, a partir de la relación de Absorbancia 260/270nm de la muestra (la cual es proporcionada por el Nanodrop) se puede conocer cuánto de la cantidad de absorbancia obtenida mediante el Nanodrop se debe de hecho al ARN. Gracias a esto, a través del Nanodrop logramos obtener medidas de concentración de ARN que se encuentren menos desviadas de su valor real debido a contaminantes.

9. Evaluación del ARN mediante Bioanalyzer

A partir de los medios definidos se procedió a la obtención de la fracción ribonucleoproteica, se extrajo el ARN mediante el método del Trizol y el mismo fue analizado mediante Bioanalyzer (Agilent 2100 bioanalyzer).

El Bioanalyzer analiza ARN, ADN y proteínas llevando a cabo una electroforesis a través de micro canales. El equipo consiste un chip que presenta pocillos a los cuales se le ingresa la muestra y luego la misma se mueve a través de los micro canales bajo la fuerza de un campo eléctrico creado por electrodos. De esta forma, los componentes de la muestra son separados en función de su tamaño. La detección se lleva a cabo mediante sondas fluorescentes que se unen de forma específica al material analizado en cuestión y la señal es convertida en un electroferograma.

10. RT-qPCR para la detección de mitades de ARN y microARNs.

Para la detección de mitades de ARNt y microARNs se utilizó una modificación del protocolo *stem-loop RT qPCR* (ver figura 5). Este método implica un primer paso de retrotranscripción (RT) para el cual se utiliza un cebador bucle – horquilla (*stem-loop primer* o *SL primer*) el cual se hibrida a las 6 bases del extremo 3' del ARN pequeño de interés y luego el mismo se retrotranscribe utilizando una transcriptasa reversa. Diversos autores sostienen el uso de *SL primers* para la detección de ARNs

pequeños ya que el uso de los mismos aumenta la especificidad y eficiencia de la retrotranscripción [39]. Esto es así dado que la estructura bucle – horquilla del *SL primer* impediría la unión del mismo al ADN o ARN doble hebra que podría estar presente en la muestra lo cual permite en especial discriminar entre miARNs maduros y los pre- miARNs; sus precursores más largos y de doble hebra [40]. Por otro lado, se cree que la corta secuencia de unión del *SL primer* al extremo 3' del ARN pequeño de interés es capaz de discriminar entre el extremo 3' blanco en cuestión y un extremo 3' mutado o parcialmente degradado.

El segundo paso implica la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR en tiempo real o qPCR) en donde el ADN copia resultante de la retrotranscripción es cuantificado utilizando Syber Green. Para la PCR en tiempo real se utilizan dos cebadores, un cebador reverso el cual es complementario a una región interna de la horquilla del *SL primer* y un cebador directo el cual es complementario a una región del ARN pequeño de interés. El Syber Green es un fluorocromo que se une al ADN doble hebra y forman un complejo el cual fluoresce a 522nm. Por lo tanto a medida que se amplifica el ADN, el Syber Green se va uniendo al ADN doble hebra y la fluorescencia va aumentando. La intensidad de fluorescencia se mide a final de cada ciclo y se registra el ciclo de PCR en el cual la misma supera un determinado umbral. Dicho ciclo es denominado “ciclo de cuantificación” (Cq) y es el parámetro que se

compara entre muestras distintas para establecer concentraciones relativas.

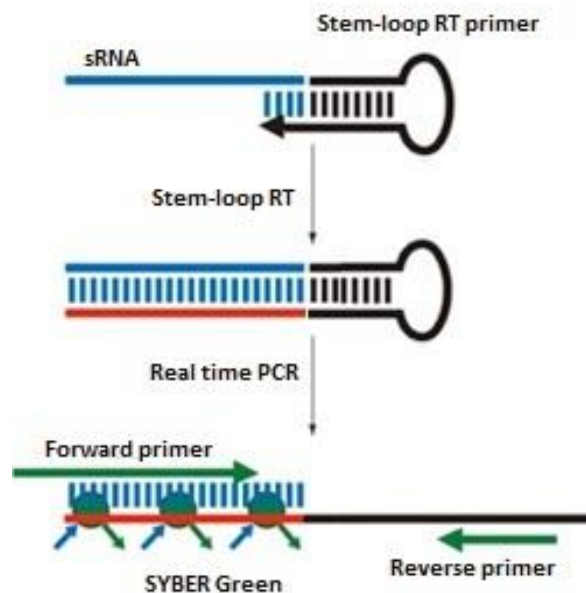


Figura 5: Esquema representativo del ensayo RT-qPCR de los ARNs pequeños. La cuantificación de los ARNs pequeños mediante RT-qPCR incluye un primer paso de retrotranscripción utilizando un cebador bucle – horquilla (*stem-loop primer*) complementario a la región 3' del ARN pequeño en cuestión y un segundo paso el cual consiste en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR en tiempo real) en donde el ADN copia resultante de la retrotranscripción es cuantificado utilizando Syber Green. Para llevar a cabo la misma se utiliza un cebador directo complementario a la región 5' del ARN pequeño y un cebador reverso complementario a una región interna del stem-loop primer.

Se evaluaron por RT-qPCR la presencia de tres ARNs pequeños: las mitades 5' de los ARNt aceptores de ácido glutámico (anti-codón CUC) y glicina (anti-codón GCC), y el miARN miR-21-5p.

Las muestras de ARN fueron diluidas hasta alcanzar una concentración final de 20 ng/μL. Para llevar a cabo la retrotranscripción se trabajó con un volumen final de 7μL. Se agregaron 2 μL de muestra al mix de retrotranscripción en el cual las condiciones de los reactivos fueron las

siguientes: 1X buffer Superscript II, dNTPs 10mM, DTT 10 mM, 1X Inhibidor de ARNasa recombinante (Sigma) y la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, Life Technologies). Por último se agregó el *SL primer* correspondiente a una concentración final de 10nM. La especificidad de cada reacción está dada por los nucleótidos protruyentes en el extremo 3' del SL primer cuya secuencia se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 2: Secuencia de los *SL primer* empleados en la retrotranscripción. En rojo se señalan los extremos protruyentes de los cebadores los cuales son específicos para cada ARN pequeño y en negro se señala el sitio donde se une el cebador reverso.

Oligonucleótido	Secuencia
miR-21-5p [23nt] SL-RT 3'	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGAC GTCAAC
tRNA- ^{GLY} _{gcc/ccc} [1-30] SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGAC GCGAGA
tRNA- ^{GLU} _{ctc} [1-31] SL-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGAC CGCCGA

Las condiciones de la reacción de la RT fueron las siguientes: 16°C 30min; 42°C 30min; 85°C 5 min (Veriti 96 well thermalcycler, Applied Biosystems)

Luego, 15 µl de agua libre de nucleasas se agregó a cada tubo de reacción a efectos de diluir el ADNc y el SL primer. Para llevar a cabo la qPCR se utilizó 2µl del ADNc, un “*master mix*” conteniendo el fluoróforo SYBR-green (Kapa Biosystems), cebador directo a concentración 1.5 µM y

cebador reverso a concentración 0.7 μ M. El volumen final de reacción fue de 10 μ L. En este caso, el cebador reverso consistía en un oligonucleótido universal complementario a una región interna del SL primer mientras que el cebador directo es específico del extremo 5' de cada ARN pequeño a analizar. Sus secuencias se detallan a continuación:

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para qPCR

Oligonucleótido	Secuencia
Cebador directo tRNA-GLYgcc/ccg [1-30]	5' ccGCATTGGTGGTTCAGTGGTA
Cebador directo tRNA-GLUctc [1-31]	5' TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGG
Cebador directo miR-21-5p [23nt]	5' gccccgTAGCTTATCAGACTGATGT
Cebador reverse	5' GTGCAGGGTCCGAGGT

El programa de ciclado utilizado para la PCR fue 95 $^{\circ}$ C 10min; [95 $^{\circ}$ C 15s; 60 $^{\circ}$ C 1min] por 40 ciclos (Eco™ Real time PCR Systems, Illumina).

11. Análisis estadístico

Los valores de la expresión de los tiRNAs para el ensayo de protección de la proteinasa K y ARNasa A como para la evaluación de la abundancia de los tiRNAs en la fracción s100 con respecto a la intracelular, se evaluaron para tres réplicas biológicas mediante el test t de Student (una cola) y se consideraron significativas aquellas diferencias con $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Obtención y caracterización de las poblaciones vesiculares.

Como método de purificación de las vesículas extracelulares se utilizó un método de centrifugación diferencial a través del cual se logran aislar las dos poblaciones vesiculares: microvesículas, exosomas y luego una fracción soluble denominada fracción ribonucleoproteica que consiste en ARNs unidos a proteínas formando complejos. Sin embargo, es incorrecto asignar *a priori* la identidad y naturaleza de las poblaciones obtenidas mediante un protocolo simple de centrifugación diferencial. Por lo tanto, en lugar de nombrar las fracciones como microvesículas, exosomas y fracción ribonucleoproteica se las llamó en un principio p16 (pellet obtenido durante la centrifugación a 16.000g), p100 (pellet obtenido durante la centrifugación a 100.000g) y s100 (sobrenadante de la centrifugación a 100.000g), respectivamente.

El primer objetivo de este trabajo consistió en una adecuada caracterización de estas fracciones, de modo de determinar si el protocolo de purificación utilizado permitía efectivamente separar poblaciones extracelulares discretas y de distinta naturaleza. Para esto fue necesario mantener los cultivos celulares, obtener los medios condicionados libres de suero, y purificar las fracciones extracelulares a efectos de poder caracterizar las mismas mediante diversas técnicas.

1.1. Cultivos celulares

Como fue explicado anteriormente, las células MCF-7 fueron cultivadas en medio convencional (conteniendo 10% de suero fetal bovino) hasta obtener el número deseado. Las mismas se sometieron posteriormente a un periodo de aclimatación en medio definido libre de suero por 48 horas, y el medio condicionado se colectó luego de 48 horas tras una nueva reposición de medio definido. Para nuestros fines el trabajo en condiciones libres de suero es indiscutible, ya que así se elimina cualquier posible contribución de vesículas extracelulares que puedan estar presentes en el mismo. Dicho cambio no afecta la viabilidad de las células sino que al contrario, se vio que en medio definido las células MCF-7 crecen de forma aún más rápida que en medio con suero, tal como se muestra en la figura 6.

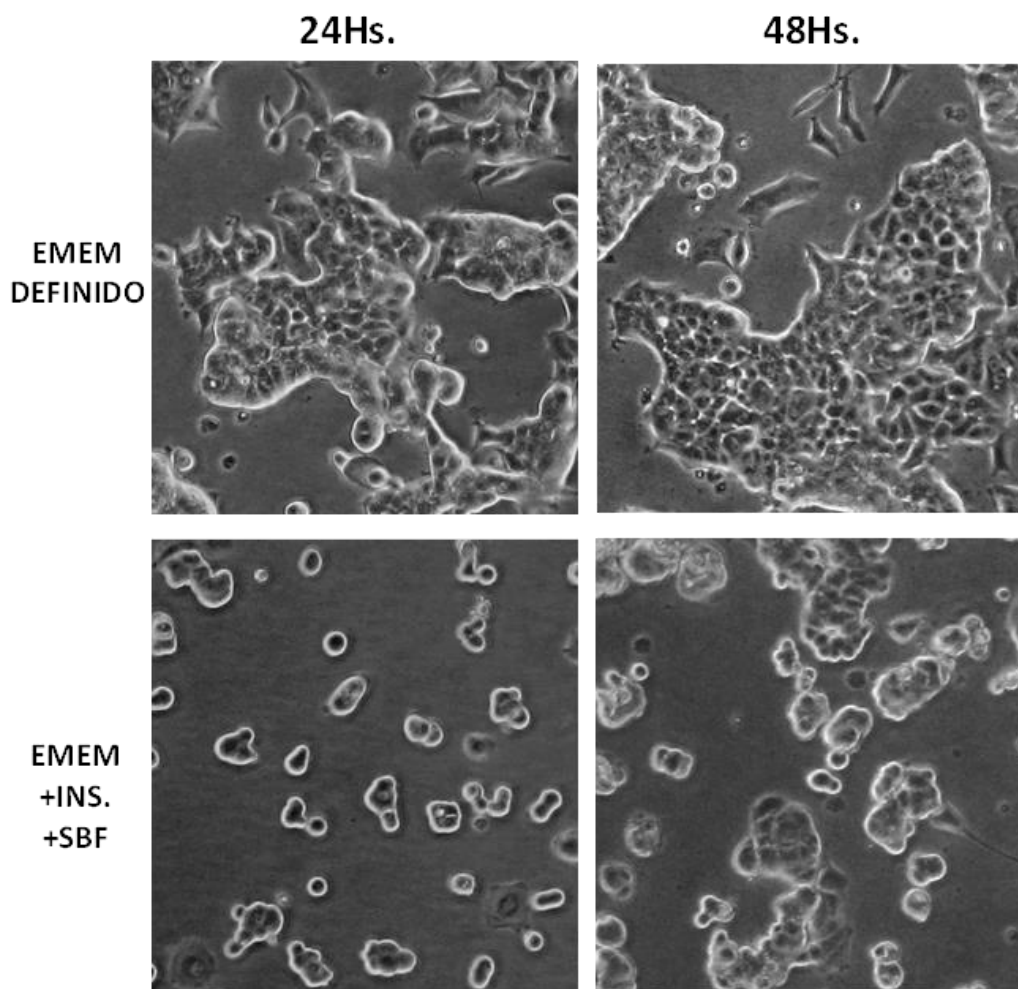


Figura 6: Cultivo de células MCF-7 en medio EMEM con suero e insulina y EMEM definido. En la figura se muestra como las células MCF-7 crecen de forma más rápida en medio definido que en medio con suero e insulina.

1.2. Caracterización de las poblaciones vesiculares

La caracterización de las poblaciones vesiculares fue llevada a cabo por microscopía electrónica de transmisión (TEM), *Western Blot*, análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y dispersión dinámica de luz (DLS).

1.2.1. Caracterización mediante microscopia electrónica de transmisión y NTA

Con el propósito de caracterizar las poblaciones vesiculares, las mismas fueron analizadas mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM). Las micrografías obtenidas se muestran a continuación, primero para la fracción p16 (Figura 7) y luego para la fracción p100 (Figura 8).

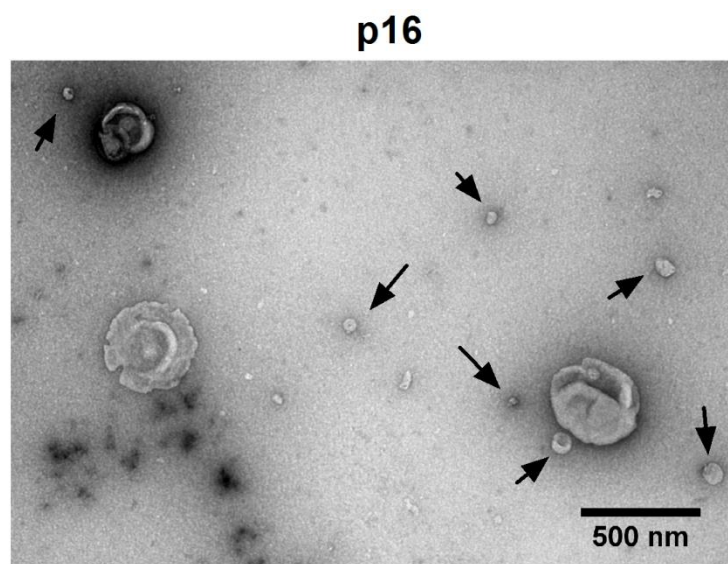


Figura 7: Microscopia electrónica de transmisión (tinción negativa) obtenida a partir de la fracción p16 de cultivo de células MCF-7. Con las flechas se señala la presencia de vesículas de menor tamaño, <100 nm.

La literatura sostiene que las microvesículas poseen forma irregular y que su tamaño varía entre 100-1000 nm. Esto mismo fue observado a partir de la micrografía obtenida de p16 (figura 7), en donde es clara la presencia de vesículas de morfología y tamaño variable pero con una predominancia en vesículas que rondan entorno a los 300 nm. En p16 también se observó la presencia de vesículas de menor tamaño, las cuales podrían ser microvesículas de tamaño pequeño entorno a los 100

nm o exosomas que están siendo co-purificados con las microvesículas. Esto último apoyaría la idea de que la purificación de vesículas extracelulares mediante centrifugación diferencial no es un método de aislamiento absoluto.

En la figura 8 se muestran las micrografías obtenidas a partir de la fracción denominada p100.

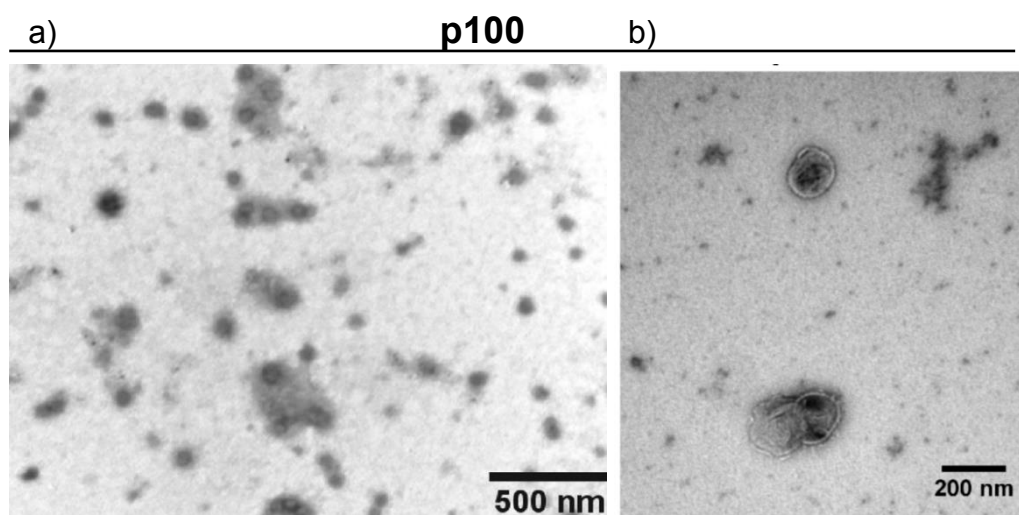


Figura 8: Microscopía electrónica de transmisión (tinción negativa) de las fracciones p100 de células MCF-7 a distintos aumentos.

En la misma se observa la presencia de vesículas de tamaño pequeño, entorno a los 100 - 150 nm y de morfología regular lo cual era lo esperado para exosomas.

Al comparar las dos micrografías se nota que en p100 se obtiene una población de vesículas de tamaño homogéneo entorno a los 100 nm. En

p16 se obtiene, en cambio, una población de vesículas de mayor tamaño y más heterogénea..

Los resultados de la *TEM* sostienen que p16 es una fracción vesicular enriquecida en microvesículas y p100 en exosomas.

Esto mismo se verificó a través de ensayos de análisis de seguimiento de nanopartículas (nanoparticle tracking analysis; NTA) y ensayos de dispersión dinámica de luz (dynamic light scattering; DLS) (Figura 9).

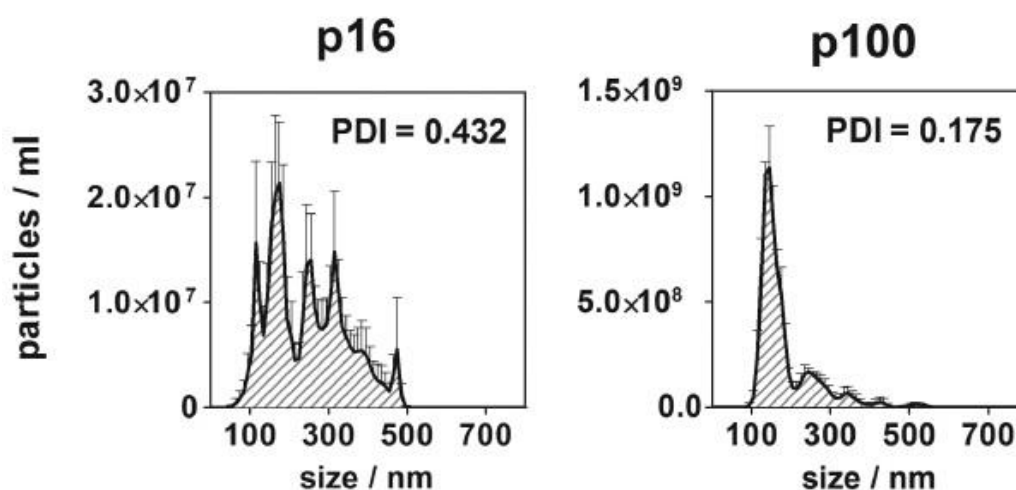


Figura 9: Distribución del tamaño de partículas presentes en la fracción p16 y p100 obtenidos por NTA. Además se indica para cada fracción el índice de polidispersión (PDI) obtenido mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS).

Como se observa en la figura 9, el análisis llevado a cabo por NTA confirma lo ya obtenido por TEM: p100 se encuentra formado principalmente por partículas de tamaño homogéneo que rondan los 100 nm, mientras que p16, si bien se encuentra enriquecido en vesículas de mayor tamaño (en torno a los 300-400 nm), también presenta partículas

mucho menores. La presencia en p16 de una población de vesículas con una distribución de tamaños más amplia que en p100 se ve reflejada también por los valores del índice de polidispersión (PDI) obtenidos para cada fracción mediante dispersión dinámica de luz (DLS). El índice de polidispersión hace referencia a la diversidad de tamaños de las partículas presentes en una muestra. Para valores menores a 0,2 la muestra presenta partículas en su mayoría del mismo tamaño, y valores de PDI mayores que 0,2 indican que la muestra contiene partículas con una amplia distribución de tamaños. Como también se observa en la figura 12, los valores de PDI obtenidos fueron 0,43 y 0,17 para p16 y p100 respectivamente. A mayor valor de PDI más heterogénea es la población, lo cual valida lo anteriormente dicho.

En definitiva: se obtuvieron resultados consistentes en lo que refiere a la caracterización de las poblaciones vesiculares p16 y p100 ya sea por TEM, NTA o DLS. Pero la pregunta que permanece es: ¿Se tratan realmente de poblaciones de naturaleza diferente, es decir, de ectosomas y exosomas, respectivamente?

1.2.2. Caracterización de exosomas mediante Western Blot

A partir del análisis del contenido proteico de exosomas cuyo resultado es compartido en las bases de datos ExoCarta y EVPedia, se definieron un conjunto de proteínas características de los exosomas y que por ende,

pueden ser utilizados como marcadores. En este contexto, los exosomas se han definido por su alta concentración (de 7 a 124 veces mayor con respecto a la célula parental) de las tetraspaninas: CD9, CD63, CD37, CD81y CD82. Las mismas constituyen una familia de proteínas caracterizadas por poseer cuatro dominios transmembrana y dominios conservados únicos de esta familia y se cree que en general tienen la función de anclaje de otras proteínas a la membrana. Otra proteína considerada marcador exosomal es TSG101 (sigla que deriva del inglés *Tumor susceptibility gene 101 protein*). TSG101 es un componente del complejo ESCRT-I el cual junto con los otros complejos ESCRT-0 y ESCRT-II regulan el tráfico vesicular. En particular TSG101 media la asociación entre los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I y además es requerida para el empaquetamiento de determinados componentes dentro de los cuerpos multivesiculares [41].

Dado lo anterior, para el análisis de la pureza de las fracciones vesiculares mediante Western blot se utilizaron los marcadores exosomales CD9, CD63 y TSG101.

La extracción de proteínas de las fracciones p16, p100 y s100 se realizó a partir del Trizol, pues las preparaciones también eran requeridas para el análisis de su ARN. Uno de las primeras cuestiones a poner a punto fue la cantidad de proteína empleada de cada fracción para realizar la corrida, en particular de s100. Sucedió que en un primero momento el medio cultivo utilizado para crecer las células MCF-7 tenía una alta

concentración de transferrina. Esto provocaba que al realizar los *western blot* el anticuerpo se uniera de manera inespecífica a la transferrina debido a que esta se encontraba en una proporción sumamente mayor que nuestras proteínas de interés. Esto traía varias implicancias, en primer lugar, la alta concentración de proteína distorsionaba la corrida electroforética, luego el anticuerpo empleado al unirse de manera inespecífica a la transferrina provocaba que la cantidad de anticuerpo disponible para la detección de nuestra proteína de interés fuese sustancialmente menor y por último, la detección de bandas inespecíficas afectaban la credibilidad de los resultados. Con el fin de evitar esto, se procedió a reducir la concentración de transferrina del medio a una concentración tal que no afectara la viabilidad ni el crecimiento de las mismas, por lo que se redujo la concentración de la misma 20 veces (de 100 µg/ml a 5µg/ml) y se siguió con la purificación de las vesículas y extracción de proteínas como se hacía hasta el momento.

Las proteínas extraídas a partir de cada fracción se cuantificaron por el método de BCA. Para ello se construyó una curva de calibración utilizando estándar de BSA 1mg/ml en RIPA1x.

Tabla 4: Valores de absorbancia de estándar de BSA 1mg/ml para la construcción de la curva de calibración

Absorbancia a 562nm			
	Estándar _{BSA}	Estándar _{BSA}	Aprom _{-blanco}
	0,239	0,262	0,0545
	0,366	0,377	0,1755
	0,49	0,415	0,2565
	0,497	0,585	0,345
	0,567	0,555	0,365
	0,651	0,653	0,456
	0,679	0,625	0,456
Blanco	0,199	0,193	

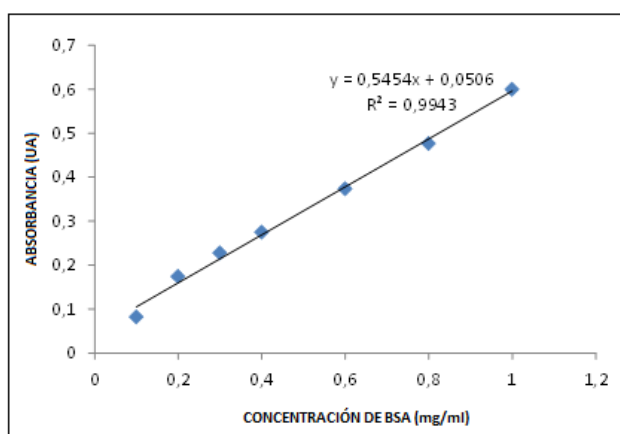


Figura 10: Curva de calibración de estándar de BSA 1mg/ml.

A partir de la curva de calibración (figura 10), se interpoló los valores de absorbancias obtenidos para cada una de las muestras y la concentración de proteínas se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Concentración de proteína total obtenidas a partir de cada muestra

MUESTRAS	Abs a 562 nm	mg/ml	µg TOTAL
p16	0,243	0,35	17,63
p100	0,403	0,65	32,3
s100 (1/10)	0,155	0,19	57,1

Para la detección de los marcadores se corrieron cantidades equivalentes de proteína para p16 y p100. De hecho, la mitad de la totalidad de las proteínas obtenida de p16 y p100 se utilizó para la detección de CD9 lo cual corresponde $\approx 8 \mu\text{g}$ y $16 \mu\text{g}$ de proteína para p16 y p100 respectivamente. Con respecto a s100, si bien se redujo la concentración de la transferrina, como se observa en la tabla 5, la cantidad total de proteína obtenida seguía siendo muy elevada con respecto a las otras dos fracciones. Ante esto se corrió una cantidad de proteína similar a la utilizada en p16 y p100, a sabiendas de que buena parte de la misma correspondería a la transferrina adicionada al medio de cultivo.

El *Western Blot* obtenido para CD9 se muestra en la figura 11, y se puede observar una banda única en p100, en torno a 25KDa, que se corresponde con el peso molecular esperado de CD9.

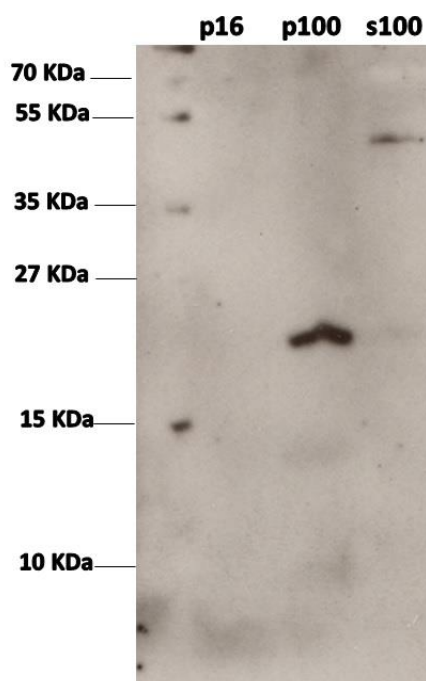


Figura 11: *Western Blot* de CD9. Se utilizaron extractos proteicos de las fracciones p16, p100 y s100 de cultivos de MCF-7.

Para el *Western Blot* de CD63 se llevó a cabo una nueva extracción de proteínas y la misma se cuantificó mediante el método de BCA tal como se realizó anteriormente. Esto debió realizarse de forma separada dado que debía realizarse en condiciones no reductoras ya que el anticuerpo monoclonal utilizado reconoce un epítipo dependiente de puentes disulfuro. El *Western Blot* obtenido mostró en p100 una única banda de aproximadamente 55KDa, tal como era lo esperado. Sin embargo, como se muestra en la figura 12, la misma no corresponde a una banda estrecha, como aquella obtenida en el *Western blot* de CD9. Esto es debido a que por un lado, CD63 es una glicoproteína que presenta varios

estados de glicosilación y esto hace que su peso molecular varíe de 50 – 60kDa y por otro lado, sucede en general que las condiciones no reductoras suelen afectar la movilidad electroforética de las proteínas. Por consiguiente al realizar el western blot se detecta una señal difusa que representa la proteína en diversos estados de glicosilación.

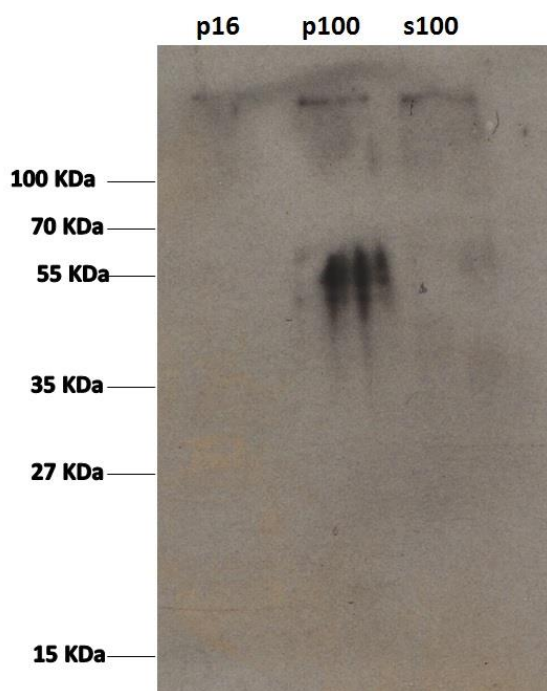


Figura 12: *Western Blot* de CD63 en condiciones no desnaturizantes. Se utilizaron extractos proteicos de las fracciones p16, p100 y s100 de cultivos de MCF-7.

Otros de los marcadores exosomales utilizados para identificar la fracción p100 fue TSG101. De forma análoga a CD9 y CD63 se llevó a cabo la extracción de proteínas de las fracciones p16 y p100 a partir del Trizol. Notar que esta vez no se utilizó la fracción s100 para realizar el *Western*

blot dado que la experiencia de los *Western blot* de CD9 y CD63 nos dejó que al tratar de normalizar la cantidad de proteínas en realidad se está poniendo mayoritariamente transferrina (propia del medio) y muy poco de proteínas secretadas, por lo que la detección de alguno de los marcadores en la fracción s100 es casi imposible, o bien por su ausencia o por su muy poca abundancia con respecto a la transferrina.

Como se muestra en la figura a continuación, para el *Western blot* de TSG101 se obtuvo una única banda en p100 de ≈ 45 KDa, el cual es el tamaño esperado para dicha proteína.

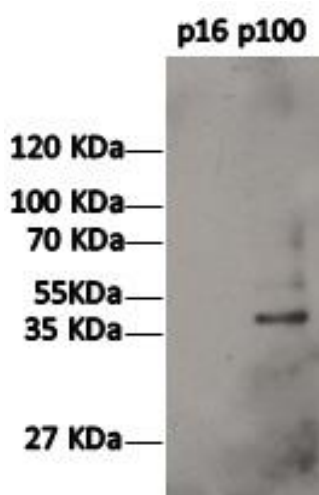


Figura 13: *Western Blot* de tsg101. Se utilizaron extractos proteicos de las fracciones p16 y p100 de cultivos de MCF-7.

Los resultados obtenidos a partir de las técnicas utilizadas para la caracterización de las fracciones vesiculares (TEM, NTA, DLS y *Western Blot*) indican que a partir del protocolo de aislamiento empleado se logran

purificar dos poblaciones vesiculares distintas: en p16 se obtiene una población enriquecida mayoritariamente en microvesículas y en p100 una población mayoritariamente enriquecida en exosomas. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento, la presencia de exosomas en la fracción s100 no puede descartarse.

2. Caracterización de la fracción s100

La naturaleza de la fracción s100 fue evaluada en otro ensayo en donde se buscó determinar si la misma se encontraba enriquecida en complejos ribonucleoproteicos como se pensaba. Para ello, se llevó a cabo un ensayo en donde se sometió a la fracción p100 y s100 a la acción de ARNasa A y proteinasa K. La ARNasa A es una enzima que corta el ARN simple hebra y la proteinasa K es otra enzima que degrada proteínas. Se trató a las fracciones p100 y s100, por un lado solamente con proteinasa K y por otro lado, con proteinasa K y luego ARNasa A. Como control del ensayo se utilizó la fracción p100 y s100 sin tratar. Después se procedió a la extracción de ARN de cada una de las muestras y evaluación por SL-RT qPCR de los niveles de distintos ARNs pequeños incluyendo micro-ARNs y tARNs.

Al tratar la fracción p100 con proteinasa K y luego ARNasa A, uno esperaría, dado que esta fracción se trata de una fracción vesicular, que la misma no fuese sensible al tratamiento con proteinasa y que por lo

tanto la ARNasa A no pudiese cortar el ARN. En cambio, al tratar la fracción s100 con proteinasa K y luego ARNasa A uno esperaría que la proteinasa K afectara los complejos proteicos, dejando expuesto el ARN y por lo tanto que la ARNasa A lograse cortar el ARN. Siendo así, se esperaría observar una disminución en la expresión de los pequeños ARNs evaluados mediante PCR en tiempo real en la fracción s100 tratada con respecto a las muestras control, y no así en la fracción p100 tratada con respecto a la muestra control.

Los resultados obtenidos de este ensayo se ilustran en la figura 14. Los valores graficados corresponden a la variación en el ciclo de cuantificación (Cq) entre muestras con y sin tratamiento con ARNasa A. Las barras rayadas muestran la sensibilidad de ambas fracciones a la ARNasa. Como puede observarse, los pequeños ARNs contenidos en p100 están completamente protegidos de la acción de la enzima, conforme a lo esperado para una población vesicular. La adición de proteasa previo a la ARNasa (barras grises) expone en parte a estos ARNs, pero es posible que al perder sus proteínas extracelulares los exosomas pierdan estabilidad y algunos puedan incluso llegar a lisarse. En cualquier caso, el efecto de la proteasa sobre p100 es ampliamente superior al efecto sobre S100, que es totalmente sensible a la acción proteolítica ($\Delta Cq = -5.71$). Si bien los ARNs contenidos en S100 presentan una cierta protección a la ARNasa cuando la proteasa no se agrega, esta protección es menor que la observada para p100, lo cual es consistente

con un efecto protector mediado únicamente por proteínas y no por una bicapa lipídica. Si bien no se muestra aquí, es de destacar que la fracción p100 es completamente sensible a la adición de detergentes.

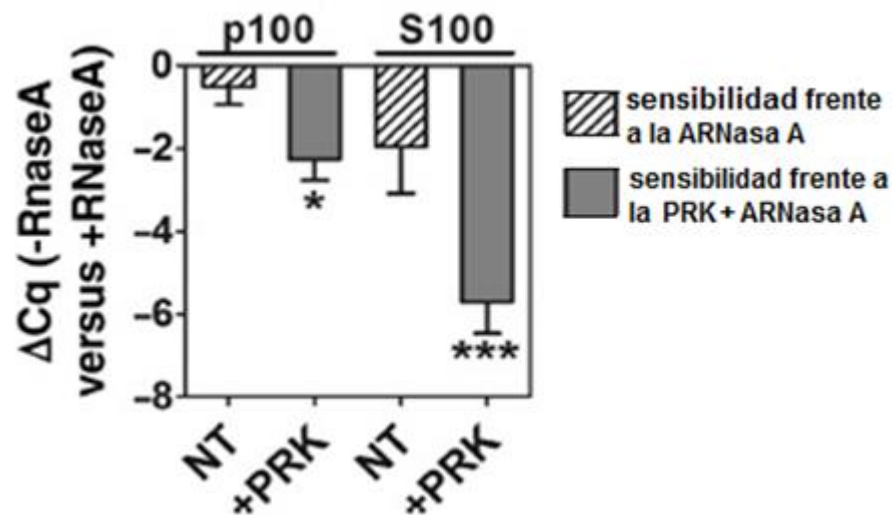


Figura 14: Ensayo de protección de RNasa A y proteinasa K. Con las siglas NT y +PRK se refiere a sin tratar y tratada además con proteinasa K respectivamente.

En definitiva, a partir de estos resultados ahora si se puede evaluar la naturaleza de las tres fracciones: se puede sostener que p16 se trata de una fracción enriquecida en microvesículas, p100 en exosomas y s100, una fracción enriquecida en complejos ribonucleoproteicos.

3. Evaluación por SL-RT-qPCR de ARNs pequeños.

En el marco de este proyecto también se quiso validar mediante PCR en tiempo real la abundancia de los $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ y $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ en la fracción s100 con respecto a la fracción intracelular corroborando los resultados obtenidos a partir del secuenciado masivo.

Como se dijo anteriormente, los resultados del secuenciado mostraron que a nivel intracelular predominaba en abundancia los miARNs mientras que a nivel extracelular y en particular a nivel de s100, predominaba los tiRNAs, tal como se muestra en la siguiente figura.

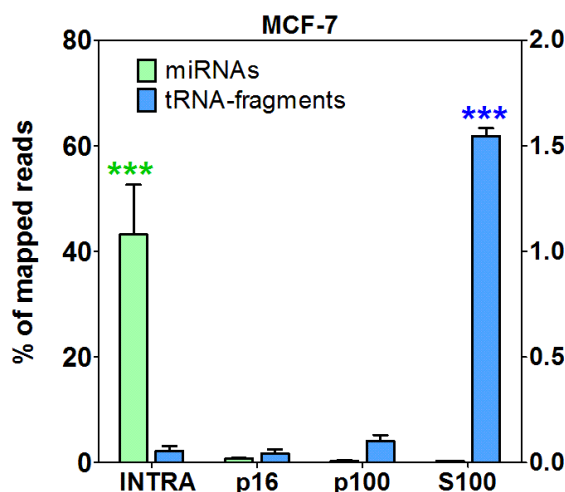


Figura 17: Para la línea MCF-7 la fracción s100 se encuentra enriquecida en mitades 5' de ARNt y la fracción intracelular en miARNs. En verde se muestra el porcentaje de lecturas mapeadas correspondientes a los miARNs y en celeste a los tiRNA.

Para ello, se purificaron las fracciones, se extrajo el ARN intracelular y de la fracción s100 y se cuantificó la cantidad de ARN extraído por Nanodrop. Se trabajó con un total de tres réplicas para cada fracción.

A continuación se muestran de modo representativo los perfiles de ARN obtenidos (figura 15).

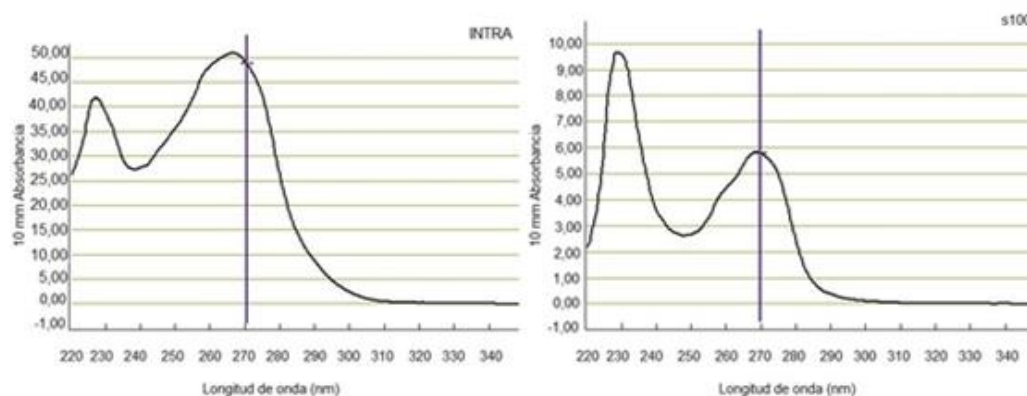


Figura 15: Espectros de absorción en el ultravioleta cercano de ARN obtenidos para la fracción intracelular (izquierda) y s100 (derecha). Con la línea vertical se muestra el pico obtenido a 270nm.

Debido al método de extracción de ARN utilizado (método de Trizol), nuestras muestras de ARN presentan una elevada contaminación con fenol. El fenol posee un máximo de absorción a 270 nm, por lo tanto los nucleótidos no son la única especie absorbente a 260 nm. Por esta razón, los valores de absorbancia a 260nm no pueden utilizarse para estimar la concentración real de ARN en las muestras. Para solucionar este problema se utilizaron factores de corrección, los cuales ya se tienen estandarizados en el laboratorio (Ver Materiales y Métodos). Dichos factores de corrección son dependientes de la relación 260/270 específica de cada muestra. Los valores corregidos de cantidad de ARN obtenidos a partir de cada muestra se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6: Concentración de ARN de cada muestra teniendo en cuenta los factores de corrección.

MUESTRA	Cantidad de ARN (ng/ μ L)
INTRA 1	400,7
INTRA 2	2445,2
INTRA 3	369,8
S100 1	20,3
S100 2	19,3
S100 3	16,7

Además, el ARN obtenido de cada muestra fue analizado mediante Bioanalyzer (electroforesis semi-capilar de alta resolución). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16.

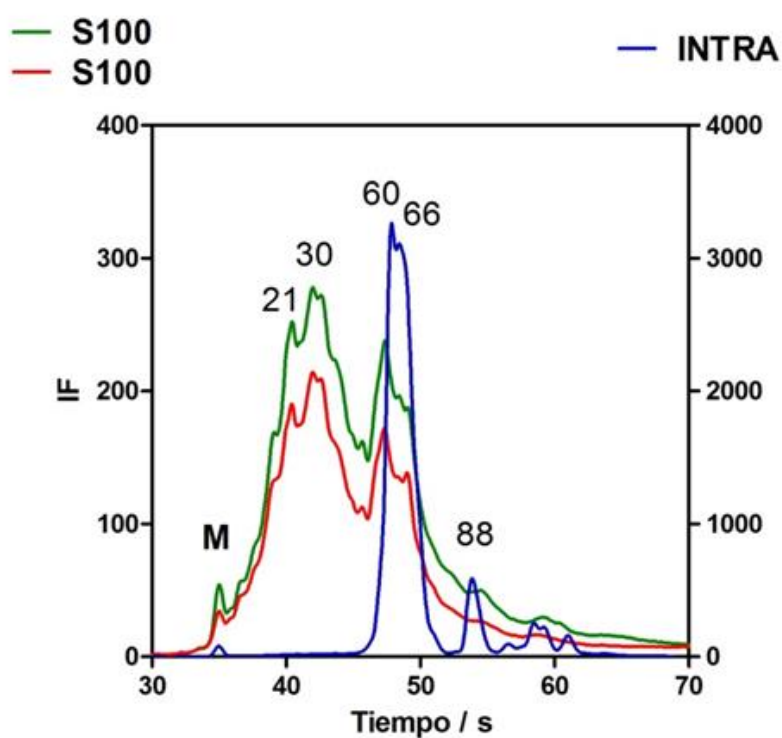


Figura 16: Electroferograma de la fracción intracelular y de la fracción s100. Con la letra M se indica el *marker* y luego con los números se indica el tamaño de los ARNs detectados.

En la figura se observa que en las fracciones de s100 el electroferograma muestra la presencia de unos picos bimodales de aproximadamente 21 y 30 nucleótidos los cuales corresponderían a los miARNs y a los tiRNAs respectivamente. Luego, la fracción INTRA muestra un claro pico que corresponde a ARNs de aproximadamente 60 – 66 nucleótidos el cual corresponde probablemente a los ARNt maduros que si bien poseen un tamaño de 70-80 nucleótidos, en estudios llevados a cabo con el Bioanalyzer suelen verse de tamaños ligeramente menores. También se observa, aunque por cuestiones de escala no se muestra en la figura, un pico de 30 nucleótidos el cual corresponde a los tiRNAs.

Por lo tanto, a partir del análisis del ARN por Bioanalyzer ya se evidencia la abundancia de los tiRNAs en la fracción s100 con respecto a la fracción intracelular, en donde predominan en cambio los ARNt (en el rango de tamaños adecuado para el tipo de chip utilizado, < 200 nucleótidos).

Se midió por RT-qPCR los niveles de expresión de las mitades 5' de los $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{GCC}}$ y $\text{tRNA}^{\text{Glu}}_{\text{CTC}}$ tanto para la fracción intracelular como a nivel de s100. Como fue explicado anteriormente, nuestros datos de secuenciado masivo mostraron que estos son los tiRNAs más abundantes secretados por la línea celular MCF-7 en la fracción ribonucleoproteica, s100. También se midió en todas las muestras por RT-qPCR los niveles de expresión de otro ARN pequeño, miR-21-5p. Esto fue así ya que la PCR en tiempo real convencional no es un método de cuantificación absoluto por lo que es necesario normalizar los niveles de expresión con respecto

a una referencia interna. El miR-21-5p es un ARN pequeño del cual se sabe también, por los resultados obtenidos del secuenciado masivo, que es secretado de forma pasiva por la célula. Entonces, dado que la secreción de miR-21-5p no se ve afectada por el proceso de secreción, pudo ser utilizado como referencia.

A continuación se muestran las curvas de amplificación obtenidas para $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ (a) y $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ (b) para cada una de las muestras:

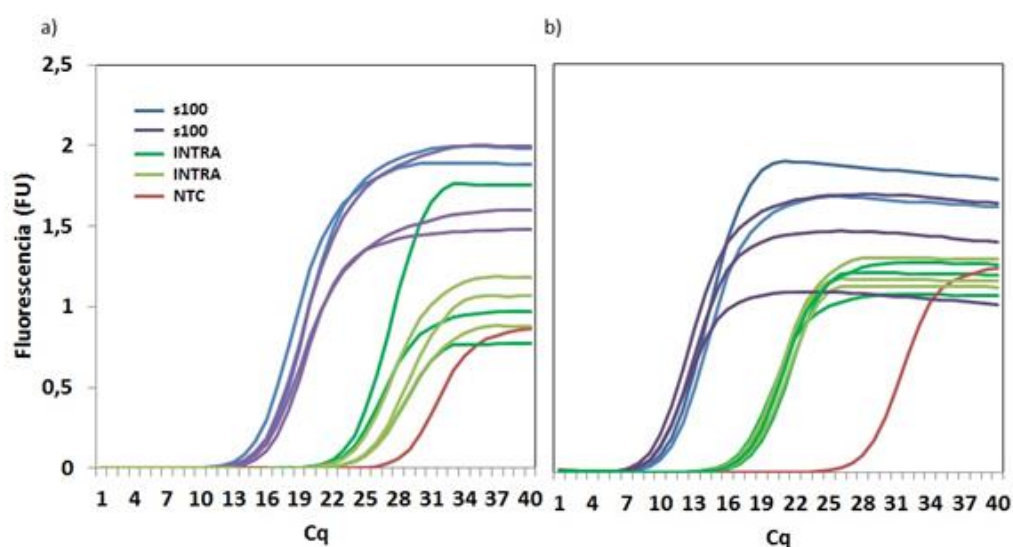


Figura 18: Curvas de amplificación obtenidas para $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ (a) y $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ (b) para cada muestra

En ambas curvas de amplificación se observa por un lado, que el control negativo sin ARN (NTC) emite señal varios ciclos después que nuestras muestras, por lo que las mismas pueden ser consideradas válidas y los datos pueden ser utilizados. El reducido tamaño de los ARNs pequeños no permite una optimización de los juegos de cebadores utilizados para la

SL-RT-qPCR, por lo que es sabido que los controles NTC amplifican con valores de Cq moderados. Por esa razón únicamente consideramos confiables aquellas medidas con valores de Cq al menos dos ciclos menores que el control negativo, como en este caso.

Por otro lado en ambos gráficos se observa también que los tiRNAs de las muestras s100 tienen un valor de Cq menor con respecto al obtenido de las muestras INTRA. Al tener un valor menor de Cq significa que estos amplifican antes y por consiguiente parecerían ser más abundantes en la fracción s100 que a nivel intracelular. De todos modos, para afirmar esto es necesario normalizar la expresión de los tiRNAs con miR-21-5p, el cual será utilizado como referencia

En la figura 19 se muestran las curvas de amplificación de para tiRNA^{Glu} y tiRNA^{Gly} y miR-21-5p obtenidas para cada una de las tres muestras INTRA (a) y s100 (b).

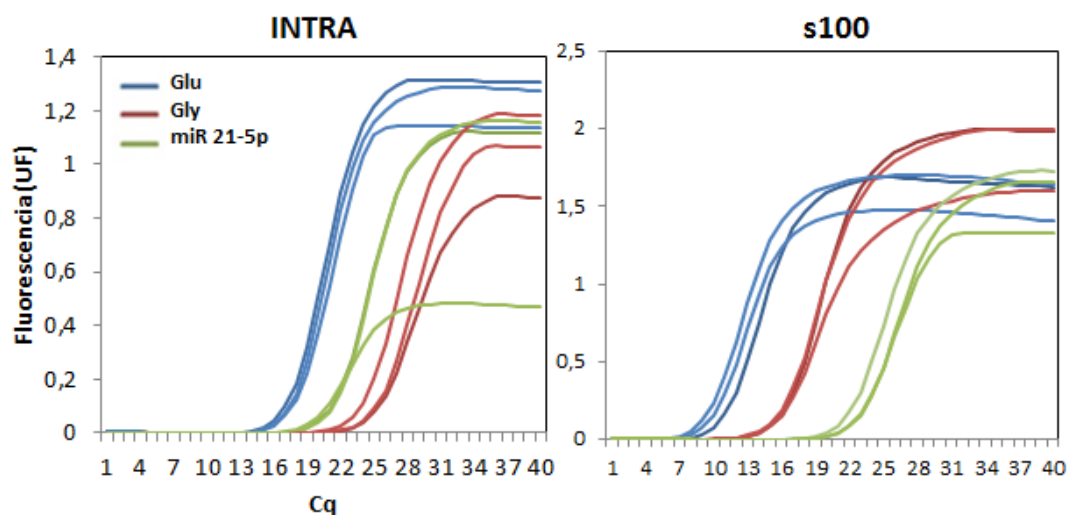


Figura 19: Curvas de amplificación de tiRNA^{Glu}, tiRNA^{Gly} y miR-21-5p obtenidas para cada una de las tres muestras INTRA (a) y s100 (b).

A partir de los valores del Cq obtenidos para cada muestra se evaluó la expresión de cada tiRNA de las distintas muestras como el ΔCq . Dicho parámetro se obtiene como la diferencia entre el Cq de cada tiRNA y el Cq del miR-21-5p en dicha muestra. Así se obtuvo una cuantificación relativa de la expresión de los tiRNAs en estudio en comparación con el miR-21-5p. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Valores de Cq para cada ARN pequeño en las distintas muestras y el ΔCq obtenido para cada tiRNA

MUESTRA	GLU	GLY	M21	$-\Delta Cq$ GLU	$-\Delta Cq$ GLY
INTRA 1	15,69	21,82	19,15	3,46	-2,67
INTRA 2	16,94	24,08	20,68	3,74	-3,40
INTRA 3	16,10	22,19	19,66	3,55	-2,53
S100 1	9,06	13,13	22,08	13,01	8,95
S100 2	9,33	14,18	22,60	13,27	8,42
S100 3	16,43	21,76	29,80	13,37	8,04

A modo de conocer acerca de la especificidad de la reacción se procedió al análisis de las curvas de disociación. Las curvas de disociación obtenidas para cada ARN pequeño en cada una de las muestras (Figura 20) demuestran que no hay amplificación de productos inespecíficos ya que para todos los casos, se ve un único pico.

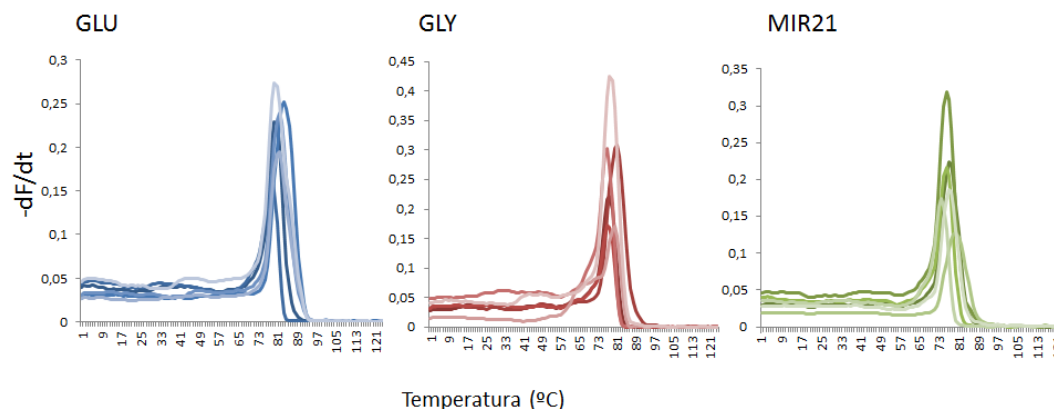


Figura 20: Curva de disociación obtenida para (a) $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$, (b) $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ y miR-21-5p (c) para cada una de las muestras.

Las curvas de disociación se obtienen al final de la reacción de PCR, en donde se aumenta la temperatura desde 50°C a 95°C y se estudia la disociación del Syber Green cuando se libera de la doble hebra al desnaturalizarse el ADN conforme aumenta la temperatura. Las curvas de disociación suelen representarse como la derivada negativa del cambio de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-\Delta F/t$ vs. T). Por lo tanto el máximo de la curva indica a qué temperatura se produjo el mayor cambio de fluorescencia y dicha temperatura corresponde a la temperatura de desnaturalización o de fusión (T_m) del amplicón. La temperatura de fusión es la temperatura a la cual el 50% del producto de ADN se encuentra desnaturalizado. De acuerdo a la longitud y secuencia de los amplicones (ya que el contenido en GC es una variable que también afecta la T_m) se pueden obtener distintas curvas de disociación.

De esta forma, la curva de disociación aporta información sobre la especificidad de la reacción. La observación de picos únicos a la T_m esperada es condición necesaria para considerar las medidas como confiables, pero no es condición suficiente ya que los dímeros entre el cebador directo y el cebador de la RT dan lugar a amplicones de casi idéntica temperatura de fusión. Por esta razón es fundamental evaluar los valores obtenidos en comparación con una reacción realizada en paralelo en la cual se agregó agua en lugar de ARN (NTC), como se ha explicado anteriormente

Los valores de las abundancias relativas de $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ para cada muestra obtenidos se muestran en la figura 21.

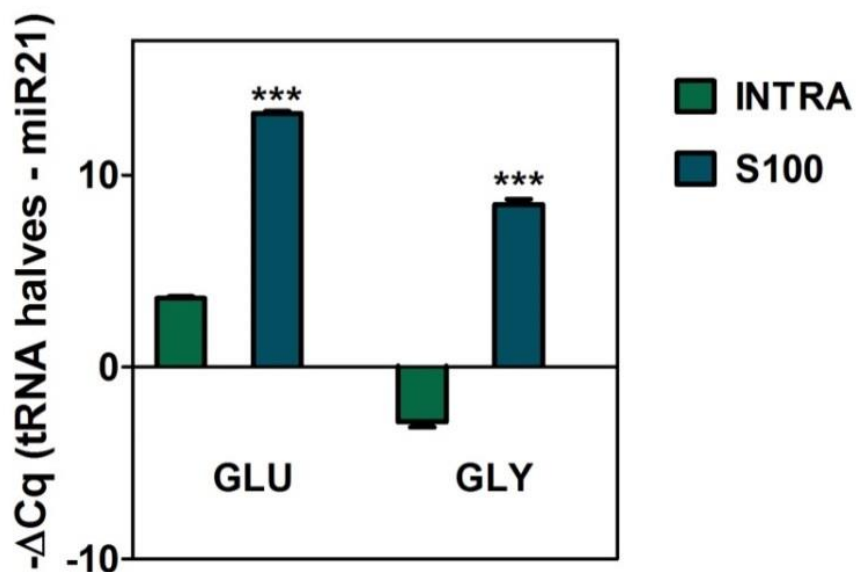


Figura 21: Abundancia relativa de $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ a nivel intracelular y fracción s100

Como se observa en la figura, la expresión de $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ es mucho mayor a nivel extracelular (a nivel de s100) que a nivel intracelular. El test estadístico de Student (t-test) de los niveles de expresión de los tiRNAs a nivel de s100 con respecto a nivel intracelular mostró que esta diferencia es estadísticamente significativa con p valores menores a 0,001 para ambos casos. Esto valida los resultados de secuenciado masivo obtenidos por nuestro grupo, y permite afirmar que los tiRNAs son secretados de manera selectiva por las células MCF-7. Si la secreción fuese no selectiva, dado que se está utilizando un micro-ARN secretado pasivamente como referencia (validado en el laboratorio), los valores de ΔCq deberían de haber sido iguales a nivel intracelular y extracelular, lo que claramente no es el caso. Otra explicación posible es que los tiRNAs sean extremadamente estables en el medio extracelular. Ya sea que estemos frente a un caso de secreción o estabilidad diferencial, esto sería como consecuencia de la formación de complejos extracelulares entre los tiRNAs y proteínas específicas. Elucidar la naturaleza de estas proteínas es la gran interrogante que se abre con estos resultados.

DISCUSIÓN

En los últimos tiempos, las vesículas extracelulares han despertado gran interés por su rol como vehículos de comunicación célula-célula y por su potencial uso como biomarcadores, por lo que muchos trabajos se han centrado en estudiar y entender los diferentes subtipos de vesículas extracelulares, su biogénesis y contenido. Por consiguiente, los protocolos de aislamiento y análisis de las vesículas han adquirido gran importancia.

El método más utilizado para el aislamiento de las vesículas extracelulares hasta el momento es la ultra-centrifugación diferencial debido a su sencillez y rendimiento [42]. La sedimentación de las vesículas depende del tamaño, densidad y forma de las mismas. Los protocolos de centrifugación diferencial aprovechan los diferentes coeficientes de sedimentación para lograr el aislamiento de las diferentes poblaciones vesiculares. Es así que, de acuerdo al tamaño de las vesículas estas pueden separarse centrifugando a distintas velocidades. Se encuentra en la literatura que los cuerpos apoptóticos (mayores a 1000nm) sedimentan a una velocidad $\approx 2000g$, las microvesículas (100-1000nm) sedimentan a 10.000 – 20.000g y los exosomas más pequeños, sedimentan a 100.000g [22]. No obstante, algunos trabajos sostienen que la purificación de las vesículas extracelulares por tamaño mediante centrifugación diferencial no logra un aislamiento absoluto [43].

En este contexto, uno de los objetivos principales del presente trabajo fue la caracterización de las fracciones extracelulares obtenidas mediante el protocolo de centrifugación diferencial a partir de medios de cultivo libres de suero de la línea celular mamaria maligna MCF-7.

El método de purificación empleado (ver materiales y métodos) fue validado en primera instancia por TEM. Los resultados obtenidos a partir de la microscopia muestran que la fracción p16 consiste mayoritariamente en una población de vesículas ≈ 300 nm en donde purifican también vesículas de tamaño entorno a los 100 nm. Los mismos pueden consistir en microvesículas de menor tamaño o bien en exosomas que se aglomeran y co-purifican durante la centrifugación a 16.000g. Esto mismo fue validado por NTA: los resultados muestran que p16 consiste en una población de vesículas con una distribución de tamaños que varía desde los 100 a 500nm pero con una predominancia de vesículas de ≈ 300 nm. Esta heterogeneidad en la distribución de tamaños se observa también a través del índice de polidispersión obtenido mediante DLS.

Con respecto a la fracción p100, las micrografías exponen la presencia de vesículas de tamaño que rondan los 100 nm. El análisis de p100 mediante NTA y DLS sostiene también lo anterior; se demuestra que la fracción p100 consiste en una población de vesículas homogénea y con una distribución de tamaño restringida en torno a los 100 nm.

Mediante *Western Blot* se logró detectar los marcadores exosomales CD9, CD63 y tsg101 únicamente en la fracción p100. Dado que para p16 y p100 se corrieron cantidades equivalentes de proteína, la detección de los marcadores exosomales únicamente en el carril de p100 y no en el carril de p16 evidencia que en p100 estamos purificando exosomas y que en p16 no estamos purificando exosomas o que por lo menos la abundancia de estos es indetectable mediante *Western Blot*. Si bien también se normalizó la cantidad de proteína incluida en la fracción s100, la no detección de los marcadores exosomales no asegura que no haya co-purificación de exosomas. Esto es debido a que la cantidad de transferrina en el medio de cultivo era tal que al intentar normalizar la cantidad de proteína de s100 para llevar a cabo los *Western Blot* se colocaba mayoritariamente transferrina y muy poco de proteína secretada. Por ende, no puede descartarse que algunos exosomas estuviesen purificando también en s100.

Con el fin de determinar la naturaleza de la fracción s100 se realizó el ensayo de protección de RNasa A y proteinasa K. Los resultados de este ensayo mostraron que esta fracción presentaba una gran sensibilidad a la acción de la proteinasa K ya que cuando se trató dicha fracción con proteinasa K y luego RNasa A, la abundancia de los ARNs pequeños disminuyó significativamente con respecto al control sin tratar. La magnitud de dicha disminución fue mucho menor cuando se evaluó la fracción p100 tratada con proteinasa K y RNasa A. De esta forma, se

puede concluir que p100 y s100 se tratan de dos fracciones de naturaleza diferente, tratándose la primera de una fracción enriquecida en vesículas (exosomas) y por ende no tan sensible al tratamiento con proteinasa K, y la segunda una fracción enriquecida en complejos ribonucleoproteicos y por consiguiente muy sensibles al tratamiento con proteinasa K.

En suma, todos estos resultados apoyan la idea que el protocolo de purificación de las poblaciones vesiculares utilizado, si bien no logra un aislamiento absoluto de las tres fracciones, logra obtener una fracción enriquecida en microvesículas (pellet de la centrifugación a 16.000g), otra enriquecida en exosomas (pellet de la centrifugación a 100.000g) y una última fracción soluble enriquecida en complejos ribonucleoproteicos (sobrenadante a 100.000g). Esto está en línea con lo reportado por otros autores, y valida a la centrifugación diferencial como un método adecuado y eficaz para el fraccionamiento extracelular en distintas poblaciones de estructuras transportadoras de ARN [42].

Otro de los objetivos del presente trabajo fue la validación mediante PCR en tiempo real de la secreción selectiva por parte de las células MCF-7 de los $\text{tiRNA}^{\text{Glu}}$ y $\text{tiRNA}^{\text{Gly}}$ en la fracción s100 mediante complejos ribonucleoproteicos, resultados ya obtenidos por el grupo de trabajo a nivel de secuenciación masiva. Para llevar a cabo esto se evaluó la expresión de estos tiRNAs en la fracción intracelular y a nivel de s100. La expresión de los mismos fue normalizada con la expresión de otro ARN pequeño, miR-21-5p, el cual presenta un mecanismo de secreción no

selectivo. Los resultados de este ensayo mostraron que la abundancia relativa de tRNA^{Glu} y tRNA^{Gly} es considerablemente mayor en la fracción s100 en comparación la abundancia de los mismos en la fracción intracelular, validando de este modo uno de los resultados más llamativos de nuestro estudio de secuenciación masiva.

Los estudios de secuenciado masivo producen una inmensa cantidad de datos, siendo una herramienta exploratoria de altísimo poder. Sin embargo, el alto costo de las técnica no permite el trabajo con un número elevado de réplicas biológicas, por lo cual la presencia de falsos positivos es frecuente. Por este y otros motivos es fundamental que los “descubrimientos” realizados a nivel de secuenciación masiva sean posteriormente validados en réplicas independientes a nivel de otras técnicas, tales como la PCR cuantitativa. De aquí que los resultados mostrados en la figura 24 sean de altísimo interés para nuestro grupo, al constatarse que, efectivamente, los niveles relativos de tRNAs/miR-21-5p en el medio extracelular (fracción s100) son mucho mayores que a nivel intracelular, siendo esto indicativo de secreción selectiva de estas moléculas.

El aumento de mitades de ARNt en el medio extracelular observado por nosotros coincide con reportes recientes en los cuales se han detectado mitades de ARNt en sangre periférica [44, 45]. Más aún, los autores encontraron estas mitades en la fracción ribonucleoproteica, en línea con nuestros resultados. En conjunto, todo apunta a que la secreción de

mitades de ARNt en complejos ribonucleoproteicos podría un mecanismo fisiológico común a diversos tipos celulares, cuya función biológica resta aún por ser explorada.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a lo planteado en los objetivos, se logró llevar a cabo la puesta a punto de la caracterización de las poblaciones vesiculares mediante diversas técnicas: microscopia electrónica de transmisión, western blot y ensayos de NTA y DLS. Nuestros resultados indican que la fracción denominada hasta el momento p16 y p100 se tratan de fracciones enriquecidas en ectosomas y exosomas respectivamente; y luego con lo que respecta a s100, la misma se trata de una fracción soluble enriquecida en complejos ribonucleoproteicos.

Por otra parte, también se logró validar la secreción selectiva de dos tiRNAs, tiRNA^{Glu} y tiRNA^{Gly}, por parte de las células MCF-7 al medio extracelular en forma de complejos ribonucleoproteicos.

Esta tesis dio lugar a una publicación científica original en una de las revistas de referencia en la temática:

Tosar JP, Gámbaro F, Sanguinetti J, Bonilla B, Witwer KW, Cayota A. ***Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines.*** Nucleic Acids Research 2015.Epub: 4 de mayo. doi: 10.1093/nar/gkv432

BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
2. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nature cell biology, 2007. **9**(6): p. 654-659.
3. Dutta, S., et al., *Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells*. PloS one, 2014. **9**(5): p. e97580.
4. Ghildiyal, M. and P.D. Zamore, *Small silencing RNAs: an expanding universe*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(2): p. 94-108.
5. Tuck, A.C. and D. Tollervey, *RNA in pieces*. Trends in genetics, 2011. **27**(10): p. 422-432.
6. Burroughs, A.M., et al., *Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin*. RNA biology, 2011. **8**(1): p. 158-177.
7. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
8. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA–target recognition*. PLoS biology, 2005. **3**(3): p. e85.
9. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(8): p. 509-524.
10. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(39): p. 13944-13949.
11. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(24): p. 15524-15529.
12. Schoof, C.R.G., et al., *MicroRNAs in cancer treatment and prognosis*. American journal of cancer research, 2012. **2**(4): p. 414.
13. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. nature, 2005. **435**(7043): p. 834-838.

14. Brueckner, B., et al., *The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function*. Cancer research, 2007. **67**(4): p. 1419-1423.
15. Lee, Y.S., et al., *A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)*. Genes & development, 2009. **23**(22): p. 2639-2649.
16. Ivanov, P., et al., *Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation*. Molecular cell, 2011. **43**(4): p. 613-623.
17. Haussecker, D., et al., *Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing*. Rna, 2010. **16**(4): p. 673-695.
18. Cole, C., et al., *Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs*. Rna, 2009. **15**(12): p. 2147-2160.
19. Li, S. and G.-f. Hu, *Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration*. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **1**(1): p. 26-35.
20. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids*. Frontiers in genetics, 2013. **4**.
21. Mittelbrunn, M. and F. Sánchez-Madrid, *Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information*. Nature reviews Molecular cell biology, 2012. **13**(5): p. 328-335.
22. Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(8): p. 569-579.
23. Hannafon, B.N. and W.-Q. Ding, *Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(7): p. 14240-14269.
24. Théry, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(8): p. 581-593.
25. De Toro, J., et al., *Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**.
26. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(3): p. 195-208.
27. Morelli, A.E., et al., *Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3257-3266.

28. Lugini, L., et al., *Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(6): p. 2833-2842.
29. Ichim, T.E., et al., *Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications*. Journal of translational medicine, 2008. **6**(1): p. 37.
30. Ashiru, O., et al., *Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA* 008 that is shed by tumor cells in exosomes*. Cancer research, 2010. **70**(2): p. 481-489.
31. Gutiérrez-Vázquez, C., et al., *Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions*. Immunological reviews, 2013. **251**(1): p. 125-142.
32. Fröhbeis, C., et al., *Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte–neuron communication*. PLoS biology, 2013. **11**(7): p. e1001604.
33. Bukong, T.N., et al., *Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90*. PLoS pathogens, 2014. **10**(10): p. e1004424.
34. Garcia-Silva, M.R., et al., *Gene expression changes induced by Trypanosoma cruzi shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves*. BioMed research international, 2014. **2014**.
35. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. Nature medicine, 2012. **18**(6): p. 883-891.
36. Kucharczywska, P., et al., *Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(18): p. 7312-7317.
37. Al-Nedawi, K., et al., *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(10): p. 3794-3799.
38. Ogata-Kawata, H., et al., *Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer*. PloS one, 2014. **9**(4): p. e92921.
39. Jung, U., et al., *A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA*. RNA, 2013. **19**(12): p. 1864-1873.

40. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. Nucleic acids research, 2005. **33**(20): p. e179-e179.
41. Andreu, Z. and M. Yáñez-Mó, *Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function*. Frontiers in immunology, 2014. **5**.
42. Jeppesen, D.K., et al., *Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation*. Journal of extracellular vesicles, 2014. **3**.
43. Witwer, K.W., et al., *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. Journal of extracellular vesicles, 2013. **2**.
44. Dhahbi, J.M., et al., *Deep sequencing of serum small RNAs identifies patterns of 5' tRNA half and YRNA fragment expression associated with breast cancer*. Biomarkers in cancer, 2014. **6**: p. 37.
45. Dhahbi, J.M., et al., *5' tRNA halves are present as abundant complexes in serum, concentrated in blood cells, and modulated by aging and calorie restriction*. BMC genomics, 2013. **14**(1): p. 298.