

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica Clínica



Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

“CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO MEDIADORAS DE LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL TIROIDEO Y SU ROL EN LA PROMOCIÓN MALIGNA”

Lic. Bravo Miana, Rocío del C.

2021

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CIBICI – CONICET)
Córdoba, Argentina.

**TESIS DE DOCTORADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. ANA CAROLINA DONADIO. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

COMISIÓN ASESORA:

Dra. FLAVIA ANDREA BOLLATI. Instituto de Farmacología Experimental (IFEC-CONICET). Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

Dr. ALDO ALEJANDRO VILCAES. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-CONICET). Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

Dra. CLAUDIA GABRIELA PELLIZAS. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

EVALUADOR EXTERNO:

Dra. GRACIELA ALICIA CREMASCHI. Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-CONICET). Facultad de Ciencias Médicas. Pontificia Universidad Católica Argentina.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

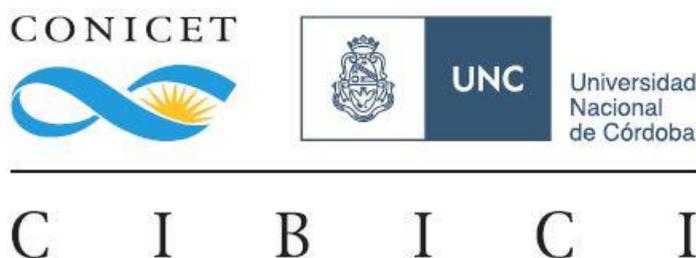
Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el:

**Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología -
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CIBICI-CONICET)**



Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas (FCQ)
Universidad Nacional de Córdoba (UNC)

El mismo fue llevado a cabo durante el desempeño de una Beca Interna Doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y una estadía en el extranjero, financiada por la Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), al haber obtenido la Wood Whelan Research Fellowship. Los subsidios nacionales que financiaron este trabajo fueron otorgados por SeCyT, Fundación Sales y CONICET.

PUBLICACIONES

Artículos en revistas científicas internacionales con referato:

2020. "Thyroid tumor cells-fibroblasts crosstalk: role of extracellular vesicles". Bravo-Miana RDC, Della Vedova AB, De Paul AL, Remedi MM, Guantay ML, Gilardoni MB, Pellizas CG, Donadio AC. *Endocrine Connections*, 2020; 9:6 506-518. DOI: 10.1530/EC-20-0113.

2021. "Extracellular vesicles from the thyroid tumor contexts acquire an ECM remodeling proteomic profile relevant for thyroid cancer". Bravo-Miana RDC, Soler MF, Ceschin DG, Royo F, Negretti-Borga DM, Azkargorta M, Elortza F, Montesinos MM, Pellizas CG, Falcón-Pérez JM*, Donadio AC*. (Manuscrito en preparación para ser enviado a publicar).

Resúmenes en revistas nacionales e internacionales con referato:

2021. "Exploring nanometer universes to decipher tumor emissaries". Bravo-Miana RDC, Ceschin DG, Royo F, Pellizas CG, Falcon-Perez JM, Donadio AC. *Medicina* Vol. 81, suppl. III, pag. 109 (Trabajo premiado por el Consejo de Genética-SAIC).

2019. "Thyroid tumor cell-fibroblast interaction produces extracellular vesicles involved in thyroid tumor aggressiveness". Bravo-Miana RDC, Negretti-Borga DM, Soler MF, Gilardoni MB, De Paul AL, Montesinos MM, Pellizas CG y Donadio AC. *Arch Endocrinol Metabol (ABEM)* Vol. 63, suppl. 02, pag. S13.

2018. "Extracellular vesicles induce fibroblasts metalloproteinases expression in thyroid tumor microenvironment". Bravo-Miana RDC, Guantay ML, Gilardoni MB, De Paul AL, Borioli GA, Pellizas CG, Donadio AC. *Journal of Extracellular Vesicles* Vol. 7, suppl. 1, pag. 49, 2018.

2017. "Extracellular vesicles, mediators of tumor stromal crosstalk, in thyroid tumor microenvironment". Bravo-Miana RdC, Guantay ML, Gilardoni MB, De Paul AL, Borioli GA, Pellizas CG, Donadio AC. *Medicina* Vol. 77, suppl. I, pag. 149.

2017. "Extracellular Vesicles as Carriers of CD147 in Thyroid Tumor Microenvironment". Bravo-Miana RDC, de Paul AL, Borioli GA, Gilardoni MB, Remedi MM, Masini-Repiso AM, Pellizas CG, Donadio AC. *Arch Endocrinol Metabol (ABEM)* Vol. 61, suppl. 02, pag. S45. (*Travel Grant* por presentación de Póster).

"Comienza haciendo lo que es necesario, luego lo que es posible y de repente estarás haciendo lo imposible".

San Francisco de Asís

A mi familia...

RESUMEN

El cáncer de tiroides es la enfermedad maligna del sistema endocrino con mayor prevalencia. Entre los carcinomas tiroideos, el Carcinoma Papilar Tiroideo (PTC) es la patología más frecuente, en general de buen pronóstico, aunque algunos casos se presentan con mayor agresividad, metástasis locales y a distancia, resistencia al tratamiento y aumentada mortalidad. Por otra parte, el Carcinoma Anaplásico Tiroideo (ATC), aunque de menor incidencia, es el más agresivo, metastásico y de alta letalidad. Las células tumorales no pueden comandar la promoción de la enfermedad de forma independiente, sino que necesitan de otras células, residentes o reclutadas al sitio tumoral, que apoyen el mantenimiento de las capacidades adquiridas por las células tumorales, conformándose lo que se conoce como microambiente tumoral (TME). La comunicación intercelular en el TME se produce tanto por interacciones célula-célula, célula-matriz, como por diversas moléculas liberadas en forma soluble o bien empaquetadas en vesículas extracelulares (EVs). Las EVs son poblaciones heterogéneas de vesículas nanométricas (< 1000 nm) y transportan biomoléculas provenientes de la célula que les da origen. Las EVs liberadas por las células al espacio extracelular pueden ser aisladas a partir de distintos fluidos biológicos o sobrenadantes de cultivo, transferir su carga a células receptoras, regulando el estado fisiopatológico de éstas, contribuir al desarrollo tumoral y participar en la invasión y metástasis en ganglios centinelas. El papel del TME en el desarrollo del cáncer de tiroides está comenzando a ser dilucidado. Sin embargo, las evidencias que relacionan el *crosstalk* entre Fb y células tumorales tiroideas, con la secreción de EVs, su carga, y eventual modulación de proteínas relacionadas con la promoción de la invasión y diseminación tumoral, fueron poco exploradas.

Este trabajo de tesis doctoral se centró en la caracterización de EVs, obtenidas a partir de un modelo *in vitro* de interacción célula tumoral-Fb, desde un abordaje morfológico, cuantitativo, bioquímico, proteómico y funcional. Los fibroblastos (Fb), fueron las células representantes del estroma elegidas en este trabajo, y se conoce que presentan un rol protagónico en el desarrollo tumoral. El modelo experimental utilizado se basó en el co-cultivo de células TPC-1 (PTC); 8505c, (ATC); y NThyOri (células no-tumorales tiroideas) con Fb humanos; y el aislamiento de EVs se llevó a cabo por ultracentrifugación de los sobrenadantes de cultivo (CMs). La caracterización morfológica y bioquímica de las EVs se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), *nanoparticle tracking analysis* (NTA) y ensayos de western blot (WB). El estudio proteómico se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masa en tándem y la caracterización funcional por zimografías, microscopía de fluorescencia, microscopía confocal y citometría de flujo. Estudios proteómicos y funcionales de las EVs permitieron dilucidar su posible rol en el TME tiroideo, así como encontrar interesantes proteínas que constituirían importantes blancos de profundización como biomarcadores en cáncer de tiroides.

Los resultados obtenidos demostraron que los Fb, las células tiroideas y sus co-cultivos liberan EVs a los CMs, con un tamaño entre 50-200nm, las que mostraron la expresión de marcadores de exosomas clásicos. La comunicación bidireccional entre Fb y células TPC-1, produjo un mayor número de EVs que las obtenidas de Fb y células TPC-1 aisladas. Sin embargo, no hubo diferencias en el número y tamaño de las partículas aisladas entre las diferentes células tiroideas co-cultivadas. El perfil proteómico de las EVs distinguió aquellas obtenidas de células co-cultivadas con respecto a las obtenidas de células aisladas y mostró una robusta segregación entre las muestras provenientes del entorno del PTC: TPC-1/Fb-TPC-1 con respecto a las provenientes de 8505c/Fb-8505c y NThyOri/Fb-NThyOri. Interesantemente, EVs provenientes del co-cultivo célula tumoral tiroidea-Fb

presentaron un perfil proteómico relacionado a la remodelación de la matriz extracelular (ECM). El estudio de las proteínas diferencialmente enriquecidas (DEPs) en el entorno Fb-TPC-1, sugirió que el Fb aportaría al direccionamiento de la potencial funcionalidad en las EVs, sin embargo, en el contexto Fb-8505c, el Fb no modificaría la capacidad funcional que presentan EVs obtenidas de 8505c aisladas. En concordancia, el *crossstalk* entre Fb y TPC-1 potenció el rol de las EVs favoreciendo la degradación del colágeno.

En la remodelación de la ECM participan enzimas como las metaloproteinasas (MMPs), proteasas inducidas y secretadas por células presentes en el TME. En el medio extracelular, éstas se activan y remodelan la ECM, degradando el colágeno contenido en la misma, favoreciendo los pasos iniciales de la migración celular. En nuestro modelo, se evidenció que el co-cultivo célula tumoral tiroidea-Fb indujo la secreción de proMMP9 y proMMP2 junto a un aumento significativo en la activación de MMP2 en los CMs. Además, en el caso de Fb-TPC-1, este aumento en la secreción de la enzima y su activación se produjo aún en ausencia del contacto directo célula-célula, mediado posiblemente por EVs y factores solubles liberados en ese contexto. De la misma manera, se demostró que la incubación de Fb y células NThyOri con EVs provenientes de Fb-TPC-1 indujo la secreción y activación de MMP2 en los CMs. En consonancia, MMP2 y proteínas relacionadas a la misma, detectadas en las EVs, permitieron discriminar entre EVs provenientes de un entorno tumoral con respecto al no tumoral. Por otro lado, se pudo evidenciar un aumento en el mRNA de GAL-1 en Fb estimulados con EVs provenientes de Fb-TPC-1. En estudios de captación de EVs realizados utilizando Fb y células TPC-1, como células receptoras, se evidenció que las EVs producidas por Fb, células tumorales y no tumorales tiroideas, son incorporadas al interior celular. Curiosamente, un mayor número de Fb internalizaron EVs provenientes del entorno tumoral que de células no tumorales tiroideas, lo que puso en evidencia la activa comunicación intercelular entre Fb y células tumorales tiroideas a través de EVs. Por último, CD147, HRAS y MAMDC2, moléculas asociadas con agresividad tumoral, se detectaron exclusivamente enriquecidas en EVs provenientes de Fb-TPC-1, lo cual abre la oportunidad de su estudio y detección en EVs provenientes de pacientes con cáncer de tiroides, con un potencial impacto traslacional en salud humana.

En su conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral nos permitieron demostrar, por primera vez, el impacto de la interacción tumor-Fb en la liberación de una subpoblación diferente de EVs en el TME tiroideo. En este sentido, la comunicación entre Fb y células tumorales tiroideas, produce EVs con un proteoma biológicamente relevante para el cáncer de tiroides, vinculado con la remodelación de la ECM y la degradación del colágeno contenido en la misma. En el TME tiroideo, estas EVs desempeñarían un rol activo en la síntesis y activación de MMPs, así como en la expresión de Gal-1, facilitando la degradación de la ECM y, potencialmente, la migración e invasión de las células tumorales promoviendo la agresividad y progresión del tumor. Tanto el conocimiento del cargo proteico presente en EVs, así como la comprensión de su función biológica en el TME tiroideo, podrían contribuir al diseño de nuevas estrategias de tratamiento y ofrecerían oportunidades en el uso de procedimientos mínimamente invasivos, para el descubrimiento de biomarcadores en biopsia líquida, potencialmente útiles en la evaluación diagnóstica y el seguimiento de los pacientes con cáncer de tiroides.

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most prevalent malignant disease of the endocrine system. Among thyroid carcinomas, Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) is the most frequent pathology, generally with a good prognosis, although some cases present higher aggressiveness, local and distant metastasis, resistance to treatment and increased mortality. On the other hand, Anaplastic Thyroid Carcinoma (ATC), although of lower incidence, is the most aggressive, metastatic and lethal malignancy. Tumor cells are not able to command independently the promotion of the disease, but need other cells, resident or permanently recruited to the tumor site, to support the maintenance of the hallmarks of cancer, establishing the tumor microenvironment (TME). Fibroblasts (Fb) were the representing stroma cells selected in this work, and they play a leading role in tumor development. Intercellular communication in the TME is produced by cell-to-cell and cell-matrix interactions, as well as by several molecules released in soluble form or packaged in extracellular vesicles (EVs). EVs are heterogeneous populations of nanometric vesicles (< 1000 nm) that carry biomolecules of their producing cells and transfer their cargo to recipient cells, regulating their pathophysiological state. EVs are released by the cells into the extracellular space, they can be identified in culture supernatants or different biological fluids, and contribute to tumor development modifying the phenotype of other TME cells and participating in invasion and metastasis to sentinel lymph nodes. The role of TME in thyroid cancer development is beginning to be elucidated. However, evidence linking the crosstalk between Fb and thyroid tumor cells with the secretion of EVs, their cargo, and an eventual modulation of proteins related to the promotion of tumor invasion and metastasis, still needs to be deciphered.

This thesis work is focused on the characterization of EVs, obtained from an in vitro model of tumor cell-Fb interaction, with a morphological, quantitative, biochemical, proteomic and functional approach. The experimental model was based on the co-culture of TPC-1 cells, from PTC; 8505c, from ATC; and NThyOri, as thyroid non-tumor cells, with human Fb; and EVs were obtained by ultracentrifugation of culture supernatants (CMs). Morphological and biochemical characterization of EVs was performed by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA) and western blot (WB). EV-proteomic analysis was performed by nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and metalloproteinases (MMPs) were studied by zymography. EV-exchange was evaluated using immunofluorescence, confocal microscopy, and flow cytometry. Proteomic and functional studies of EVs permitted to elucidate their possible role in thyroid TME, as well as to find interesting proteins that would constitute important targets for further studies as thyroid cancer biomarkers.

Our data demonstrated that Fb, thyroid cells and their co-cultures release EVs to CMs, with a size that ranged from 50 to 200nm, which showed the expression of the classical exosome markers CD63, CD81, CD9, and FLOT-1. The crosstalk between Fb and TPC-1 cells produced significantly more EVs than their isolated cells, however, no significant differences were registered among the different co-cultured thyroid cells. Unsupervised hierarchical clustering of the proteomic data showed the robust segregation between TPC-1/Fb-TPC-1 EV-samples regarding 8505c/Fb-8505c and NThyOri/Fb-NThyOri EV-samples. Interestingly, EVs from thyroid tumor cell-Fb co-culture presented a proteomic profile related to extracellular matrix remodeling (ECM). The study of differentially enriched proteins (DEPs) in the Fb-TPC-1 environment suggests that Fb would provide a functional advantage to EVs from TPC-1-tumoral milieu, specializing them in direct communication with the ECM. However, in the 8505c-tumoral context, Fb would not modify the functional capacity

presented by EVs obtained from isolated 8505c cells. Accordingly, the crosstalk between Fb and TPC-1 potentiated EV-functionality, thereby favoring collagen degradation.

One of the main drivers of ECM degradation is the matrix metalloproteinases (MMPs) family. In the extracellular region, MMPs activate their collagen degradation activity, favoring the initial steps of cell migration. In our model, it was evidenced that thyroid tumor cell-Fb co-culture induced the secretion of proMMP9 and proMMP2 and a significant increase in MMP2 activation in CMs. Moreover, MMP2 activity could also be induced in Fb-TPC-1 co-cultures independently of the cell-to-cell contact, which reinforces the role of EVs. In this regard, the incubation of Fb and NThyOri cells with EVs from Fb-TPC-1 co-cultures induced the MMP2 secretion and activation in CMs. Accordingly, MMP2 and their related proteins detected in the EVs, can discriminate between thyroid microenvironments, and also distinguish Fb-tumor cell interplay in the tumoral milieu. On the other hand, an increase in GAL-1 mRNA in Fb stimulated with EVs from Fb-TPC-1 co-culture was evidenced. EV-uptake assay using Fb and TPC-1 cells as recipient cells revealed that EVs produced by Fb, tumor and non-tumor thyroid cells are incorporated into the cells. Interestingly, In the present work, evidence has been provided of higher amounts of EVs from thyroid tumor producing cells being taken up by Fb, evidencing an active EV-mediated communication between Fb and tumor thyroid cells. In contrast, in TPC-1 cells no differences were detected in the incorporated EVs from tumor and non-tumor thyroid cells. Finally, the exclusively enriched proteins CD147, HRAS and MAMDC2 in EVs from Fb-TPC-1 co-culture, open the opportunity for their study and detection in EVs from thyroid cancer patients, with a potential translational impact on human health.

Taken together, the results obtained in the present PhD work demonstrated, for the first time, the relevance of the tumor-Fb crosstalk in the release of a different subpopulation of EVs in thyroid TME. In this sense, the efficient communication between Fb and thyroid tumor cells produces EVs with a biologically relevant proteome for thyroid cancer, that participate in ECM remodeling and collagen degradation. In thyroid TME, these EVs would perform an active role in the synthesis and activation of MMPs, as well as in the expression of Gal-1, facilitating the degradation of the ECM and, potentially, the migration and invasion of tumor cells, promoting tumor progression and aggressiveness. The knowledge of the bioactive cargo present in EVs, and a better the understanding of their biological function on the TME, could contribute to promoting novel treatment strategies, offering opportunities for minimally invasive diagnostic procedures and the identification of better biomarkers for the diagnosis and the monitoring of the evolution of cancer patients.

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
1. El tumor y su microambiente tumoral (TME)	2
2. Rol del Fb en el TME	3
3. Remodelación de la ECM y progresión tumoral	5
4. Rol de las MMPs en el TME	7
4.1. Generalidades	7
4.2. Estructura y clasificación de las MMPs	8
4.3. Funciones de las MMPs en cáncer	9
4.4. Regulación de la actividad de las MMPs	11
4.5. Activación de la proMMP2	11
5. Rol de galectina-1 en el TME	12
6. Vesículas extracelulares (EVs)	13
6.1. Historia	13
6.2. Clasificación de las EVs	14
6.3. Biogénesis y liberación de microvesículas y exosomas	16
6.4. Composición molecular de las EVs	17
6.4.1. Proteínas en EVs	18
6.4.2. Ácidos nucleicos en EVs	19
6.4.3. Lípidos en EVs	19
6.4.4. Cambios en la composición y heterogeneidad de las EVs	20
6.5. Captación de las EVs	20
7. EVs en cáncer, CAFs y ECM	21
8. Cáncer de tiroides	22
8.1. Clasificación y epidemiología	22
8.2. Genética del tumor en PTC y ATC	23
8.3. CAFs en PTC y ATC	24
8.4. EVs en cáncer de tiroides	25
9. Biopsia líquida y biomarcadores de cáncer	26
9.1. EVs como biomarcadores en cáncer de tiroides	28
10. Antecedentes del modelo	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
MATERIALES Y METODOS	33
1. Células y condiciones de cultivo	34
1.1. Líneas celulares y mantenimiento	34
1.2. Obtención de Fb normales	34

1.3.	Co-cultivos de células tiroideas tumorales o no tumorales con Fb.....	35
1.3.1.	Estrategia de co-cultivo en placas tradicionales.....	35
1.3.2.	Estrategia de co-cultivo en placas <i>transwell</i>	35
2.	Aislamiento y caracterización de EVs.....	36
2.1.	Obtención de EVs.....	36
2.2.	Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	37
2.2.1.	TEM en células.....	37
2.2.2.	TEM en EVs.....	37
2.2.3.	Inmunomarcación en EVs.....	37
2.3.	Caracterización por <i>Dinamic Light Scattering</i>	38
2.4.	Caracterización por <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	38
2.4.1.	Distribución de tamaños de EVs por NTA.....	39
2.4.2.	Cuantificación de EVs por NTA.....	39
2.5.	Cuantificación de proteínas y determinación de pureza.....	39
2.6.	Determinación del efecto funcional de EVs sobre células.....	39
3.	Cromatografía líquida-espectrometría de masas (nLC-MS/MS).....	40
3.1.	Preparación y procesamiento de las muestras en EVs.....	40
3.2.	Identificación de proteínas y cuantificación.....	40
3.3.	Perfiles de distribución de los datos proteómicos.....	41
3.4.	Análisis bioinformáticos de las proteínas.....	42
3.4.1.	Análisis de las proteínas identificadas en las EVs con las anotadas en Vesiclepedia y ExoCarta.....	42
3.4.2.	Análisis de enriquecimiento ontológico-funcional.....	42
3.4.3.	Identificación de la presencia del péptido señal y sitios de clivaje.....	42
3.4.4.	Análisis del <i>clustering</i> jerárquico no supervisado, PCoA y matrices de correlación.....	42
3.5.	Análisis estadísticos de los datos y obtención de proteínas diferencialmente enriquecidas (DEPs).....	43
3.6.	Análisis bioinformáticos de las DEPs.....	43
3.6.1.	Análisis de enriquecimiento ontológico-funcional de las DEPs.....	43
3.6.1.1.	Representación e interpretación de la información ontológica-funcional usando Cytoscape.....	43
3.6.2.	Predicción de relaciones proteína-proteína mediante String-db y análisis en KEGG.....	44
3.7.	Disponibilidad de los datos y repositorio público.....	44
4.	Ensayos de captación de EVs.....	44
4.1.	Ensayo de captación utilizando EVs coloreadas.....	44
4.2.	Ensayo de captación de EVs utilizando células coloreadas.....	45

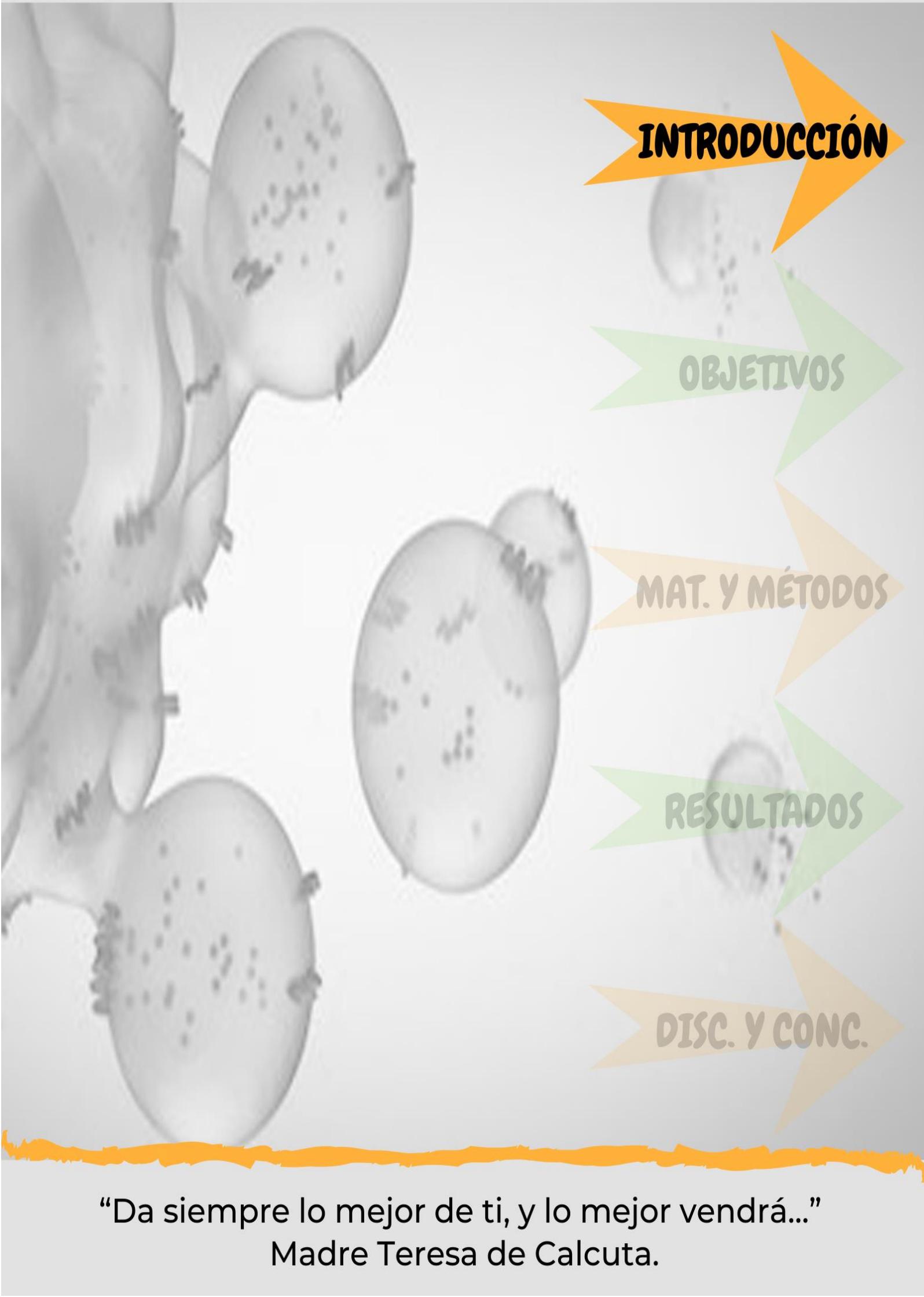
5.	Técnicas de inmunodetección por microscopía.....	46
5.1.	Inmunofluorescencia indirecta.....	46
5.1.1.	Evaluación de la expresión de proteínas celulares.....	46
5.1.2.	Evaluación de la captación de EVs.....	47
5.2.	Microscopía confocal.....	47
5.2.1.	Evaluación de la captación de EVs y su co-localización cualitativa..	47
6.	Técnicas bioquímicas clásicas.....	48
6.1.	Western Blot.....	48
6.1.1.	Obtención de extractos proteicos celulares, cuantificación, preparación y corrida.....	48
6.1.2.	Obtención de extractos proteicos de EVs, cuantificación, preparación y corrida.....	48
6.1.3.	Electrotransferencia e inmuno-detección.....	49
6.2.	Zimografía.....	50
6.2.1.	Zimografía en TW-CMs.....	51
6.3.	Citometría de Flujo.....	52
6.3.1.	Cuantificación de la captura de EVs.....	52
6.3.2.	Expresión de CD147 en células.....	52
7.	Técnicas de biología molecular en células.....	52
7.1.	Extracción del RNA total.....	52
7.2.	Síntesis del cDNA por transcripción reversa.....	53
7.3.	Diseño de <i>primers</i>	53
7.4.	PCR convencional preparativa y evaluación de productos amplificados....	54
7.5.	qPCR.....	54
8.	Análisis estadísticos.....	54

RESULTADOS 56

1. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, ULTRAESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICA DE EVs.....	57
1.1. Las células tiroideas presentan una superficie rica en proyecciones de membrana.....	57
1.2. El pellet 100K de EVs, obtenido por ultracentrifugación diferencial de los CMs, es seleccionada como muestra representativa de las EVs.....	58
1.3. EVs liberadas por células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas con Fb presentan una distribución homogénea de tamaños entre 50-200nm.....	61
1.4. El co-cultivo de Fb-TPC-1 evidencia un aumento significativo en el número de EVs en comparación al cultivo de Fb y TPC-1 aisladas.....	63
1.5. Las EVs liberadas por Fb, células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas presentan marcadores de "exosomas clásicos".....	64

I. CONCLUSIONES PARCIALES	66
2. CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS EVs Y POSIBLES FUNCIONES BIOQUÍMICAS EN EL TME	67
2.1. Más del 90% de las proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs se encuentran descritas en las bases de datos de EVs.....	67
2.2. Las proteínas identificadas en las EVs están enriquecidas en componentes celulares relacionados a exosomas/EVs.....	68
2.3. Las EVs posibilitan la liberación al medio extracelular de proteínas que carecen de péptido señal.....	69
2.4. El perfil proteico de las EVs discrimina las muestras obtenidas de células aisladas y co-cultivadas, distinguiendo a su vez a EVs provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1 del resto de las muestras.....	70
2.5. El proteoma de EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1 muestra una mayor variabilidad en comparación a Fb-8505c vs 8505c y Fb-NThyOri vs NThyOri.....	71
2.6. EVs provenientes del co-cultivo Fb-célula tumoral tiroidea participan de la remodelación de la ECM.....	72
2.6.1. El Fb aportaría una ventaja funcional a las EVs provenientes de Fb-TPC-1.....	72
2.6.2. El Fb no aportaría una ventaja funcional a las EVs generadas por Fb-8505c vs 8505c.....	73
2.7. EVs provenientes de NThyOri y Fb-NThyOri participan en el mantenimiento del metabolismo celular.....	74
2.8. La comunicación entre Fb y TPC-1 produce EVs vinculadas con la degradación de la ECM.....	76
II. CONCLUSIONES PARCIALES	79
3. CAPÍTULO III: EFECTOS FUNCIONALES DE EVs SOBRE COMPONENTES DEL TME	80
3.1. CMs depletados de EVs provenientes de 8505c y EVs provenientes de TPC-1 aumentan la expresión de α -actina de músculo liso en Fb.....	80
3.2. La actividad de MMP2 aumenta en los CMs de células tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb.....	82

3.3. EVs de Fb-TPC-1 y Fb-8505 inducen un aumento en la actividad de MMP2 en Fb.....	84
3.4. La actividad de proMMP9 aumenta en CMs de Fb-8505c y de Fb estimulados con EVs de Fb-8505c.....	84
3.5. EVs de Fb-TPC-1 inducen un aumento en la actividad de MMP2 en células no tumorales tiroideas.....	85
3.6. La activación de MMP2 en CMs de Fb-TPC-1 se produce aún en ausencia del contacto célula-célula entre Fb y TPC-1.....	86
3.7. Los interactores de MMP2 logran diferenciar EVs provenientes de TPC-1, 8505c, Fb-TPC-1 y Fb-8505c de EVs provenientes de Fb aislados, NThyOri y Fb-NThyOri.....	88
3.8. EVs de Fb-TPC-1 producen un aumento en el mRNA de Gal-1 en Fb.....	89
3.9. Expresión de CD147 en células aisladas y co-cultivadas.....	90
3.10. EVs de Fb-TPC-1 y Fb-8505c presentan una expresión aumentada de CD147.....	92
III. CONCLUSIONES PARCIALES.....	94
4. CAPÍTULO IV: CAPTACIÓN DE EVs.....	95
4.1. Un patrón de marca compatible con la captación de EVs se observa en Fb co-cultivados con Fb y células tiroideas marcadas.....	95
4.2. Las EVs son captadas e incorporadas al interior celular del Fb.....	96
4.3. Los Fb incorporan más eficientemente EVs producidas por células tumorales tiroideas.....	99
4.4. Un patrón de marca compatible con la captación de EVs se observa en células TPC-1 co-cultivadas con Fb y células tiroideas marcadas.....	101
4.5. Las EVs son captadas e incorporadas al interior celular de TPC-1.....	102
4.6. Células TPC-1 incorporan de manera equivalente EVs provenientes de células tiroideas tumorales y no tumorales.....	102
IV. CONCLUSIONES PARCIALES.....	105
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	106
ANEXO.....	118
BIBLIOGRAFÍA.....	130
ABREVIATURAS.....	148
AGRADECIMIENTOS.....	150



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MAT. Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISC. Y CONC.

“Da siempre lo mejor de ti, y lo mejor vendrá...”
Madre Teresa de Calcuta.

1. El tumor y su microambiente tumoral (TME)

Cáncer o tumor maligno es el nombre con que se designa a un amplio grupo de enfermedades relacionadas, no transmisibles, multifactoriales y de origen celular. Las células normales para transformarse en tumorales adquieren capacidades específicas, y complementarias entre sí, que les confieren un fenotipo característico y las diferencian sustancialmente de las células normales. El desarrollo y progresión inicial de un tumor está basado en alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores, adquiridas y acumuladas en una célula. Sin embargo, estas células transformadas no pueden comandar la promoción de la enfermedad de forma independiente y necesitan de otras células, residentes o reclutadas permanentemente al sitio tumoral, que apoyen el mantenimiento de las capacidades adquiridas por las células tumorales, conformándose lo que se conoce como microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) [1]. Los tumores se reconocen como un órgano diferente, cuya complejidad y heterogeneidad se aproxima e incluso supera a un tejido sano, formado por células tumorales (parénquima), así como por otras: fibroblastos, células endoteliales y del sistema inmune, adipocitos (estroma), embebidas en una matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) que les proporciona un soporte estructural, apoyando la arquitectura y la integridad del tejido. Entre estas capacidades adquiridas, siete reciben contribuciones de las células del TME: independencia de factores de crecimiento (GF, por sus siglas en inglés), evasión de los supresores del crecimiento y de la destrucción por el sistema inmune, activación de la invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular y reprogramación del metabolismo energético. Otras que cabe mencionar son: potencial replicativo ilimitado, inflamación promovida por el tumor e inestabilidad genómica [2]. Los efectos del TME sobre el tumor y viceversa, son cada vez más entendidos, siendo las propias células tumorales capaces de mediar su reclutamiento, activación, reprogramación y persistencia. Esta comprensión mejorada presenta nuevos e interesantes objetivos para la terapia antitumoral.

La medicina contra el cáncer se encuentra en una nueva era, que utiliza un enfoque integrador para el diagnóstico y la terapéutica, mediante estrategias combinadas y personalizadas. Es decir, las estrategias no se dirigen sólo a vías intrínsecas de las células tumorales, sino que también a células pertenecientes al TME, sus vías de señalización y mediadores, buscando extinguir el tumor *in situ* o metastásico y eludir aquellos mecanismos de resistencia adaptativa del mismo a las terapias [3]. Los fibroblastos (Fb) son las células representantes del estroma tumoral elegidas en este trabajo y se conoce que contribuyen en todas las capacidades adquiridas por las células tumorales (Fig. 1).

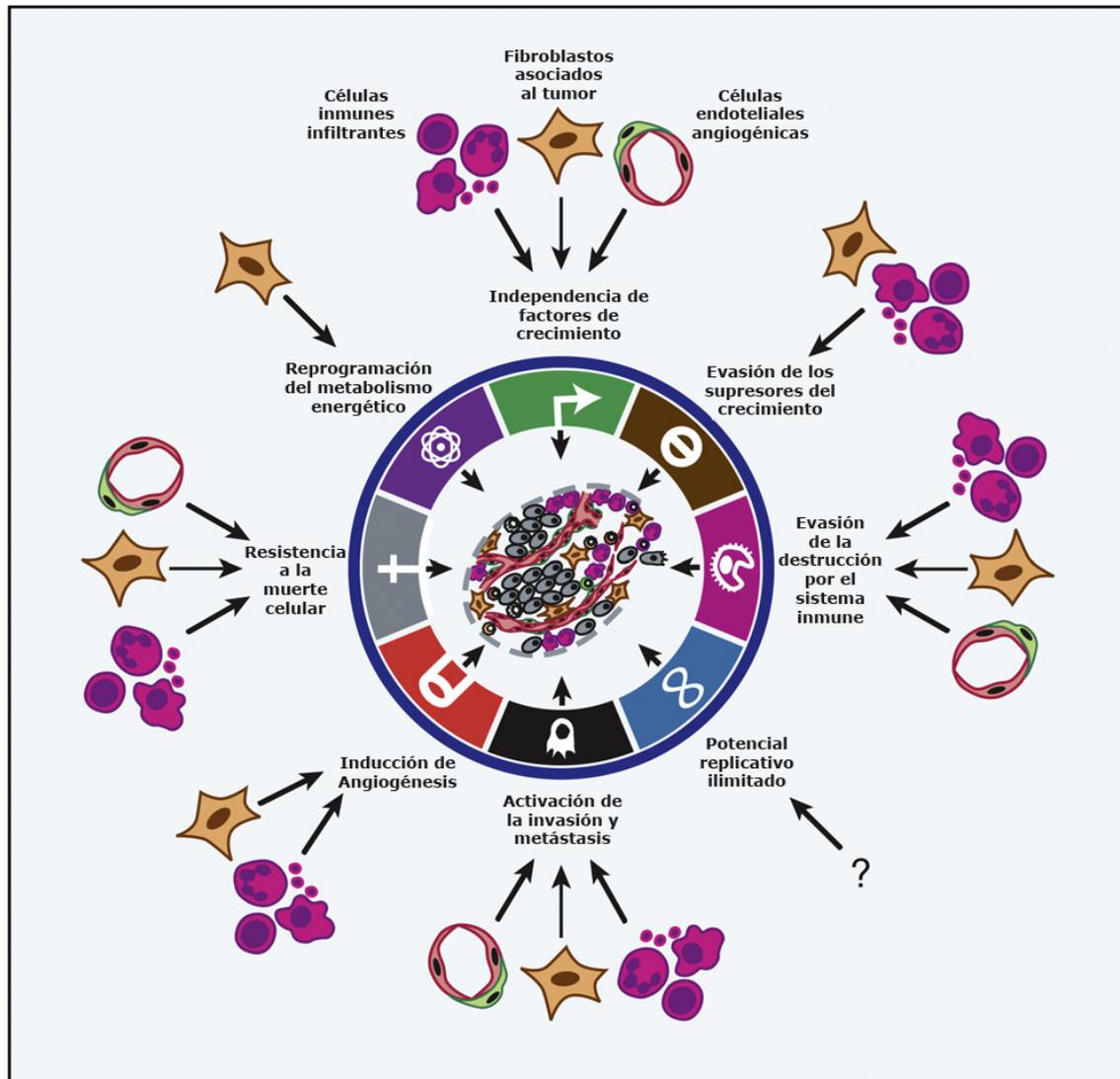


Figura 1. Contribuciones de las células estromales, residentes y/o reclutadas, sobre los hallmarks del cáncer. Participación de Fb asociados al tumor, células inmunes infiltrantes y células endoteliales angiogénicas (células del estroma en el TME), en las capacidades adquiridas por las células tumorales. La importancia de cada una de estas células varía según el tipo de tumor y el órgano en el que se encuentre. Representación esquemática adaptada de Hanahan and Coussens (2012) [2].

2. Rol del Fb en el TME

Los Fb, entre el gran número de tipos celulares y factores ambientales diferentes que forman parte del TME, juegan un rol clave en el desarrollo tumoral. Sin embargo, a pesar de ser uno de los tipos celulares más estudiados en biología, todavía no se conoce en profundidad su papel y comportamiento en el TME. La comunicación recíproca existente con las células tumorales, podría ser la responsable de la aparición de una subpoblación de Fb hiperactivados, que en el TME se conocen como fibroblastos asociados al cáncer (CAFs, por sus siglas en inglés) y cuya abundancia depende del tipo de tumor [4]. Los CAFs son altamente heterogéneos, y Kalluri [5] describe las distintas contribuciones funcionales de estas células en el TME (Fig. 2), las que participan en:

- El mantenimiento de señales proliferativas, expresando y secretando diferentes proteínas de señalización, por ej. GF como HGF, EGF, FGFs, que estimulan la proliferación de células tumorales.
- La activación de la invasión y metástasis, orquestando la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) de las células tumorales mediante la secreción de TGF- β y otras citoquinas. Además, pueden remodelar la ECM regulando la expresión, junto a las células tumorales, de diferentes enzimas como las metaloproteinasas de matriz (MMPs).
- La inducción de angiogénesis, secretando diversos factores proangiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) e IL6; y proteasas que regulan la biodisponibilidad de los mismos.
- La resistencia a la muerte celular, inhibiendo a células del sistema inmune innato. Además, gracias a que expresan PDL1 y PDL2, mediando funciones inmunosupresoras y ayudando a las células tumorales a evadir a las células del sistema inmune adaptativo.
- La reprogramación recíproca del metabolismo energético. La célula tumoral cambia su perfil metabólico y la proliferación celular tumoral genera un elevado estrés oxidativo (con producción de especies reactivas del oxígeno) sobre los Fb, que a su vez colaboran en su producción en el TME. Además, la liberación de lactato y piruvato, debido a una glicólisis aumentada, sirven como fuente de energía directa para las células tumorales.

Sin embargo, se conoce también que los CAFs podrían servir como reguladores negativos de la progresión del tumor en determinadas circunstancias, aunque esta consideración ha sido desapercibida en numerosos trabajos. Los diversos orígenes de los CAFs, así como los diferentes tejidos en los que residen, sumado a sus interacciones con las células tumorales en el TME, podrían ser responsables de esta heterogeneidad fenotípica, funcional y morfológica [6]. Entre estos orígenes se pueden mencionar, los Fb residentes en el tejido donde se origina el tumor, aquellos que provienen de células de la médula ósea, que durante el desarrollo del tumor son reclutadas continuamente al tejido tumoral; los que provienen del linaje vascular (células endoteliales, del músculo liso, pericitos) y se transforman en CAFs dentro del nicho tumoral; así como los que, a través de EMT, provienen de las propias células tumorales [7, 8].

Numerosos autores mencionan al tumor como “una herida que nunca sana”. En este sentido, Fb activados de manera reversible, normalmente asociados a la cicatrización de heridas, adquieren en el TME fenotipos secretorios adicionales, propiedades proliferativas mejoradas, capacidad de activación autocrina robusta, independientemente de su cercanía a la célula tumoral, y funciones inmunomoduladoras dinámicas. Estas capacidades adquiridas por el Fb en el TME, junto a la regulación epigenética, conduce a un estado de activación irreversible de los Fb en CAFs [5].

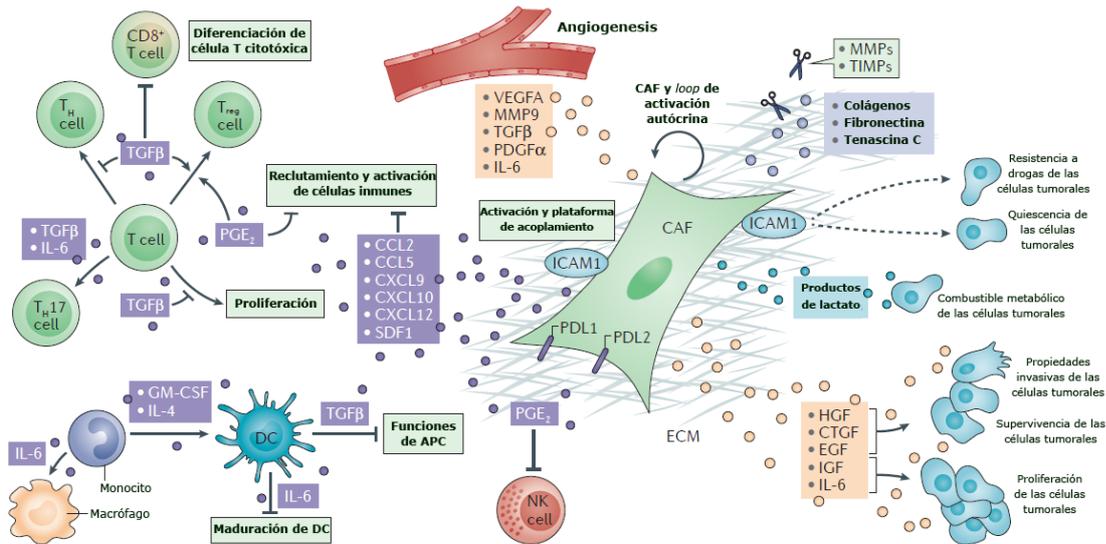


Figura 2. Los CAFs y su secretoma remodelan el TME. Los CAFs remodelan y reprograman la ECM así como a componentes celulares del TME. El secretoma de los CAFs inhibe el reclutamiento y activación de células del sistema inmune adaptativa (sector izquierdo de la imagen). Participa en la activación autócrina autosostenida (centro de la imagen) y en diversas funciones sobre las células tumorales (sector derecho de la imagen), promoviendo su crecimiento, invasión, supervivencia y/o resistencia a la terapia. La reprogramación metabólica en los CAFs impacta en el TME y mejora la adaptación de las células tumorales al tumor en crecimiento. Los CAFs y su secretoma también están involucrados en la angiogénesis tumoral, afectando indirectamente al reclutamiento y activación de células inmunes, así como a la migración e invasión de las células tumorales. APC: célula presentadora de antígenos; CCL: ligando de quemoquinas con motivo C-C; CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo; CXCL: ligando de quemoquinas con motivo C-X-C; DC: célula dendrítica; EGF: factor de crecimiento epidérmico; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; IL: interleuquina; MMP: metaloproteínasa de la matriz; NK: natural killer; PDGF α : factor de crecimiento derivado de plaquetas α ; PGE $_2$: prostaglandina E $_2$; SDF1: factor derivado de células estromales 1; TGF β : factor de crecimiento transformante β ; TH: célula T helper; TIMPs: inhibidores tisulares de las MMPs; Treg: célula T reguladora; VEGFA: factor de crecimiento endotelial vascular A. Representación esquemática adaptada de Kalluri (2016) [5].

3. Remodelación de la ECM y progresión tumoral

El *core* del matrisoma, definido como el conjunto de proteínas de la ECM y sus factores asociados, se compone de ~300 macromoléculas de matriz únicas y puede clasificarse en colágenos, proteoglicanos (tales como proteoglicanos de heparán sulfato, versicano y ácido hialurónico) y glicoproteínas (como lamininas, elastina, fibronectina y tenascinas), que son modificadas de manera postraduccional por una serie de enzimas secretadas, como oxidasas y proteasas. La ECM proporciona señales de crecimiento sostenido debido a que une GF y otras proteínas asociadas. La interacción de las células con estos GF, a través de receptores de superficie, permite su adhesión y señalización, regulando diversos procesos relacionados con la propagación del tumor. También, contribuye a evitar señales supresoras y favorece la resistencia a mecanismos de muerte celular [9]. Existen dos formas principales de ECM:

- La matriz intersticial, forma redes tridimensionales porosas alrededor de las células, garantiza la integridad estructural de los tejidos y órganos, y modula procesos de diferenciación y migración celular. Su composición proteica incluye colágeno I, III, V, etc, fibronectina y elastina.

- La membrana basal, es una estructura densa, más estable, que recubre la cara basal de células epiteliales y endoteliales, así como células musculares y adipocitos. Su composición proteica consiste principalmente de colágeno tipo IV y lamininas, las cuales son interconectadas a través de diferentes proteínas que funcionan como red-puente, tales como nidogen y proteoglicanos de heparán sulfato.

En un tumor, la ECM es bioquímicamente distinta en su composición y presenta mayor rigidez que la del estroma del tejido sano. Los mecanismos de remodelación tumorigénica pueden ser divididos en tres procesos principales:

1. Depósito de componentes de la ECM: se produce un cambio en su abundancia y composición afectando propiedades bioquímicas y mecánicas.
2. Modificaciones postraduccionales en proteínas constituyentes: altera las propiedades bioquímicas y características estructurales de la ECM.
3. Degradación proteolítica: proteasas, como las MMPs, escinden proteínas y liberan fragmentos bioactivos, así como GF previamente unidos. Además, la remodelación de la ECM se requiere para la liberación de restricciones celulares, abriendo paso a la migración celular.

Tanto las células tumorales como estromales participan en los mecanismos de remodelación de la ECM, que contribuye activamente en la patología del tumor. La figura 3 muestra los principales eventos de remodelación que ocurren en el tumor primario. A grandes rasgos, factores derivados del tumor activan a células estromales, que se diferencian en CAFs y provocan junto al tumor la secreción y depósito, en gran cantidad, de componentes de la ECM. Un incremento en el depósito de fibronectina, ácido hialurónico y tenascina C en la matriz intersticial resulta en un fenotipo fibrótico en el tumor, denominado desmoplasia, que se asemeja a las alteraciones observadas durante la fibrosis en un órgano. Enzimas remodeladoras de la ECM, como la lisil oxidasa, expresadas por células tumorales y CAFs, participan en el entrecruzamiento y alineamiento de las fibras de colágeno que, a su vez, aumenta la rigidez de la ECM alrededor del tumor, permitiendo la formación de una barrera física que contribuye en la evasión de la vigilancia inmunológica de las células T. Esta rigidez en la ECM favorece la interacción entre sus componentes y receptores de superficie de células tumorales, que desencadena una mecano-señalización mediada por integrinas. Además, para mantener un microambiente tumorigénico, las células tumorales e inmunes residentes secretan citoquinas, quemoquinas y GF, que reclutan y diferencian a células derivadas de la médula ósea. Estas, junto a los CAFs y las células tumorales, secretan proteasas que degradan la ECM, incluyendo MMPs. La degradación proteolítica de la ECM genera la escisión de sus componentes largos y produce fragmentos bioactivos, más cortos, denominados matricinas. Estos, dada su estructura similar a citoquinas y quemoquinas, junto a GF inducen señalización pro-tumorigénica, que promueve la proliferación, migración, invasión y angiogénesis del tumor. Además, el rápido crecimiento y desarrollo tumoral junto a la presencia de una microvasculatura tumoral aberrante, lleva a un desbalance entre disponibilidad y consumo de oxígeno produciendo un microambiente hipóxico, que modifica el comportamiento celular, la remodelación de la ECM, migración y metástasis. Por otro lado, CAFs junto a neutrófilos secretan MMP9 que degrada la ECM, libera VEGF unido a la matriz y favorece la angiogénesis [10].

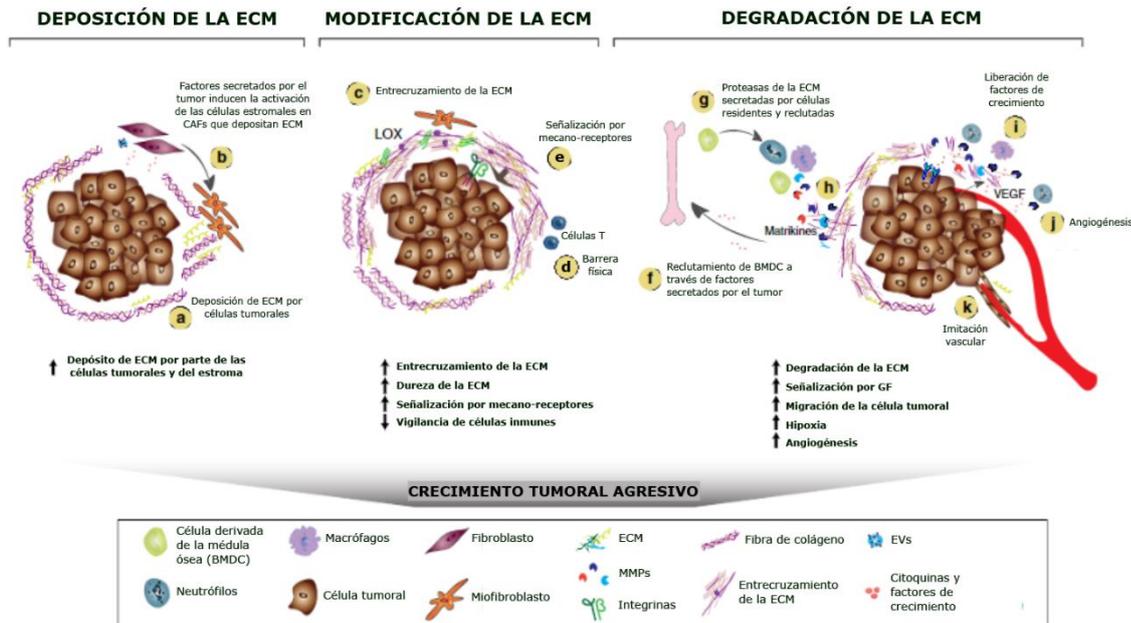


Figura 3. Mecanismos involucrados en la remodelación de la ECM. En un tumor, la remodelación de la ECM contribuye activamente en su desarrollo, creando un microentorno permisivo para la migración e invasión de las células tumorales. **(a, b)** Factores derivados del tumor activan a las células estromales, como los Fb que se diferencian en CAFs; estos junto a las células tumorales secretan y depositan grandes cantidades de componentes de la ECM. **(c)** Enzimas modificadoras de la ECM, como LOX, expresadas por las células tumorales y por los CAFs, producen el entrecruzamiento y alineamiento de las fibras de colágeno, lo cual aumenta la rigidez de la ECM que rodea al tumor y **(d)** genera la formación de una barrera física que permite evadir la vigilancia inmunológica de las células T. **(e)** El aumento en la rigidez de la ECM promueve la interacción entre sus componentes y los receptores de la superficie celular de las células tumorales, lo cual desencadena una mecano-señalización mediada por las integrinas. **(f)** Células tumorales y células inmunes residentes secretan citoquinas, quemoquinas y GF, que reclutan y diferencian a células derivadas de la médula ósea (BMDC). **(g)** Las BMDC, los CAFs, algunas células inmunes y las células tumorales secretan proteasas, como las MMPs, que degradan la ECM. **(h)** La degradación proteolítica de la ECM genera matricinas bioactivas y **(i)** libera GF unidos a la ECM. **(j)** Estos factores inducen una señalización pro-tumorigénica que promueve la proliferación, migración, invasión y angiogénesis del tumor. **(k)** Las células tumorales, estimuladas por la ECM densa y endurecida, adquieren funciones similares a las células endoteliales e imitan la vasculatura que se conecta a los vasos sanguíneos. Representación esquemática adaptada de Winkler y col. (2020) [10].

4. Rol de las MMPs en el TME

4.1. Generalidades

El equilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de la ECM es un factor clave para mantener la homeostasis y el buen funcionamiento de los tejidos. En cáncer, cambios en la expresión de enzimas moduladoras conducen a una anormal dinámica de la ECM. Las MMPs, junto a aquellas proteínas que las regulan, son las enzimas mayormente involucradas en la regulación de su degradación. La interrupción del equilibrio fisiológico entre la activación e inactivación de las MMPs puede contribuir a la progresión de varias enfermedades, además del cáncer, como ser enfermedades cardiovasculares, artritis fibrosa, úlceras crónicas, patologías del sistema nervioso central, eventos asociados con problemas de fertilidad como la endometriosis y la preñez ectópica [11].

4.2. Estructura y clasificación de las MMPs

Las MMPs forman una familia de más de 23 endopeptidasas multidominio distintas, sintetizadas como pre-proenzimas y fueron descritas por primera vez en 1962 [12]. En el extremo amino terminal poseen un péptido señal que las dirige hacia el retículo endoplásmico. La presencia del péptido señal es característico de aquellas proteínas que siguen la vía secretora hacia el exterior celular, sin embargo, existen miembros de la familia que, al poseer dominios transmembrana, llegan a su destino localizándose en la superficie celular. Luego del péptido señal, se encuentra el pro-péptido, que presenta un motivo conocido como "*switch de cisteína*", cuya cisteína se enlaza con el zinc del sitio activo manteniendo a la proMMP como un precursor inactivo [13]. La actividad proteolítica de la enzima tiene lugar en el dominio catalítico de la misma, presentando un motivo conservado que posee tres histidinas que coordinan al zinc del sitio activo. Además, este dominio presenta motivos de unión a tres iones calcio y un ion zinc adicional que estabilizan su estructura. La especificidad de sustrato del sitio activo de la enzima, está dada por una cavidad hidrofóbica, conocida como "*S1 pocket*", cuya conformación y profundidad varía entre las distintas MMPs [14]. Finalmente, le sigue el dominio tipo hemopexina que, al ser un dominio de unión a proteínas, es importante para la especificidad de sustrato y la dimerización de algunos miembros de la familia; un puente disulfuro intramolecular estabiliza su estructura tridimensional. Uniendo el dominio catalítico con el dominio tipo hemopexina se encuentra un péptido de longitud variable conocido como la región bisagra o *linker*. Algunos miembros de la familia poseen dominios adicionales tales como dominios de fibronectina tipo II, importante para el reconocimiento y procesamiento proteolítico, o dominios que les permiten su anclaje a la membrana plasmática [15] (Fig. 4).

La clasificación más general de las MMPs las divide en colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana y otras. La MMP2 (gelatinasa A) y MMP9 (gelatinasa B) pertenecen al subgrupo de las gelatinasas y son las MMPs de interés en este trabajo. Una de las características estructurales distintivas de estas enzimas es la presencia de tres repeticiones de un motivo de fibronectina tipo II, inserto en el dominio catalítico, que resultan fundamentales para unir sustratos como el colágeno o la gelatina. Ambas gelatinasas tienen una actividad proteolítica similar y degradan colágeno desnaturalizado, gelatina y otras moléculas de la ECM tales como el colágeno nativo tipo IV, V, VII, X y XI, laminina, fibronectina y la proteína central del agregano [16]. MMP2 degrada además elastina, tenascina y el colágeno nativo tipo I, II y III de manera similar a las colagenasas. Además, entre el subgrupo de las MMPs de membrana, MT1-MMP (MMP14) fue el primer miembro del grupo que se identificó y tiene la más amplia especificidad de sustrato. MT1-MMP degrada colágenos fibrilares, incluyendo colágeno tipo I, II y III y tiene un papel importante en la degradación de los componentes más abundantes de la ECM. Además, ha demostrado activar a la proMMP2 en la superficie de la célula y estimular la liberación de GF asociados a la ECM, como VEGF o TGFβ [11].

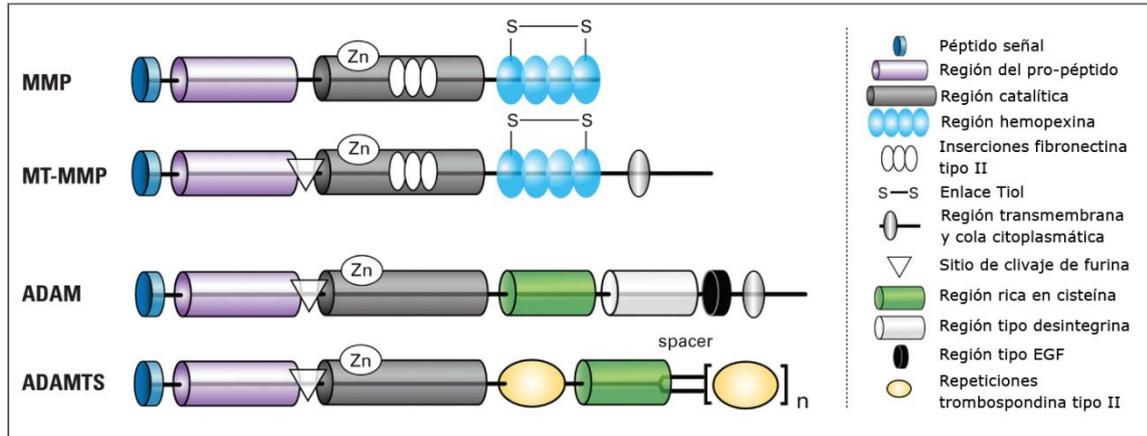


Figura 4. Representación esquemática de los distintos miembros de la familia de las MMPs.

Los dominios estructurales característicos de las MMPs incluyen el dominio del péptido señal, que guía a la enzima hacia el retículo endoplásmico rugoso durante la síntesis; el dominio del pro-péptido, que mantiene la latencia de estas enzimas hasta que se elimina o se altera; el dominio catalítico, que alberga la región de unión al Zn^{2+} , altamente conservada, y es responsable de la actividad enzimática; el dominio de hemopexina, que determina su especificidad de sustrato y una pequeña región bisagra, que le permite al dominio de hemopexina presentar el sustrato al núcleo activo del dominio catalítico. La subfamilia de MMPs de membrana (MT-MMP) posee un dominio transmembrana adicional y un dominio intracelular. Las MMPs se producen en forma latente y la mayoría se activan por escisión proteolítica extracelular del pro-péptido. Las MT-MMP también contienen un sitio que puede ser clivado por proteasas como furinas, lo que proporciona la base para la activación, dependiente de furina, de las MT-MMP latentes antes de su secreción. Otra subfamilia es la tipo desintegrina y metaloproteinasa (ADAM), las cuales son proteínas multidominio compuestas del dominio del pro-péptido, dominio tipo metaloproteinasa, un dominio tipo desintegrina, otro rico en cisteína y uno tipo el factor de crecimiento epidérmico. Las ADAM ancladas a la membrana contienen un dominio transmembrana y otro citoplasmático. Por último, las ADAMTS tienen al menos un motivo de repetición de la secuencia de trombospondina tipo I. EGF: factor de crecimiento epidérmico. Representación esquemática adaptada de Roy y col. (2009) [9].

4.3. Funciones de las MMPs en cáncer

La comunicación intercelular entre las células tumorales y las del estroma permite que estas últimas sean "corrompidas" y se transformen en verdaderos aliados del tumor. CAFs, macrófagos y neutrófilos asociados al tumor, así como las propias células tumorales, expresan y secretan MMPs en el TME. Estas enzimas, al estar involucradas en una variedad de procesos fisiológicos y señales de progresión, podrían representar uno de los principales actores de la interacción de las células tumorales con componentes del TME. Entre las diferentes funciones en las que se involucran se pueden mencionar [17] (Fig. 5):

- Regulación de GF: influyen en la disponibilidad y funcionalidad de múltiples factores que regulan la proliferación celular, invasión y metástasis del tumor. Un ejemplo de esto lo constituye la activación proteolítica de $TGF\beta 1$ por MMP9, MMP2 y MT1-MMP, el cual participa en la evasión de la vigilancia inmunológica y la activación de Fb a CAFs.
- Regulación de la apoptosis: clivan ligandos o receptores que transducen señales proapoptóticas en células tumorales.
- Formación de la vasculatura del tumor: MMP2, MMP9 y MT1-MMP son mayormente involucradas con angiogénesis tumoral, estabilidad y permeabilidad vascular. Una mayor expresión de MMP2 activa está vinculada con invasión linfática y metástasis a ganglios linfáticos.

MMP9 regula la biodisponibilidad de VEGF y afecta la linfangiogénesis vinculándose con la formación de metástasis linfáticas.

- **Inflamación en cáncer:** principales reguladores de inmunidad innata y adaptativa, modulando la función de citoquinas, quemoquinas y participando en funciones inmunoregulatorias en el TME. Específicamente, MMP2 y MT1-MMP participan en la liberación de IL-1 β .
- **Invasión tisular y metástasis:** el inicio de la metástasis implica la invasión del tumor en el tejido periférico, que lleva a la intravasación de las células tumorales en la sangre o vasos linfáticos, desde donde se diseminan a los órganos secundarios. Sin embargo, esto requiere de la pérdida de adhesión de estas células y de la capacidad de cruzar barreras físicas, como la membrana basal. La degradación de la ECM es necesaria para la invasión y algunas células tumorales producen unas protrusiones llamadas invadopodias, que liberan MMPs y que "allanan" el camino en el tejido periférico. Otras no forman invadopodias, sino que activan a Fb adyacentes que contribuyen en la degradación de la ECM a través de diferentes mecanismos [18].

Además de las funciones proteolíticas mencionadas anteriormente, las MMPs presentan funciones no catalíticas principalmente relacionadas a su dominio de hemopexina. Se pueden mencionar actividades de señalización, de regulación génica, como factores de transcripción, antimicrobianas, en diferenciación celular, entre otras [19, 20].

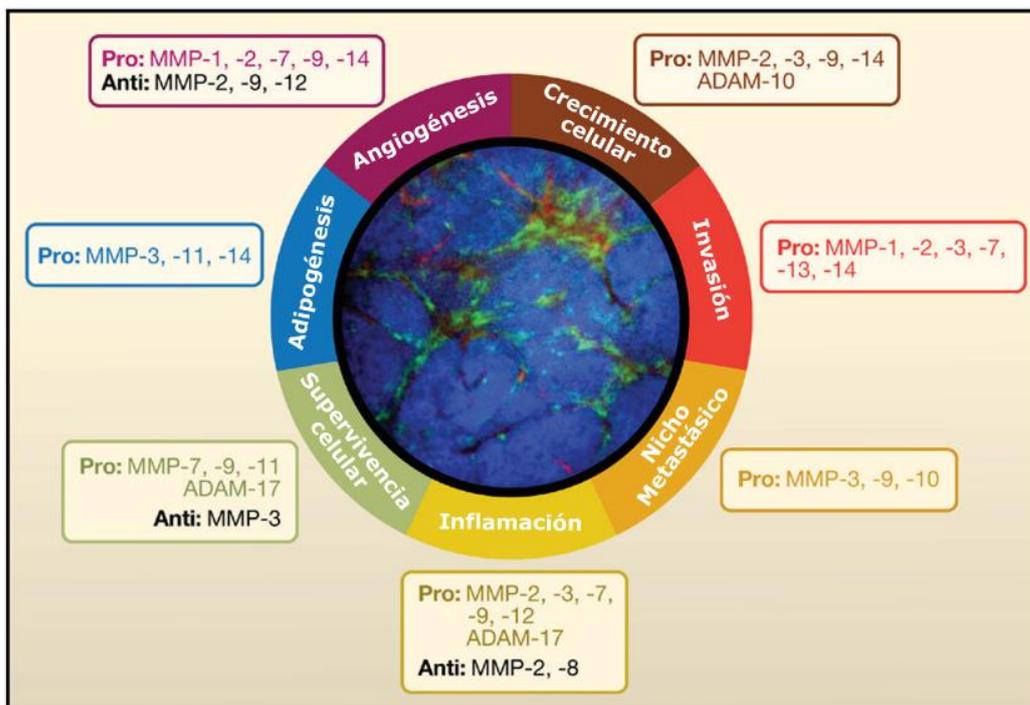


Figura 5. Modulación del TME por las MMPs. Resumen de los distintos procesos modulados por las MMPs en el TME. Los ejemplos seleccionados de MMPs y ADAMs promueven (pro) o suprimen (anti) cada uno de estos procesos. El centro de la figura muestra una imagen de la glándula mamaria de un ratón que desarrolla espontáneamente un carcinoma mamario, capturada mediante microscopía confocal. Tiene como objetivo el ilustrar la complejidad del TME, en el que influyen en gran medida células no tumorales, como las células mieloides, las cuales podrían ser tanto objetivo como fuente de las MMPs en el tumor. Las células tumorales se observan de color azul, las células mieloides en color verde y los vasos sanguíneos en color rojo. Representación esquemática adaptada de Kessenbrock y col. (2010) [11].

4.4. Regulación de la actividad de las MMPs

La actividad de las MMPs está estrictamente regulada a distintos niveles como ser: (1) a nivel de la transcripción, donde señales de inducción y/o supresión actúan sobre receptores de superficie celular desencadenando cascadas de señalización intracelulares que concluyen en la activación o represión transcripcional de genes que expresan a estas enzimas. (2) A nivel postranscripcional, pudiendo degradarse el mRNA que codifica para estas proteínas; así como (3) a nivel proteico. Ciertas proMMPs son activadas intracelularmente antes de ser secretadas o insertadas en la membrana plasmática. Sin embargo, la mayoría son secretadas en sus formas latentes y activadas en el espacio extracelular por otras proteasas. Además, a nivel extracelular pueden sufrir proteólisis que las inactive o ser inhibidas por la unión a otras proteínas [21]. Por lo tanto, la función de las MMPs *in vivo* depende del balance local entre su expresión y la de sus inhibidores fisiológicos. El inhibidor fisiológico más importante de la función de las MMPs son los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs, por sus siglas en inglés) [11].

4.5. Activación de la proMMP2

Las MMPs son inicialmente expresadas en una forma inactiva, debido a la interacción de un residuo de cisteína de su pro-dominio con el ión zinc del sitio catalítico. Después de la disrupción de esa interacción, mediante acción proteolítica o modificación química en este residuo, por un mecanismo llamado *switch* de cisteína, la enzima llega a ser proteolíticamente activa. Según mencionamos, su expresión está controlada por citoquinas inflamatorias, GF, hormonas, proteínas como el inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN o CD147) e inhibidores, tanto endógenos (TIMPs) como exógenos (α 2-macroglobulina, inhibidor de MMPs en suero) [17]. En cuanto a la proMMP2, uno de los principales mecanismos de activación, reportados en la bibliografía, involucra la formación de un complejo ternario: MT1-MMP, TIMP2 y proMMP2 en la superficie celular. Conforme TIMP2 aumenta, se produce una mayor activación de la MMP2; lo cual ocurre hasta que TIMP2 alcanza niveles suficientemente altos, que logra revertir este proceso, inhibiendo la activación de proMMP2 e incluso bloqueando su actividad (Fig. 6) [22, 23]. Sin embargo, éste no es el único mecanismo reportado en bibliografía. Existen trabajos que muestran que la activación de la proMMP2 podría ser MT1-MMP-dependiente presente en la superficie de unas vesículas nanométricas conocidas con el nombre de vesículas extracelulares, sobre las que profundizaremos más adelante [24]. Además, en otros modelos, se reportó que la activación de proMMP2 podría involucrar a miRNAs [25]. Por último, también se conoce que la secreción y activación de MMPs está regulada por una proteína de membrana con un amplio rango de funciones en salud y enfermedad humana, especialmente en cáncer, llamada EMMPRIN, CD147 o Basigin (BSG), sin embargo, el mecanismo no se conoce con exactitud [26].

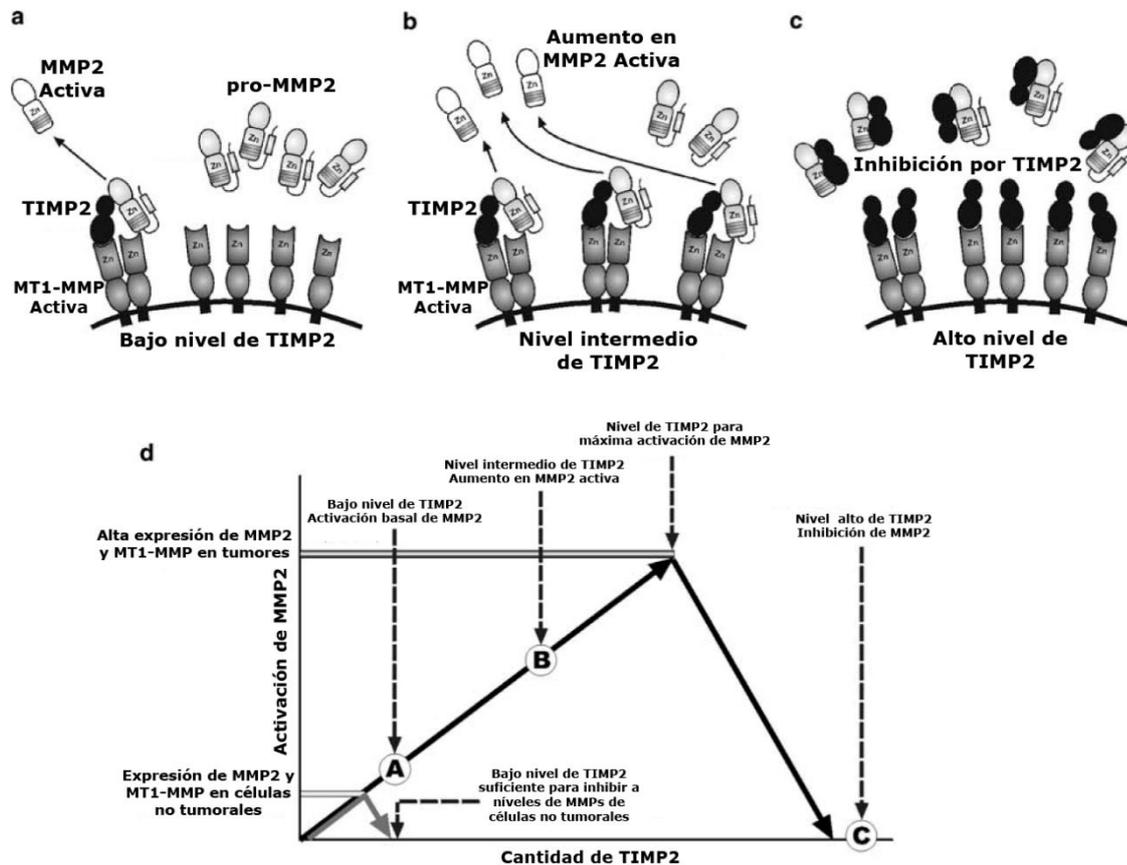


Figura 6. Modelo que representa el equilibrio entre la expresión de MMP2/MT1-MMP y TIMP2 en la activación de MMP2. (a) La proteína TIMP2 (negro) se une a la MT1-MMP (gris oscuro) en la superficie celular y actúa como receptor de proMMP2 (gris claro). Una segunda molécula de MT1-MMP, libre de TIMP2, escinde el dominio del pro-péptido de la proMMP2 para generar MMP2 activa (blanco), que se libera al espacio extracelular. (b) El aumento de la expresión de TIMP2, permite el ensamblaje de un mayor número de complejos ternarios MT1-MMP/TIMP2/proMMP2 en la superficie celular y da lugar a una mayor activación de MMP2. (c) Niveles altos de expresión de TIMP2 inhiben tanto la actividad de las MMPs como su activación, por saturación de los sitios de unión a MT1-MMP, como por unión directa a proMMP2 y MMP2. (d) Representación gráfica de la relación entre la expresión de MMPs, los niveles locales de TIMP2 y la activación de MMP2. Las flechas negras solidas representan la activación de MMP2 en células con alta expresión de proMMP2 y MT1-MMP en función de los niveles de TIMP2. La activación de MMP2 aumenta a medida que aumenta la cantidad de TIMP-2, hasta que esta proteína alcanza el nivel óptimo para la máxima activación de MMP2. A partir de ese nivel, aumentos en TIMP2 inhiben la activación y, a niveles más altos, inhiben directamente la actividad de las MMPs. Los puntos A, B y C son posiciones representativas para los tres escenarios representados en la figura superior (A)-(C). En los tejidos no tumorales, que presumiblemente expresan niveles bajos de MMP2 y MT1-MMP, incluso cantidades bajas de TIMP2 son suficientes para inhibir la activación y la actividad de las MMPs (flecha gris, abajo a la izquierda). Representación esquemática adaptada de Lu y col. (2004) [22].

5. Rol de galectina-1 en el TME

La familia de las galectinas, proteínas de unión a glicanos, juega importantes funciones en el desarrollo y progresión del cáncer. Se encuentran tanto en el citoplasma, en el núcleo, como en el exterior celular, siendo secretadas, mediante un mecanismo no convencional, y depositadas en la ECM o quedando unidas a la membrana plasmática. Datos obtenidos en modelos preclínicos sugieren que GAL-1 podría representar un *target* interesante en el TME y sus inhibidores tienen actualmente un gran interés en terapia, dado que mostraron resultados prometedores en estos

modelos. Dado que GAL-1 se encuentra, por lo general, ausente en el epitelio normal, cada vez más datos han revelado el potencial uso de la detección de sus niveles para el diagnóstico del cáncer [27]. En el TME, modula interacciones bidireccionales entre células tumorales y sus otros componentes, participando en mecanismos de activación de Fb a CAFs, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. En este sentido, TGF- β 1 activa a Fb aumentando la expresión de GAL-1 a través de la fosfoinositol-3 quinasa y p38, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), permitiendo la diferenciación celular. También, regula la proliferación y migración en células estrelladas pancreáticas (PSCs), donde su expresión se correlaciona positivamente con un incremento en los niveles de fibronectina, colágeno tipo I, α -SMA, MMP2 y TIMP-1, a través de la vía TGF- β 1/Smad [28]. Además, en modelos preclínicos de ratones transgénicos con cáncer de páncreas, su inhibición resulta en tumores con un contenido reducido en α -SMA, dificulta el crecimiento del mismo, su metástasis y aumenta la supervivencia de los animales [29, 30]. En este sentido, el papel de las galectinas en la activación de Fb parece estar monopolizado por GAL-1. Por otro lado, en cáncer de ovario, GAL-1 secretada por Fb modula en forma paracrina la invasión de células tumorales a través de MMP2 [31]. De igual manera, en cáncer de páncreas, incrementa la proliferación e invasión del tumor debido al aumento en la expresión de MMP2 y MMP9 en las células tumorales [32, 33]. En carcinomas tiroideos, GAL-1 se observó sobreexpresado en comparación con tejido tiroideo no tumoral. Además, ha sido propuesto como marcador de malignidad tiroidea dada su sobreexpresión en tumores y tejidos metastásicos [34].

6. Vesículas extracelulares (EVs)

6.1. Historia

La secreción de vesículas de membrana es un proceso que parece conservarse a lo largo de evolución: células de diferentes organismos, incluidos todos los eucariotas (amebas, *Caenorhabditis elegans*, parásitos, mamíferos) y también procariotas, demostraron liberar vesículas al medio extracelular. Además, en organismos pluricelulares (o eucariotas superiores), las mismas fueron aisladas de diversos fluidos corporales (sangre, orina, saliva, leche materna, líquido amniótico, ascitis, líquido cefalorraquídeo, bilis y semen). Es así que los nombres utilizados en la literatura son diversos y se fueron modificando con el tiempo [35, 36]. La primera observación de la existencia de vesículas, en 1946, fue gracias a Chargaff y West, dadas las propiedades anticoagulantes de partículas derivadas de plaquetas presentes en el plasma [37]. Estas fueron denominadas en 1967 como '*platelet-dust*' [38]. En 1969, Anderson describió la secreción de '*matrix-vesicles*' en el proceso de calcificación de hueso [39]. Entre 1970s-1985s comenzaron a aparecer términos como '*microparticles*' [40], '*microvesicles*' [41], '*membrane fragments*' [42], '*membrane vesicles*' [43], para describir a vesículas que participaban en el transporte intercelular de nutrientes y eran generadas a partir del cultivo *in vitro* de líneas celulares tumorales y no tumorales u obtenidas de fluidos biológicos. Recién en 1985-1987 se demostró que las células podrían secretar estas vesículas por un proceso que involucra a la vía endocítica (en tres pasos: endocitosis, formación de vesículas intraluminales en el interior de endosomas y fusión de endosomas o cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática) [44]. Aunque hasta ese momento, se las seguía considerando como mecanismos de eliminación

de proteínas transmembrana innecesarias. Recién en 1987 se propone el término 'exosomes' para referirse específicamente a vesículas de origen endosomal producidas a partir de reticulocitos [45]. A partir de 1990, trabajos en células presentadoras de antígenos comenzaron a generar nuevos indicios acerca de estas vesículas, modificando lo que se pensaba hasta ese momento, al asociarlas con funciones en comunicación intercelular, es decir, capacidad de transportar moléculas de superficie que podrían inducir señalización en células *targets*, lo cual renueva el interés de los científicos en este campo [46]. En 2002, el término 'exosomes' superó en número al término 'microvesicles' convirtiéndose en el más usado en la literatura científica. Esto podría llevar a pensar, erróneamente, que los exosomas son biológicamente más importantes que otras vesículas, sin embargo, el conocimiento actual es demasiado parcial para confirmar o contradecir tal suposición. Años subsiguientes y debido a la falta de evidencia sólida acerca de marcadores específicos que permitan identificar una u otra subpoblación de vesículas, es que en 2011, desde la creación de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, por sus siglas en inglés), se llegó al consenso de incentivar el uso del término 'vesículas extracelulares' (EVs, por sus siglas en inglés) y aparecieron una gran cantidad de trabajos que lo utilizaron para hacer referencia a este campo de estudio. En 2012 se creó el *Journal of Extracellular Vesicles*, la primera revista científica que publica trabajos específicamente del campo, que al año 2021 presenta un factor de impacto de 25.841 puntos, siendo este campo un 'hot topic' a nivel mundial. En 2014 se plantearon los requisitos experimentales mínimos para el estudio de EVs (MISEV, por sus siglas en inglés) y sus funciones, los cuales fueron actualizados en 2018 [47]. Por último, en 2021, ISEV lanzó su segunda revista, *Journal of Extracellular Biology*, referida a este campo (www.onlinelibrary.wiley.com/journal/27682811) (Fig. 7).

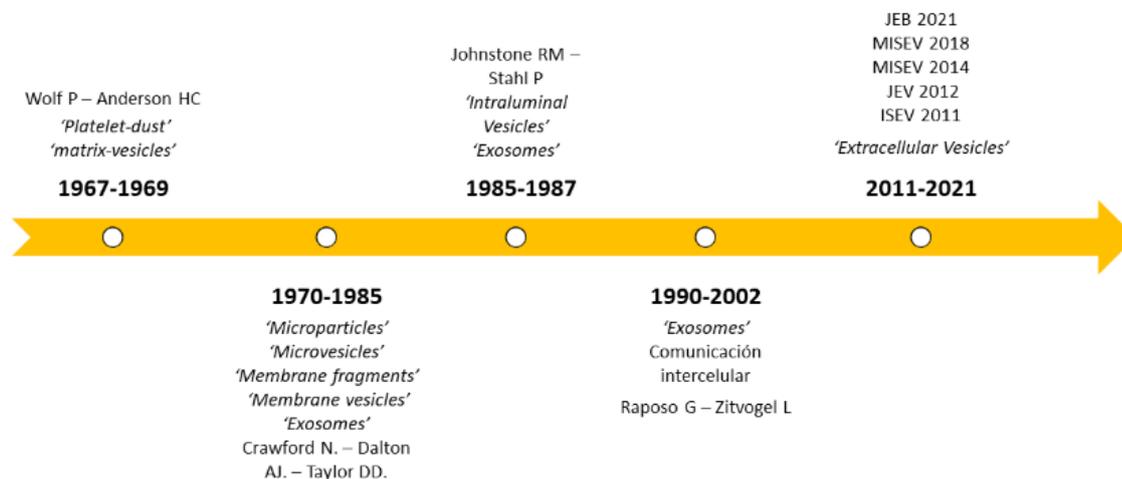


Figura 7. Hitos importantes en el campo de las EVs. Un campo con reciente crecimiento, se indica la nomenclatura adoptada a lo largo del tiempo y algunos autores que la acuñaron. ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares; JEV: Revista de Vesículas Extracelulares; MISEV: requisitos experimentales mínimos para el estudio de vesículas extracelulares; JEB: Revista de la Biología Extracelular.

6.2. Clasificación de las EVs

Las EVs pueden clasificarse en cuatro subtipos: exosomas, microvesículas, apoptosomas y oncosomas. Según se explicará en más detalle en la sección 6.3, los **exosomas** provienen de

la fusión del endosoma tardío o cuerpo multivesicular (MVB, por sus siglas en inglés) con la membrana plasmática. Debido a las restricciones de tamaño en el endosoma, los exosomas miden entre 30 a 200nm. El tamaño de los exosomas se solapa con el rango de tamaños heterogéneo reportado para las **microvesículas**, entre 50-1000nm, las que evaginan directamente de la membrana plasmática. Incluso partiendo de distintos compartimientos subcelulares, los exosomas y las microvesículas comparten algunos de los mecanismos moleculares de biogénesis y se solapan en sus propiedades biofísicas, por lo cual presentan muchos componentes estructurales y moleculares en común [48]. Los **oncossomas** constituyen otra población de EVs, que también se forma a partir de la membrana plasmática pero exclusivamente de células tumorales. Presentan un gran tamaño, que va de 1-10 μm y se caracterizan por expresar niveles muy bajos de ciertas proteínas, conocidas como tetraspaninas, como ser CD9, CD63 y CD81, de importancia en el resto de las EVs. Por último, las células que experimentan apoptosis liberan una población de EVs llamadas apoptosomas que se forman tanto por evaginación como fragmentación de la membrana plasmática. También presentan un amplio rango de tamaños, entre 100 a 5000 nm de diámetro, aunque suelen presentar organelas celulares (ausentes en los demás tipos de EVs [49, 50]). En el medio extracelular nos encontramos con otra serie de partículas no vesiculares como ser diferentes tipos de lipoproteínas y virus envueltos. Recientemente se describieron, también, unas partículas entre 30-50nm conocidas como exómeros, que fueron poco caracterizadas hasta ahora [51] (Fig. 8). Las características biofísicas entre los subtipos de EVs, tales como tamaño o densidad, no permiten discriminar entre los diferentes tipos y, hasta hoy en día, no existen marcadores bioquímicos totalmente específicos que permitan discriminar entre los diferentes orígenes subcelulares, una vez que se encuentran en el medio extracelular. Por lo cual, es ampliamente conocido que ninguna técnica de purificación permite aislar un tipo particular de EVs y que todas llevan a co-aislar diferentes poblaciones, en el mejor de los casos enriquecidas en uno u otro subtipo. Un avance en materia de marcadores bioquímicos y nomenclatura de EVs, fue reportado por Kowal y col. [52] quienes aconsejaron que, dado que el tamaño es necesario pero no suficiente para definir a un subtipo en particular, se podrían utilizar los términos *large-* (>200 nm) o *small-EVs* (50-200 nm), con un sentido más amplio y menos erróneo, dejando abierta la posibilidad de que *small-EVs*, por ejemplo, puedan no estar asociadas con un origen endosomal. Más recientemente, las clásicas microvesículas, referenciadas también como *large-EVs*, mostraron presencia de anexina A1 que podría utilizarse como un marcador proteico selectivo. Además, las *small-EVs* se subclasificaron en exosomas clásicos, los que expresan marcadores proteicos como las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9; y exosomas no clásicos, que muestran ausencia de éstas. Otras proteínas que pueden encontrarse en los exosomas clásicos son FLOT-1, ALIX, TSG101, entre otras [53].

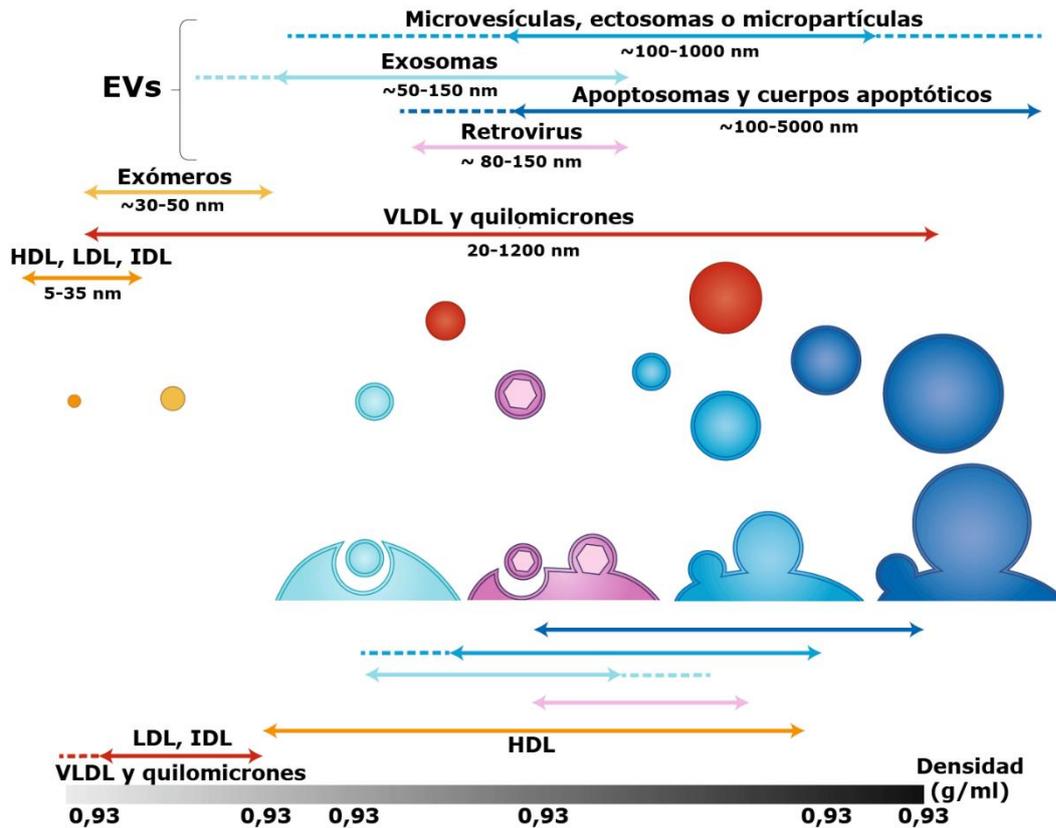


Figura 8. Superposición en tamaños y densidad de los diferentes subtipos de EVs. Representación de los diferentes subtipos de EVs y de otras partículas con las que se co-aislan. Se esquematiza el origen subcelular de las EVs (del compartimento endosomal o de la membrana plasmática) junto con sus rangos de tamaño y densidad. Independientemente de los mecanismos de secreción, los subtipos de EVs no pueden separarse completamente según tamaño o densidad, debido a la superposición que presentan en sus características físicas. Esto se aplica por ejemplo a las MVs de tamaño pequeño, los exosomas y los virus envueltos. Los restos celulares, como los cuerpos apoptóticos o las pequeñas vesículas apoptóticas pueden no distinguirse de las demás EVs. Otras partículas secretadas que pueden ser co-aisladas con las EVs son los exómeros y diferentes tipos de lipoproteínas. IDL: lipoproteína de densidad intermedia; LDL: lipoproteína de baja densidad; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. Representación esquemática adaptada de Mathieu y col. (2019) [48].

6.3. Biogénesis y liberación de microvesículas y exosomas

En las células eucariotas, las proteínas presentes en las vesículas intracelulares son clasificadas, empaquetadas en el aparato de Golgi y transportadas eficazmente a sus destinos finales a través de la llamada vía secretora clásica. Una ruta alternativa, considerada como una de las vías de secreción no clásica de proteínas, supone su encapsulación en EVs. Las **microvesículas**, según se mencionó en la sección 6.2, se forman por evaginación de la membrana plasmática. Su biogénesis, a pesar de no haber sido estudiada al detalle, es un proceso que generalmente comienza con la activación de la célula en respuesta a GF, citoquinas proinflamatorias, factores procoagulantes o, incluso, en respuesta a hipoxia. Requiere de pasos de reorganización molecular en la membrana plasmática que involucran tanto a proteínas como a lípidos. Además, un aumento en la concentración de calcio, la reorganización del citoesqueleto cortical y la actividad de ciertas enzimas, constituyen fases esenciales [54, 55]. Por otro lado, los **exosomas** provienen de la ruta endosomal. En este caso, el cargo de estas EVs es

internalizado por la célula secretora mediante endocitosis (libre o mediada por receptor) y, en el interior celular, constituye el endosoma temprano. Durante su maduración, se produce la invaginación de la membrana del endosoma formándose las vesículas intraluminales (ILVs, por sus siglas en inglés), conformándose así los endosomas tardíos o MVBs. El MVB puede seguir la ruta degradativa, es decir, fusionarse con lisosomas degradándose su contenido; o bien puede fusionarse con la membrana plasmática y así liberar las ILVs al espacio extracelular, las que reciben el nombre de exosomas [56, 57]. Respecto a la formación de las ILVs, han sido descritos mecanismos dependientes de un complejo proteico denominado ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) o independientes de éste. Uno de los mecanismos ESCRT-independientes depende de la generación de ceramida, a partir de esfingomielina, por parte de la enzima esfingomielinasa neutra. Por otra parte, las proteínas de la familia de las tetraspaninas parecen jugar también un papel importante en la biogénesis de EVs independiente de ESCRT [55]. La heterogeneidad de las EVs no sólo deriva de su distinto origen subcelular, sino también de la existencia de distintas subpoblaciones de MVBs que secretan subpoblaciones de exosomas con diferente morfología y composición. Para el caso de los exosomas, una vez formadas las ILVs se requiere del transporte, anclaje y fusión de los MVBs con la membrana plasmática. Para esto, es necesaria la acción coordinada del citoesqueleto de actina y microtúbulos, motores moleculares asociados (kinesinas y miosinas), interruptores moleculares (pequeñas GTPasas), como las proteínas de la familia Rab, y factores de anclaje tipo SNAP/SNARE, que participan en el proceso de fusión de membranas [54]. La biogénesis tanto de exosomas como microvesículas, comparte componentes moleculares como TSG101, ESCRT-III, VSP4, tetraspaninas, entre otros.

6.4. Composición molecular de las EVs

La composición de las EVs no es aleatoria y, durante su biogénesis, son incorporadas selectivamente ciertas proteínas específicas de la célula secretora, así como ciertos lípidos y ácidos nucleicos, que se convierten en su "firma molecular" específica (Fig. 9). Análisis detallados de su cargo otorgan información acerca de su célula de origen y su estado metabólico, pudiendo ser explotado como marcadores específicos o biomarcadores, según se comentará más adelante. Muchos estudios en EVs se recogen, almacenan y catalogan en diversas bases de datos de acceso libre (*exocarta*, *vesiclepedia*, *EVpedia*) que engloban tanto estudios "ómicos" como de técnicas tradicionales. ExoCarta [58] fue incorporada a una base de datos más completa denominada Vesiclepedia [59]. Su información se actualiza continuamente con la ayuda de la comunidad científica que trabaja en el campo de las EVs. Ambas incluyen datos de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y de los procedimientos de purificación realizados para su determinación [60].

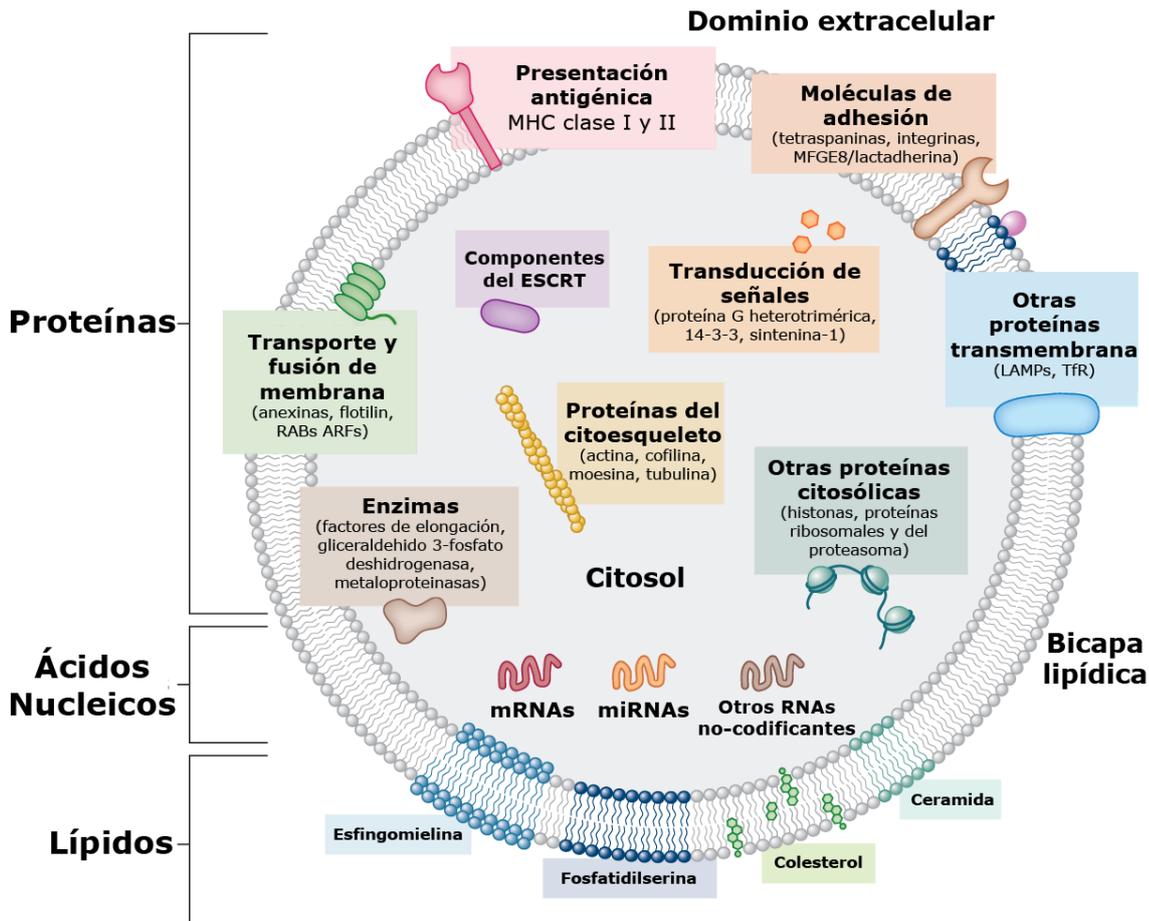


Figura 9. Composición global de las EVs. Representación esquemática de la composición (familias de proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos) y la orientación de membrana de las EVs. Ejemplos de tetraspaninas que se encuentran habitualmente en las EVs incluyen a CD63, CD81 y CD9. Se debe considerar que algunos de los componentes representados pueden estar presentes en algunos subtipos de EVs y no en otros. Por ejemplo, las histonas, los componentes del proteasoma y del ribosoma, probablemente se secretan en las MVs derivadas de membrana plasmática y/o en los apoptosomas y no en los exosomas. ARF: factor de ADP-ribosilación; ESCRT: *endosomal sorting complexes required for transport*; LAMP: proteína de membrana asociada al lisosoma; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; MFGE8: factor VIII-factor de crecimiento epidérmico de glóbulos de grasa de la leche; RAB, proteínas relacionadas con Ras en el cerebro; TFR, receptor de transferrina. Adaptada de Colombo y col. (2014) [60].

6.4.1. Proteínas en EVs

Además de las técnicas tradicionales, que utilizan anticuerpos para la detección de proteínas específicas (western blot, inmunomarcación por microscopía electrónica de transmisión, entre otras), el desarrollo de técnicas de análisis proteómico, como la espectrometría de masa, permitió la identificación a gran escala de proteínas que no habían sido descritas anteriormente en las EVs, provenientes tanto de cultivos celulares como fluidos biológicos (sangre, orina, leche materna, entre otros). En este sentido, los estudios proteómicos mostraron que las EVs presentan un subconjunto específico de proteínas celulares que dependen del tipo de célula que las secreta, mientras que otras están conservadas entre las diferentes líneas celulares [60]. De forma general, las EVs presentan proteínas típicas de endosomas, membrana plasmática y citosol, mientras que proteínas del retículo endoplásmico, complejo de Golgi, mitocondrias y

núcleo están en su mayoría ausentes. Específicamente, los apoptosomas presentan proteínas como ser calnexina, citocromo C, anexina V, entre otras. En los oncosomas se demostró la presencia de CAV-1, ARF6, AKT1, entre otras y en microvesículas, además de la ya mencionada anexina A1, fueron reportadas selectinas, integrinas, CD40, CD45, glicoforinas, antígenos del grupo sanguíneo, entre otras. Por último, la composición proteica de los exosomas fue descrita principalmente, reportándose la presencia de proteínas de transporte de membrana y de fusión (anexinas, GTPasas y flotilin), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), proteínas de choque térmico (HSC70 y HSP90), proteínas involucradas en la biogénesis del MVB (ALIX y TSG101), proteínas relacionadas con los lípidos y fosfolipasas, ESCRT y proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad [50]. Las tetraspaninas forman complejos oligoméricos tipo microdominios en la membrana plasmática y endosómica, mediante su interacción con receptores de señalización, integrinas, receptores de adhesión, metaloproteinasas, moléculas del citoesqueleto y sintenina-1. Las tetraspaninas participan en diversos aspectos de la biología de las EVs, como ser su biogénesis, selección del cargo y captación por células receptoras [61]. Específicamente, CD63 está implicada en la selección del cargo exosomal en diversos tipos celulares. Además, su delección mediante CRISPR/Cas9 reduce la secreción de EVs [62]. Si bien fueron reportados estudios de este tipo sobre los demás miembros de esta superfamilia, los datos obtenidos a menudo son controversiales dados los mecanismos compensatorios que se producen tras la delección de un gen [63]. Por último, se conoce que las modificaciones postraduccionales presentes en las proteínas juegan un papel importante en la selección del cargo en MVBs y por lo tanto en EVs [64].

6.4.2. Ácidos Nucleicos en EVs

La mayoría de los estudios en EVs describen RNA no-codificantes pequeños (menor a 300pb), incluidos snRNA (*small nuclear RNA*), snoRNA (*small nucleolar RNA*), piRNA (*piwi-interacting RNA*), miRNA (microRNA). Además, se reportaron rRNA (ribosomal RNA), tRNA (transfer RNA) y mtRNA (mitochondrial RNA). También se presentan circRNA, Y-RNA, RNA no-codificantes largos (lncRNA) y RNA codificantes (mRNA) [65, 66]. Menos información existe al respecto en cuanto a la presencia de DNA genómico, DNA simple hebra y DNA mitocondrial en las EVs. Sin embargo, el DNA podría encontrarse en la superficie de las EVs y no en su interior [53, 67, 68].

6.4.3. Lípidos en EVs

Son muchos menos los estudios que han analizado la composición lipídica de las EVs con respecto a los estudios que describen proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, al comparar su composición con la de membrana plasmática, se reportó un enriquecimiento en enfingomielina, fosfatidilserina (con respecto a fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina), colesterol y glicoesfingolípidos. Además, la ceramida se encuentra enriquecida en exosomas, dado que participa en uno de sus mecanismos de biogénesis, formando subdominios en la membrana que inducen su curvatura negativa para la formación de las ILVs. Otros lípidos de la membrana endosomal juegan un papel relevante en la inducción de la curvatura negativa, así como también lo hace el colesterol en la participación de la fusión de los MVBs con la membrana plasmática [69].

6.4.4. Cambios en la composición y heterogeneidad de las EVs

Numerosos estudios han mostrado que modificaciones de las condiciones de cultivo, que imitan diferentes entornos extracelulares, estados fisiológicos o de diferenciación de las células secretoras, producen cambios en la composición de las EVs. Se pueden mencionar la hipoxia, condiciones ácidas, deprivación de nutrientes o suero, señales inflamatorias, radiación ionizante, estrés térmico u oxidativo, drogas citotóxicas, entre otras [70]. De la misma manera, cambios biológicos que se producen en las EVs reflejan el estado celular, incluida la transformación oncogénica [71]. Sin embargo, la heterogeneidad de las diversas subpoblaciones de EVs y su composición exacta no pueden ser adecuadamente caracterizadas usando metodologías tradicionales que obtienen información a partir de conjuntos de EVs, que inevitablemente promedian la información de diversas subpoblaciones. A futuro se espera aumentar la comprensión y caracterización de las distintas subpoblaciones, pudiendo ilustrar con éxito su diversidad, gracias a la posibilidad de estudiar EVs individuales mediante *single-vesicle analysis* [72, 73].

6.5. Captación de las EVs

Una vez que las EVs son liberadas pueden actuar sobre células receptoras o blanco, que se encuentren próximas o distantes de la célula secretora; produciendo una respuesta fenotípica a través de diversos mecanismos de internalización (1) o por interacciones ligando receptor (2).

(1) Respuesta por internalización de las EVs o sus componentes mediante:

✓ Endocitosis:

-La endocitosis mediada por clatrina, caveolina o flotilin, puede involucrar a dominios de membrana denominados balsas lipídicas. Una vez internalizadas, las EVs pasan a formar parte de los endosomas desde donde pueden liberar su contenido al interior celular, ser recicladas y re-secretadas al medio extracelular, o ser dirigidas al lisosoma para su degradación.

-Endocitosis en fase fluida y macropinocitosis (procesos constitutivos y no específicos de carga), ambos procesos comparten mediadores proteicos similares por lo que su distinción es muy difícil. No se requiere el contacto directo con el material a internalizar y consiste en evaginaciones desde la célula que rodean un área de líquido extracelular, el que es internalizado.

✓ Fagocitosis: consiste en la formación de invaginaciones que rodean el material destinado a la internalización, con o sin la participación de extensiones de membrana envoltentes y no es requerido el contacto directo con el material a internalizar.

✓ Fusión directa: el cargo de las EVs es liberado directamente en el citosol, mediante la fusión directa de la membrana de las EVs con la membrana de la célula blanco.

(2) Respuesta por interacciones ligando-receptor (sin internalización):

Se produce un acoplamiento (*direct binding*) con la célula blanco, que involucra interacciones moleculares específicas a través de proteínas, lípidos, azúcares, que induce vías de señalización intracelular como respuesta fenotípica. Los mecanismos mencionados anteriormente se resumen en la figura 10 [48, 66, 74].

La endocitosis pareciera ser el método principal de captación de EVs, pero existe poco consenso en la literatura sobre qué tipo de mecanismo endocítico es más importante o prevalente. Además, es posible que una población de EVs pueda utilizar simultáneamente vías

diferentes dado que, si se inhibe una de éstas, rara vez se logra una inhibición completa de la captación. Sin embargo, la captación continúa siendo el paso menos comprendido en la comunicación intercelular basado en EVs [75].

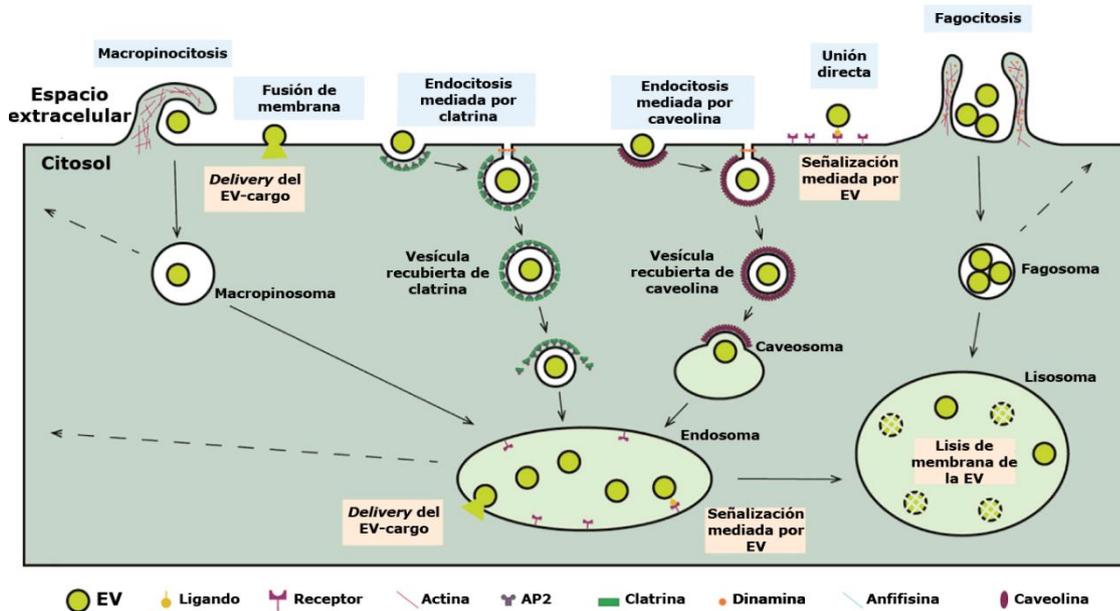


Figura 10. Vías celulares utilizadas por las EVs para la entrega de su carga a células receptoras. Las EVs que llegan a las células receptoras pueden interactuar con receptores de superficie celular o fusionarse con la membrana plasmática de la misma y liberar su carga soluble directamente en el citosol. Alternativamente, las EVs pueden ser internalizadas a través de macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina o fagocitosis. Las EVs internalizadas transitan a través de compartimentos endosomales y, dentro de estas organelas, ligandos presentes en la superficie de las EVs pueden inducir una cascada de señalización intracelular a través de mecanismos ligando-receptor. También, las EVs pueden liberar su carga en el citosol, por fusión de su membrana con la membrana del endosoma, o pueden ser dirigidas al lisosoma para su degradación. Además, la acción de hidrolasas ácidas podría liberar el cargo de EVs para su degradación, para su interacción con otros componentes endo-lisosomales, o su reciclado al medio extracelular mediante una nueva fusión con la membrana plasmática. Los símbolos utilizados se especifican en la parte inferior del esquema. Representación esquemática adaptada de Pedrioli y Paganetti (2021) [74].

7. EVs en Cáncer, CAFs y ECM

Diversos autores han descrito el rol de los Fb, y en especial de CAFs, en el comportamiento del tumor orquestado por las EVs que se producen en ese entorno. En cáncer de páncreas, EVs derivadas de CAFs afectan la proliferación y supervivencia de células tumorales epiteliales [76]. Se han obtenido resultados similares en un modelo tumoral de cáncer colorrectal [77] y en cáncer de mama, donde el intrincado *crosstalk* entre Fb y células tumorales mamarias, a través de EVs, impulsa el comportamiento invasivo del tumor [78]. En este sentido, las EVs fueron implicadas en la promoción de diversos tumores y su participación como mediadoras de la comunicación intercelular en el TME ha sido ampliamente reportada. Por otro lado, el colágeno constituye uno de los principales componentes de la ECM y sirve de andamio para el crecimiento y división celular. La regulación de la matriz de colágeno influye en la progresión tumoral en un gran número de tumores. Estudios realizados por Tokarz y col. [79] en cáncer tiroideo demostraron que la ultraestructura del colágeno es significativamente diferente entre el tejido normal y el tejido del carcinoma papilar tiroideo. En un tumor, el entrecruzamiento de las fibras de colágeno se observa principalmente en la periferia, y áreas enriquecidas con CAFs colocalizan

con aquellas que muestran un aumento en la densidad de colágeno. El depósito de colágeno y un incremento en la rigidez de la ECM ha sido asociado con la progresión del tumor, la invasividad de las células tumorales y el aumento de la metástasis, siendo las integrinas los principales receptores de señalización de la ECM [80]. En conclusión, los CAFs modulan la progresión tumoral y la respuesta terapéutica mediante numerosos mecanismos moleculares que implican 1) efecto directo sobre las células tumorales, 2) efecto indirecto a través de otras células estromales, y 3) efecto indirecto a través de la remodelación de la ECM. En todos estos mecanismos participan las EVs, factores solubles liberados, así como la interacción célula-célula. Es así que, para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra CAFs, se deberían considerar enfoques combinados, dirigidos sobre estos efectos directos e indirectos [81].

8. Cáncer de Tiroides

8.1. Clasificación y epidemiología

La glándula tiroides presenta dos lóbulos encapsulados conectados entre sí por un istmo. Su unidad funcional se denomina folículo tiroideo, los que se constituyen de una capa simple de células epiteliales foliculares, recubiertas por una membrana basal, rodeando una cavidad central o lumen [82]. El cáncer de tiroides es la enfermedad maligna del sistema endocrino más frecuente, con mayor prevalencia en mujeres, y se origina, principalmente, en las células foliculares del tejido tiroideo (95% del total de casos). Estas pueden dar lugar a cuatro tipos de tumores, el carcinoma papilar tiroideo (PTC, por sus siglas en inglés), que es el más frecuente (más del 80% del total de casos); el carcinoma folicular tiroideo (FTC, por sus siglas en inglés) (10-15% del total de casos); el carcinoma tiroideo pobremente diferenciado (PDTC, por sus siglas en inglés) (3,5% del total de casos) y el carcinoma anaplásico tiroideo (ATC, por sus siglas en inglés) (1-2% del total de casos) (Fig. 11). Tanto el PTC como el FTC son clasificados como carcinomas tiroideos diferenciados (DTC, por sus siglas en inglés). El PTC, aunque presenta el mejor pronóstico, podría exhibir un comportamiento agresivo, con metástasis que afectan principalmente a los ganglios linfáticos cervicales y en menor medida los pulmones. Los FTC y PDTC podrían presentar, más comúnmente, metástasis en zonas distantes, especialmente en pulmones y huesos. El ATC, clasificado como carcinoma tiroideo indiferenciado, aunque tiene una muy baja incidencia, presenta un crecimiento rápido, alta agresividad, letalidad y resistencia al tratamiento oncológico. Las metástasis se producen tanto a nivel local como a distancia, afectando en mayor medida a pulmones, seguido de huesos y cerebro. Este tipo de carcinoma podría progresar secuencialmente tanto a partir de DTC como PDTC y, a su vez, coexistir con quien le da origen, sin embargo, también podría aparecer de *novo*. El tratamiento actual de los DTC consiste en la extirpación (parcial o total) de la glándula, con o sin vaciamiento ganglionar cervical, seguida de ablación del tejido remanente y posibles metástasis, con yodo radiactivo, y terapia de sustitución con hormonas tiroideas (levotiroxina). Este ha demostrado ser eficaz, con tasas del 90-98% de supervivencia en 5-10 años. Sin embargo, un pequeño porcentaje de pacientes con DTC podrían manifestar un comportamiento agresivo que no puede ser controlado por la terapia convencional. Además, el ATC presenta una tasa de supervivencia muy corta, de 3 a 6 meses, y la terapia estándar suele resultar ineficaz [83, 84]. La incidencia del cáncer de tiroides ha venido aumentando continuamente desde la década de 1980, y se proyecta que para

el año 2030 ocupará el cuarto puesto en incidencia entre los tipos de neoplasias más comunes, luego del cáncer de mama, próstata y pulmón/bronquios [85]. Sin embargo, Siegel y col. [86] reporta una aparente estabilización de la incidencia en el cáncer de tiroides, a partir de 2015. Estas tendencias fueron analizadas también por Kitahara y Sosa quienes afirmaron que, en la actualidad, existe una tendencia real al aumento en la detección de PTCs más grandes y avanzados, lo cual se muestra acompañado por un aumento significativo en la mortalidad por cáncer de tiroides [87, 88].

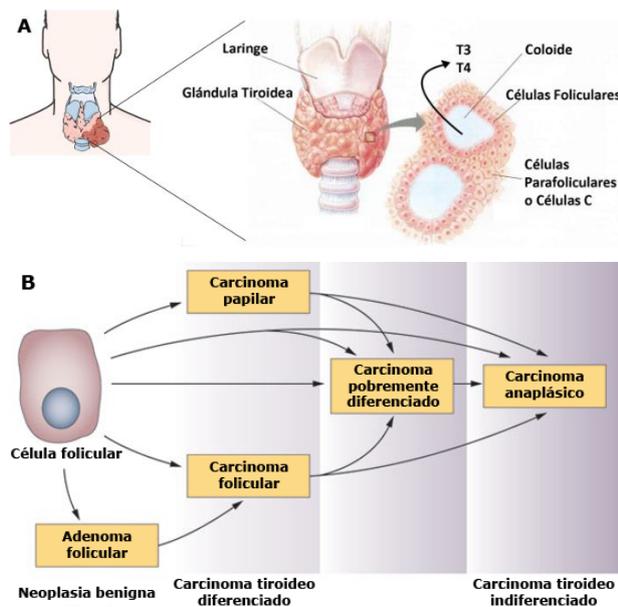


Figura 11. Estructura de la glándula tiroides y clasificación simplificada de carcinomas foliculares. (A) La glándula tiroides es un órgano en forma de mariposa. Presenta dos lóbulos compuestos por folículos relativamente esféricos (de 50 a 500 μm) revestidos por una única capa de células foliculares epiteliales que albergan el material coloide. Las células parafoliculares o células C, productoras de calcitonina, se encuentran en la unión de ambos lóbulos tiroideos, y están situadas dentro de los folículos o en una localización parafolicular. Las principales funciones de la tiroides son la síntesis, el almacenamiento y la secreción de hormonas tiroideas, triiodotironina (T3) y tetraiodotironina (T4), bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis con retroalimentación negativa ejercido por las hormonas tiroideas. **(B)** Esquema de desdiferenciación por etapas del cáncer de tiroides derivado de células foliculares. Representación esquemática adaptada de Nikiforov y Nikiforova (2011) [90].

8.2. Genética del tumor en PTC y ATC

Alteraciones genéticas, debido a mutaciones puntuales o rearrreglos cromosomales, promueven la actividad de oncogenes, así como la pérdida de actividad de genes supresores tumorales, y fomentan la tumorigénesis. Particularmente en DTC, la vía MAPK (RTK→RAS→RAF→MEK→ERK) se activa constitutivamente a través de mutaciones puntuales en BRAF y RAS o, a través de fusiones cromosómicas de receptores tirosinas quinasas incluyendo los genes RET o NTRK1 [82]. Alrededor de un 60% y un 10-15% de PTCs presentan alteraciones en BRAF y RAS, respectivamente. Las mutaciones en BRAF confieren una fuerte activación en ERK (estimulación crónica de la vía MAPK) mientras que las mutaciones en RAS proporcionan una activación más débil de ERK, pero permiten la activación de otros efectores relevantes como ser PI3K [89]. La mutación BRAF más prevalente (90% del total) es la BRAF^{V600E} y es considerada un marcador de mal pronóstico para el PTC ya que se asocia con características tumorales más agresivas como extensión extratiroidea, estadio avanzado del tumor y mayor prevalencia de metástasis a ganglio linfático o a distancia [90]. Además, la mutación BRAF^{V600E} es útil como predictor de fracaso al tratamiento convencional con yodo radioactivo y recidiva tumoral (incluso en pacientes con PTC de bajo riesgo) [91]. Por otro lado, la familia de protooncogenes RAS, implicados en la tumorigénesis, incluye HRAS, KRAS y NRAS. Estos codifican para proteínas G monoméricas que están situadas en la superficie interna de la

membrana plasmática y participan en la propagación de señales procedentes de la activación de receptores tirosina kinasa de membrana y receptores acoplados a proteína G triméricas, a través de la activación dual de la señalización de MAPK y de PI3K/AKT. Las proteínas RAS tienen actividad GTPasa; en su estado activo se unen a GTP y para su inactivación hidrolizan el GTP dando GDP finalizando la señalización. La mayoría de las mutaciones puntuales en RAS causan la pérdida de la actividad GTPasa, permaneciendo constitutivamente activa. Dado que las mutaciones en RAS son más prevalentes en PDTCs y ATCs en comparación con DTCs, podrían estar implicadas en el fenómeno de progresión tumoral tiroidea, correlacionándose con desdiferenciación tumoral y mal pronóstico [82, 92]. Además, en el FTC y el PTC se demostró correlación positiva entre mutaciones RAS y el desarrollo de metástasis, especialmente en hueso [93]. No obstante, dado que las mutaciones de RAS también se encuentran en lesiones benignas, estas no deberían ser utilizadas universalmente como marcadores pronóstico para tumores tiroideos [94]. Por último, el protooncogén RET, codifica un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa y normalmente no se expresa en células foliculares. Los oncogenes quiméricos, designados como RET/PTC, están implicados en el desarrollo del PTC [95]. RET/PTC carece de péptido señal y de dominio transmembrana, por lo que se expresa en el citoplasma de células foliculares bajo el control de promotores adquiridos. La dimerización constitutiva de la proteína de fusión, conduce a la fosforilación de tirosinas independiente de ligando y clásicamente estas oncoproteínas activan las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT [82].

Para el caso de ATC, se conoce que mutaciones con pérdida de función del gen supresor tumoral TP53, que interviene en la reparación del DNA, son eventos cruciales para impulsar la progresión de tumores tiroideos indolentes hacia tumores letales como de este tipo, ya que estas mutaciones están restringidas a tumores agresivos, presentándose en el 67-88% de los mismos. Mutaciones en BRAF están presentes en el 35% de los ATC [96].

8.3. CAFs en PTC y ATC

Las evidencias indican que el desarrollo y la progresión del tumor, no sólo dependen de la activación de oncogenes o la pérdida de actividad en genes supresores de tumores, sino que la interacción de las células tumorales con el TME resulta ser mandatoria [2]. Los CAFs son uno de los componentes celulares más importantes del TME de la mayoría de los tumores sólidos, incluyendo el cáncer de tiroides [8]. Los Fb en el TME son reprogramados por el tumor adquiriendo un estado activado y en carcinomas tiroideos se encontraron anormalmente incrementados con respecto a tejido normal [97]. El primer estudio que reportó el rol del estroma, en carcinoma tiroideo, fue realizado utilizando un modelo de tumor de rata y se pudo demostrar la participación de los Fb en la promoción del crecimiento de células de carcinoma tiroideo tanto *in vivo* como *in vitro* [98]. Específicamente, en un modelo experimental de PTC progresivo, inducido por la expresión del oncogén BRAF^{V600E}, se demostró que el reclutamiento de Fb, el depósito de colágeno I y la remodelación de la ECM, en el entorno del tumor, son características claves para su progresión [99]. Además, en PTC, la presencia de CAFs α -SMA+ fue considerado un marcador predictivo de metástasis en ganglios linfáticos locales [100]. En la misma línea de evidencia, nuestro laboratorio reportó que Fb cultivados *in vitro* adquirieron un fenotipo de CAFs luego de estar en contacto con factores solubles de medios condicionados

(CMs, por sus siglas en inglés) secretados por células de ATC (8505c). Estos CAFs adquirieron propiedades proliferativas mejoradas con respecto a Fb controles, y además CMs de estos CAFs promovieron la proliferación e invasión de una línea celular de carcinoma folicular de tiroides [101]. En PTC, Minna y col. [102] describieron una expresión enriquecida de α SMA en tejidos tiroideos tumorales, como indicativo de CAFs. Aunque este patrón de expresión positivo fue heterogéneo entre las muestras tumorales, es decir, no se encontraron claras asociaciones entre CAFs y un tipo particular de carcinoma, es importante destacar que la mayor expresión de α SMA se detectó en el frente invasivo del tumor. De la misma manera, un modelo de PTC murino que presenta la expresión del oncogén BRAF^{V600E}, mostró un incremento en la infiltración de Fb en el tejido tumoral comparado con el tejido normal [103]. La evidencia acumulada acerca de las funciones pro-tumorigénicas ejercidas por los CAFs en PTC, resalta la importancia de considerar como objetivos terapéuticos interesantes a los mecanismos a partir de los cuales estas células se activan, o gracias a los que, una vez activados, ejercen su función sobre el tumor. Sin embargo, todavía es necesario una profundización acerca de las vías de señalización involucradas en la reprogramación fenotípica de Fb tiroideos a CAFs, así como en indagar si la secreción de las señales paracrinas necesarias para su activación son secretadas también por otras células del TME, además de las propias células tumorales [97].

8.4. EVs en cáncer de tiroides

Las EVs presentes en el TME participan en la progresión tumoral dado su rol en proliferación, EMT, migración y metástasis, angiogénesis y regulación del sistema inmune (Fig. 12). En patología tiroidea, la principal biomolécula estudiada como cargo en las EVs fueron los miRNA [104]. En este sentido, recientemente se describió que EVs provenientes de pacientes con PTC presentan un aumento en la expresión de miR-146b-5p y miR-222-3p, lo que se correlacionó con metástasis ganglionares en los pacientes, y el aumento de la migración e invasión de líneas celulares de PTC (K1 y BCPAP) [105]. De la misma manera, la sobreexpresión de miR-423-5p en EVs provenientes de una línea celular de PTC (TPC-1) promueve la migración e invasión de células de PTC (TPC-1 y KTC-1) *in vitro* [106]. La EMT constituye una fase temprana de la metástasis tumoral que se caracteriza por la reducción de la adhesión y un aumento en la motilidad de las células epiteliales tumorales. Estas adquieren un comportamiento caracterizado por la disminución en la expresión de proteínas que indican un fenotipo epitelial y el aumento de otras asociadas a características mesenquimales [107]. Además, se pudo demostrar que miR-145 actúa como supresor del crecimiento del tumor tiroideo. En este sentido, la sobreexpresión de miR-145 en líneas celulares tiroideas tumorales (TPC-1, FTC-133 y 8505c) disminuyó la secreción de VEGF y la expresión de E-cadherina en estas células, proteínas relacionadas con el proceso de EMT. También se observó una menor proliferación celular, migración e invasión. Dado que la expresión de miR-145 se mostró disminuida en tejido tumoral tiroideo comparado con tejido normal, que los niveles de miR-145 circulante se evidenciaron aumentados en pacientes con cáncer y que EVs provenientes de suero de estos pacientes presentaron miR-145, los autores suponen que esto podría deberse a la excreción de miR-145 por células tumorales, buscando reducir su expresión local y promover su crecimiento y metástasis [108].

Por otro lado, la glándula tiroidea presenta abundante vascularización y el tejido tumoral tiroideo presenta más vasos sanguíneos con respecto al tejido normal [109]. Wu y col. [110] demostraron que EVs obtenidas a partir de líneas celulares hipóxicas de PTC (BCPAP y KTC-1) produjeron un aumento en la angiogénesis de células endoteliales de la vena umbilical humana/HUVEC, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con EVs provenientes de una línea celular tiroidea no-tumoral (NThyOri), o células BCPAP y KTC-1 en normoxia. Además, Zhu y col. [111] demostraron que la exposición de las células NK a la IL-15 da lugar a un aumento de la producción de EVs y potencia efectos inmunoterapéuticos de las EVs contra varios cánceres humanos, incluido el ATC. Por último, aunque la relevancia del *crossstalk* entre células de carcinoma tiroideo y CAFs ha sido revelado por varios autores, el rol de las EVs en dicha interacción requiere mayor investigación [112].

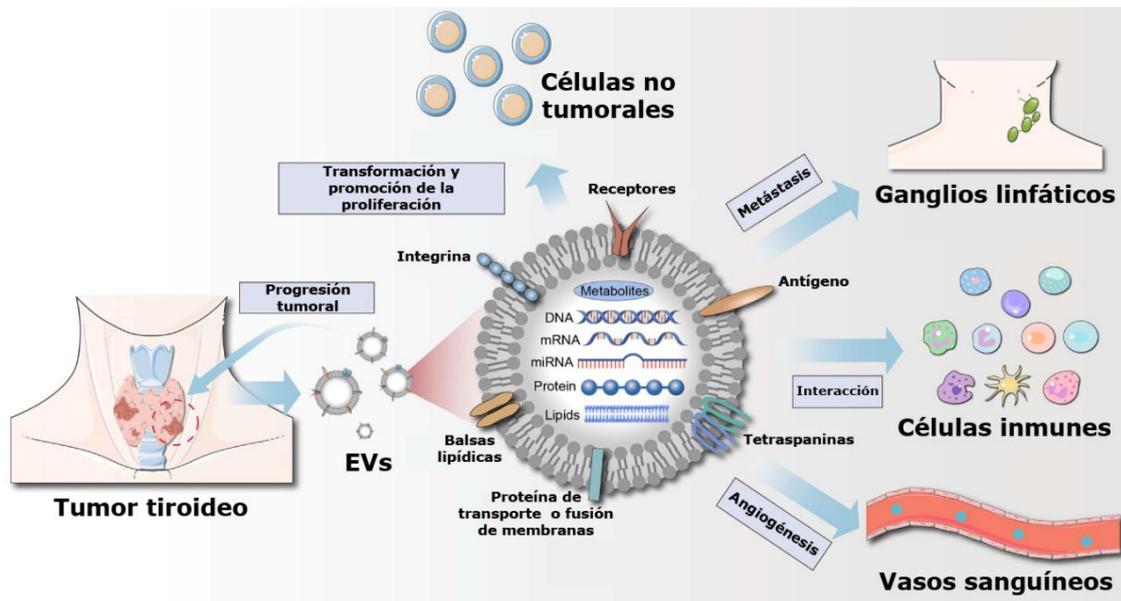


Figura 12 Rol de las EVs derivadas del tumor tiroideo en la progresión del cáncer. Las EVs actúan sobre las propias células tumorales, regulando la angiogénesis, induciendo la inmunosupresión y remodelando el TME para lograr el crecimiento del tumor y la metástasis. Además, estas EVs secretadas por células tumorales tiroideas también podrían promover la transformación oncogénica de células normales. Representación esquemática adaptada de Feng y col. (2020) [107].

9. Biopsia líquida y biomarcadores en cáncer

La técnica diagnóstica *gold standard* en la detección de un tumor es la biopsia, que consiste en la obtención de una muestra de tejido del presunto tumor primario, así como de posibles sitios de metástasis, que son estudiados mediante análisis histológicos y, actualmente, en ciertos tipos de tumor, mediante análisis molecular como ayuda para la toma de decisiones [113, 114]. Sin embargo, es ampliamente conocido que los tumores son muy dinámicos, cambian rápidamente su patrón mutacional dominante o adquieren nuevas mutaciones, especialmente después de la presión selectiva ejercida mediante un tratamiento con drogas. Además, este procedimiento presenta numerosas desventajas: lo invasivo que resulta, su riesgo e inaccesibilidad en ciertos tipos de tumor lo que desemboca en la obtención de cantidades insuficientes de muestra, los falsos positivos e indeterminaciones, su costo, la posibilidad de que

una sola muestra del tumor no represente la heterogeneidad del mismo y, finalmente, que brinda información de un determinado momento en el tiempo [115].

La progresión del cáncer hacia estadios avanzados, sin la aparición de síntomas, es una de las razones para que esta patología se encuentre entre las principales causas de muerte en todo el mundo. En este sentido, el desarrollo de pruebas diagnósticas eficaces que identifiquen “individuos asintomáticos” junto a la detección temprana de la enfermedad, constituiría uno de los principales avances contra esta enfermedad dado que, de esa manera, los tratamientos existentes resultan más exitosos. Por todo esto es que comenzó a considerarse un enfoque emergente, conocido como biopsia líquida, que es el análisis en tiempo real de las células del tumor primario, sus metástasis, o los productos de éstas, encontrados o liberados en la sangre u otros fluidos corporales. La biopsia líquida permite el desarrollo de nuevos métodos que facilitan una detección temprana del tumor, el seguimiento de la eficacia del tratamiento elegido, el pronóstico y monitoreo personalizado del paciente, la detección de mecanismos de resistencia a drogas que permitan adaptar la terapia a necesidades específicas de cada paciente y la estimación del riesgo de recaída [116]. Entre las diferentes plataformas en biopsia líquida se pueden mencionar, las células tumorales circulantes (CTCs, por sus siglas en inglés), el DNA libre de células (cfDNA, por sus siglas en inglés), el RNA libre de células (cfRNA, por sus siglas en inglés), las plaquetas educadas por el tumor (TEPs, por sus siglas en inglés) y las EVs. A grandes rasgos, las CTCs presentan el problema de que su presencia es muy baja (requiriéndose métodos de alta sensibilidad para su identificación y aislamiento) y que, dada su fragilidad, requiere que las muestras sean rápidamente procesadas sin posibilidad de almacenamiento y conservación. Los cfDNA y cfRNA, que se originan a partir de células en apoptosis o necrosis, presentan como principal desventaja su corta vida media en circulación. Las TEPs son componentes de la sangre, donde podrían analizarse diferentes tipos de RNA o perfiles proteicos, pero su principal limitación reside en que sus características y número podrían verse alterados por ciertas terapias. Aunque la mayoría de los esfuerzos en este campo incluyeron cfDNA y CTCs, las EVs surgieron como una plataforma con amplia potencialidad y han cobrado interés en la investigación de biomarcadores, dada su funcionalidad como parte de la enfermedad, siendo fiel “reflejo” del desarrollo del tumor, presentando “pistas” de su origen específico de tejido. Además, estas se presentan en una enorme cantidad en los fluidos, permiten el estudio de las diversas macromoléculas que cargan, son notablemente estables y pueden almacenarse en biobancos. Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas, el uso de EVs como biomarcadores también enfrenta retos, principalmente relacionados a su aislamiento, rendimiento y pureza, dado que en fluidos complejos, como por ejemplo sangre, representan una minoría con respecto a otros componentes presentes en la misma (Fig. 13) [115, 116]. Actualmente, se piensa que la combinación de enfoques o modalidades podrían convertirse en un futuro en las herramientas rápidas, fiables, dinámicas, no invasivas y de bajo costo que se buscan [117].

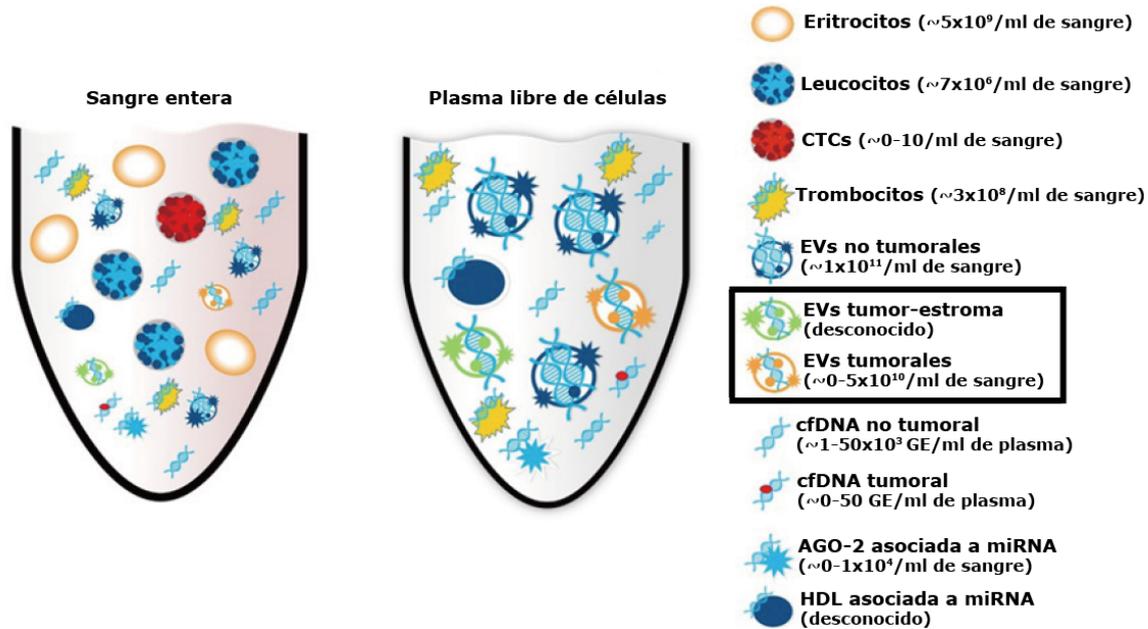


Figura 13. Fluidos biológicos, como la sangre, presentan EVs provenientes del TME. Las EVs obtenidas de fluidos biológicos de pacientes oncológicos, y su cargo característico, funcionarían como un “retrato en tiempo real” de la situación oncológica del paciente. En los fluidos biológicos del paciente con cáncer se encuentran, entre sus diversos componentes, las EVs provenientes de diversas células del organismo, junto a EVs provenientes de células tumorales. Además, se reconoce la presencia de EVs provenientes de las células del estroma tumoral, mencionadas como EVs tumor-estroma en la figura, las que reflejarían el estado fisiopatológico de sus células productoras, dada la comunicación intercelular en el TME. Uno de los principales desafíos lo constituye su aislamiento a partir del resto de los componentes de la muestra biológica, y la caracterización de biomarcadores específicos que permitan su utilización en el diagnóstico y seguimiento del paciente oncológico. GE, equivalentes genómicos. Representación esquemática adaptada de Brock y col. (2015) [115].

9.1. EVs como biomarcadores en cáncer de tiroides

En el diagnóstico de cáncer de tiroides, existen dos importantes problemas [118]:

1. La distinción entre nódulos tiroideos benignos y funcionales, y malignos, principalmente no funcionales. Los nódulos funcionales son raramente malignos, por lo cual la evaluación diagnóstica inicial incluye la medida de la cantidad de hormona estimulante de la tiroides (TSH, por sus siglas en inglés) en suero que permitiría diferenciar entre nódulos funcionales y no funcionales. Si el examen inicial sugiere la presencia de un nódulo no funcional, con características ecográficas sospechosas, debería realizarse una biopsia por aspiración con aguja fina guiada por ecografía, técnica *gold standard* de diagnóstico diferencial actual. Sin embargo, los resultados de este enfoque a menudo no son concluyentes y tiene limitaciones en cuanto a la discriminación de las diferentes patologías tumorales foliculares, pudiendo dar lugar a un sobrediagnóstico y/o tratamiento excesivo.

2. Identificación de extensión extratiroidea del tumor, que afecta a ganglios linfáticos cervicales. Hasta el 50% de los pacientes con PTC presentan metástasis en ganglios linfáticos cervicales, sin embargo, la ecografía de cuello preoperatoria identifica sólo la mitad de los que luego se encuentran durante la cirugía, complicando la toma de decisiones. En este sentido, la disponibilidad de un biomarcador circulante validado para distinguir PTC localizados en tiroides de aquellos con metástasis a ganglios linfáticos (T+N+), que se utilice como técnica

complementaria, permitiría planificar con antelación una cirugía localizada frente a una cirugía que incluya linfadenectomía.

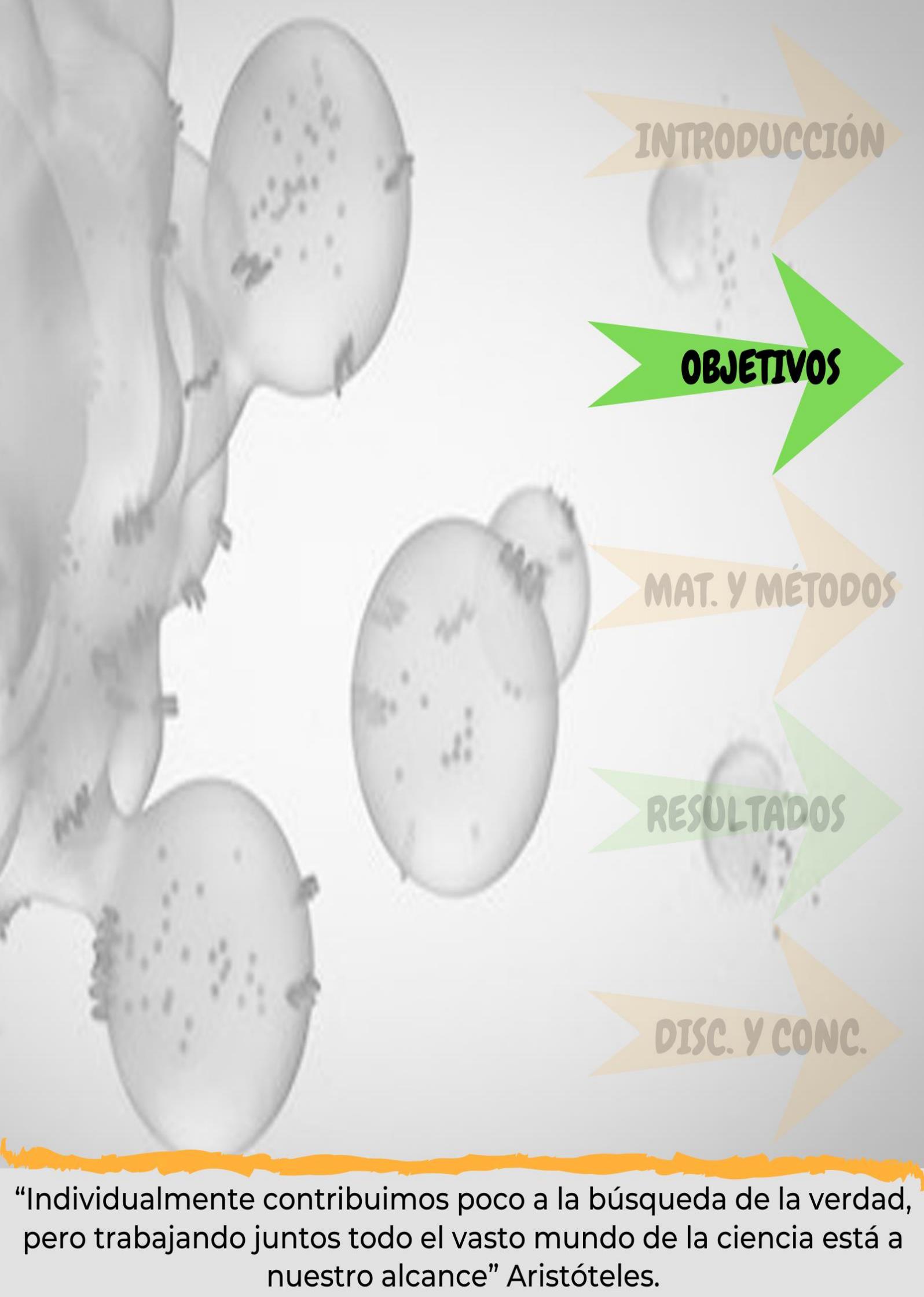
Es por las razones anteriores que la biopsia líquida tiene un gran potencial en el abordaje clínico del paciente con cáncer de tiroides. Existe bibliografía que defiende el uso de EVs por sobre otras plataformas, incluso más estudiadas, como cfDNA y CTCs, argumentando que muestran superioridad en sensibilidad, especificidad y estabilidad [116]. Además, se conoce que sólo las EVs, con respecto a cfDNA y CTCs, tienen la capacidad de representar también a los cambios del estroma, de la interacción tumor-estroma, respuestas inflamatorias y otros cambios sistémicos [115]. Como ya se comentó previamente, miR-146b-5p y el miR-222-3p proveniente de EVs obtenidas de plasma de pacientes con cáncer de tiroides, podrían servir como potenciales biomarcadores de metástasis ganglionar en pacientes con PTC [105]. En la misma línea, Dai y col. [119] observaron que la alta expresión de miR-485-3p en exosomas de plasma de pacientes con PTC se correlacionó con la mutación BRAF, el tamaño del tumor, extensión extratiroidea y metástasis en ganglios linfáticos, y un estadio clínico avanzado de la enfermedad. También, miR-21-5p se encontró elevado en exosomas obtenidos de suero de pacientes con PTC [110]. Por otro lado, son muy limitados los estudios tendientes a la búsqueda y/o caracterización de proteínas como biomarcadores en EVs y cáncer tiroideo. Un trabajo realizado en EVs provenientes de suero de pacientes con PTC y metástasis en ganglios linfáticos demostró la sobreexpresión de proteínas asociadas con EMT y metástasis (SRC, TLN1, ITGB2 y CAPN1) [120]. Por su parte, Caruso Bavisotto y col. [121] descubrieron que los niveles de HSP27, HSP60 y HSP90 en EVs de pacientes con PTC, se encontraban elevados antes de la cirugía con respecto a los niveles obtenidos en el mismo paciente luego de ésta, y también con respecto a pacientes con bocio benigno, sugiriendo su potencial uso como biomarcadores. La base de datos de ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov), recoge actualmente 18 trabajos que utilizan EVs como biomarcadores en diversos tipos de cáncer.

10. Antecedentes del modelo

La capacidad de las células tumorales para migrar e invadir tejidos circundantes y llegar a órganos distantes es uno de los *hallmarks* del cáncer, con cambios en el reordenamiento del citoesqueleto celular, que involucra estructuras dinámicas de actina como fibras de estrés, filopodios y lamelipodios, dispuestas por las células para poder moverse en su entorno [122]. En relación a este tema, antecedentes vinculados con este trabajo evidenciaron el rol del Fb y su comunicación con células tumorales tiroideas en la inducción de un fenotipo migratorio en las células tumorales tiroideas [123]. La organización de filopodios y lamelipodios, se evidenció como un indicador del fenotipo migratorio de las células en cultivo, y se analizó mediante inmunofluorescencia utilizando faloidina conjugada con rodamina. Específicamente, células tumorales tiroideas TPC-1, 8505c y células no tumorales tiroideas (NThyOri), fueron estimuladas con los CMs obtenidos de Fb, células tiroideas aisladas y de los co-cultivos de Fb y células TPC-1, Fb y células 8505c y Fb y células NThyOri, respectivamente. Factores solubles presentes en los CMs de Fb o de los co-cultivos de Fb con células tumorales tiroideas aumentaron el número de células tumorales tiroideas TPC-1 y 8505c con filopodios y lamelipodios. Este cambio en el fenotipo no se evidenció, sin embargo, utilizando células no tumorales tiroideas en los cultivos.

Por otro lado, cuando se analizó la capacidad migratoria de células TPC-1, 8505c y NThyOri, incubadas con CMs provenientes de estas células aisladas y co-cultivadas con Fb, se evidenció que factores presentes en los CMs de Fb y Fb co-cultivados con 8505c promovieron la migración 2D de células 8505c, con respecto al control. Sin embargo, células TPC-1 y NThyOri no evidenciaron cambios significativos en su motilidad respecto a la migración basal, en ninguna de las condiciones ensayadas [123]. En línea con esto, Salvatore y col. [124] demostraron que células malignas de osteosarcoma alteran su morfología luego de ser co-cultivadas con Fb, dando lugar a la polarización del citoesqueleto y a la formación de protuberancias celulares. Estos autores también describieron un aumento gradual en la migración celular en estos co-cultivos, en respuesta a señales paracrinamente secretadas por el Fb. Por otro lado, Das y col. [125], demostraron, en células de cáncer de mama, que MMP2 desencadena una vía de señalización que resulta en la polimerización de la actina y, por lo tanto, induce la migración celular.

El estudio del TME en cáncer de tiroides es un campo relativamente nuevo y, a pesar de que existen estudios que enfatizan y apoyan el rol protagónico del Fb en la progresión tumoral tiroidea, las evidencias que relacionan la comunicación bidireccional entre Fb y células tumorales tiroideas, con la secreción de EVs y su carga, fueron poco exploradas. Además, no existen estudios que profundicen en el impacto de EVs, provenientes de esta interacción, en la expresión y eventual modulación de proteínas relacionadas con la promoción de la invasión y diseminación tumoral. El esclarecimiento de estos procesos resultará de gran interés fisiopatológico, brindando fundamentos para la comprensión de la etiopatogenia del cáncer de tiroides, alternativas para el desarrollo de futuras modalidades terapéuticas y permitirá la detección de potenciales biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con cáncer.



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MAT. Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISC. Y CONC.

“Individualmente contribuimos poco a la búsqueda de la verdad, pero trabajando juntos todo el vasto mundo de la ciencia está a nuestro alcance” Aristóteles.

HIPÓTESIS

La interacción de células tumorales tiroideas con Fb promovería un perfil de EVs de calidad diferente, que impactaría en su comunicación con componentes del TME y posibilitaría su utilización en la búsqueda de potenciales biomarcadores diagnóstico, pronóstico o de progresión de la enfermedad.

OBJETIVOS

Evaluar el rol que desempeña la interacción tumor-estroma en la modulación de mecanismos celulares y bioquímicos comprometidos en la progresión tumoral tiroidea.

Para ello se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Caracterizar la producción y liberación de EVs por células tiroideas, tumorales y no tumorales, aisladas y co-cultivadas con Fb normales, desde un abordaje morfológico, cuantitativo y bioquímico.
- 2.** Analizar la expresión diferencial de proteínas en EVs obtenidas del cultivo de células aisladas y co-cultivadas con Fb **(2a)**. Identificar los procesos biológicos, componentes celulares y/o funciones moleculares en las que se encuentran implicadas **(2b)**.
- 3.** Analizar el impacto de EVs provenientes del cultivo de células tiroideas tumorales y no tumorales aisladas o co-cultivadas con Fb, sobre el fenotipo de Fb y células no tumorales tiroideas **(3a)**. Caracterizar la expresión, perfil de glicosilación o fracciones proteolíticas de CD147 en EVs provenientes de células aisladas y co-cultivadas **(3b)**.
- 4.** Evaluar la captación o asociación de EVs en Fb y células tumorales tiroideas.



INTRODUCCION

OBJETIVOS

MAT. Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISC. Y CONC.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad” Albert Einstein.

1. Células y condiciones de cultivo

1.1. Líneas celulares y mantenimiento

La línea celular humana TPC-1 derivada de carcinoma papilar tiroideo (rearreglo RET/PTC3) fue adquirida a partir del repositorio de líneas celulares de cáncer de tiroides (administrado por la Dra. Rebecca E. Schweppe) del banco de células del centro de cáncer de la Universidad de Colorado (EEUU) [126]. La línea celular humana 8505c derivada de carcinoma anaplásico tiroideo (BRAF^{V600E} positiva) y la línea celular tiroidea humana no tumoral NThyOri 3-1 fueron donadas generosamente por la Dra. Pilar Santisteban (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid, España). Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM con alto contenido en glucosa (HG-DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) o, para el caso de NThyOri 3-1, en medio RPMI 1640 (Gibco; Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.) suplementados con un 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Natocor, Córdoba, Argentina), 2 µmol/ml de glutamina y la combinación de antibióticos (Penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 0,1 mg/ml (Gibco). Los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a 37°C. Las células se sub-cultivaron al llegar a un 70-80% de confluencia, a razón 1:8 en placas de cultivo de 10cm o en placas de 6 o 24 pocillos múltiples, según el esquema experimental. Todas las líneas celulares se utilizaron antes del pasaje número 20. La criopreservación de los cultivos celulares fue efectuada en vapor de nitrógeno líquido en una solución conteniendo 90% de SFB y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las líneas celulares NThyOri 3-1 y 8505c se autenticaron utilizando el kit PowerPlex Fusion System (Promega) para la genotipificación en el Centro de Excelencia en Procesos y Productos de Córdoba (Córdoba, Argentina).

1.2. Obtención de Fb normales

Como células representativas del estroma, se utilizaron fibroblastos normales provenientes de biopsias de piel obtenidas de mamoplastías de reducción y/o de dermolipsectomías abdominales de voluntarios sanos anónimos. El protocolo de obtención de las muestras fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Los Fb se obtuvieron siguiendo los lineamientos establecidos por Carlo Besta [127]. Para ello, las biopsias obtenidas se lavan en buffer fosfato salino (PBS), removiéndose el tejido adiposo y subcutáneo remanente. A continuación, se cortan en pequeños fragmentos, que se enjuagan con PBS y transfieren a una placa de cultivo previamente incubada con SFB por 30min a 37°C. Se deja adherir el tejido al soporte eliminando el líquido remanente cuidadosamente, en forma mecánica y por evaporación, evitando secar completamente la placa para no dañar el tejido. Los explantos se incuban en medio de crecimiento de fibroblastos (HG-DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU., suplementado con SFB 20% (Gibco), a razón de 1-1,5ml por placa de 6cm de diámetro), en condiciones de esterilidad y en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a 37°C. Luego de 2-3 días de incubación, el medio de cultivo de los explantos es reemplazado cada 48-72hs. Una vez que los fibroblastos se desprenden del tejido y alcanzan una confluencia del 50-60% de crecimiento adheridos a la placa, son expandidos y criopreservados de manera convencional.

1.3. Co-cultivos de células tiroideas tumorales o no tumorales con Fb

Para el desarrollo del trabajo experimental se llevaron a cabo co-cultivos entre células tiroideas tumorales o no tumorales con Fb, como un modelo *in vitro* de interacción célula tumoral-estroma. Para ello, las diferentes células se lavaron con PBS e incubaron con una solución de tripsina (Gibco) al 0,05% (Fb) o 0,025% (TPC-1, 8505c y NThyOri) para desprenderlas de la superficie y poder transferirlas. El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer. Para el estudio de la interacción célula tumoral-estroma se utilizaron dos estrategias de cultivo diferentes, co-cultivos en placas tradicionales (cultivo contacto-dependiente) y co-cultivos en placas *transwell* (cultivo contacto-independiente), utilizando como control el cultivo de las células aisladas, así como el co-cultivo de la célula tiroidea no tumoral con el Fb.

1.3.1. Estrategia de co-cultivo en placas tradicionales

Para la realización del modelo *in vitro* de interacción contacto-dependiente, Fb (600.000 células) y células tumorales tiroideas humanas (TPC-1 o 8505c) o células no tumorales (NThyOri) (600.000 células), se siembran y colocan juntas, en una relación 1:1, en placas de 10 cm de diámetro. Las expresiones "Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri" se utilizan a lo largo de este trabajo para indicar el co-cultivo contacto-dependiente del Fb con cualquiera de las líneas celulares tiroideas indicadas. Además, cultivos aislados de Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri se sembraron y utilizaron como controles, utilizando el mismo número de células que en los correspondientes co-cultivos [123]. Los co-cultivos son incubados en un medio suplementado con 10% de SFB durante 72hs (10ml/placa). Luego de esta primera incubación, las monocapas se lavaron con PBS, a fin de eliminar restos de SFB, y se incubaron con medio de cultivo libre de SFB (9ml/placa) durante 48 horas. Luego de esta incubación, los sobrenadantes del cultivo se recogen y se conservan a 4°C para la obtención de EVs (sección 2.1) o a -80°C para la realización de zimografías (sección 5.3). Éstos sobrenadantes son mencionados como CMs a lo largo de este trabajo.

1.3.2. Estrategia de co-cultivo en placas *transwell*

Para la realización de co-cultivos contacto-independiente, los Fb (100.000 células) o las células TPC-1 (40.000 células) se sembraron en la cámara inferior de un sistema *transwell* de 6 pocillos (Transwell Corning-Costar), en HG-DMEM (2ml/pocillo) suplementado con 10% de SFB durante 2hs, hasta lograr la adherencia de las células al fondo de la placa. Posteriormente, se colocaron los insertos del *transwell* (24 mm de diámetro) y se sembraron en ellos a las células aisladas Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri (40.000 células) o a los co-cultivos contacto-dependiente Fb-TPC-1, Fb-8505c o Fb-NThyOri (40.000 células + 40.000 células). Éstos insertos presentan una membrana de poliéster con poros de 0,4 μm , que no permite el paso de células de una cámara a la otra durante el ensayo. Las condiciones de cultivo fueron las utilizadas anteriormente; un período inicial de 72hs, utilizando medio suplementado con 10% de SFB, seguido de un período de 48hs con medio libre de SFB. Entre ambos períodos, las células se lavaron con PBS, a fin de eliminar restos de SFB. A tiempo final de cultivo, se

recogen los CMs de la cámara inferior del *transwell* (TW-CMs) y se conservan a -80°C hasta la realización de las zimografías, según se explica más adelante (sección 6.2.1).

2. Aislamiento y caracterización de EVs

2.1. Obtención de EVs

Las EVs se aislaron de los CMs, obtenidos a partir del mismo número de células finales después del cultivo [128], tanto de células aisladas como co-cultivadas de forma contacto-dependiente. Se probaron tres protocolos de aislamiento de EVs, que consisten básicamente en centrifugación diferencial y filtración, descritos anteriormente en la literatura y con ligeras modificaciones [129]. Los tres protocolos comparten dos pasos de centrifugación iniciales, uno a $300\times g$ durante 10 min a 4°C para eliminar células muertas y *debris* celular, y un segundo paso a $3.000\times g$ durante 20 min a 4°C para obtener el llamado *pellet* 3K. Posteriormente, dependiendo del protocolo utilizado, el sobrenadante remanente de la obtención del *pellet* 3K fue:

1. Protocolo 1: filtrado, utilizando un filtro de $0,22\mu\text{m}$ (Steriflip Millipore) para la obtención de EVs que quedan retenidas en el filtro.
2. Protocolo 2: centrifugado a $20.000\times g$ durante 40min a 4°C (Beckman-coulter ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti Fixed-Angle) para obtener el llamado *pellet* 20K.
3. Protocolo 3: centrifugado a $100.000\times g$ durante 90min a 4°C (Beckman-coulter ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti Fixed-Angle), para obtener el llamado *pellet* 100K y el medio depletado de EVs (DEVs), es decir, libre de todas aquellas EVs que sedimentan a $100.000\times g$. Todos los pasos de centrifugación y ultracentrifugación se llevaron a cabo a 4°C , manteniendo a los CMs en condiciones refrigeradas (Fig. 14). Los *pellets* obtenidos se re-suspendieron en diferentes soluciones según el análisis a realizar, siendo utilizados inmediatamente o conservados a -80°C hasta su utilización.

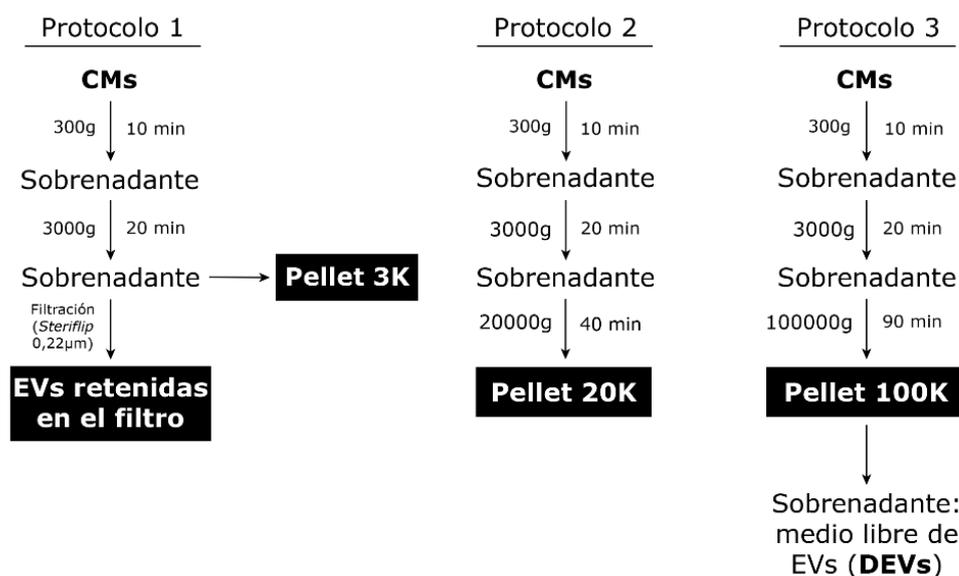


Figura 14. Protocolos de aislamiento de EVs. Representación esquemática de los protocolos utilizados para la puesta a punto del aislamiento de EVs. El protocolo elegido, para ser utilizado a lo largo de todo el trabajo, fue el número 3. CMs: medios condicionados. EVs: vesículas extracelulares. DEVs: medio depletado de EVs que sedimentan a $100.000\times g$.

2.2. Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

2.2.1. TEM en células

Una vez finalizada la incubación, las monocapas de Fb, células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas (sección 1.3.1) se lavaron con PBS, con el fin de eliminar células muertas. Cuidadosamente, utilizando un *scraper* de goma, se levantaron las células, se lavaron una vez más y el *pellet* celular se fijó utilizando una mezcla de 4% p/v de formaldehído y 2% p/v de glutaraldehído en buffer cacodilato 0,1M durante 2hs. Las células fijadas fueron luego centrifugadas y los *pellets* obtenidos se trataron con OsO₄ al 1% p/v durante 1h, antes de ser teñidas en bloque con acetato de uranilo al 1% en buffer acetato 0,1M pH 5,2 durante 20min. Posteriormente, se procedió a la deshidratación de las muestras con una serie graduada de acetonas frías y a su inclusión en resina de araldite. Usando un ultramicrotomo JEOL, con cuchillas con filo de diamante, se cortaron secciones ultrafinas de los preparados incluidos y se tiñeron con acetato de uranilo/citrato de plomo para su correcta visualización y examen, utilizando un microscopio electrónico Zeiss Leo 906-E (Oberkochen, Germany) [130].

2.2.2. TEM en EVs

Los *pellets* 3K, 20K y 100K de EVs, obtenidos utilizando los protocolos mencionados anteriormente (sección 2.1), se examinaron mediante TEM. Para la preparación de las muestras, los *pellets* se re-suspendieron y fijaron en p-formaldehído (PFA) al 4% p/v durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Luego, 5 µL de la preparación de EVs se agregaron y dejaron decantar sobre grillas recubiertas de formvar-carbon y se post-fijaron con una solución al 1% p/v de glutaraldehído. Posteriormente, las grillas se lavaron con agua destilada y visualizaron mediante tinción negativa, utilizando acetato de uranilo (pH 7) al 2% p/v durante 5min, seguido de metil celulosa al 2% p/v durante 10min en hielo. Una vez removido el excedente de fluido y luego del secado de las grillas, se procedió a la observación y adquisición de imágenes mediante la utilización de un microscopio electrónico Zeiss Leo 906-E (Oberkochen, Germany) [131]. Las microfotografías obtenidas de cada una de las muestras de EVs, se utilizaron para realizar un análisis morfométrico [52], mediante el uso del *software* ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Todas las EVs presentes en cada imagen se midieron mediante el *software* y se clasificaron, obteniéndose el porcentaje de EVs que presenta un tamaño entre 20-200nm y >200nm. Se analizaron un total de 18 campos provenientes de cada muestra a partir de dos experimentos independientes (n=2).

2.2.3. Inmunomarcación en EVs

El *pellet* 100K de EVs (sección 2.1), fue utilizado para estudiar mediante inmunomarcación (*immunogold labelling*) la presencia de CD147 en la superficie de las EVs. Para esto, las EVs se procesaron como se indica en la sección 2.2.2 y antes de exponerlas a las soluciones para la tinción negativa se llevó a cabo la inmunomarcación con anticuerpos específicos. Básicamente, las EVs fijadas y adsorbidas sobre grillas recubiertas de formvar-carbon se transfirieron a una gota de solución de bloqueo de albúmina sérica bovina al 5% durante 5-10 min a TA. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo (Ab, por sus siglas en inglés)

primario anti-CD147 de ratón (dilución 1:25; Affimetrix, eBioscience, USA), durante 1h a TA. Luego de sucesivos lavados, se pusieron en contacto con el Ab secundario IgG anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal de 15nm (1:30; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) durante 1h a TA. Finalmente, las EVs se contrastaron por tinción negativa y visualizaron, siguiendo el mismo procedimiento mencionado en la sección 2.2.2. Las técnicas de TEM, se realizaron en colaboración con las Dras. Carolina Leimgruber y Ana De Paul del Centro de Microscopía Electrónica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA-CONICET) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

2.3. Caracterización por *Dinamic Light Scattering*

Una de las tecnologías basadas en las medidas de dispersión de la luz para obtener el tamaño de EVs presentes en una muestra, así como su distribución poblacional, se conoce como dispersión dinámica de la luz o *Dinamic Light Scattering* (DLS, por sus siglas en inglés) [132]. Esta consiste en obtener el diámetro hidrodinámico (D) de una partícula en cierto fluido, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H}$$

Donde D es el coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad del fluido y D_H es el diámetro hidrodinámico.

La técnica consiste en irradiar a la suspensión de EVs con un láser, siendo la luz dispersada recolectada por un detector y analizada por un correlacionador. Dicha luz presenta fluctuaciones en la intensidad debida al movimiento browniano de las EVs en suspensión. Las fluctuaciones generadas en la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo son traducidas, por una función de correlación utilizando un *software* específico, a medidas del D de las EVs en suspensión, que es inversamente proporcional al D_H .

Para llevar a cabo esta metodología, el *pellet* 3K de EVs y el obtenido por filtración, mediante el protocolo 1 de la sección 2.1, se resuspendieron en 300ul de PBS y colocaron en el analizador de partículas Nicomp Model CW 380 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA), usando microcubetas de vidrio. El láser usado fue de He-Ne, la longitud de onda (λ) de 632, 8 y su intensidad fue ajustada a ~ 300 MHz. Cada muestra fue corrida 3 veces durante 5 min a TA. El procesamiento y análisis de los datos fue realizado con el *software* CW-380, hasta obtener gráficos de intensidad de dispersión relativa en función del diámetro.

2.4. Caracterización por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Otra tecnología basada en medidas de dispersión de la luz, muy utilizada en la caracterización de EVs, se conoce como análisis de seguimiento de nanopartículas o *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA, por sus siglas en inglés). De igual manera que lo explicado para DLS, esta metodología permite obtener el D_H de las EVs gracias a medidas de dispersión de la luz debido al movimiento browniano de las EVs en suspensión. Sin embargo, a diferencia de aquella, la metodología NTA es cuantitativa y, dado que permite la visualización de las partículas, proporciona información en tiempo real de la muestra analizada [133]. Un microscopio de campo oscuro con una cámara digital científica acoplada, permite realizar un

seguimiento del movimiento de las partículas presentes en la muestra sobre las que incide el haz del láser. Estos videos son posteriormente analizados por el *software* del equipo que, finalmente, arroja gráficos de concentración de partículas en función del diámetro. Para llevar a cabo esta metodología, los *pellets* 100K de EVs obtenidas a partir de los diferentes cultivos (protocolo 3 de la sección 2.1.1) se resuspendieron en 60µl de PBS. En la cámara láser del NanoSight LM10 (NanoSight, Amesbury, UK) se cargaron 300µl de una dilución 1:50 en PBS, realizada a partir de la preparación inicial de EVs. La temperatura de cada muestra, colocada en la cámara del equipo, se determinó individualmente y se obtuvieron 2 videos de 40seg a partir de cada una de éstas (nivel de cámara=10). Los ajustes posteriores a la adquisición de los datos se mantuvieron constantes entre las diferentes muestras.

2.4.1. Distribución de tamaños de EVs por NTA

Los datos arrojados por NTA, a partir de los 2 videos y en un rango de 30-1000nm de diámetro, corresponden a la concentración promedio de EVs, en un determinado rango de tamaños, en cada una de las muestras analizadas. La razón entre esa concentración, de cada rango, y la concentración total de partículas en la muestra, permitió obtener valores normalizados en porcentaje que van de 0 a 1 (donde 1=100%). Los datos se expresaron como la media \pm SEM de los porcentajes, para cada rango de tamaño, obtenidos a partir de cinco experimentos independientes (n=5).

2.4.2. Cuantificación de EVs por NTA

Considerando los valores de concentración promedio de partículas/ml brindados por el equipo, la dilución y el volumen inicial de muestra, se calculó la cantidad de partículas totales en cada una de las muestras. Los datos se expresaron como la media \pm SEM de la cantidad de partículas liberadas por cada 10^6 células productoras totales obtenidas al final del cultivo, a partir de cinco experimentos realizados de manera independiente (n=5).

2.5. Cuantificación de proteínas y determinación de pureza

La determinación de la pureza de una muestra de EVs se estima como la razón N° de partículas/µg de proteínas [47, 134]. Para determinar la pureza del *pellet* 100K de EVs, obtenidas a partir de los diferentes cultivos, se realizó la cuantificación proteica de las preparaciones mediante la técnica de Bradford [135] (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, California, USA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Los datos se expresaron como la media \pm SEM de la pureza de cada muestra, a partir de cinco experimentos independientes (n=5).

2.6. Determinación del efecto funcional de EVs sobre células

Fb y células NThyOri se sembraron en placas de 6 pocillos (200.000 células/pocillo) en HG-DMEM suplementado con SFB al 10% hasta confluencia y/o a baja densidad sobre cubreobjetos. Las monocapas de células se lavaron con PBS atemperado e incubaron con EVs, resuspendidas en un volumen final de 2ml de HG-DMEM en ausencia de SFB, o con medio DEVs (protocolo 3 sección 2.1). Luego de 24hs de incubación, los sobrenadantes del cultivo

se recogieron y conservaron a -80°C para ser utilizados posteriormente en la realización de zimografías. Las células, se lavaron con PBS atemperado y prepararon para su análisis mediante inmunofluorescencia (sección 5.1.1) o la realización de estudios de expresión génica (sección 7).

3. Cromatografía líquida-espectrometría de masas (nLC-MS/MS)

La preparación, identificación y cuantificación de las muestras de EVs, así como su análisis en el espectrómetro de masas, se realizaron en el marco de una pasantía de investigación en el laboratorio de exosomas, liderado por el Dr. Juan Manuel Falcón-Perez, en el Centro de investigación Cooperativa en Biociencias (CIC bioGUNE). Este centro cuenta con la tecnología necesaria para realizar análisis de proteínas en solución, evitando la incorporación de las mismas en geles y las consiguientes pérdidas o dificultades en la identificación de proteínas menos abundantes.

3.1. Preparación y procesamiento de las muestras de EVs

Los *pellets* 100K de EVs (protocolo 3 sección 2.1), provenientes de Fb, células TPC-1, 8505c y NThyOri cultivadas en forma aislada y co-cultivadas con Fb (Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri), de manera contacto-dependiente (sección 1.3.1), se procesaron para su análisis proteómico. Un total de 21 muestras, correspondientes a los 7 tipos de cultivos realizados por triplicado, se prepararon para su digestión en solución siguiendo el protocolo *filter-aided simple preparation* descrito por Wisniewski y col., [136] con pequeñas modificaciones. Básicamente, las muestras se incubaron en un buffer urea 7M, tiourea 2M, CHAPS al 4% y DTT 5mM. Las proteínas se digirieron con tripsina, en una relación tripsina:proteína de 1:50, a 37°C durante toda la noche y se utilizó iodoacetamida para la carbamidometilación de los tioles. Posteriormente, se sometió la muestra a una ultrafiltración que permitió la eliminación de componentes de bajo peso molecular, DNA y lípidos, y la elución de los péptidos tripticos. Estos fueron concentrados utilizando un *RVC 25 speedvac concentrator* (Christ) y resuspendidos en ácido fórmico (FA) al 0,1%. Finalmente, los péptidos fueron desalados utilizando *C18 stage tips* (Millipore) y nuevamente resuspendidos en FA al 0,1%. Las muestras se analizaron en un espectrómetro híbrido timsTOF Pro – PASEF (Bruker Daltonics), acoplado en línea a un cromatógrafo líquido nanoElute (Bruker), presente en la plataforma de proteómica avanzada del Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC BioGUNE, Derio, España). Este equipo presenta alta sensibilidad, velocidad en el análisis y precisión. La muestra (200ng) se cargó directamente en una columna analítica nanoelute FIFTEEN de 15 cm (Bruker) y se resolvió a 400 nl/min en un gradiente de 0-35% acetonitrilo durante 30 min (la fase móvil A fue de agua/FA al 0,1% v/v y la fase móvil B fue de acetonitrilo/FA al 0,1% v/v).

3.2. Identificación de proteínas y cuantificación

La identificación de las proteínas y su cuantificación en ausencia de sondas o *label free quantification* (LFQ, por sus siglas en inglés) se realizó con el *software* PEAKS (Bioinformatics solutions), utilizando la base de datos Uniprot/Swissprot (2020_04, 20375 entradas en humanos), con tolerancias de precursores y fragmentos de 20ppm y 0,05 Da. Para el análisis

se aceptó un índice de 2 en relación a los sitios de clivaje incompletos (*missed cleavage sites*), se consideró la oxidación de metionina como modificación variable y la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija. La determinación de la tasa de descubrimientos falsos o *false discovery rate* (FDR, por sus siglas en inglés) se realizó mediante la base de datos señuelo o *decoy* y, para los análisis cuantitativos posteriores, fueron consideradas sólo las proteínas identificadas con al menos dos péptidos únicos y un $FDR < 1\%$. El valor de intensidad-LFQ correspondiente a cada proteína en cada muestra se consideró proporcional a su concentración/abundancia. Finalmente, los datos se cargaron en el *software* Perseus (v. 1.6, Max Planck Institute of Biochemistry) [137] para los análisis posteriores.

3.3. Perfiles de distribución de los datos proteómicos

Los valores de intensidad-LFQ, cargados en Perseus, se transformaron a $\log_2(x)$ y filtraron hasta obtener una lista de proteínas que presenten valores válidos en al menos 2 de las 3 réplicas, en al menos un grupo (de los 7 grupos de muestras analizadas). Los valores faltantes se imputaron y reemplazaron con valores correspondientes a la distribución normal. El análisis de los histogramas obtenidos para las proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs mostró una distribución normal y la imputación de los datos mantuvo su unimodalidad (Fig. 15). Los valores imputados, representados en color rojo, corresponden a valores ausentes de proteínas que no se identificaron/cuantificaron mediante esta técnica pero que fueron imputados para permitir los análisis estadísticos posteriores.

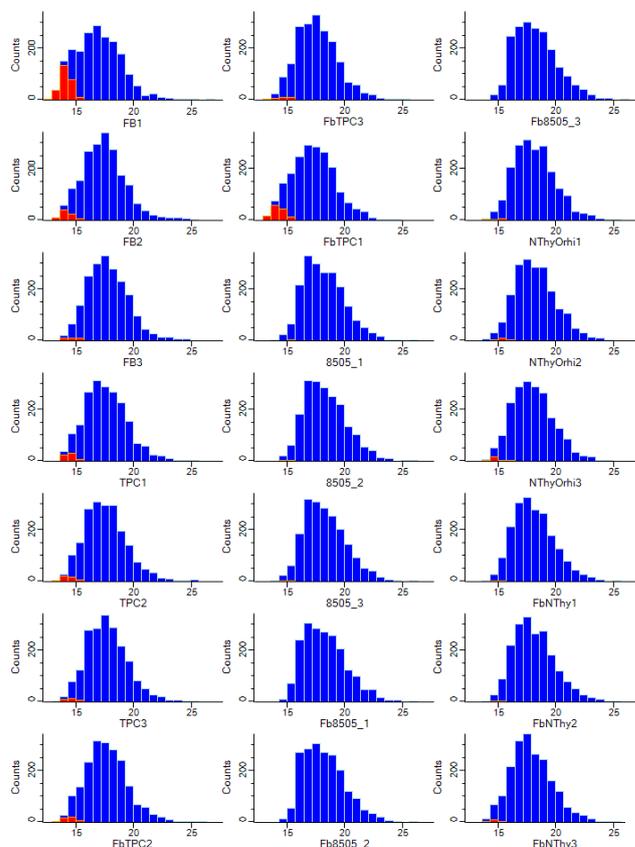


Figura 15. Histogramas de distribución de los datos Histograma de distribución de los valores de intensidad-LFQ logaritimizados ($\log_2(x)$) para visualizar la distribución unimodal y normal de los datos. Los valores imputados de la distribución normal se representan en color rojo.

3.4. Análisis bioinformáticos de las proteínas

3.4.1. Análisis de las proteínas identificadas en las EVs con las anotadas en Vesiclepedia y ExoCarta

Las proteínas identificadas mediante el criterio mínimo de exclusión mencionado anteriormente (proteínas identificadas con al menos dos péptidos únicos y un FDR<1%) se compararon con dos bases de datos de libre acceso, disponibles en la web, que son un compendio colaborativo de información (anotaciones/entradas) acerca de las diferentes macromoléculas reportadas en EVs. Estas bases de datos, ExoCarta (www.exocarta.org) [58] y Vesiclepedia (www.microvesicles.org) [59], son anotadas y curadas manualmente por expertos, pudiendo ser utilizadas para realizar comparaciones con los datos obtenidos experimentalmente. Además, las proteínas presentes en las EVs provenientes de muestras humanas presentan el mayor número de entradas disponibles. El % de inclusión/exclusión de las proteínas obtenidas en EVs respecto a las proteínas descritas en ambas bases de datos se determinó mediante la realización de diagramas de Venn.

3.4.2. Análisis de enriquecimiento ontológico-funcional

Para la clasificación de las proteínas identificadas y cuantificadas en EVs respecto a los componentes celulares a los que pertenecen se utilizó el análisis de enriquecimiento ontológico-funcional, utilizando el consorcio de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés) (www.geneontology.org/). Los análisis estadísticos de enriquecimiento de los datos se realizaron mediante la utilización del *software* FunRich (www.funrich.org) [138] y la base de datos DAVID (*database for annotation, visualization and integrated discovery*, <https://david.ncifcrf.gov/>) [139]. Las anotaciones funcionales que se indican como enriquecidas corresponden a aquellas que presentan un número de proteínas, identificadas en las EVs, significativamente mayor que las esperadas por azar.

3.4.3. Identificación de la presencia del péptido señal y sitios de clivaje

Archivos FASTA que contienen las secuencias de las 1977 proteínas identificadas se analizaron utilizando el *software online*, de acceso libre, Signal P 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/) [140], que infiere acerca de la presencia de sitios de clivaje del péptido señal. Mediante este análisis se identificaron a aquellas proteínas, presentes en las EVs, que podrían también ser secretadas por vías clásicas (dado que presentan secuencias consenso del péptido señal).

3.4.4. Análisis de *clustering* jerárquico no supervisado, PCoA y matrices de correlación

Un análisis de *clustering* (o agrupamiento) jerárquico no supervisado se realizó utilizando el *software* R (R Core Team (2016). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org/) [141] y el paquete *heatmap_1.0.12* sobre las 100 proteínas identificadas que presentaron mayor intensidad promedio, utilizando distancia euclídea. Además, con este top-100 de proteínas, se realizó el análisis de coordenadas principales

(PCoA) (paquete `limma_3.48.3`). Por último, también se utilizó R, junto al paquete `corrplot_0.90`, para la realización de matrices que utilizan el coeficiente de correlación de Pearson para correlacionar la intensidad de todas las proteínas identificadas en las EVs provenientes de un determinado tipo o contexto celular, con respecto a otro. Este tipo de matrices se utilizó también para realizar el análisis de correlación de las proteínas identificadas en las EVs que interactúan con MMP2 y MMP9, pertenecientes a un tipo o contexto celular con respecto a otro (ver sección 3.6.2 de materiales y métodos).

3.5. Análisis estadísticos de los datos y obtención de proteínas diferencialmente enriquecidas (DEPs)

La determinación de las proteínas diferencialmente enriquecidas en cada muestra (DEPs), es decir, aquellas que presentan diferencias en su abundancia entre muestras, se obtuvo utilizando el método *differential expression analysis of quantitative mass spectrometry data* (DEqMS, por sus siglas en inglés). Éste es altamente robusto para el análisis de datos obtenidos por LFQ, logrando una estimación más precisa de la varianza, demostrando mejor precisión y poder estadístico en la detección de las DEPs [142].

3.6. Análisis bioinformáticos de las DEPs

3.6.1. Análisis de enriquecimiento ontológico-funcional de las DEPs

El análisis de enriquecimiento ontológico-funcional de las DEPs se realizó utilizando la estrategia de *over-representation analysis* (ORA, por sus siglas en inglés). Las comparaciones establecidas en el análisis fueron:

1. TPC-1 y 8505c vs NThyOri, y viceversa,
2. Co-cultivos Fb-TPC-1 y Fb-85005c vs Fb-NThyOri y viceversa, y
3. Co-cultivos Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri vs TPC-1, 8505c y NThyOri, respectivamente.

Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p_{adjust} < 0,001$ y *fold change* (FC) ≥ 2 en las comparaciones (1) y (2), y $p_{adj.} < 0,01$ y $FC \geq 2$ para la comparación (3). Las listas de DEPs candidatas se analizaron mediante el *software online* de acceso libre `g:Profiler` (www.biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) [143, 144] y compararon con bases de datos de información ontológica-funcional, como GO y Reactome (www.reactome.org) [144], detectándose los términos enriquecidos de forma estadísticamente significativa, según un valor umbral ($p < 0,001$) colocado en la página web.

3.6.1.1. Representación e interpretación de la información ontológica-funcional usando Cytoscape

El conjunto de datos arrojado por `g:Profiler` se visualizó e interpretó mediante el *software* de acceso libre Cytoscape v3.8.2 (www.cytoscape.org) [145]. La aplicación EnrichmentMap plug-in v3.3.1 de Cytoscape se utilizó para representar en forma de nodos, asociados por líneas, a los enriquecimientos significativos obtenidos en cada análisis comparativo. Los enriquecimientos corresponden a categorías anotadas en la base de datos de GO o Reactome

y el tamaño de los nodos es proporcional al número de DEPs, presentes en las muestras de EVs, que corresponden a cada enriquecimiento. Finalmente, las aplicaciones AutoAnnotate v1.3.3 y ClusterMaker2 se utilizaron para identificar grupos o *clusters* de nodos fuertemente interconectados, que se describieron mediante una única etiqueta, obteniéndose un resumen de la información, simplificando y facilitando la interpretación de los resultados.

3.6.2. Predicción de relaciones proteína-proteína mediante String-db y análisis en KEGG

La predicción de interacciones proteína-proteína (PPI, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando la base de datos String-db (*search tool for the analysis of interacting genes/proteins*) [146], lo que permitió detectar relaciones (publicadas o predichas) entre las proteínas en estudio, ya sea funcionales, correspondientes a pruebas experimentales, co-expresión, minería de texto y bases de datos. El análisis se realizó utilizando las DEPs obtenidas de las comparaciones de Fb-TPC-1 vs Fb-NThyOri y Fb-8505c vs Fb-NThyOri. Para la representación gráfica solo se consideraron aquellas relaciones o interacciones que presentaron un alto nivel de confianza (*confidence score cut off*) > 0,7. Además, utilizando String-db se realizó un análisis de enriquecimiento ontológico-funcional utilizando la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, www.kegg.jp/), representándose aquellos enriquecimientos significativos con un $p < 0,01$. String-db también permitió determinar las proteínas que presentan PPI significativo, con un alto nivel de confianza > 0,7, con MMP2 (denotadas como interactores de MMP2) y MMP9 (interactores de MMP9), y que, además, se encuentran presentes en las EVs.

3.7. Disponibilidad de los datos y repositorio público

Los datos proteómicos obtenidos a partir de las diferentes muestras de EVs, fueron depositados en el consorcio ProteomeXchange, a través del repositorio PRIDE (www.ebi.ac.uk/pride), con el identificador PXD028081 (*Project DOI: 10.6019/PXD028081*).

4. Ensayos de captación de EVs

4.1. Ensayo de captación utilizando EVs coloreadas

Una de las estrategias que permite el estudio de la captación de EVs por células en cultivo se basa en la obtención de las EVs, su tinción con un colorante fluorescente y posterior incubación sobre la célula receptora. EVs obtenidas (protocolo 3 sección 2.1) de CMs provenientes de células aisladas y co-cultivadas (sección 1.3.1), fueron marcadas con el colorante lipofílico fluorescente PKH26 (*red fluorescent cell linker*, MIDI26; Sigma Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente, se preparó una suspensión de EVs 2x a partir de 20 μg de proteínas totales (sección 2.5) en diluyente C (200 μl). Inmediatamente antes de la tinción se preparó la solución colorante 2x (200 μl diluyente C + 1,6 μl de PKH26, por cada muestra a teñir), la que se puso en contacto con la suspensión de EVs, durante 5 min a TA. Posteriormente, se frenó la tinción agregando BSA al 1%. Finalmente, las EVs teñidas se resuspendieron en PBS (volumen final de 9ml) y se centrifugaron a 100.000x g durante 90min, a fin de eliminar restos de colorante. Las EVs teñidas se utilizan para los

ensayos de captación utilizando Fb (200.000 células/pocillo) o células TPC-1 (200.000 células/pocillo) como células receptoras. Estas son sembradas en placas de 6 pocillos, y eventualmente sobre cubreobjetos, y cultivadas durante 24 hs hasta lograr su adherencia. EVs provenientes de la misma cantidad de células productoras al final del cultivo, se agregaron sobre las células receptoras e incubaron durante 24hs. Luego de la incubación, se eliminó el sobrenadante y se procedió como se indica en la sección 5.1.2 para su visualización al microscopio de fluorescencia, y en la sección 6.3.1 para su análisis mediante citometría de flujo. Como control negativo, placas libres de células fueron incubadas con medio de cultivo, de manera equivalente a los cultivos celulares. Al finalizar el periodo de incubación, el medio de cultivo obtenido se centrifugó siguiendo el mismo protocolo utilizado para la obtención de las EVs (protocolo 3 sección 2.1). Una vez descartado el sobrenadante, se procedió a la tinción utilizando las mismas condiciones que las mencionadas para las muestras de EVs, y se incubó con las células receptoras.

4.2. Ensayo de captación de EVs utilizando células coloreadas

Una estrategia alternativa para obtener EVs coloreadas, consiste en teñir a las células productoras de las mismas, de modo tal que el colorante se transfiera a las EVs. La tinción de estas células se realizó utilizando dos colorantes lipofílicos fluorescentes, llamados DiI y DiO (*Vybrant Cell-Labeling Solutions*; Thermo-Fisher). Para ello, monocapas de las células productoras (Fb o células tiroideas tumorales y no tumorales), cultivadas en placas de 10cm de diámetro (al 80% de confluencia), se incubaron con 5 ml de HG-DMEM (sin SFB) conteniendo 25µl de DiI o DiO (5 µl/ml), durante 4hs a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células se lavaron con PBS atemperado, a fin de eliminar el exceso de colorante y evitar la formación de micelas. Las células marcadas se levantaron con tripsina, contaron (sección 1.3) y utilizaron para el ensayo de captación en *transwell* de 6 pocillos. En la cámara inferior del *transwell* (donde previamente se colocaron dos cubreobjetos de vidrio/pocillo) se sembraron las células receptoras, ya sea Fb (100.000 células/pocillo) o células TPC-1 (40.000 células/pocillo) en 2ml de HG-DMEM al 10% de SFB. En los insertos, se colocaron las células marcadas anteriormente (DiI+ o DiO+), tanto de forma aislada (40.000 células/pocillo) como co-cultivadas con Fb (40.000 células DiI+/pocillo + 40.000 células DiO+/pocillo), en 2ml/pocillo de HG-DMEM al 10% de SFB. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las utilizadas anteriormente (sección 1.3.1 y 1.3.2), con un período inicial de incubación de 72hs en HG-DMEM con 10% de SFB, seguido del lavado de la cámara inferior como de los insertos con PBS tibio a fin de eliminar restos de SFB y la incubación con HG-DMEM libre de SFB durante 48hs más. Al finalizar la incubación, se obtuvieron los TW-CMs, de la cámara inferior del *transwell*, los que se conservaron a -80°C hasta la realización de las zimografías. Las células de la cámara inferior adheridas a los cubreobjetos se utilizaron para la visualización de las marcas obtenidas, mediante microscopía de fluorescencia y/o microscopía confocal (sección 5.1.2 y 5.2.1). Además, las células de la cámara inferior se levantaron y utilizaron para evaluar la incorporación de EVs marcadas mediante citometría de flujo (sección 6.3.1). Los pocillos controles consistieron en Fb o TPC-1 en la cámara inferior del *transwell*, cultivadas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y en los

insertos, células no marcadas (como controles negativos) o 1µl de DiI o DiO/ml de HG-DMEM en ausencia de células (como controles positivos).

5. Técnicas de inmunodetección por microscopía

5.1. Inmunofluorescencia indirecta

5.1.1. Evaluación de la expresión de proteínas celulares

Para la determinación de antígenos por inmunofluorescencia indirecta, Fb, células tiroideas tumorales o no tumorales cultivadas de forma aislada o co-cultivadas (sección 1.3.1) se sembraron a baja densidad sobre cubreobjetos de vidrio de 11 mm (*uncoated glass coverslips*), colocados en las placas de cultivo, e incubaron durante 24 o 48hs. Una vez finalizada la incubación, los cubreobjetos se lavaron con PBS y las células se fijaron con 4% p/v PFA/4% p/v sucrosa, durante 20 min a TA. Para la identificación de proteínas intracelulares las monocapas se permeabilizaron con tritón 0,2% v/v en PBS, durante 5 min a TA. Los cubreobjetos se incubaron con BSA al 5% p/v en PBS durante 30min a 37°C, para el bloqueo de sitios inespecíficos, continuando con la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 1) preparados en BSA al 1% p/v en PBS durante 1h a TA. Luego de exhaustivos lavados con PBS, se procedió a incubar los cubreobjetos con el respectivo anticuerpo secundario (Tabla 2) durante 1h a TA y protegidos de la luz. Al finalizar la incubación, se lavaron con PBS y se tiñeron los núcleos celulares con 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) durante 2 min. Una vez lavados, se montaron los vidrios sobre portaobjetos, utilizando 10µl de Mowiol (Vectashield, Vector Laboratories, España). En todos los experimentos, se incluyó un control de autofluorescencia de las células, omitiendo el anticuerpo primario y el secundario durante los pasos de incubación; así como un control del anticuerpo secundario, mediante la omisión del primario. Los portaobjetos se guardaron en oscuridad y conservaron a 4°C hasta su observación. Las muestras se examinaron y fotografiaron con un microscopio invertido de epifluorescencia (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA). Los ajustes durante la adquisición de las imágenes se mantuvieron constantes entre las diferentes muestras. Para el caso de α-SMA, la integración de la intensidad de fluorescencia se realizó a partir de las imágenes obtenidas, normalizadas según el número de núcleos presentes en cada foto, utilizando el *software* ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Se analizaron al menos 6 campos provenientes de dos experimentos independientes (n=2).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

Proteína	Proveedor	Catálogo	Reactividad	Dilución
α-SMA	Cell Signaling	19245	Rabbit	1/400
CD63 (H5C6)	BD Biosciences	556019	Mouse	1/1000
CD81 (Js-81)	BD Biosciences	555675	Mouse	1/500
EEA1	BD Biosciences	610456	Mouse	1/500
TfR (H68.4)	Invitrogen	13-6800	Mouse	1/100

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados

Proteína	Proveedor	Catálogo	Reactividad	Dilución
Cy3	Jackson ImmunoResearch	715-165-150	Mouse	1/500
Alexa 488	Invitrogen	A-21202	Mouse	1/500
Cy5	Jackson ImmunoResearch	715-175-150	Mouse	1/500
Alexa 488	Invitrogen	A-21206	Rabbit	1/500

5.1.2. Evaluación de la captación de EVs

Fb o células TPC-1 cultivadas sobre cubreobjetos (sección 4.1 y 4.2) se lavaron con PBS y fijaron con 2% de formaldehído durante 20 min. Luego de la fijación, se procedió a la tinción de los núcleos celulares con 1 µg/ml de DAPI durante 2 min y a su montaje en portaobjetos, utilizando 10µl de Fluormount-G (SouthernBiotech). En cada uno de los experimentos, se evaluó también un control negativo (autofluorescencia de las células) y los controles positivos de los colorantes (mencionados en sección 4.2). Las muestras se examinaron y fotografiaron utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia Axiovert S100 y el *software* Zen 2.0 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Los ajustes durante la adquisición de las imágenes se mantuvieron constantes entre las diferentes muestras. Aquellas imágenes en donde se presentaron tanto marcas DiI+ (rojas) como DiO+ (verdes) se analizaron por separado, utilizando la función *plot profile* del *software* ImageJ, en los canales rojo como verde (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). De esta manera, se obtuvieron los gráficos correspondientes al perfil de intensidades obtenidos para cada fluoróforo.

5.2. Microscopía confocal

5.2.1. Evaluación de la captación de EVs y su co-localización cualitativa

Fb o células TPC-1 cultivadas sobre cubreobjetos (sección 4.2) se lavaron con PBS, se fijaron con 2% de formaldehído durante 20 min y marcaron con los anticuerpos primarios anti-CD81, anti-CD63, anti-TfR y anti EEA1 y los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 1 y 2), según se indicó en la sección 5.1.1. Luego del montaje, las células se examinaron y fotografiaron utilizando un microscopio invertido confocal de fluorescencia Fv1200 (Olympus Life Sciences). El microscopio confocal permite obtener imágenes con una vista superior (xy) y una vista ortogonal (xz) de la célula, lo que junto a la delimitación de la misma mediante la marcación de la membrana celular con anti-CD81, permitió evaluar si las EVs fluorescentes se encontraban en el interior celular. Por otro lado, un z-stack de las imágenes obtenidas mediante el uso de este microscopio, permitió el análisis de la co-localización cualitativa de las EVs con otras proteínas marcadas en la/s células. Aquellas imágenes en donde se presentaron tanto marcas DiI+ (rojas) como DiO+ (verdes) se analizaron por separado, utilizando la función *plot profile* del *software* ImageJ, en los canales rojo como verde (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). De esta manera, se obtuvieron gráficos correspondientes al perfil de intensidades obtenidos para cada fluoróforo.

6. Técnicas bioquímicas clásicas

6.1. Western Blot

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) tanto en condiciones desnaturalizantes como no desnaturalizantes y su análisis posterior, mediante inmunomarcación, se realizó utilizando el sistema Mini-Protean 3 o 4 (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) o el sistema XCell SureLock Mini-Cell.

6.1.1. Obtención de extractos proteicos celulares, cuantificación, preparación y corrida

Para la obtención de muestras para el análisis de la expresión de proteínas, se preparó un extracto celular a partir de células aisladas crecidas en monocapa (sección 1.1 y 1.2) utilizando buffer RIPA (Tris HCl 25mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, Desoxicolato de Na 1%, SDS 0,1%, pH 7,6), suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatina A, 10 µg/ml Aprotinina, 10 µg/ml Leupeptina). Para esto, se lavaron las células con PBS, a fin de eliminar células muertas y/o restos de SFB, se lisaron con buffer RIPA (300 µl/placa de 10cm) y se recogieron de forma mecánica utilizando *scrapers*. Sobre estos lisados celulares se aplicaron 3 pulsos a máxima velocidad en vórtex cada 5min, en hielo. Finalmente, los lisados obtenidos se centrifugaron a 10.000x g durante 10 min a 4°C, para eliminar el *debris* celular. El sobrenadante recuperado, se alícuotó y conservó a -80°C. La cuantificación proteica de los lisados totales se realizó mediante la técnica de Bradford [135] (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, California, USA) utilizando BSA como estándar. Dependiendo de la proteína a analizar, se utilizaron entre 20 a 40µg de proteínas totales que se prepararon en buffer de siembra 2x [117 mM Tris (pH 6,8), 12 % v/v glicerol anhidro, 3,43 % p/v SDS, 1,7 % v/v β-mercaptoetanol, 0,004 % p/v azul de bromofenol] e hirvieron en baño seco termostatzado a 100°C durante 5 min para permitir la desnaturalización y reducción de las proteínas. Los geles de concentración y resolución se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 29,2:0,8. Dependiendo del tamaño de la proteína en estudio, el gel de resolución se utilizó al 12 o 15% [147]. La corrida electroforética se realizó empleando buffer de corrida (25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glicina y 0,1%SDS) y una diferencia de potencial constante de 100 V (intensidad de corriente variable, medida en mA) durante un tiempo aproximado de 2 a 3hs.

6.1.2. Obtención de extractos proteicos de EVs, cuantificación, preparación y corrida

Los *pellets* 100K de EVs (protocolo 3 sección 2.1), fueron resuspendidos en PBS y cuantificados mediante la técnica de Bradford [135] (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, California, USA) utilizando BSA como estándar. Para el estudio de la expresión de CD63, CD9, FLOT-1, CAV-1, GRP78 y GM130, 5µg de proteínas totales de cada una de las muestras se prepararon en buffer de siembra comercial (NuPAGE LDS *Sample Buffer*, Thermo scientific) e incubaron por 15 min a 37°C, 10min a 65°C y 5min a 95°C. La corrida electroforética se realizó utilizando geles de poliacrilamida NuPAGE *pre-cast* 4-12% Bis-Tris (Thermo Scientific),

empleando buffer de corrida comercial 1x (NuPAGE MOPS SDS *Running Buffer*, Thermo Scientific) y una diferencia de potencial constante de 100 V (intensidad de corriente variable, medida en mA) durante un tiempo aproximado de 2 a 3hs. Por otro lado, para el análisis de CD147 y CD81, los *pellets* 100K, provenientes del mismo número de células productoras (sección 3.1), se disolvieron en buffer de siembra 2x, hirvieron en baño seco termostatzado a 100°C durante 5 min y sembraron para la corrida electroforética (sección 6.1.1). CD147 fue detectada bajo condiciones reductoras y el resto de proteínas en EVs bajo condiciones no reductoras.

6.1.3. Electrotransferencia e inmuno-detección

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania) utilizando buffer de transferencia conteniendo 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8,8) y 20 % metanol; o a membranas de PVDF (Millipore, Merck), previamente activada en metanol, utilizando buffer de transferencia 1x comercial conteniendo 12% de metanol (NuPAGE *Transfer Buffer*; Thermo Scientific). La transferencia se realizó a una diferencia de potencial constante de 100 V (250-350 mA, 30-40 W) durante 60min. Posteriormente, los sitios inespecíficos de la membrana se bloquearon por incubación en solución de bloqueo [5 % p/v de leche descremada ó 5 % p/v de BSA en TBS-Tween (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20)] durante 60 min a TA bajo agitación permanente. Las membranas bloqueadas se incubaron con los anticuerpos primarios, dirigidos contra las proteínas de interés, diluidos en solución de bloqueo (Tabla 3) durante toda la noche a 4°C, con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron con TBS-Tween 3 veces por 5 min a TA, a fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario. La inmuno-detección del anticuerpo primario se realizó mediante incubación con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (Tabla 4), capaz de reconocer el isotipo del anticuerpo primario utilizado, diluido en TBS-Tween, durante 90 min a TA bajo agitación suave y protegido de la luz. El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado mediante 3 lavados con TBS-Tween cada 5 min a TA y protegido de la luz. Las bandas reactivas fueron visualizadas y obtenidas por el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biotechnology - Lincoln, NE, USA). Como metodología alternativa, se realizó la inmuno-detección del anticuerpo primario mediante la incubación de la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabanita (HRP) (Tabla 4). Las bandas específicas fueron detectadas por quimioluminiscencia con Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados

Proteína	Proveedor	Catálogo	Reactividad	Dilución
CD63 (H5C6)	BD Biosciences	556019	Mouse	1/1000
CD81 (Js-81)	BD Biosciences	555675	Mouse	1/500
CD9	R&D Systems	MAB1880	Mouse	1/1000
Flot-1	BD Biosciences	610820	Mouse	1/1000
Cav-1	BD Biosciences	610057	Mouse	1/1000
GRP78	BD Biosciences	610979	Mouse	1/250
GM130	BD Biosciences	610822	Mouse	1/250
CD147	Affymetrix	14-1472-82	Mouse	1/400

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados

Proteína	Proveedor	Catálogo	Reactividad	Dilución
IRDye 680 RD	LI-COR Biotechnology	P/N 925-68070	Mouse	1/15000
IRDye 800 CW	LI-COR Biotechnology	P/N 925-32211	Rabbit	1/15000
HRP	Jackson ImmunoResearch	315-035-045	Mouse	1/6000
HRP	Amersham	NA934	Rabbit	1/6000

6.2. Zimografía

La actividad de MMP2 y MMP9 fue estudiada en CMs obtenidos de células cultivadas en forma aislada y co-cultivadas (sección 1.3.1), en las suspensiones del *pellet* 100K de EVs y en los CMs obtenidos de células incubadas con EVs (sección 2.6), a través de la realización de zimogramas, usando gelatina como sustrato [148]. Para ello, los CMs se centrifugaron a 10.000x g durante 10min, a fin de eliminar el *debris* celular, y las proteínas presentes en los sobrenadantes obtenidos (48 μ L) se prepararon en buffer de siembra 2x (117 mM Tris pH 6,8, 12 % v/v glicerol anhidro, 3,43 % p/v SDS, 0,004 % p/v azul de bromofenol) y se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Los geles de concentración y resolución (Tabla 5) se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 29,2:0,8. El gel de resolución se preparó al 8% conteniendo gelatina al 1,5% (Thermo-Fisher). Las muestras, preparadas en buffer de siembra, se sembraron directamente en el gel sin realizar ningún paso de desnaturalización previo. Es importante resaltar que el buffer de muestra no contiene el agente reductor β -mercaptoetanol, ya que éste, al romper los enlaces disulfuro, altera la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, y por consiguiente su función. La corrida electroforética utilizando el sistema Mini-Protean 4 (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) se realizó empleando buffer de corrida (25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glicina y 0,1%SDS) y una diferencia de potencial constante de 125 V (intensidad de corriente variable, medida en mA) durante un tiempo aproximado de 2 a 3hs, en baño de hielo (evitando que el gel levante temperatura). Una vez finalizada la corrida, los geles se lavaron con agua destilada durante 10 min y se incubaron dos veces con Tritón al 2,5% v/v durante 45 min en agitador, a fin de remover el SDS del gel de electroforesis. A continuación, se incubaron a 37° durante 42 horas con el buffer de desarrollo (50 Mm Tris-HCl pH 7,4, 200mM NaCl, 9mM CaCl₂) que contiene los iones, osmolaridad y el pH necesario para favorecer la actividad de las metaloproteasas. Finalmente, los geles se tiñeron con la solución colorante (*Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,125% p/v, metanol 15% v/v y ácido acético 5% v/v) con agitación suave durante 45 min; el exceso de colorante se eliminó mediante lavados con solución decolorante (etanol 25% v/v, ácido acético 10% v/v). La solución colorante tiñe de azul la gelatina del gel, salvo en las regiones donde fue degradada por la acción enzimática, las que se visualizan como bandas claras. La técnica de zimografía permite detectar tanto las formas activas como las proenzimas de las MMPs, debido a que estas últimas sufren cambios conformacionales que les permiten exponer su sitio activo y, por lo tanto, presentar actividad catalítica aún en presencia del pro-péptido. Las imágenes de los geles fueron capturadas con el EC3 Imaging System

(UVP) con VisionWorks y OptiChemi 600 camera para la adquisición y registro de imágenes. Las bandas claras observadas sobre un fondo oscuro se cuantificaron utilizando el *software ImageJ* (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Los datos se expresaron (en unidades arbitrarias) como la media \pm SEM de la densidad óptica de la banda, obtenida en cada experimento, de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 5. Fórmula para la preparación de los geles de concentración y resolución

Reactivos	1 gel de concentración (μ l)	1 gel de concentración (μ l)
Agua	2950	3000
Acrilamida	500	2000
TRIS (1,5 M y pH 8,8)	500	2000
SDS (10% p/v)	40	80
APS (10% p/v)	60	80
TEMED	4	6
Gelatina	-	800

6.2.1. Zimografía en TW-CMs

La actividad de MMP2 y MMP9 fue estudiada los TW-CMs presentes en la cámara inferior de los co-cultivos en *transwell* (sección 1.3.2), utilizando el sistema XCell SureLock Mini-Cell. Los TW-CMs se centrifugaron a 10.000x g durante 10min y 8 μ l de los sobrenadantes se prepararon en 5 μ l de buffer de siembra comercial 2x (*Tris-Glycine SDS Sample Buffer, Life Technologies*) y se sembraron en geles de poliacrilamida Novex pre-cast al 10% (*Novex Zymogram Gels, Life Technologies*). La corrida electroforética se realizó empleando buffer de corrida comercial 1x (*Tris-Glycine SDS Running Buffer, Life Technologies*) y una diferencia de potencial constante de 125 V (intensidad de corriente variable, medida en mA) durante un tiempo aproximado de 2hs, en baño de hielo. Una vez finalizada la corrida, se lavaron los geles con agua destilada, durante 10 min. A continuación, los geles se incubaron con buffer de renaturalización 1x (*Novex Zymogram Renaturing Buffer*) durante 30 min, a TA, con agitación suave y, posteriormente, a 37° durante 24 horas con el buffer de desarrollo 1x (*Novex Zymogram Developing Buffer*). Al finalizar la incubación, los geles fueron teñidos con la solución colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,125% p/v, metanol 25% v/v y ácido acético 5% v/v) con agitación suave durante 30 min, eliminándose posteriormente el exceso de colorante mediante lavados con solución decolorante (etanol 25% v/v, ácido acético 10% v/v). Las imágenes de los geles fueron capturadas con DigiDoc-It imaging system (UVP) acoplado a digital graphic printer UP-D897 (Sony) y las bandas claras, observadas sobre el fondo oscuro, se cuantificaron utilizando el *software ImageJ* (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Los datos correspondientes a MMP2 se expresaron como el cociente de MMP2/proMMP2 (media \pm SEM) en unidades arbitrarias, a partir de tres experimentos independientes.

6.3. Citometría de Flujo

6.3.1. Cuantificación de la captura de EVs

Las células receptoras (Fb o TPC-1) de la cámara inferior de los co-cultivos en *transwell* (sección 1.3.2), se lavaron con PBS y levantaron de la placa utilizando 300µl (Fb) y 600µl (TPC-1) de TryPLE Select (Gibco). En cada muestra fueron adquiridos 10.000 (Fb) y 50.000 (TPC-1) eventos, utilizando un *threshold* de 5000. La evaluación de la marca DiI y DiO positivas en las células, debido a la captación de EVs DiI+ y/o DiO+, se realizó utilizando un láser de 488nm (láser azul). El colorante DiI (rojo) fue leído en el canal de PE (578nm) y el colorante DiO (verde) en el canal de FITC (520nm). La adquisición de las muestras se realizó mediante un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) y el análisis de los datos usando el *software* FlowJo. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM del porcentaje de eventos positivos, para ambos colorantes, así como la media \pm SEM de la intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) en cada caso analizado.

6.3.2. Expresión de CD147 en células

La expresión de CD147 fue analizada por citometría de flujo, en células cultivadas en forma aislada y/o co-cultivadas, de forma contacto-dependiente, en placa (sección 1.3.1). La identificación de los Fb en los co-cultivos se realizó a través de la tinción de los mismos con el colorante de proliferación celular eFluor 670 (CPD, eBioscience, USA) según las instrucciones del fabricante, previo a su incorporación en los cultivos. Fb-CPD positivos se cultivaron en forma aislada o co-cultivaron con células TPC-1, 8505c y NThyOri. Cultivos de las células tiroideas aisladas se utilizaron como controles. Después del periodo de incubación, las células se recogieron utilizando *scrapers* de goma y la expresión de CD147 se evaluó, tanto en células aisladas como co-cultivadas, utilizando el anticuerpo CD147-FITC (BD Pharmingen, BD Biosciences, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de los datos se realizó con un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y su análisis con el *software* FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Los datos se expresaron como la media \pm SEM del % de eventos CD147(+) y de la MFI, en células tiroideas-CPD negativas aisladas o co-cultivadas con Fb y en Fb-CPD positivos aislados y co-cultivados con células tiroideas; obtenidos a partir de cuatro experimentos realizados de manera independiente.

7. Técnicas de biología molecular en células

7.1. Extracción del RNA total

La extracción de RNA total a partir de células en cultivo se realizó siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi [149]. Para ello, Fb cultivados en placas de 6 pocillos (35mm de diámetro) y previamente incubados con EVs (sección 2.6), se lavaron con PBS, a fin de eliminar células muertas. Las células adheridas se lisaron con 500 µl/pocillo de solución desnaturante TRIzol (Invitrogen Life Technologies) y el lisado se colocó en tubos *ependorf*. Se adicionó 100µl de cloroformo por lisado, la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 seg, se incubó 5 min a TA y se centrifugó a 12.000x g durante 15 min a 4°C. El RNA presente en la fase acuosa superior fue recuperado y precipitado con 250µl de isopropanol, centrifugando las muestras a 12.000x g durante 15 min a 4°C. Posteriormente, los *pellets* obtenidos se

lavaron con etanol al 75 % v/v y centrifugaron a 7.500x g durante 10 min a 4°C. Finalmente, una vez removido el etanol, se dejaron secar a TA durante 15-30min y se disolvieron en 15-20µl de agua libre de nucleasas. La evaluación de la concentración de la solución de RNA obtenida se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm utilizando un lector de placas BioTek (Life Science). Se determinó la relación de absorbancia a 260 y 280 nm para valorar la calidad de la muestra obtenida. La integridad del material extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. El RNA total extraído se alicuotó y conservó a -80°C, hasta el momento de ser usado para la síntesis de cDNA.

7.2. Síntesis del cDNA por transcripción reversa

La reacción de transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) se realizó a partir de 2 µg de RNA total de cada muestra, utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Virus de la leucemia murina de Moloney) (Promega), oligo-dT como *primer* y dNTPs. Las muestras fueron desnaturalizadas a 70°C durante 5 min en un volumen final de 13 µl, conteniendo agua estéril libre de nucleasas y 25 pmol de oligo dT. Durante esta etapa de calentamiento se produce la desnaturalización del ARN, lo cual es necesario para evitar la formación de estructuras secundarias que puedan afectar la reacción. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos con las muestras se enfriaron rápidamente en hielo para evitar la renaturalización de las hebras. A continuación, se añadieron 12 µl de una mezcla de reacción para transcripción reversa compuesta por: 5 µl de Buffer 5X M-MLV Transcriptasa Reversa (Promega) (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; DTT 16,67 mM); 5 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato o dNTPs (Invitrogen) (0,5 mM de cada uno: dATP, dTTP, dCTP y dGTP); 1 µl (200 U/µl) de la enzima transcriptasa reversa M-MLV y 1 µl de agua libre de ARNasas, completando de este modo un volumen final de reacción de 25 µl. La mezcla de reacción se homogeneizó e incubó a 37°C durante 60 minutos para la síntesis del cDNA y posteriormente a 95°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. Los cDNA obtenidos se conservaron a -20°C hasta ser utilizados.

7.3. Diseño de *primers*

Se diseñaron *primers* específicos que permitieron amplificar fragmentos de cDNA correspondientes al mRNA de Gal-1, utilizando β-actina como control interno. Empleando las bases de datos de secuencias nucleotídicas del National Center of Biotechnology Information (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov), se realizó la búsqueda de las secuencias de los mRNA de interés. Obtenidas las secuencias, se empleó el *software* Primer BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) para el diseño de los *primers*. Para Gal-1, la secuencia del *primer forward* o sentido usada fue: 5'-CCTGGAGAGTGCCTTCGAGTG-3' y del *primer reverse* o antisentido: 5'-CTGCAACACTTCCAGGCTGG y el tamaño del amplicón obtenido de 220pb (acceso *GenBank*: NM_002305.4). Para β-actina, la secuencia del *primer forward* o sentido usada fue: 5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTCC-3' y del primer reverse o antisentido: 5'-GTTGGCGTACAGGTCTTTGC-3' y el tamaño del amplicón obtenido de 109pb

(acceso *GenBank*: NM_001101.5). Los *primers* fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Houston, TX, USA).

7.4. PCR convencional preparativa y evaluación de productos amplificados

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l conteniendo 4 μ l de buffer de PCR 1x (Promega, Madison WI, USA), 1 μ l de *primer forward* (10 μ M), 1 μ l de *primer reverse* (10 μ M), 2 μ l de dNTPs (2,5 mM), 0,2 μ l de Taq-polimerasa (1 U), 2 μ l del cDNA de interés y 9,8 μ l de agua para completar volumen. El perfil térmico fue: 94°C 5 min; 94°C 30 seg, 60°C 35 seg, 72°C 30 seg (40 ciclos); 72°C 10 min. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 2 % y observados mediante tinción con bromuro de etidio (imágenes no mostradas). Como controles negativos se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas en lugar del producto de la RT y reacciones donde no se adicionó la enzima transcriptasa reversa en la RT del RNA. Estos controles se realizaron principalmente en la puesta a punto de la técnica para el par de *primers* utilizado.

7.5. qPCR

Los cDNA fueron utilizados para el análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR). Cada reacción se realizó en un volumen final de 15 μ l, utilizando 7,5 μ l de la mezcla 2x PCR SYBR Green Master Mix para PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), 5 μ l cDNA de simple cadena (previamente diluido 1/20), 0,5 μ l de *primer forward* (10 μ M), 0,5 μ l de *primer reverse* (10 μ M) y 1, 5 μ l de agua para completar volumen. Las reacciones de la amplificación se realizaron en el termociclador ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) y el perfil térmico fue: 95°C 4 min (desnaturalización inicial); 95°C 32 seg, 60°C 1 min (40 ciclos) (hibridación y extensión); 95°C 1 min, 60 °C 1 min, seguido de un aumento progresivo de la temperatura desde 60 °C a 95 °C, a una velocidad de 0,5 °C cada 10 seg (curva de disociación). La medición de la señal emitida por SYBR Green fue realizada al final de cada ciclo de hibridación y extensión. La curva de disociación demostró la amplificación de un solo producto, excluyendo posibles interferencias de dímeros de *primers* o la amplificación de productos inespecíficos y su identidad se evaluó mediante la observación del tamaño previsto del amplicon mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. La cuantificación de los cambios relativos en la expresión de Gal-1 respecto al gen de expresión constitutiva β -actina, usado como control interno, fue realizada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [150]. Los datos obtenidos se expresaron (en unidades arbitrarias) como la media \pm SEM de la expresión relativa del mRNA, obtenida a partir de tres experimentos realizados de forma independiente.

8. Análisis estadísticos

Los resultados experimentales se muestran como la media \pm SEM. La significancia estadística de las diferencias de medias entre tres o más grupos, se determinó mediante un test de análisis de varianzas (ANOVA) paramétrico o no paramétrico. Aquellos experimentos cuyos resultados independientes mostraron una distribución normal, utilizando un test de normalidad (Shapiro-Wilk normality test), y homogeneidad de varianzas, utilizando el método

de Barlett (Barlett's test), se analizaron mediante un test ANOVA paramétrico (ordinary one-way ANOVA) y un post-test de comparaciones múltiples (Tukey-Kramer multiple comparisons test). Aquellos resultados que no mostraron una distribución normal o no presentaron homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante un test ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis test) y un post-test de comparaciones múltiples (Dunn's multiple comparisons test). Por otro lado, la significancia estadística de las diferencias de las medias entre dos grupos, se determinó utilizando un test t de Student para muestras no apareadas. Aquellos experimentos cuyos resultados independientes mostraron distribución normal (Shapiro-Wilk normality test) y homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante un test t paramétrico (Unpaired t test). Aquellos que mostraron distribución normal, pero varianzas no homogéneas, se analizaron mediante un test t paramétrico con la corrección de Welch (Unpaired t test, Welch corrected). Aquellos que no mostraron distribución normal, se analizaron mediante un test t no paramétrico (Mann-Whitney test). Los test estadísticos se realizaron mediante la utilización de los *softwares* GraphPad Prism 6.0 y GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Se consideró que valores de $p < 0,05$ indican una diferencia estadísticamente significativa.



INTRODUCCION

OBJETIVOS

MAT. Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISC. Y CONC.

“Te pasas años y años investigando y, de repente, das con un gran descubrimiento y eres consciente, por primera vez en tu vida, de que conoces algo que a esa misma hora y ese mismo día nadie más sabe” Judah Folkman.

1. CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, ULTRAESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICA DE EVs.

El estudio de la biología celular tumoral ha evidenciado la importancia de considerar a los tumores en forma integral, teniendo en cuenta las células que conforman el parénquima y el estroma, a la ECM, así como las interrelaciones y señales que se gatillan debido a la interacción célula epitelial-estroma [151]. Las células tumorales no comandan, por si mismas, la promoción de la enfermedad, sino que necesitan de otras células, ya sea residentes o reclutadas al entorno tumoral, que apoyan el mantenimiento de sus capacidades adquiridas, conformándose lo que se conoce como TME [1, 2]. Las células en el TME se comunican entre si a través de interacciones célula-célula, así como por mecanismos paracrinicos y endocrinicos que involucran diversas moléculas ya sea liberadas en forma soluble por las células, o bien empaquetadas en EVs. Los fibroblastos son una población abundante y heterogénea en el TME, participante de varios de los eventos asociados al desarrollo del tumor [152], y para el desarrollo de este trabajo fueron elegidos como célula representativa del estroma tumoral.

1.1. Las células tiroideas presentan una superficie rica en proyecciones de membrana

Se conoce que todas las células, tanto eucariotas como procariotas, son capaces de liberar EVs hacia el medio extracelular y que éstas participan como un mecanismo de intercambio de información en el TME [153]. En primer lugar, con el objetivo de evidenciar estructuras compatibles o similares en forma o tamaño a cuerpos multivesiculares/EVs en el interior celular o evaginaciones de membrana que pudieran representar la liberación de EVs, se analizó la ultraestructura de las células cultivadas en forma aislada o co-cultivadas con Fb, utilizándose TEM (sección 2.2.1 de materiales y métodos). La figura 16 muestra microfotografías obtenidas mediante TEM del co-cultivo de células TPC-1 y Fb. Mediante la utilización de esta metodología, no pudieron ser detectadas estructuras compatibles con cuerpos multivesiculares/EVs; sin embargo, la membrana plasmática de TPC-1 co-cultivadas con Fb se observó enriquecida en proyecciones de membrana, ya sea redondeadas (Fig. 16A, B, C) y/o estrechas "villi-like" (Fig. 16A, B), lo cual fue sugestivo de la liberación de EVs al medio extracelular. Resultados similares fueron obtenidos al analizar células TPC-1, 8505c y NThyOri cultivadas en forma aislada, así como en células 8505c y NThyOri co-cultivadas con los Fb (datos no mostrados). Por el contrario, los Fb mostraron una superficie celular más lisa, carente de proyecciones destacables, tanto al cultivarse en forma aislada como al ser co-cultivados con células TPC-1, así como con las demás líneas celulares tiroideas (Fig. 16D, Fb co-cultivados con células TPC-1).

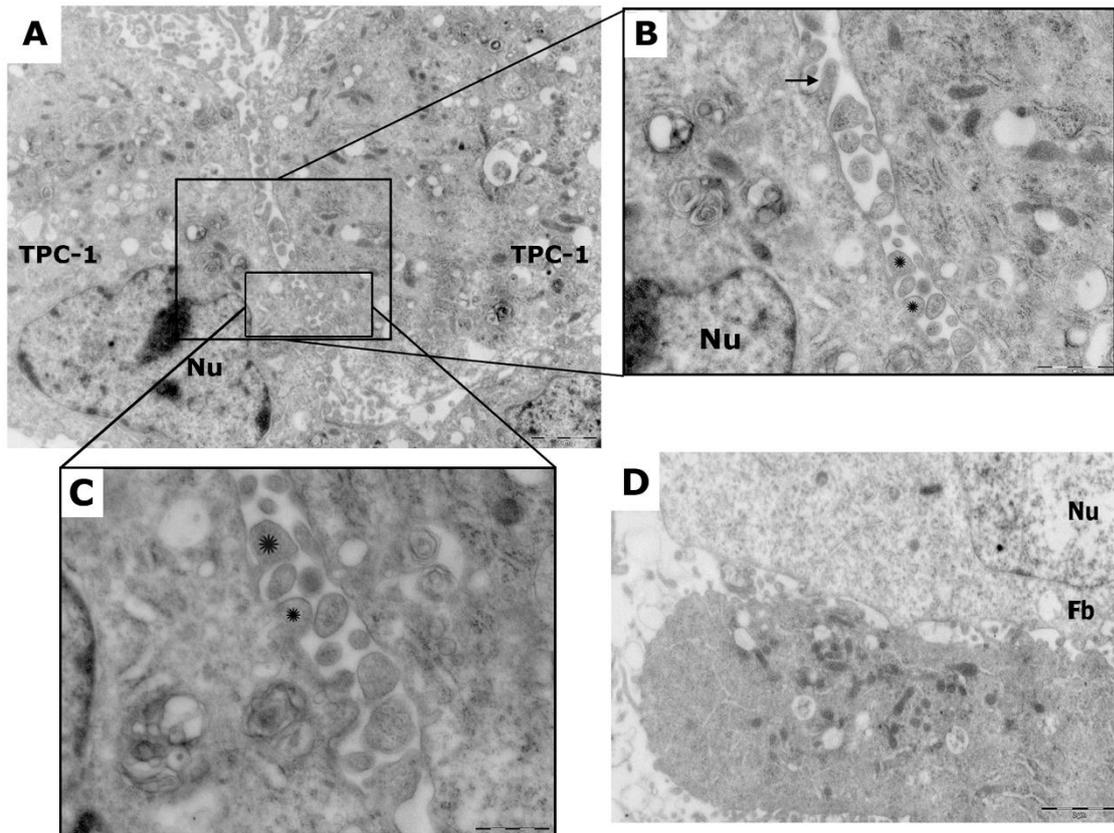


Figura 16. Microfotografías representativas de células TPC-1 co-cultivadas con Fb por TEM. (A) TPC-1 co-cultivadas con Fb; (B) se destacan las proyecciones de membrana *villi-like* (flecha) y (C) redondeadas (asteriscos) en las células TPC-1. (D) Se evidencia la superficie celular más lisa en Fb, en comparación a las células TPC-1. Las barras de escala representan: (A, D) 2µm, (B, C) 1µm. Nu: núcleo.

1.2. El *pellet* 100K de EVs, obtenido por ultracentrifugación diferencial de los CMs, es seleccionada como muestra representativa de las EVs

Es importante mencionar que no existe una técnica *gold standard*, sino que se han reportado varios protocolos y metodologías alternativas para el aislamiento de EVs. Para evidenciar la presencia de EVs en los CMs se siguieron los lineamientos establecidos en MISEV (2018) [47], realizándose la caracterización morfométrica de las EVs utilizando TEM y otras técnicas complementarias. Para ello, los CMs de los cultivos de Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri, así como de Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri fueron recolectados y procesados como se indica en la sección 2.2.2 de materiales y métodos. La figura 17 muestra la caracterización morfométrica mediante TEM de las EVs aisladas en los *pellets* 3K, 20K y 100K de EVs, así como de las EVs obtenidas por filtración (poro 0,22 µm) a partir de los CMs provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1. Este estudio permitió evidenciar la presencia de EVs en todas las fracciones analizadas (Fig. 17A, B, C, D). Tanto el *pellet* 20K (Fig. 17C), 100K (Fig. 2D), como el obtenido por filtración (dato no mostrado) se encuentran enriquecidos en EVs con un tamaño menor a 200nm o *small-EVs* (en un 90% o más) (Fig. 17E), encontrándose tanto de forma aislada como agrupadas. El *pellet* 3K de EVs presenta alrededor de un 20-30% de EVs con un tamaño mayor a 200nm o *large-EVs*, y el resto, corresponde a *small-EVs* que se co-aislan con estas

(Fig. 17A, B, E). Si bien existen *large-* y *small-EVs*, en casi todas las muestras, todas las fracciones presentan un enriquecimiento en *small-EVs*.

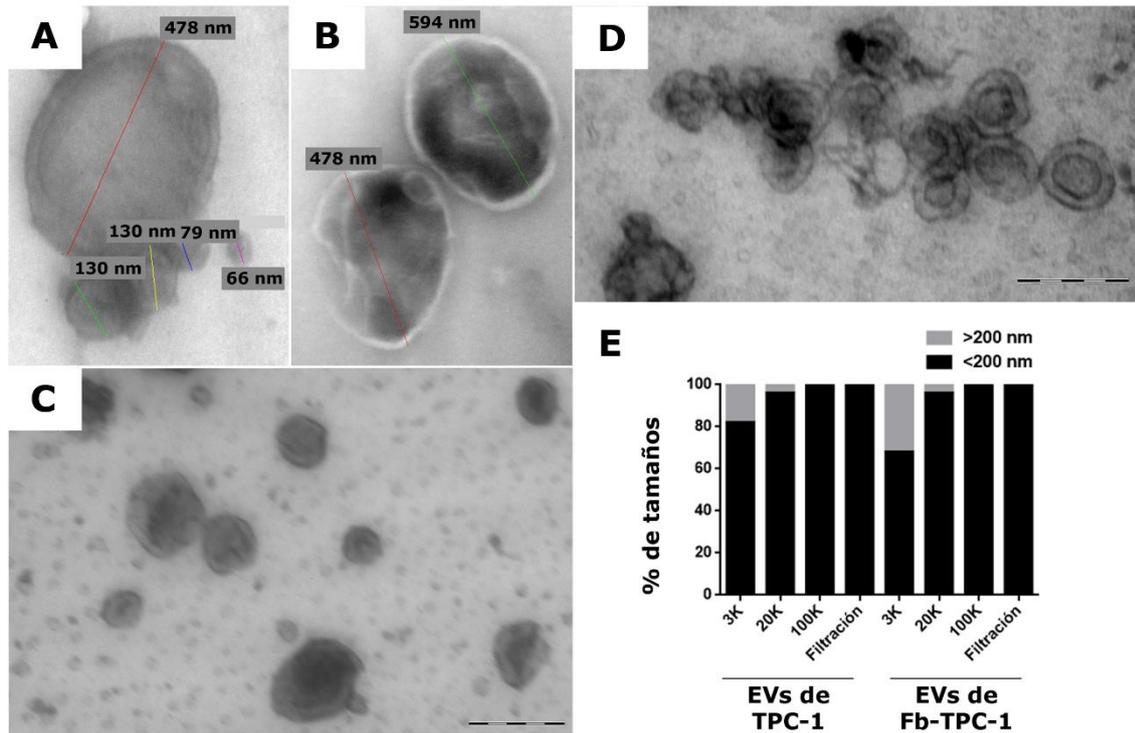


Figura 17. Microfotografías representativas del aislamiento de EVs a partir de CMs de células TPC-1 aisladas y co-cultivadas. Imágenes características de EVs (*pellet* 3K) provenientes de (A) TPC-1, (B) Fb-TPC-1, (C) *pellet* 20K, EVs provenientes de TPC-1 y (D) *pellet* 100K, EVs provenientes de TPC-1. En todas las muestras las EVs aparecen aisladas (C) y/o agrupadas (D). Se destaca la morfología distintiva tipo *cup-shaped* que adquieren las EVs al ser sometidas a su preparación necesaria para TEM. (E) Análisis morfométrico realizado por TEM de las EVS del *pellet* 3K, 20K y 100K, y del obtenido por filtración, provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1. La distribución porcentual de tamaños de EVs se determinó utilizando las microfotografías y el *software* ImageJ en dos experimentos independientes. Las barras de escala representan: (C, D) 200nm. 3K: 3.000x g, 20K: 20.000x g, 100K: 100.000x g, filtración: retenidas en membranas de 0,22 μ m de poro. EVs: vesículas extracelulares.

Para confirmar los resultados morfométricos obtenidos por TEM, se utilizó la metodología DLS, la cual permite determinar el tamaño promedio de las EVs así como su distribución poblacional (sección 2.3 de materiales y métodos). A través de esta metodología se obtienen gráficos de intensidad de dispersión relativa de la luz en función del diámetro. Como se observa en la figura 18A, el *pellet* 3K de EVs obtenidas de TPC-1, Fb-TPC-1, 8505c, Fb-8505c, NThyOri y Fb-NThyOri presenta principalmente dos poblaciones, una entre 400-650nm y otra de menor tamaño, entre 90-200nm, excepto para el caso de 8505c/Fb-8505c. Estos resultados están en consonancia con lo observado por TEM para el *pellet* 3K de TPC-1 y Fb-TPC-1, donde EVs de un tamaño menor a 200nm se encuentran incluso en el *pellet* 3K. Por otro lado, considerando los resultados obtenidos por TEM en EVs de TPC-1 y Fb-TPC-1, donde se observa una proporción similar de EVs del mismo tamaño tanto en el *pellet* 20K como en el obtenido por filtración, se decidió estudiar por DLS la fracción de EVs obtenidas por filtración como representativa de ambas subpoblaciones. Los resultados obtenidos en las muestras

provenientes de TPC-1, Fb-TPC-1, 8505c, Fb-8505c, NthyOri y Fb-NthyOri, mostraron la presencia de una población de EVs de menos de 200nm (*small-EVs*) en todas las muestras analizadas. Sólo el caso de NthyOri mostró una población extra de EVs de alrededor de 500-600nm (Fig. 18B). Sin embargo, es importante mencionar que los estudios mediante TEM evidenciaron la presencia de EVs agrupadas, las cuales podrían ser leídas por el equipo utilizado en DLS como una única partícula de gran tamaño. En conjunto, los análisis realizados por DLS estuvieron en consonancia con los obtenidos por TEM para TPC-1 y Fb-TPC-1, validando el uso de DLS como técnica confirmatoria y complementaria a la TEM.

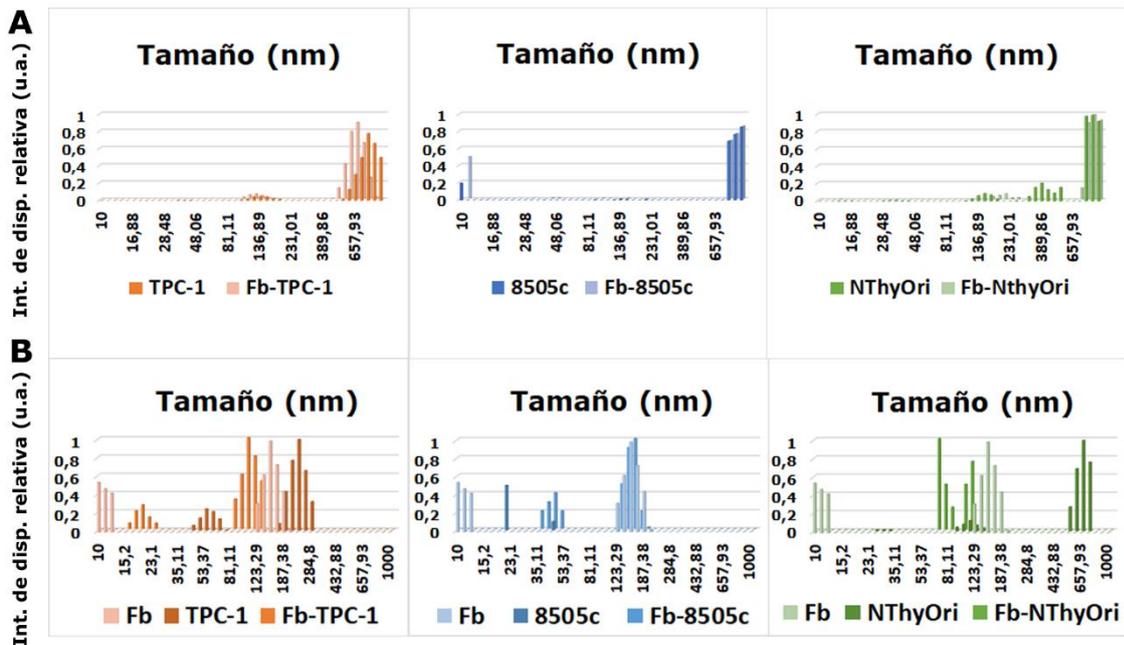


Figura 18. Análisis de la distribución de tamaños de EVs obtenidas de células tiroideas aisladas y co-cultivadas con Fb mediante DLS. (A) Distribución de tamaños de EVs (*pellet* 3K) provenientes de TPC-1, Fb-TPC-1, 8505c, Fb-8505c, NthyOri y Fb-NthyOri. **(B)** Distribución de tamaños de EVs retenidas en filtros de 0,22µm, provenientes de Fb, TPC-1, Fb-TPC-1, 8505c, Fb-8505c, NthyOri y Fb-NthyOri. Se destaca la co-existencia de *small-* y *large-EVs* en el *pellet* 3K y la presencia de solo *small-EVs* en el *pellet* obtenido por filtración. El procesamiento y análisis de los datos fue realizado con el *software* CW-380, para obtener gráficos de intensidad de dispersión relativa en función del diámetro (expresado en nanómetros). u.a.: unidades arbitrarias.

Los resultados obtenidos por DLS, en consonancia con lo observado por MET, confirmaron el enriquecimiento en *small-EVs* observado en el *pellet* 20K y el obtenido por filtración. Además, las fracciones 3K demostraron una mayor heterogeneidad, presentando *large-EVs* y *small-EVs*. En este sentido, se decidió eliminar la fracción 3K y realizar un solo paso de centrifugación posterior para obtener todas las EVs de la muestra (protocolo 3, sección 2.1 de materiales y métodos), optimizando el rendimiento y el tiempo por sobre la especificidad de la preparación. La figura 19 muestra imágenes representativas del *pellet* 100K de EVs, y su morfología característica “*cup-shaped*”, provenientes de TPC-1 (Fig. 19A), Fb-TPC-1 (Fig. 19B, C), 8505 (Fig. 19D), Fb-8505c (Fig. 19E), NthyOri (Fig. 19F) y Fb-NthyOri (Fig. 19G). La figura 19H muestra el análisis morfométrico realizado por TEM para las EVs obtenidas de los diferentes cultivos, observándose la presencia de un 80-100% de *small-EVs* en todas las muestras analizadas. Estos resultados evidenciaron que, en nuestro modelo, las fracciones de

EVs obtenidas por ultracentrifugación, a partir de Fb y células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas, están enriquecidas en *small-EVs*.

De esta manera se estableció la utilización del *pellet* 100K de EVs, obtenido por ultracentrifugación diferencial de los CMs, como muestra representativa de las EVs producidas por células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas con Fb para el desarrollo experimental de este trabajo de tesis, los que son mencionados como EVs a lo largo del mismo.

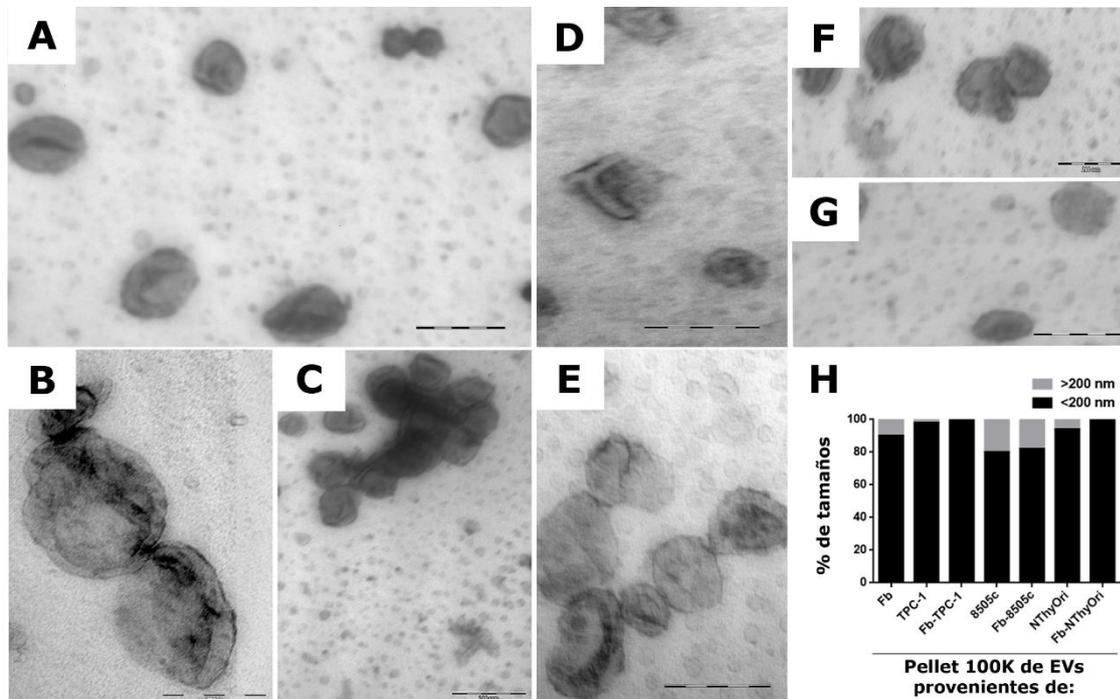


Figura 19. Análisis morfométrico del *pellet* 100K de EVs obtenidas de células tiroideas aisladas y co-cultivadas por TEM. Imágenes representativas de EVs provenientes de (A) TPC-1, (B, C) Fb-TPC-1, (D) 8505, (E) Fb-8505c, (F) NThyOri y (G) Fb-NThyOri. (H) Análisis morfométrico realizado por TEM de las EVs del *pellet* 100K provenientes de Fb, TPC-1, Fb-TPC-1, 8505c, Fb-8505c, NThyOri y Fb-NThyOri. Se destaca un enriquecimiento en *small-EVs*. La distribución porcentual de tamaños de las EVs en los análisis morfométricos se determinó utilizando microfotografías de dos experimentos independientes y el *software* ImageJ. Las barras de escala representan: 200nm. 100K: 100.000x g. EVs: vesículas extracelulares.

1.3. EVs liberadas por células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas con Fb presentan una distribución homogénea de tamaños entre 50-200nm

Con el objetivo de complementar la caracterización realizada por TEM de los *pellets* 100K de EVs en nuestro modelo, se utilizó la metodología conocida como NTA (sección 2.4 de materiales y métodos). Esta técnica proporciona información en tiempo real de la muestra analizada y permite medir la distribución de tamaños de las EVs entre 30-1000nm, mediante el fenómeno de dispersión de la luz. Los resultados obtenidos mostraron una distribución homogénea de tamaños en EVs, mayoritariamente por debajo de los 200nm, para las EVs obtenidas a partir de TPC-1, 8505c y NThyOri (Fig. 20A). Similares resultados se observaron para las EVs obtenidas de los co-cultivos, las que no mostraron diferencias en su distribución de tamaños con respecto a las obtenidas a partir de las células cultivadas en forma aislada. Una distribución más heterogénea se observó en EVs obtenidas a partir de Fb (Fig. 20B, C,

D). El análisis de la distribución de frecuencias de EVs en función del tamaño de las mismas ratificó que la mayor proporción de EVs se encuentra en el rango de 50 a 200nm en todas las muestras. A su vez, no evidenció diferencias significativas en la proporción de EVs, en un determinado rango de tamaños, entre las provenientes de células aisladas y co-cultivadas (Fig. 20E).

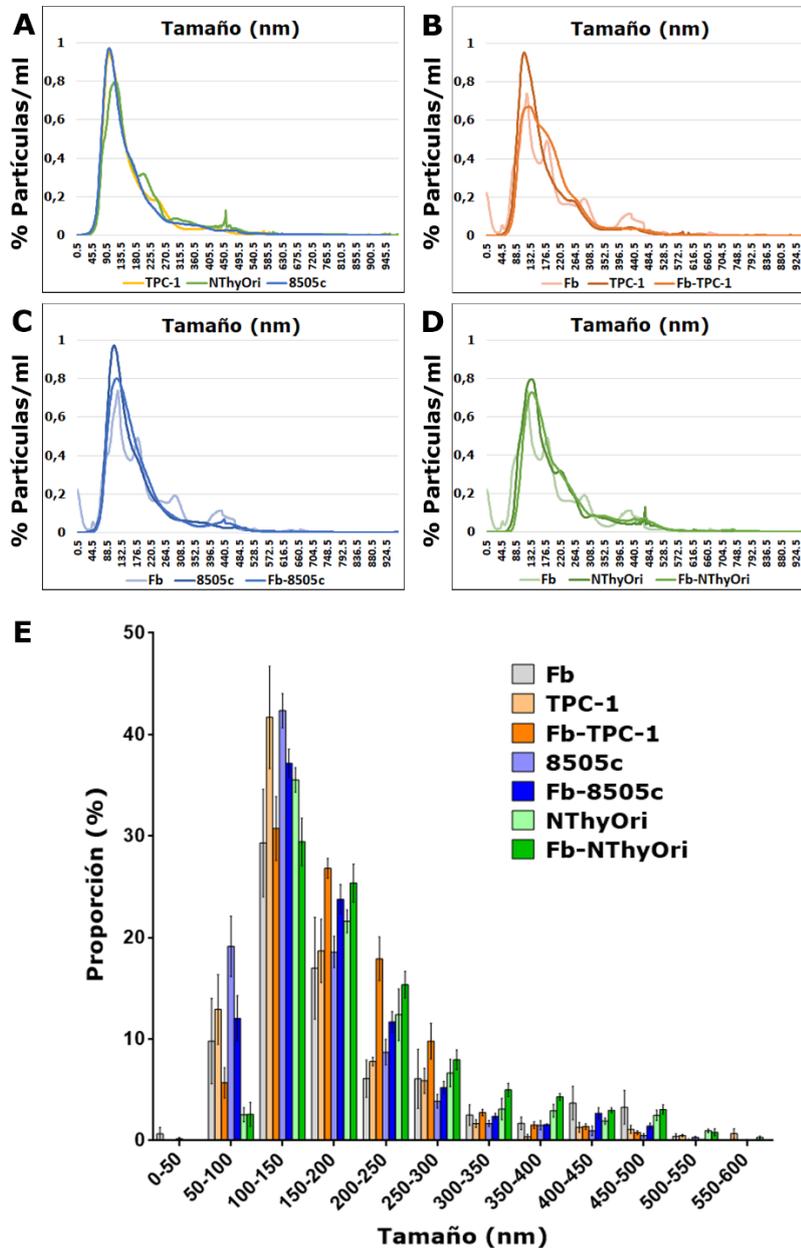


Figura 20. Análisis de la distribución de tamaños de EVs obtenidas de Fb y células tiroideas aisladas y co-cultivadas mediante NTA. Perfil de distribución de la proporción de partículas/ml en función del tamaño provenientes de (A) células tiroideas aisladas (B) Fb, TPC-1 y Fb-TPC-1; (C) Fb, 8505c y Fb-8505c; (D) Fb, NThyOri y Fb-NThyOri. (E) Distribución de frecuencia del % de EVs en función del tamaño obtenidas de Fb, células tiroideas aisladas y co-cultivadas. Se destaca principalmente la presencia de EVs con un tamaño entre 50-200nm. Los datos se expresaron como la media \pm SEM de la proporción de EVs, en cada intervalo, obtenidas a partir de cinco experimentos independientes (n=5).

1.4. El co-cultivo de Fb-TPC-1 evidencia un aumento significativo en el número de EVs en comparación al cultivo de Fb y TPC-1 aisladas

NTA es también una metodología cuantitativa que permitió determinar la cantidad de EVs/ml de muestra. El análisis del número de EVs liberadas por células co-cultivadas en relación a las células cultivadas en forma aislada evidenció que el número de EVs liberadas por Fb-TPC-1 aumentó significativamente en comparación a las EVs liberadas por Fb ($8,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$ vs. $2,9 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$; $p < 0,05$; Fb-TPC-1 vs Fb, respectivamente) y TPC-1 ($8,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^7$ vs. $2,7 \times 10^8 \pm 5,7 \times 10^7$; $p < 0,01$; Fb-TPC-1 vs. TPC-1, respectivamente) cultivadas en forma aislada. En el caso de 8505c, no se observan diferencias significativas en el número de partículas liberadas cuando ésta crece de forma independiente o en contacto con el Fb ($2,4 \times 10^9 \pm 8 \times 10^8$ vs. $1,4 \times 10^9 \pm 3,5 \times 10^8$; Fb-8505c vs. 8505c). Sin embargo, se observó un aumento significativo en relación a la cantidad liberada por Fb cultivados en forma aislada ($2,4 \times 10^9 \pm 8 \times 10^8$ vs. $2,9 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$; $p < 0,05$; Fb-8505c vs. Fb). No se observaron cambios significativos en el número de EVs liberadas en los cultivos de Fb y células NThyOri aisladas y/o co-cultivadas ($2,9 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$; $8,7 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^8$; $1,5 \times 10^9 \pm 5,8 \times 10^8$; Fb, NThyOri, Fb-NThyOri, respectivamente) (Fig. 21A). El análisis del número de EVs liberadas por las células cultivadas en forma aislada, mostró que 8505c produce una cantidad significativamente mayor de EVs que Fb ($1,4 \times 10^9 \pm 3,5 \times 10^8$ vs. $2,9 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$) y TPC-1 ($1,4 \times 10^9 \pm 3,5 \times 10^8$ vs. $2,7 \times 10^8 \pm 5,7 \times 10^7$) pero no así con respecto a NThyOri ($1,4 \times 10^9 \pm 3,5 \times 10^8$ vs. $8,7 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^8$) (Fig. 21B). Por otra parte, la comparación del número de EVs liberadas por células tiroideas co-cultivadas no mostró diferencias significativas entre Fb-TPC-1, Fb-8505c, y Fb-NThyOri (Fig. 21C). Por último, siguiendo los lineamientos de Webber y Clayton [134], se analizó la homogeneidad en la pureza entre las preparaciones de EVs obtenidas, dada por la relación entre el N° de partículas y los μg de proteínas totales de la muestra. El análisis de las EVs obtenidas de Fb, células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas mostró resultados similares entre todas las muestras analizadas (Fig. 21D).

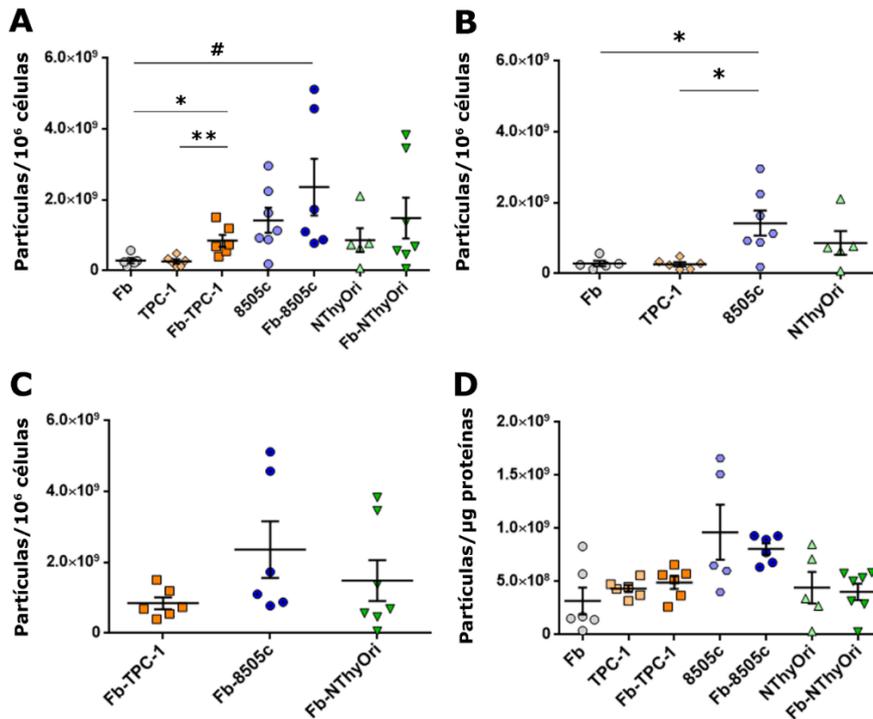


Figura 21. Cuantificación del N° de EVs provenientes de Fb y células tiroideas aisladas y co-cultivadas mediante NTA. N° de EVs/ 10^6 células productoras, presentes en el *pellet* 100K y liberadas a partir de **(A)** Fb, TPC-1, Fb-TPC-1, 8505c, Fb-8505c, NThyOri, Fb-NThyOri. **(B)** Fb y células tiroideas aisladas, **(C)** Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri. **(D)** Pureza de las preparaciones de EVs. Una cantidad significativamente mayor de EVs se liberaron a partir de Fb-TPC-1 con respecto a TPC-1 y Fb (** $p < 0.01$, * $p < 0,05$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test), Fb-8505c con respecto a Fb (# $p < 0,05$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test) **(A)** y a partir de 8505c con respecto a TPC-1 y a Fb (* $p < 0,05$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test) **(B)**. Los datos se expresan como la media \pm SEM de cinco experimentos independientes ($n=5$). EVs: vesículas extracelulares. μ g: microgramo.

1.5. Las EVs liberadas por Fb, células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas presentan marcadores de "exosomas clásicos"

Dado que el tamaño de las EVs es necesario pero no suficiente para definir a un subtipo de EVs en particular y que es conocido que ninguna técnica de purificación permite aislar un tipo específico de las mismas [52], la búsqueda de marcadores bioquímicos para su identificación constituye un área activamente explorada. Sin embargo, no ha sido posible aún establecer marcadores específicos o universales que permitan identificar exclusivamente a EVs de origen endosomal, de otras *small-EVs* provenientes de membrana plasmática [47]. Los lineamientos consensuados en MISEV 2018 [47], definen distintas categorías de marcadores proteicos a estudiar en EVs. Entre estas, es fundamental demostrar su presencia en las preparaciones, analizando al menos una proteína de las categorías 1 y 2. Adicionalmente, marcadores correspondientes a la categoría 4 son importantes de analizar en EVs, dado que no deberían estar presentes en *small-EVs*, ya sea de origen endosomal o de membrana plasmática, y corresponde a proteínas de retículo endoplásmico, complejo de Golgi, entre otras. En la figura 22 se muestran imágenes representativas de las diferentes proteínas estudiadas por western blot en EVs, siguiendo la metodología descrita en la sección 6.1 de materiales y métodos. En primer lugar, se observó un enriquecimiento de CD63, CD9 (categoría 1a y b), FLOT-1 y CAV-

1 (categoría 2a) en EVs respecto a los lisados celulares correspondientes. CD63 se evidenció enriquecido en EVs de Fb-TPC-1 y Fb-8505c en comparación a los resultados obtenidos en EVs provenientes de los cultivos de Fb, TPC-1 y 8505c, así como de NThyOri y Fb-NThyOri. Por otra parte, CD9 y CAV-1 se hallan enriquecidas en EVs provenientes de Fb-8505c con respecto a EVs obtenidas de sus cultivos aislados. Además, es importante destacar que no se observó la expresión de proteínas intracelulares como ser GRP78 (marcador de retículo endoplásmico), GM130 (marcador de complejo de golgi) (categoría 4) en las preparaciones de EVs, lo que confirma la ausencia de contaminación con *debris* celular. Finalmente, siguiendo los lineamientos establecidos por Jeppesen y col. [53] para la clasificación de "exosomas clásicos" y "exosomas no clásicos", y considerando la expresión de CD63, CD81 y CD9, podemos concluir que las EVs se muestran enriquecidas en aquellas referenciadas como "exosomas clásicos" (Fig. 19).

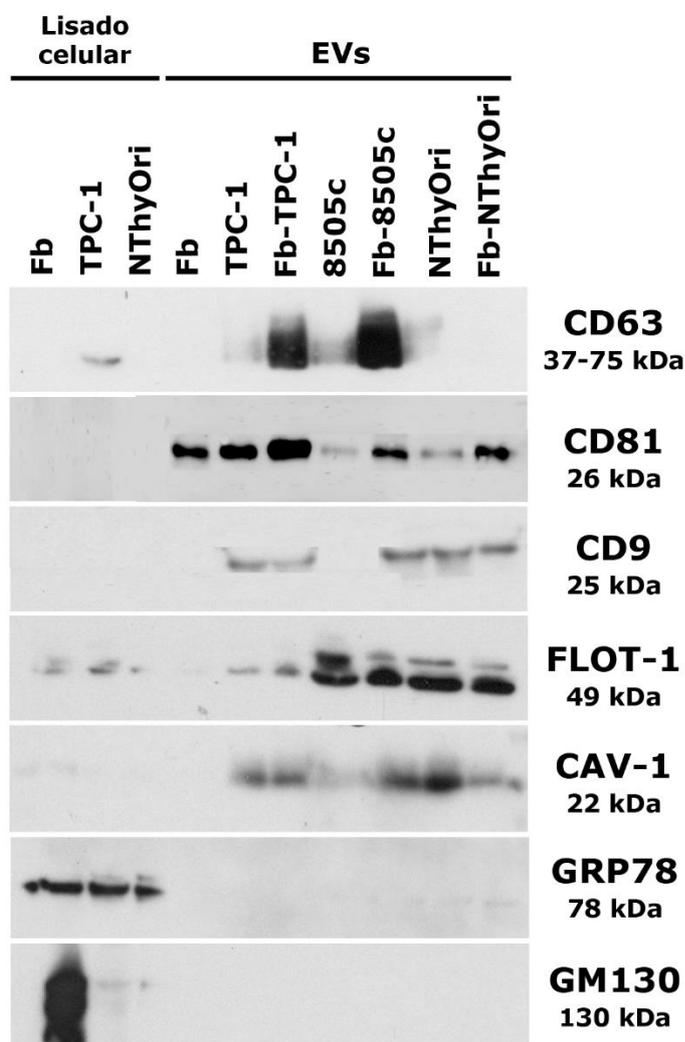


Figura 22. Las EVs presentan un enriquecimiento en marcadores de "exosomas clásicos". Western blots representativos de las distintas proteínas estudiadas: CD63, CD81, CD9, FLOT-1, CAV-1, GRP78 y GM130. GRP78 es característica de retículo endoplasmático y GM130 de complejo de Golgi, estas se utilizan como controles negativos en EVs para confirmar la ausencia de contaminación con *debris* celular. EVs: vesículas extracelulares. kDa: kilodaltons.

I. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados descritos en este capítulo se concluye que:

- Fb, células tiroideas aisladas y co-cultivadas liberan EVs a los CMs, las que son aisladas mediante ultracentrifugación diferencial, lo que permite obtener el *pellet* 100K de EVs (referenciadas como EVs a lo largo del resto del trabajo). Esta elección favorece el rendimiento y el tiempo por sobre la especificidad de la preparación.
- El *pellet* de EVs está enriquecido en *small-EVs*, las que presentan un tamaño entre 50-200nm en todas las muestras analizadas.
- Fb-TPC-1 libera una cantidad significativamente mayor de EVs en relación a las EVs obtenidas a partir de Fb y TPC-1 aisladas. Se observó una tendencia similar en Fb-8505c respecto a Fb y 8505c aisladas, mientras que no se obtuvieron diferencias entre EVs liberadas por Fb-NThyOri vs. NThyOri.
- El número de EVs liberadas por los co-cultivos Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri no mostró diferencias significativas.
- El *pellet* de EVs está enriquecido en EVs referenciadas como "exosomas clásicos".

2. CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS EVs Y POSIBLES FUNCIONES BIOQUÍMICAS EN EL TME

Las tecnologías ómicas junto a la utilización de herramientas analíticas de alto rendimiento (“*high throughput*”) y el uso de la bioinformática, permiten el análisis, caracterización e interpretación de grandes conjuntos de datos obtenidos a partir de muestras complejas. Como ya se mencionó, la participación de las EVs como mediadoras de la comunicación intercelular en el TME está ampliamente reportada [66]. En nuestro modelo de estudio, Fb, células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas con Fb liberan EVs a CMs (Capítulo 1 de Resultados). Además, otros hallazgos en el modelo muestran que factores presentes en los CMs obtenidos del co-cultivo de Fb con células tumorales tiroideas inducen un fenotipo migratorio en las células tumorales, produciendo cambios en la motilidad celular. Sin embargo, este fenómeno no se observa al utilizar CMs de células tumorales tiroideas aisladas o de células no tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb (sección introducción). Considerando estos antecedentes, es factible hipotetizar que modificaciones cualitativas o cuantitativas en el cargo de las EVs, podrían reflejarse en los cambios funcionales observados en el entorno en el que se liberan. De esta manera, se planteó estudiar el proteoma de las EVs obtenidas a partir de los diferentes cultivos del modelo experimental, y analizar si la presencia del Fb produce modificaciones en la calidad bioquímica de éstas.

2.1. Más del 90% de las proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs se encuentran descritas en las bases de datos de EVs

EVs obtenidas de CMs de Fb, células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas fueron digeridas en solución y analizadas por espectrometría de masas de alta resolución (nLC-MS/MS) (sección 3.1 de materiales y métodos). Los resultados obtenidos permitieron identificar 1977 proteínas (1% FDR), con dos o más péptidos únicos en todas las muestras de EVs, en al menos dos de los tres replicados biológicos (sección 3.2 de materiales y métodos). ExoCarta y Vesiclepedia son dos bases de datos que albergan información acerca de las macromoléculas descritas en las EVs. Con el objetivo de determinar la inclusión/exclusión de las proteínas presentes en las muestras de EVs de los cultivos en las anotaciones contenidas en estas bases de datos, se comparó las 1977 proteínas obtenidas con el total y con las 100 proteínas más frecuentemente publicadas en Vesiclepedia y ExoCarta (sección 3.4.1 de materiales y métodos). En la figura 23 se muestran los diagramas de Venn obtenidos al realizar ambas comparaciones. Un 90% de las proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs han sido descritas en la base de datos ExoCarta y 95 de las 100 proteínas de exosomas, más frecuentemente identificadas y catalogadas en ExoCarta, están presentes en las muestras de EVs. Las 5 proteínas restantes corresponden a actina citoplasmática B, proteína relacionada con Ras RAB-1A, proteína relacionada con Ras RAP-1b, tubulina α cadena 1A y tubulina α cadena 1B (Fig. 23A). Por otro lado, un 98% de las proteínas observadas y cuantificadas en las EVs han sido descritas en la base de datos Vesiclepedia y 97 de las 100 proteínas más frecuentemente identificadas y catalogadas en esta base de datos están presentes en las muestras de EVs. Las 3 proteínas restantes corresponden a actina citoplasmática B, proteína relacionada con Ras RAP-1b y

tubulina β cadena 4B (Fig. 23B). Estos resultados sugieren que las preparaciones obtenidas están enriquecidas en EVs.

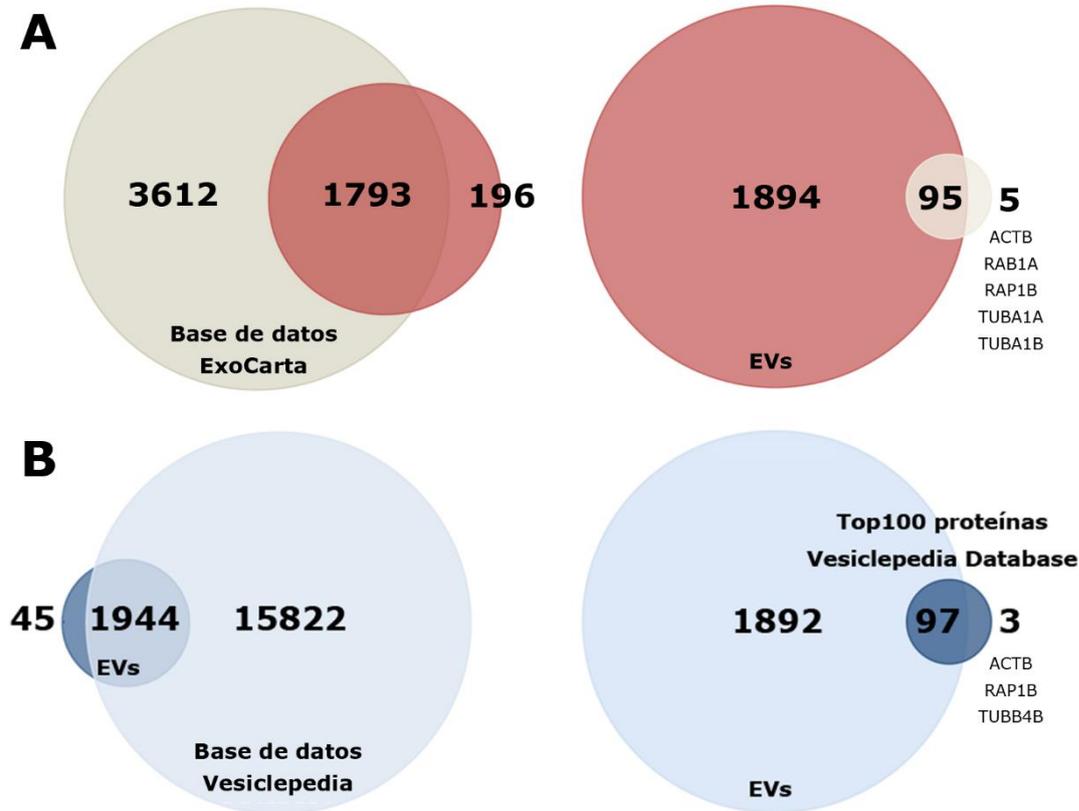


Figura 23. Representación comparativa de las proteínas identificadas en EVs y las descritas en bases de datos. Diagramas de Venn que muestran el solapamiento entre las proteínas identificadas en EVs con respecto a todas las proteínas reportadas y las 100 más frecuentes, disponibles en la base de datos Exocarta **(A)** y Vesiclepedia **(B)**. ACTB: actina citoplasmática B; RAB1A: Ras-related protein RAB-1A; RAP1B: Ras-related protein RAP-1B, TUBA1A: tubulina α cadena 1A; TUBA1B: tubulina α cadena 1B; TUBB4B: tubulina β cadena 4B.

2.2. Las proteínas identificadas en las EVs están enriquecidas en componentes celulares relacionados a exosomas/EVs

La base de datos *Gene Ontology* (GO) provee un vocabulario controlado para clasificar genes y sus productos asociados, según términos relacionados a los componentes celulares a los que pertenecen (GO:CC), la función biológica (GO:BP) y molecular (GO:MF) que desempeñan, para así determinar las posibles funciones en las que se encuentran implicadas (sección 3.4.2 de materiales y métodos). Con el objetivo de clasificar a las 1977 proteínas identificadas y cuantificadas en las distintas muestras de EVs según los componentes celulares a los que se asocian, se realizó un análisis de enriquecimiento para GO:CC utilizando FunRich y DAVID. En la figura 24A se observa que los componentes celulares más destacados y significativos fueron exosomas (45%), membrana (32%), citosol (53%), adhesiones focales (11%) y colágeno contenido en la ECM (7,4%). Otras categorías indican a proteínas de la matriz extracelular, región extracelular y núcleo. Por otro lado, los análisis obtenidos mediante DAVID muestran enriquecimientos semejantes, relacionados a EVs, uniones celulares, matriz

extracelular y citosol (Fig. 24B). Estos resultados confirman que las preparaciones obtenidas a partir de los diferentes cultivos celulares corresponden a EVs.

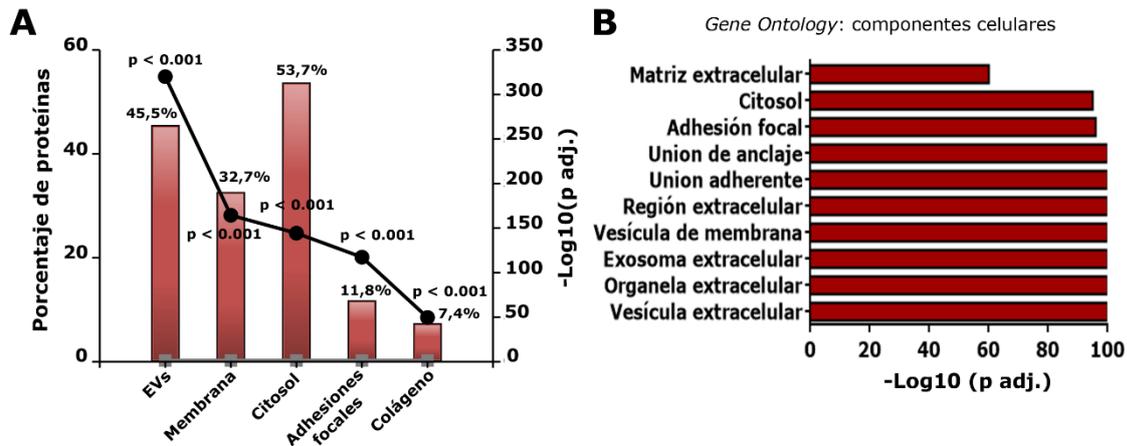


Figura 24. Las proteínas identificadas en las EVs presentan un enriquecimiento en la categoría de EVs/exosomas. (A) Análisis de enriquecimiento de componentes celulares (GO:CC) del proteoma de las EVs con un $p < 0.001$, con corrección FDR Benjamini-Hochberg por múltiples pruebas, realizado con FunRich y utilizando el genoma humano de *uniprot* como *background*. **(B)** Análisis de enriquecimiento de componentes celulares (GO:CC) del proteoma de las EVs representando el $-\log_{10}(p \text{ adj.})$ realizado con DAVID. $p \text{ adj.}$: p-valor ajustado, corregido mediante el test Benjamini-Hochberg.

2.3. Las EVs posibilitan la liberación al medio extracelular de proteínas que carecen de péptido señal

Las diferentes proteínas pueden ser liberadas por las células a través de vías de secreción clásicas y no clásicas. La vía de secreción clásica es utilizada por aquellas proteínas que contienen un péptido señal amino terminal, e involucra el transporte a través del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, hasta la llegada a su destino [154, 155]. Sin embargo, otras proteínas que no presentan el péptido señal pueden ser transportadas a través de vías de secreción no clásicas, es decir, independientes del sistema retículo endoplásmico/golgi. Dentro de estas vías no clásicas, uno de los mecanismos de secreción lo constituyen las EVs [156]. Con el objetivo de evidenciar si en nuestro modelo las EVs transportan proteínas que carecen de péptido señal, se realizó un análisis mediante el *software* Signal P 4.1 (sección 3.4.3 de materiales y métodos), el que permite predecir la presencia del péptido señal en la secuencia polipeptídica de la proteína en cuestión. El análisis realizado evidenció que el 22% de las proteínas descritas en las EVs presentan péptido señal, lo que permite suponer que en el caso de no ser liberadas por las células en EVs, estas proteínas utilizarían la vía secretoria clásica para liberarse al medio extracelular. El 78% de las proteínas restantes corresponden a proteínas que no presentan péptido señal en su secuencia polipeptídica. Sugiriendo que en nuestro modelo las EVs posibilitan la liberación al medio extracelular de proteínas que carecen de péptido señal.

La base de datos UniProt es el repositorio central de información referida a proteínas. Este repositorio contiene información muy variada, como estructura, funcionalidad, localización subcelular, expresión, interacciones, secuencia y homologías, entre otras. Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs, estas

fueron analizadas utilizando la base de datos UniProt. Los resultados obtenidos evidenciaron que un 28% de las proteínas presentes en las EVs poseen actividad catalítica, es decir, se comportan como enzimas. Un 12 % recibe algún tipo de regulación postraduccional sobre su actividad y un 50% presenta algún tipo de modificación postraduccional (PTM, por sus siglas en inglés), de las cuales un 27% corresponde a glicosilación.

2.4. El perfil proteico de las EVs discrimina las muestras obtenidas de células aisladas y co-cultivadas, distinguiendo a su vez a EVs provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1 del resto de las muestras

Una vez determinado que las proteínas identificadas y cuantificadas corresponden a preparaciones de EVs, se llevaron a cabo diferentes análisis tendientes a su caracterización. El *clustering* jerárquico no supervisado consiste en un análisis estadístico que agrupa datos según la homogeneidad entre ellos, de manera tal que aquellos considerados similares, es decir, sin la necesidad de etiquetas previas, son asignados a un mismo *cluster* y aquellos diferentes se localizan en *clusters* distintos. Es así que determinados *softwares* o lenguajes bioinformáticos, como R v3.3.2, utilizan diferentes algoritmos matemáticos para calcular distancias que determinan si los datos son o no agrupables por similitud. En su representación gráfica o estructura, en forma de árbol, denominada dendograma, las ramas inferiores son englobadas dentro de *clusters* por las ramas superiores. Se llevó a cabo un análisis de *clustering* jerárquico no supervisado, a partir de las intensidades de las proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs, con el objetivo de evaluar la segregación/discriminación de los datos. Para esto, las proteínas presentes en las EVs, de cada una de las 21 muestras analizadas, fueron ordenadas según su valor de intensidad promedio y las 100 proteínas que presentaron mayor intensidad se analizaron mediante el paquete *pheatmap_1.0.12* en el entorno de R (sección 3.4.4 de materiales y métodos). En la figura 25A, el espectro de colores o *heatmap* es usado para representar patrón de intensidad de expresión de las proteínas. El análisis de las proteínas en EVs permite separar al Fb del resto de las líneas celulares tiroideas y sus co-cultivos. A su vez, las proteínas identificadas en las EVs de TPC-1 y Fb-TPC-1 separan a este grupo de células de las EVs provenientes de NThyOri, Fb-NThyOri, 8505c y Fb-8505c. Este análisis mostró también el agrupamiento de los triplicados biológicos de las células tiroideas aisladas y de las co-cultivadas con Fb, evidenciando una buena reproducibilidad del patrón de expresión de proteínas, característico para cada situación de cultivo. Finalmente, la reproducibilidad metodológica entre las muestras, la ausencia de *outliers*, así como la robusta segregación entre TPC-1/Fb-TPC-1 con respecto a 8505c/Fb-8505c y NThyOri/Fb-NThyOri se confirmó mediante PCoA (paquete *limma_3.48.3*), utilizando el top-100 de proteínas mencionadas anteriormente (Fig. 25B). En conclusión, el análisis de *clustering* jerárquico no supervisado agrupa por separado a las EVs obtenidas a partir de las células tiroideas co-cultivadas con respecto a las células cultivadas en forma aislada y distingue a las EVs provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1 del resto de las EVs provenientes de las líneas celulares tiroideas y sus co-cultivos.

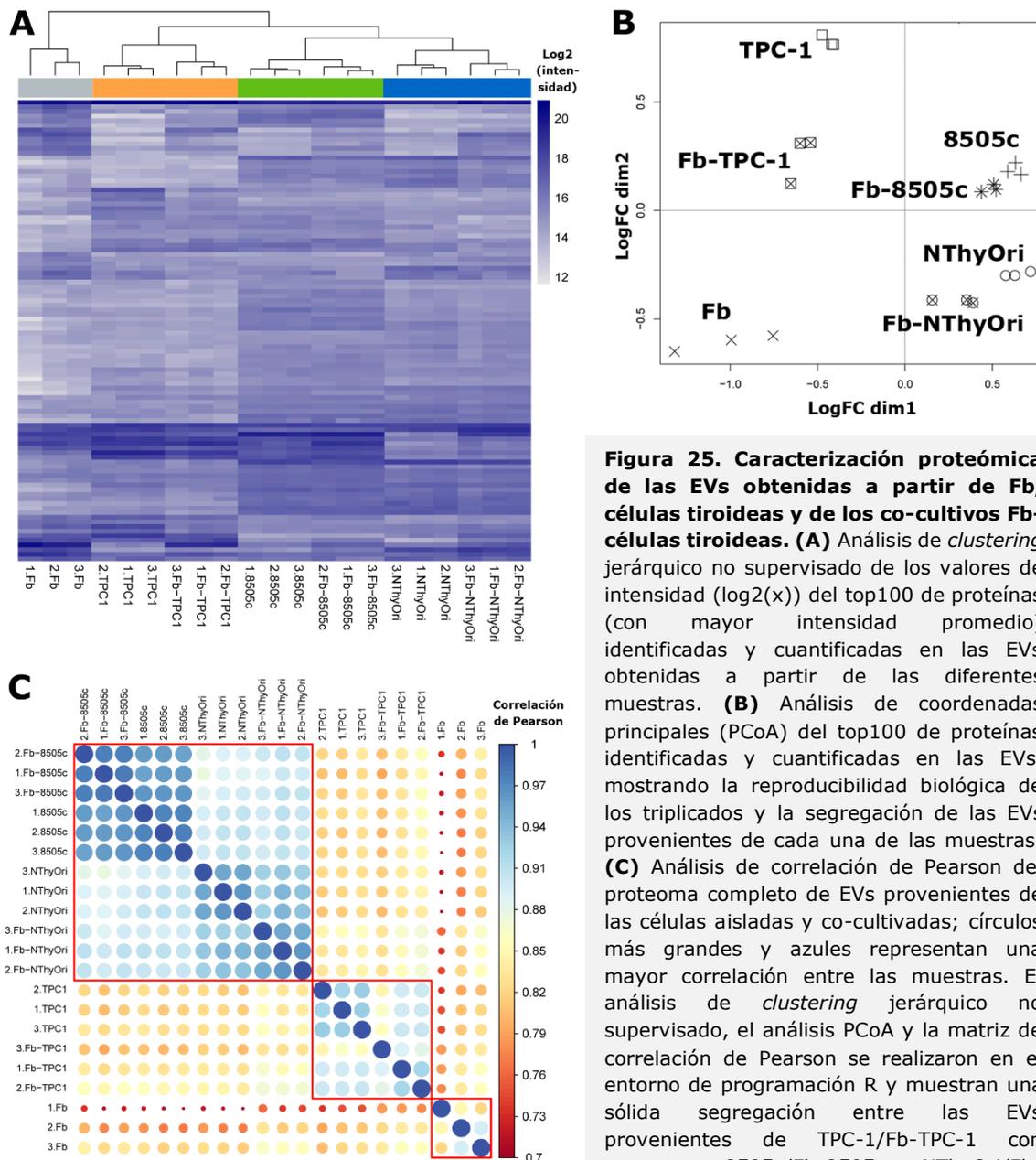


Figura 25. Caracterización proteómica de las EVs obtenidas a partir de Fb, células tiroideas y de los co-cultivos Fb-células tiroideas. (A) Análisis de *clustering* jerárquico no supervisado de los valores de intensidad ($\log_2(x)$) del top100 de proteínas (con mayor intensidad promedio) identificadas y cuantificadas en las EVs obtenidas a partir de las diferentes muestras. **(B)** Análisis de coordenadas principales (PCoA) del top100 de proteínas identificadas y cuantificadas en las EVs, mostrando la reproducibilidad biológica de los triplicados y la segregación de las EVs provenientes de cada una de las muestras. **(C)** Análisis de correlación de Pearson del proteoma completo de EVs provenientes de las células aisladas y co-cultivadas; círculos más grandes y azules representan una mayor correlación entre las muestras. El análisis de *clustering* jerárquico no supervisado, el análisis PCoA y la matriz de correlación de Pearson se realizaron en el entorno de programación R y muestran una sólida segregación entre las EVs provenientes de TPC-1/Fb-TPC-1 con respecto a 8505c/Fb-8505c y NThyOri/Fb-NThyOri; así como la discriminación entre las EVs de las células tiroideas aisladas con respecto a EVs provenientes de sus co-cultivos.

2.5. El proteoma de EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1 muestra una mayor variabilidad en comparación a Fb-8505c vs 8505c y Fb-NThyOri vs NThyOri

Los análisis de correlación permiten determinar la relación entre dos datos o conjuntos de datos. Una matriz de correlación considerando las intensidades de todas las proteínas identificadas en EVs de los distintos tipos celulares, brindará información sobre el grado de similitud entre los conjuntos estudiados. Con el objetivo de determinar el grado de similitud entre los diferentes tipos celulares y condiciones de cultivo, utilizando los niveles de expresión de todas las proteínas presentes en las EVs, se realizó una matriz de correlación (paquete

corrplot_0.90) y un análisis de *clustering* jerárquico no supervisado (sección 3.4.4 de materiales y métodos). Como se observa en la figura 25C, se obtuvieron valores de R altos ($> 0,83$) al analizar los triplicados biológicos para las 21 muestras de EVs estudiadas. Por otra parte, el análisis de los valores de correlación mostró una similitud estrecha entre los datos proteómicos de EVs obtenidas de Fb-8505c y Fb-NThyOri con los datos obtenidos de sus correspondientes células aisladas ($R=0,96$ y $0,93-0,95$, respectivamente). Sin embargo, aunque una alta correlación se detectó también entre los datos proteómicos de EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1, los valores de correlación obtenidos fueron inferiores ($R=0,85-0,91$) a los obtenidos con los otros tipos celulares. De manera interesante, el análisis de *clustering* jerárquico no supervisado de los valores de correlación mostró el mismo patrón de *clustering* que los obtenidos anteriormente con los valores de intensidad (sección 2.4), lo que sugiere que existen patrones de expresión característicos que identifican a las EVs de los diferentes tipos celulares y sus co-cultivos. Con estos resultados se pudo concluir que el proteoma de las EVs de Fb-8505c y Fb-NThyOri muestra una correlación/similitud estrecha con el proteoma de las EVs obtenidas a partir de sus células tiroideas aisladas (8505c y NThyOri, respectivamente). Para el caso de Fb-TPC-1 vs TPC-1, aunque también existe una correlación alta, el co-cultivo de TPC-1 con Fb proporcionaría una fuente adicional de variabilidad.

2.6. EVs provenientes del co-cultivo Fb-célula tumoral tiroidea participan de la remodelación de la ECM

Con el objetivo de evidenciar e identificar los procesos biológicos, funciones moleculares y/o rutas metabólicas en las que las DEPs se encuentran implicadas, se realizó el análisis ORA, tal como se describe en la sección 3.6 de materiales y métodos. Para ello, a partir del análisis estadístico mediante DEqMS (sección 3.5 de materiales y métodos) y seleccionando filtros estrictos para asegurar la significancia biológica, tales como un $p \text{ adj.} < 0,001$ y un $FC \geq 2$, se obtuvo la lista de DEPs utilizada en el análisis.

2.6.1. El Fb aportaría una ventaja funcional a las EVs provenientes de Fb-TPC-1

En una primera instancia se compararon las proteínas identificadas y cuantificadas en EVs provenientes de células TPC-1 vs. NThyOri. El análisis DEqMS y los filtros mencionados arrojaron 53 DEPs (Tabla 6 y anexo tabla 1.A), que están implicadas en una amplia variedad de funciones ($p < 0,001$) (secciones 3.6.1 y 3.6.1.1 de materiales y métodos) tales como: la interacción y organización de la ECM, señalización por MET y PTK2, unión a laminina de matriz, degranulación de plaquetas, metabolismo del heparan sulfato/heparina, entre otras (Fig. 26A). A continuación, se realizó el análisis entre las proteínas identificadas y cuantificadas en EVs provenientes de Fb-TPC-1 con respecto a Fb-NThyOri, el que mostró 31 DEPs (Tabla 6 y anexo tabla 2.A). A diferencia de lo observado en el estudio de EVs provenientes de células TPC-1 y NThyOri aisladas, el análisis de enriquecimiento ($p < 0,001$) mostró una convergencia particular en funciones relacionadas a la remodelación y degradación de la ECM, su organización, estructura y adhesión, entre otras (Fig. 26B). A continuación, se estudiaron las PPI de las 31 DEPs obtenidas al comparar Fb-TPC-1 vs Fb-NThyOri, las que se analizaron y

representaron utilizando String-db y Cytoscape (sección 3.6.2 de materiales y métodos). 21 de las 31 DEPs estudiadas mostraron interacción significativa ($PPI\ score=1 \times 10^{-16}$), utilizando un nivel de confianza alto, es decir $>0,7$ (Fig. 27A). Además, utilizando la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) se evidenció la participación de las proteínas en vías relacionadas a interacción receptor-ECM ($FDR=1,13 \times 10^{-13}$), en concordancia con lo mencionado anteriormente. Otras funcionalidades evidenciadas en el análisis fueron adhesión focal ($FDR=5,15 \times 10^{-9}$) y la vía de señalización PI3K-Akt ($FDR=3,37 \times 10^{-7}$). Entre las 21 proteínas que presentaron PPI significativo pudimos evidenciar a CD63, sintenina-1 (SDCBP), activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA o PLAU), ITGA3, LAMC1, TNC, entre otras, que se muestran enriquecidas en EVs provenientes de Fb-TPC-1 vs Fb-NThyOri y corresponden a proteínas relacionadas con la promoción tumoral. Por su parte, CD63 y sintenina-1 están implicadas en la biosíntesis de ciertas subpoblaciones de EVs [54, 157] y, por lo tanto, podrían ser utilizadas para la identificación y obtención de ciertas EVs.

Tabla 6. Número de DEPs en EVs obtenidas con el método DEqMS

DEPs (p. adj < 0,001 and FC ≥ 2)			
EVs de células tiroideas aisladas			
Comparación TPC-1 & NThyOri (Table A1)		Comparación 8505c & NThyOri (Table A3)	
A. DEPs en EVs de TPC-1	B. DEPs en EVs de NThyOri	A. DEPs en EVs de 8505c	B. DEPs en EVs de NThyOri
53	171	33	7
EVs de Fb-células tiroideas			
Comparación Fb-TPC-1 & Fb-NThyOri (Table A2)		Comparación Fb-8505c vs Fb-NThyOri (Table A4)	
A. DEPs en EVs de Fb-TPC-1	B. DEPs en EVs de Fb-NThyOri	A. DEPs en EVs de Fb-8505c	B. DEPs en EVs de Fb-NThyOri
31	111	41	9

El método DEqMS, con corrección FDR Benjamini-Hochberg por múltiples pruebas, se aplicó utilizando el paquete DEqMS 1.10.0 de Bioconductor en el *software* R para obtener DEPs con un p adj. < 0,001 y $FC \geq 2$ entre las diferentes comparaciones seleccionadas. DEPs: proteínas diferencialmente enriquecidas. Adj. p: *p-value* ajustado.

2.6.2. El Fb no aportaría una ventaja funcional a las EVs generadas por Fb-8505c vs 8505c

El análisis estadístico de las proteínas identificadas y cuantificadas en EVs obtenidas de células 8505c con respecto a NThyOri, dio como resultado 33 DEPs con un p adj. < 0,001 y $FC \geq 2$ (Tabla 6 y anexo tabla 3.A). El análisis ORA ($p < 0,001$) (secciones 3.6.1 y 3.6.1.1 de materiales y métodos) evidencia a estas proteínas confluyendo en dos funciones principales: organización, interacción y degradación de la ECM, y la unión a diversas moléculas, como factores de crecimiento, integrinas y glicosaminoglicanos (Fig. 26C). El análisis comparativo de las proteínas presentes en EVs provenientes de Fb-8505c con respecto a Fb-NThyOri, detectó 41 DEPs en Fb-8505c con un p adj. < 0,001 y $FC \geq 2$ (Tabla 6 y anexo tabla 4.A). En este caso, el análisis ORA mostró resultados semejantes a los obtenidos en el estudio de las DEPs de EVs provenientes de células 8505c aisladas (Fig. 26D). Además, es interesante

mencionar que al realizar el análisis de enriquecimiento con un $p < 0,01$ (significativo, aunque menos restrictivo que el mostrado anteriormente) se evidenció la participación de las EVs en procesos relacionados a regulación del cierre de herida/motilidad celular (imagen no mostrada), en concordancia con los antecedentes descritos para este tipo celular en la sección de introducción. Por último, el estudio de las PPI mostró interacciones significativas ($PPI\ score=8,6 \times 10^{-11}$) entre 25 de las 41 DEPs analizadas, utilizando un nivel de confianza alto $>0,7$ (Fig. 27B). Además, utilizando la base de datos KEGG se corroboraron los resultados obtenidos previamente, mostrando la participación de las proteínas en vías relacionadas a interacción receptor-ECM ($FDR=1,4 \times 10^{-11}$), adhesión focal ($FDR=7,2 \times 10^{-6}$) y PI3K-Akt ($FDR=1,5 \times 10^{-5}$). Al igual que lo observado para Fb-TPC-1, CD63, sintenina-1 (SDCBP), uPA (PLAU), ITGA3, LAMC1, TNC, entre otras, se muestran enriquecidas en las EVs provenientes de Fb-8505c con respecto a Fb-NThyOri y corresponden a proteínas relacionadas con la promoción tumoral.

2.7. EVs provenientes de NThyOri y Fb-NThyOri participan en el mantenimiento del metabolismo celular

El estudio, mediante ORA, de las funcionalidades asociadas a las DEPs obtenidas a partir del estudio comparativo de las proteínas identificadas y cuantificadas en EVs provenientes de NThyOri con respecto a TPC-1 arrojó 171 DEPs, con un $p\ adj. < 0,001$ y $FC \geq 2$ (Tabla 6 y anexo tabla 1.B). En la figura 26E se muestran los enriquecimientos en los que estas proteínas están implicadas ($p < 0,001$) como ser: traducción de proteínas, glicólisis, unión al complejo mayor de histocompatibilidad y señalización mediada por IL-12, todos en general relacionados al mantenimiento del metabolismo y homeostasis celular. El análisis comparativo de las proteínas presentes en EVs provenientes de Fb-NThyOri con respecto a Fb-TPC-1 mostró 111 DEPs, con un $p\ adj. < 0,001$ y $FC \geq 2$ (Tabla 6 y anexo tabla 2.B). El estudio de enriquecimiento funcional mostró que las DEPs en EVs provenientes del co-cultivo de Fb-NThyOri se asocian a funciones similares ($p < 0,001$) a las observadas en EVs de células NThyOri aisladas (Fig. 26F). Estos resultados contrastan con lo observado en el estudio comparativo realizado en el contexto de células TPC-1 (item 2.6.1 de Resultados), donde el Fb estaría relacionado al redireccionamiento funcional de las EVs provenientes de células TPC-1 aisladas. El estudio de las funcionalidades asociadas mediante ORA a las 7 DEPs, en NThyOri con respecto a 8505c (Tabla 6 y anexo tabla 3.B), y las 9 DEPs, en Fb-NThyOri con respecto a Fb-8505c, no presentaron enriquecimientos significativos (Tabla 6 y anexo tabla 4.B).

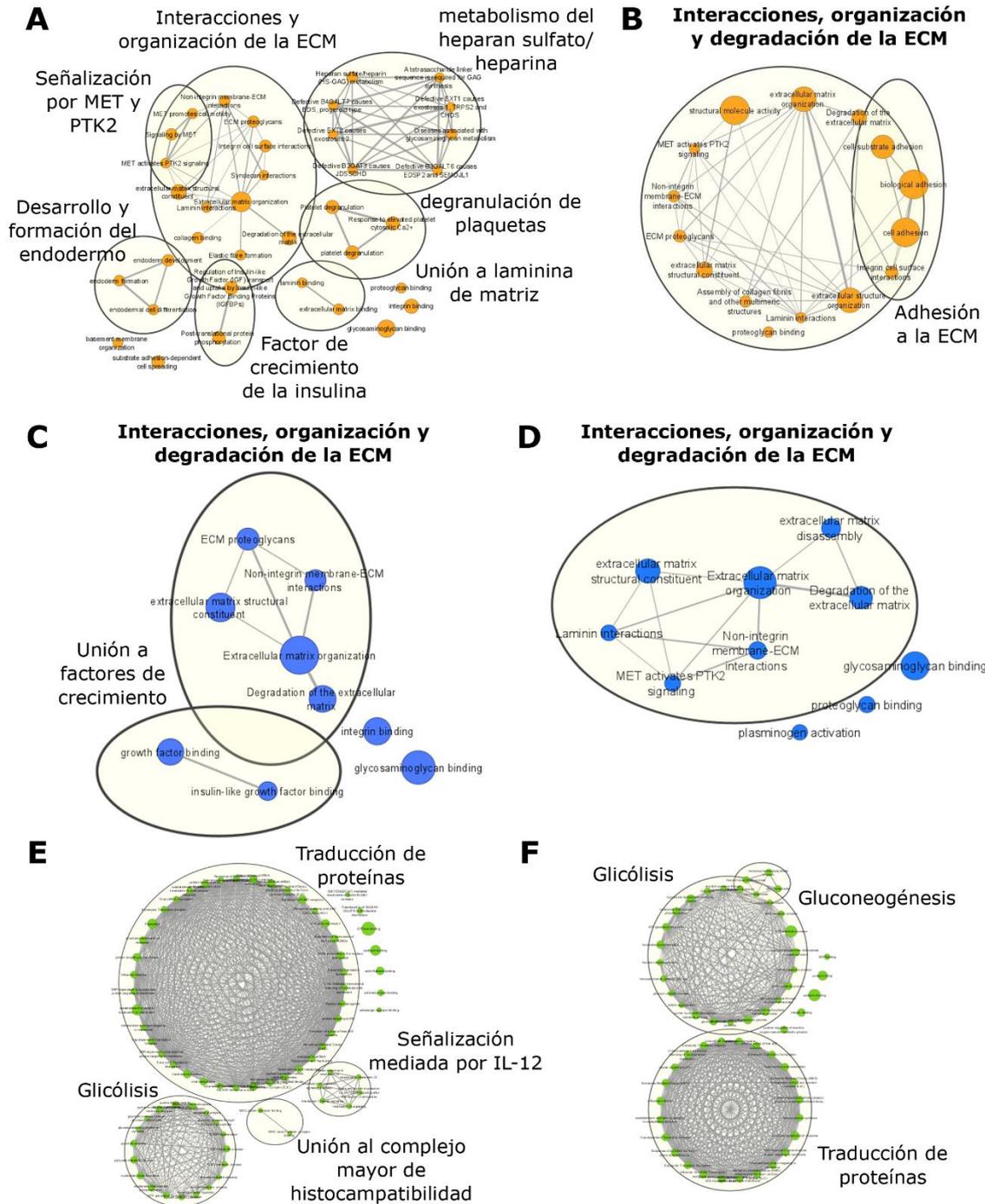


Figura 26. EVs provenientes de Fb-TPC-1, 8505c y Fb-8505c presentan una convergencia funcional en remodelación de la ECM. Over-representation enrichment analysis (ORA) de procesos biológicos, funciones moleculares (utilizando gene ontology) y vías de señalización (utilizando Reactome) asociadas a las DEPs en las EVs. Los datos obtenidos a partir de g:profiler fueron visualizados e interpretados utilizando EnrichmentMap plug-in v3.3.1, ClusterMaker2 y AutoAnnotate v1.3.3 con Markov clustering (MCL cluster) ejecutados en Cytoscape v3.8.2. **(A)** Análisis ORA entre DEPs en EVs de TPC-1 vs. NThyOri mostrando su convergencia en varios clusters. **(B)** Análisis ORA entre DEPs en EVs de Fb-TPC-1 vs. Fb-NThyOri mostrando su convergencia en un cluster, asociado a la remodelación de la ECM. **(C)** Análisis ORA entre DEPs en EVs de 8505c vs. NThyOri y **(D)** Fb-8505c vs Fb-NThyOri, ambos asociados a términos relacionados con la remodelación de la ECM. **(E)** Análisis ORA entre DEPs en EVs de NThyOri vs. TPC-1 y **(F)** Fb-NThyOri vs. Fb-TPC-1, ambos asociados a términos similares, relacionados con el mantenimiento del metabolismo celular. Los nodos más grandes corresponden a un mayor número de DEPs asociadas a ese término. DEPs: proteínas diferencialmente enriquecidas. vs: versus. ECM: matriz extracelular.

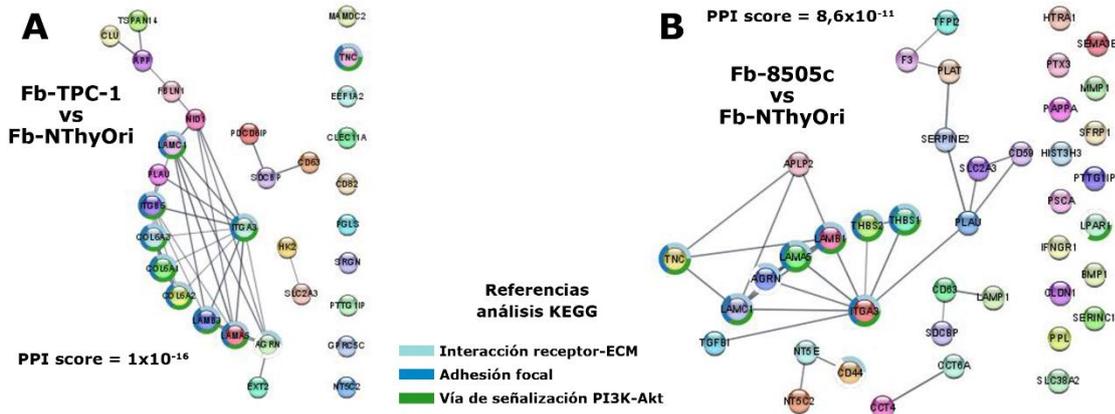


Figura 27. Red de interacciones proteína-proteína de las DEPs en EVs obtenidas de los co-cultivos Fb-células tumorales tiroideas vs el co-cultivo Fb-célula no tumoral tiroidea. Redes de DEPs que muestran relaciones reportadas entre las mismas (funcionales, experimentales, co-expresión, minería de texto y bases de datos), generadas usando la base de datos String-db (mediante String App v. 1.6.0) en el *software* Cytoscape v.3.8.2. **(A)** 16 de 22 DEPs en EVs provenientes de FbTPC-1 vs. Fb-NThyOri y **(B)** 25 de 43 DEPs en EVs provenientes de Fb-8505c vs. Fb-NThyOri presentan un PPI score significativo. vs: versus. PPI: interacciones proteína-proteína.

2.8. La comunicación entre Fb y TPC-1 produce EVs vinculadas con la degradación de la ECM

Como se describió previamente, las DEPs en EVs provenientes de Fb-TPC-1 así como las de Fb-8505c, presentan enriquecimientos relacionados a estructura y degradación de ECM, lo que no se evidencia en los enriquecimientos obtenidos del análisis de las DEPs en EVs provenientes de Fb-NThyOri. Con el objetivo de estudiar la relevancia de la interacción del Fb con la célula tiroidea en la funcionalidad de las EVs, se analizaron los enriquecimientos obtenidos del estudio comparativo de las DEPs en los co-cultivos de Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri con respecto a sus células tiroideas aisladas. El análisis estadístico de las proteínas en EVs, considerando un $p \text{ adj.} < 0,001$ y $FC \geq 2$, reveló un total de 11, 4 y 9 DEPs al comparar Fb-TPC-1 vs TPC-1, Fb-8505c vs 8505c y Fb-NThyOri vs NThyOri, respectivamente. Dado el bajo número de DEPs obtenidas mediante este análisis tan restrictivo, el análisis de enriquecimiento se realizó considerando un $p \text{ adj.} < 0,01$ y $FC \geq 2$, lo que arrojó un total de 20, 4 y 15 proteínas, respectivamente (Tabla 7 y anexo tabla 5). Un diagrama de Venn analizando las DEPs obtenidas entre los tres conjuntos mostró que 14 proteínas aparecen exclusivamente enriquecidas en Fb-TPC-1 con respecto a TPC-1 y 6 se comparten con las DEPs en EVs provenientes de Fb-8505c y Fb-NThyOri. El análisis de las DEPs en EVs provenientes de Fb-8505c vs. 8505c no mostró proteínas exclusivamente enriquecidas en ese conjunto y 9 de las 15 DEPs enriquecidas en EVs provenientes de Fb-NThyOri con respecto a NThyOri aisladas están solo presentes en este subconjunto de células (Fig. 28A). Las 14 DEPs en Fb-TPC-1 vs TPC-1 y las 9 DEPs en Fb-NThyOri vs NThyOri exclusivamente enriquecidas en esos conjuntos, fueron analizadas mediante Cytoscape ($p < 0,05$) (sección 3.6.1.1 de materiales y métodos). Interesantemente, las 14 proteínas exclusivamente enriquecidas en Fb-TPC-1 vs TPC-1 mostraron una confluencia en sólo 3 nodos, asociados con degradación del colágeno contenido en la ECM, constituyentes estructurales de la ECM y señalización mediante PDGF (Fig. 28.A1). Por el contrario, las 9 proteínas exclusivamente enriquecidas en Fb-NThyOri se

mostraron involucradas en un amplio número de funciones (34 nodos) relacionadas al metabolismo del condroitin y dermatán sulfato, organización de la ECM, unión a factores de crecimiento, entre otros (Fig. 28.A2).

Por último, buscando profundizar en nuestro análisis en el conjunto Fb-TPC-1 vs TPC-1, utilizando un $p \text{ adj.} < 0,001$ y $FC \geq 2$ como filtro, se compararon las DEPs correspondientes a este conjunto con las obtenidas a partir de Fb-TPC-1 vs Fb y Fb vs TPC-1 (Fig 14B). De manera interesante, MAMDC2 (Fig. 28.B1) y HRAS (Fig. 28.B2) se mostraron exclusivamente enriquecidas en el proteoma de EVs provenientes de Fb-TPC-1 y no compartidas con las DEPs del conjunto Fb vs TPC-1. En su conjunto, los resultados mencionados sugieren que la comunicación existente entre Fb y células TPC-1 produce EVs que transportan un mensaje vinculado con la degradación del colágeno contenido en la ECM, en comparación al mensaje asociado a las EVs obtenidas a partir de TPC-1 cultivada en forma aislada. Sin embargo, estas capacidades no se observarían en las EVs obtenidas de la comunicación entre Fb y NThyOri.

Tabla 7. Número de DEPs en EVs obtenidas con el método DEqMS

DEPs ($p \text{ adj.} < 0,01$ and $FC \geq 2$) (Table A5)		
EVs de Fb-células tiroideas vs. EVs de células tiroideas aisladas		
Comparación Fb-TPC-1 & TPC-1	Comparación Fb-8505c & 8505c	Comparación Fb-NThyOri & NThyOri
DEPs en EVs de Fb-TPC-1	DEPs en EVs de Fb-8505c	DEPs en EVs de Fb-NThyOri
20	4	15

El método DEqMS, con corrección FDR Benjamini-Hochberg por múltiples pruebas, se aplicó utilizando el paquete Bioconductor en el *software* R, para obtener DEPs con un $p \text{ adj.} < 0,01$ y $FC \geq 2$ en EVs provenientes de los co-cultivos (Fb-TPC-1, Fb-8505c, Fb-NThyOri) con respecto a las células tiroideas aisladas (TPC-1, 8505c, NThyOri, respectivamente). DEPs: proteínas diferencialmente enriquecidas. Adj. p: *p-value* ajustado.

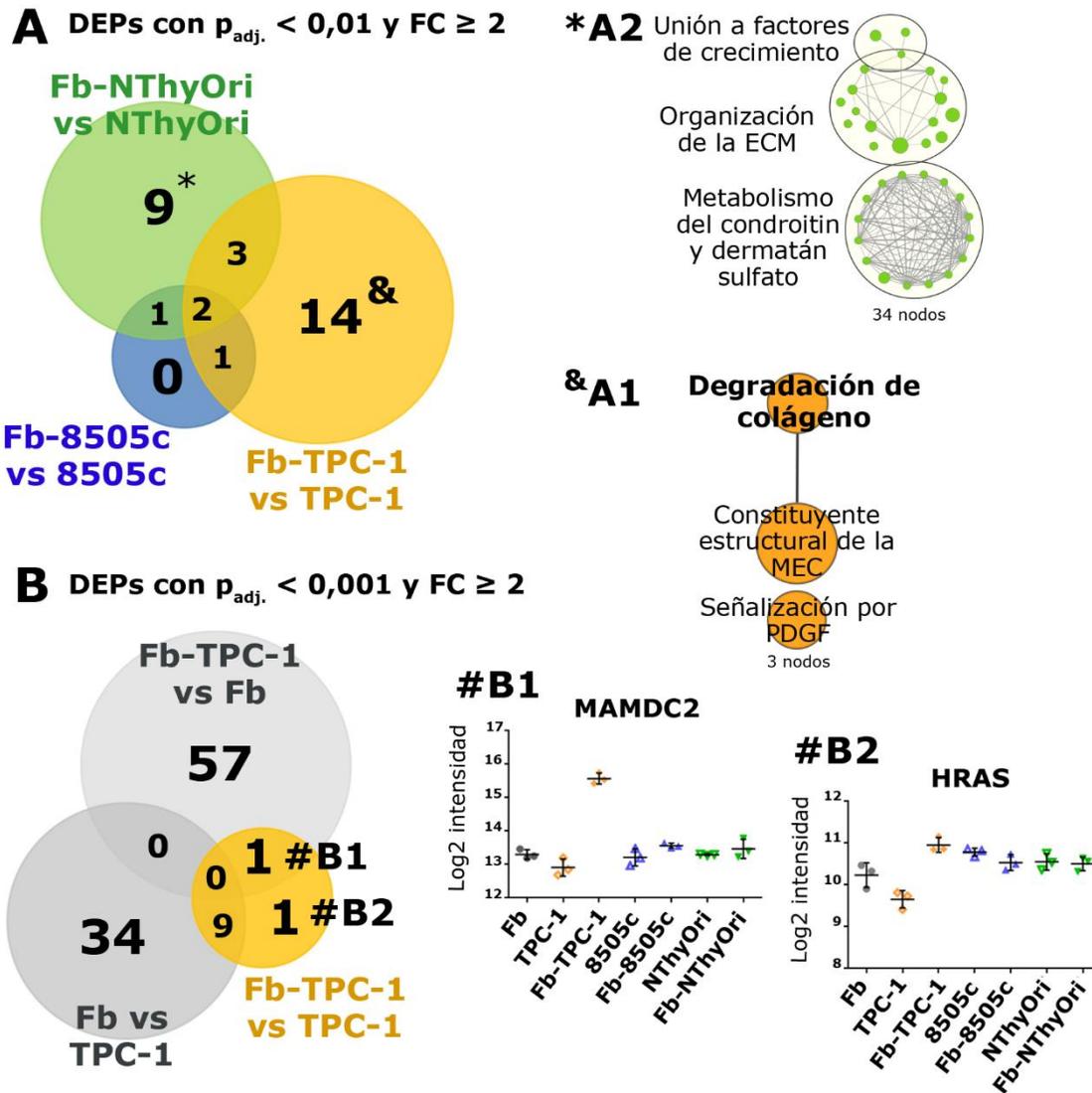


Figura 28. Las proteínas enriquecidas exclusivamente en EVs de Fb-TPC-1 se asocian a la degradación del colágeno y a componentes estructurales de la ECM. (A) Diagramas de Venn de las DEPs en EVs provenientes de Fb-TPC-1 vs. TPC-1, Fb-8505c vs. 8505c y Fb-NThyOri vs. NThyOri ($p_{adj.} < 0,01$ y $FC \geq 2$). 9 y 14 DEPs aparecen exclusivamente enriquecidas en los conjuntos Fb-NThyOri vs. NThyOri y Fb-TPC-1 vs. TPC-1, respectivamente. El conjunto Fb-8505c vs. 8505c no mostró DEPs exclusivamente enriquecidas en esas condiciones. **(*A1)** Se obtuvieron 3 nodos con el análisis ORA de las 14 DEPs exclusivamente enriquecidas en Fb-TPC-1 y **(*A2)** 34 nodos, agrupados en 3 clusters, con el análisis ORA de las 9 DEPs exclusivamente enriquecidas en Fb-NThyOri. Los datos obtenidos a partir de g:profiler fueron visualizados e interpretados utilizando EnrichmentMap plug-in v3.3.1, ClusterMaker2 y AutoAnnotate v1.3.3 con Markov clustering (MCL cluster) ejecutados en Cytoscape v3.8.2. **(B)** Diagramas de Venn que muestran 2 DEPs ($p_{adj.} < 0,001$ y $FC \geq 2$), MAMDC2, exclusivamente enriquecida en el conjunto Fb-TPC-1 vs TPC-1 y Fb-TPC-1 vs Fb, y HRAS en Fb-TPC-1 vs TPC-1. Representación gráfica de los niveles de intensidad ($\log_2(\text{intensidad})$) de **(#B1)** MAMDC2 y **(#B2)** HRAS, obtenidos mediante proteómica en EVs provenientes de Fb, TPC-1, 8505c, NThyOri y sus co-cultivos con Fb. DEPs: proteínas diferencialmente enriquecidas. Adj p: p-value ajustado. PPI: interacciones proteína-proteína.

II. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados descriptos en este capítulo se concluye que:

- El proteoma identificado y cuantificado en las EVs se encuentra reportado en ExoCarta y Vesiclepedia y presenta un enriquecimiento en proteínas relacionadas a EVs, lo que confirma el correcto aislamiento de las mismas.
- El perfil proteómico caracterizado en las EVs permitió el agrupamiento de los triplicados biológicos de las muestras estudiadas, y distinguió EVs provenientes de células tiroideas aisladas con respecto a las obtenidas de células co-cultivadas.
- Se observó una robusta segregación entre las muestras provenientes del entorno TPC-1/Fb-TPC-1 con respecto a las provenientes de 8505c/Fb-8505c y NThyOri/Fb-NThyOri.
- CD63 está enriquecido en el proteoma de EVs provenientes de Fb-TPC-1 y Fb-8505c, como se observó anteriormente en la caracterización bioquímica mediante WB (capítulo I).
- EVs provenientes de células tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb participarían en la remodelación de la ECM. En el entorno Fb-TPC-1, el Fb aportaría al direccionamiento de la potencial funcionalidad en las EVs. En el contexto Fb-8505c, el Fb no modificaría la capacidad funcional que presentan EVs obtenidas de 8505c aisladas.
- EVs provenientes de células no tumorales tiroideas aisladas y co-cultivadas participarían en una funcionalidad similar, potencialmente relacionada al mantenimiento del metabolismo celular y la homeostasis del tejido.
- Proteínas diferencial y exclusivamente enriquecidas en EVs del entorno Fb-TPC-1 centrarían su función en la degradación de colágeno y podrían posicionarse como constituyentes estructurales de la ECM. El entorno Fb-TPC-1 liberaría EVs con un proteoma biológicamente relevante para el cáncer de tiroides.

3. CAPÍTULO III: EFECTOS FUNCIONALES DE EVs SOBRE COMPONENTES DEL TME.

Como ya fue mencionado, existe una sofisticada red de comunicación dinámica y bidireccional en el TME la que incluye el contacto célula-célula, célula-matriz, la señalización mediante factores de crecimiento y citoquinas y las EVs. En un tumor, la remodelación de la ECM comprende la secreción y depósito de sus componentes, su modificación, así como la degradación de la misma, creando un microentorno permisivo para la migración e invasión de células tumorales. Los Fb, junto con las células tumorales, participan en la degradación de la ECM a través de la secreción de proteasas que se activan en el TME [10]. Los estudios proteómicos demostraron que las EVs provenientes de la interacción Fb-célula tumoral tiroidea participarían en la remodelación de la ECM y, específicamente, las EVs obtenidas a partir del entorno Fb-TPC-1 presentarían una potencial funcionalidad asociada a la degradación del colágeno contenido en la matriz.

3.1. CMs depletados de EVs provenientes de 8505c y EVs provenientes de TPC-1 aumentan la expresión de α -actina de músculo liso en Fb

En un tejido normal, los Fb se encuentran en un estado inactivo o en reposo, sin embargo, cuando pasan a formar parte del tejido tumoral y, debido a señales que se gatillan en el TME, los Fb se activan y en el nicho tumoral se denominan CAFs. Los CAFs adquieren un fenotipo secretorio, propiedades proliferativas mejoradas, así como propiedades contráctiles y de migración. Además, su fenotipo está caracterizado por la sobreexpresión de diversos marcadores, entre los cuales se puede mencionar a α -SMA, la proteína de activación de Fb alfa, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, entre otros. Así como factores solubles provenientes de células tumorales son capaces de producir un aumento en la expresión de marcadores de activación de Fb [101], existen trabajos que reportan que las propias EVs son capaces de transmitir información a Fb normales y desencadenar una respuesta celular y otros cambios consistentes con el proceso de activación de Fb a CAFs [66]. En primer lugar y con el objetivo de estudiar la capacidad de activación del Fb en nuestro modelo, se midió la expresión de α -SMA. Para ello, monocapas de Fb fueron incubadas con la fracción DEVs (Fig. 1, sección 2.1 de materiales y métodos) y las correspondientes fracciones de EVs, obtenidas a partir de igual número de células TPC-1, 8505c o NThyOri presentes al final del cultivo, y se estudió la expresión de α -SMA mediante inmunofluorescencia (sección 5.1.1 de materiales y métodos). Un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de α -SMA se observó al incubar los Fb con la fracción de DEVs proveniente de 8505c con respecto al Fb control, incubado con DMEM libre de SFB ($7,06 \times 10^{11} \pm 2,6 \times 10^{11}$ vs. $6,01 \times 10^9 \pm 9,64 \times 10^8$; $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia de α -SMA al incubar a los Fb con las fracciones DEVs provenientes de TPC-1 y NThyOri, con respecto al Fb control (Fig. 29A, C). Cuando se estudió la expresión de α -SMA en Fb, utilizando a las EVs como estímulo, un aumento significativo en la expresión de α -SMA se evidenció al incubar Fb con EVs provenientes de TPC-1 con respecto a Fb incubados con EVs provenientes de NThyOri ($1,97 \times 10^{-10} \pm 3,93 \times 10^{-11}$ vs. $1,36 \times 10^{-11} \pm 5,23 \times 10^{-12}$; $p < 0,01$). Sin embargo,

utilizando esta estrategia, no se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia en Fb incubados con EVs provenientes de Fb, 8505c y NThyOri (Fig. 29B, D). Estos resultados en su conjunto sugieren que, en los co-cultivos del Fb con las líneas tumorales tiroideas, factores solubles o EVs son capaces de producir un aumento de α -SMA en Fb, lo cual indicaría la activación del Fb en estos contextos.

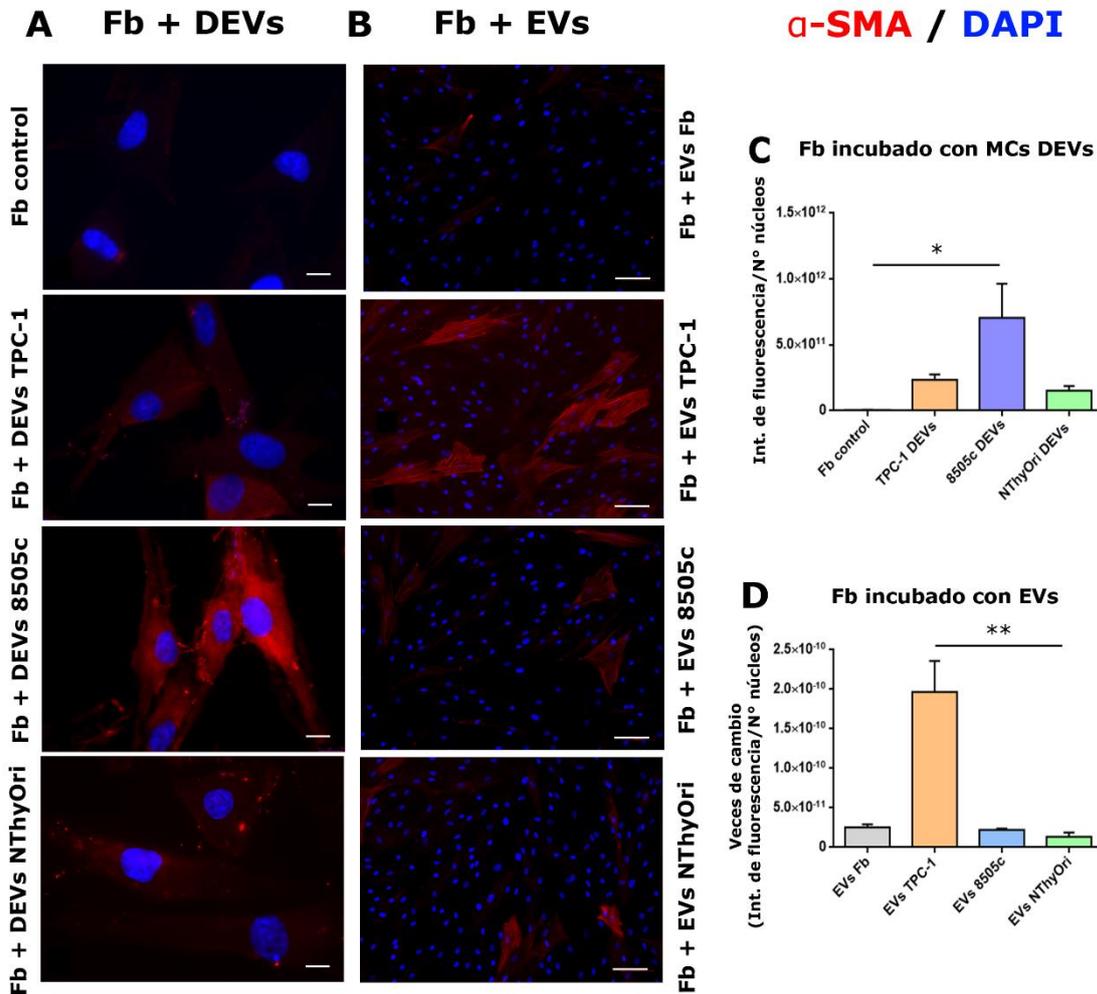


Figura 29. Expresión de α -SMA en Fb estimulados con CMs y EVs de células tiroideas tumorales y no tumorales. Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la expresión proteica de α -SMA en Fb (A) incubados con la fracción DEVs proveniente de TPC-1, 8505c y NThyOri o con (B) EVs provenientes de Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri, durante 24hs. (C) Se observó un aumento significativo en la expresión de α -SMA en Fb incubados con DEVs provenientes de 8505c con respecto al Fb control (* p <0.05; Kruskal Wallis test, Dunn's post test). Los resultados se indican como la intensidad de fluorescencia relativa al número de células por campo (media \pm SEM), de dos experimentos realizados de manera independiente (n=2). (D) Se observó un aumento significativo en la expresión de α -SMA en Fb incubados con EVs provenientes de TPC-1 con respecto a NThyOri (** p <0.01; Kruskal Wallis test, Dunn's post test). Los resultados se indican como las veces de cambio en la intensidad de fluorescencia (media \pm SEM) a partir de dos experimentos realizados de manera independiente (n=6). Las barras de escala representan 10 μ m (A) y 100 μ m (B). DEVs: medio depletado de EVs que sedimentan a 100.000x g.

3.2. La actividad de MMP2 aumenta en los CMs de células tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb

Los CAFs, dados los cambios en su secretoma, se caracterizan por presentar una biología pleiotrópica, responsable de efectos fenotípicos diferentes sobre diversas células de su entorno. Uno de éstos consiste en la expresión, liberación y activación de enzimas que participan en la remodelación de la ECM o matriz proteica en la que se hallan embebidas las células del TME [151]. Entre estas enzimas, se puede mencionar a las MMPs, las que además participan en la activación de señales intracelulares que, indirectamente, dan lugar a migración e invasión celular, angiogénesis e inflamación [17]. Con respecto a MMPs, MMP2 y MMP9 son efectores críticos de mecanismos de invasión llevados a cabo por líneas celulares de carcinoma papilar y carcinoma folicular tiroideo [158]. En nuestro modelo, se determinó la actividad gelatinolítica de proMMP2 y MMP2 en CMs obtenidos a partir de células aisladas y co-cultivadas mediante zimografía (sección 6.2 de materiales y métodos). Como se muestra en la figura 30, en CMs obtenidos de Fb aislados y de los co-cultivos Fb-TPC-1, Fb-8505 y Fb-NThyOri se observó la expresión de proMMP2, mientras que una actividad muy débil se detectó en CMs de TPC-1, NThyOri y 8505c (Fig. 30B). De manera interesante, se observó un aumento significativo en la expresión de MMP2 activa en los CMs obtenidos de Fb-TPC-1 (Fig. 30B, C) y Fb-8505c (Fig. 30B, D) en comparación con los obtenidos de células TPC-1 ($1,7 \pm 0,4$ vs. $0,05 \pm 0,02$; $p < 0,01$) y 8505c aisladas ($1 \pm 0,2$ vs. n.d.; $p < 0,05$), respectivamente. Contrariamente, no se observaron cambios en la expresión de MMP2 al analizar los CMs de Fb-NThyOri con respecto a NThyOri (Fig. 30B, E). Además, una prevalencia significativamente mayor de la forma activa de MMP2 respecto a su pro-enzima se observó en CMs obtenidos de Fb-TPC-1 y Fb-8505c con respecto a Fb-NThyOri ($2,3 \pm 0,5$; $3,2 \pm 1,1$; $0,1 \pm 0,05$; Fb-TPC-1, Fb-8505c, Fb-NThyOri, respectivamente; $p < 0,05$) (gráfico no mostrado).

Considerando que las MMPs han sido descritas en EVs [159], se evaluó su presencia mediante zimografía, en fracciones enriquecidas en EVs obtenidas a partir de CMs provenientes de los diferentes cultivos, así como en DEVs (protocolo 3, sección 2.1 de materiales y métodos). No se observó actividad gelatinolítica de proMMP2 o MMP2 activa en ninguna de las fracciones de EVs estudiadas (Fig. 30G), sin embargo, un patrón similar de expresión al observado en los CMs completos, se detectó en los DEVs (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren un rol del Fb, de su interacción y/o comunicación con las células tumorales, en la generación de un TME proteolíticamente modificado, con respecto a un entorno no tumoral.

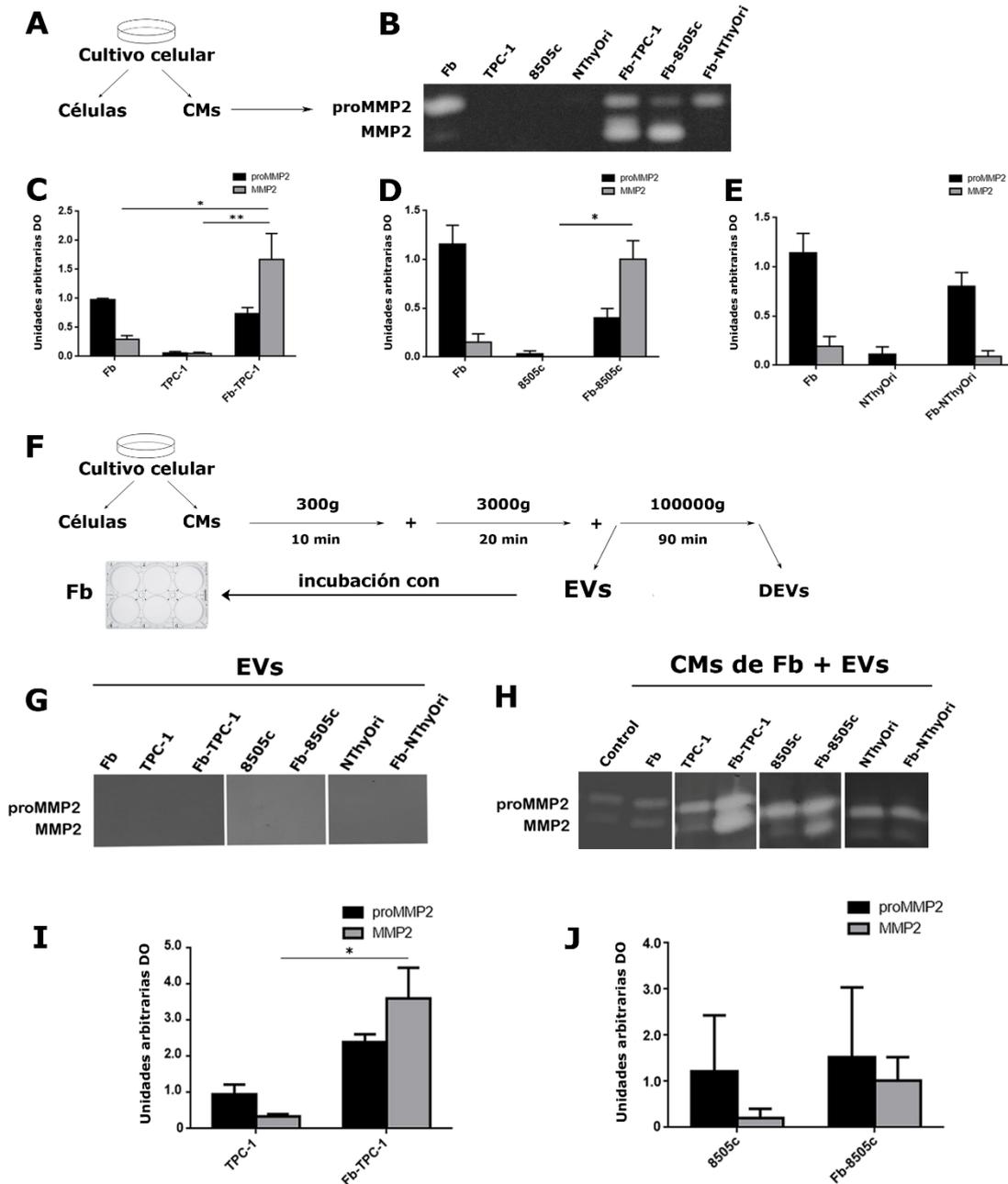


Figura 30. Actividad de proMMP2 y MMP2 en CMs de Fb, células tiroideas aisladas y co-cultivadas, y en Fb estimulados con EVs de células tiroideas aisladas y co-cultivadas. (A) Representación esquemática de obtención de la muestra. **(B)** Zimograma representativo que muestra la actividad gelatinolítica de proMMP2 y MMP2 en Fb, TPC-1, 8505c, NThyOri, Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri. Las áreas de actividad proteolítica se muestran como bandas claras en un fondo oscuro. Análisis densitométrico de proMMP2 y MMP2 en los CMs de **(C)** Fb, TPC-1 y Fb-TPC-1; **(D)** Fb, 8505c y Fb-8505c y **(E)** Fb, NThyOri y Fb-NThyOri. Se observó un aumento significativo en la actividad de MMP2 en CMs de Fb-TPC-1 vs. Fb y TPC-1 (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, respectivamente) y en CMs de Fb-8505c vs. 8505c (* $p < 0,05$; Kruskal-Wallis test, Dunn's post test). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos cuatro determinaciones independientes. **(F)** Representación esquemática de la obtención de EVs y su posterior incubación con Fb (Fb+EVs CMs). **(G)** Zimogramas representativos de EVs y de **(H)** CMs obtenidos a partir de Fb+EVs que muestran la actividad de proMMP2 y MMP2 luego de estimulación. **(I)** Se observó un aumento significativo de la actividad de MMP2 en CMs de Fb al ser estimulados con EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1 (* $p < 0,05$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test). **(J)** Se demostró una tendencia a una mayor actividad de MMP2 en Fb estimulados con EVs de Fb-8505c vs. 8505c. No se detectaron cambios en MMP2 activa al comparar Fb estimulados con EVs de NThyOri y Fb-NThyOri (H, y datos no mostrados). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres determinaciones independientes. CMs: medios condicionados. CMs de Fb+EVs: medios condicionados de Fb luego de su incubación con EVs. DEVs: medio depletado de EVs que sedimentan a 100.000x g.

3.3. EVs de Fb-TPC-1 inducen un aumento significativo en la actividad de MMP2 en Fb

Las EVs juegan un rol clave en la comunicación celular, impulsando la creación de un microambiente tumoral reactivo [160]. Para evaluar el papel de las EVs en la expresión de las MMPs descritas anteriormente, se ensayó su efecto sobre Fb (sección 2.6 de materiales y métodos). Para ello, monocapas de Fb se incubaron con EVs (Fb+EVs) obtenidas de Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri así como de Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri. La figura 30H muestra la actividad gelatinolítica de proMMP2 y MMP2 activa en los CMs obtenidos posteriormente al estímulo con EVs. De manera interesante, un aumento significativo en la expresión de MMP2 activa se observó en CMs obtenidos luego de la estimulación de Fb con EVs provenientes de Fb-TPC-1 en comparación con EVs provenientes de TPC-1 aisladas ($3,6 \pm 0,51$ vs. $0,34 \pm 0,064$; $p < 0,05$) (Fig. 30H, I). Una tendencia similar se evidenció luego de la estimulación de Fb con EVs de Fb-8505c frente a EVs de 8505c ($1 \pm 0,51$ vs. $0,21 \pm 0,2$), aunque sin alcanzar significancia estadística (Fig. 30H, J). Este efecto no se observó cuando los Fb fueron incubados con EVs provenientes de Fb-NThyOri y NThyOri ($0,13 \pm 0,091$ vs. $0,022 \pm 0,0001$; gráfico no mostrado) (Fig. 30H). Estos resultados sugieren un rol de las EVs, provenientes de entornos tumorales tiroideos, en la modificación del secretoma de Fb presentes en el TME.

3.4. La actividad de proMMP9 aumenta en CMs de Fb-8505c

La actividad gelatinolítica de MMP9 fue evaluada en los CMs obtenidos de células aisladas y co-cultivadas, utilizando zimografías (sección 6.2 de materiales y métodos), siendo detectada solamente proMMP9 (Fig. 31B). Como se muestra en la figura 31C, un aumento significativo en la actividad gelatinolítica de proMMP9 se observó en CMs provenientes de Fb-8505c con respecto a los obtenidos de Fb ($3,1 \pm 1,3$ vs. $0,04 \pm 0,04$; $p < 0,05$) y 8505c ($3,1 \pm 1,3$ vs. n.d.; $p < 0,05$) cultivadas de forma aislada. Una tendencia hacia una mayor actividad de proMMP9 se evidenció también en CMs de Fb-TPC-1 frente a TPC-1 ($1,8 \pm 0,6$ vs. $1 \pm 0,02$). Como en el caso de MMP2, no se detectó proMMP9 en CMs de NThyOri y sólo se observó una ligera expresión en los obtenidos de Fb-NThyOri (Fig. 31B, C).

Por otro lado, la expresión de proMMP9 se evaluó en fracciones enriquecidas en EVs obtenidas a partir de los CMs de los cultivos de células aisladas y co-cultivadas, no observándose actividad detectable de proMMP9 en ninguna de las poblaciones estudiadas. Sin embargo, al estimular Fb con EVs (Fb+EVs), un aumento en la actividad de proMMP9 se detectó en CMs de Fb incubados con EVs (CMs de Fb+EVs) provenientes de Fb-8505c vs. EVs de 8505c ($0,7 \pm 0,37$ vs. $0,038 \pm 0,03$) aunque éste no alcanzó niveles significativos (Fig. 31E, F; $p = 0,09$). No se observaron cambios en la actividad de proMMP9 luego de la estimulación de Fb con EVs provenientes de Fb-TPC-1 o de TPC-1, así como tampoco se registraron modificaciones en la expresión de proMMP9 en CMs de Fb incubados con EVs de NThyOri y Fb-NThyOri (Fig. 31E, F). A nivel de la fracción DEVs, se observó un patrón similar al obtenido en CMs completos (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la interacción contacto-dependiente Fb-8505c impactan en la expresión de proMMP9.

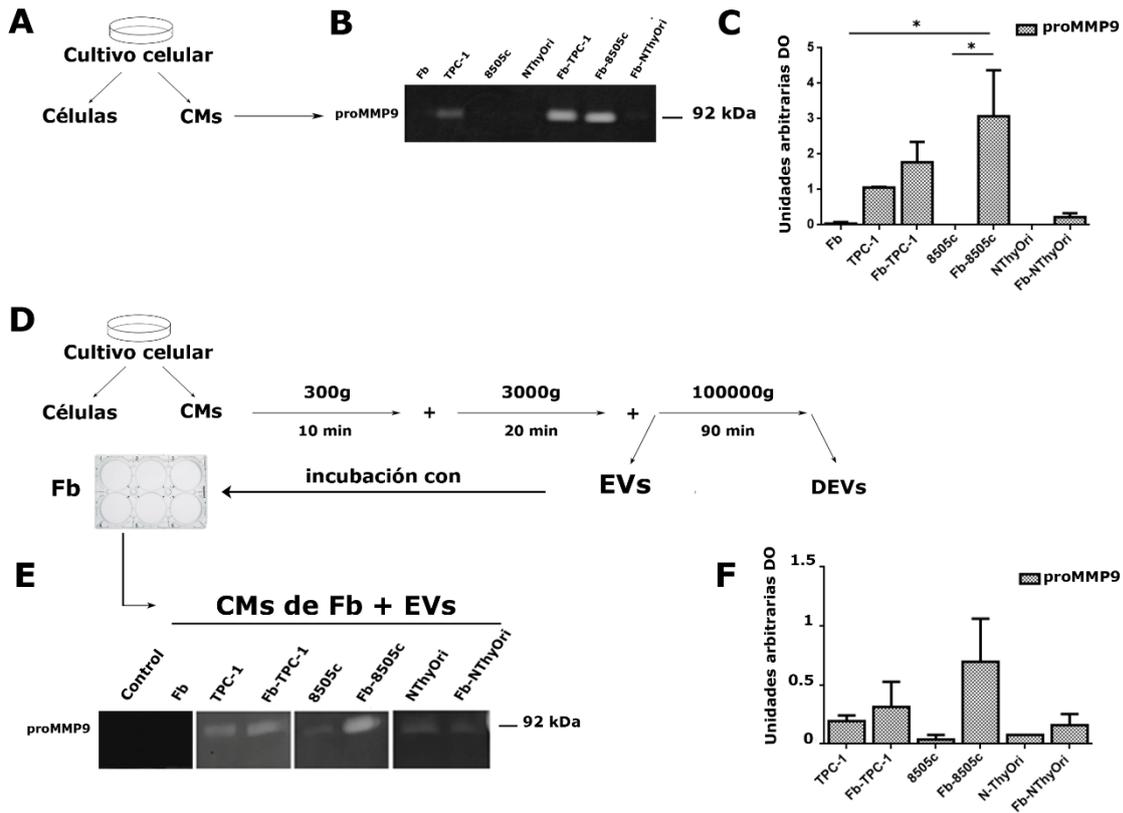


Figura 31. Actividad de proMMP9 en CMs de Fb, células tiroideas aisladas y co-cultivadas, y en Fb estimulados con EVs de células tiroideas aisladas y co-cultivadas. (A) Representación esquemática de obtención de la muestra. **(B)** Zimograma representativo que muestra la actividad gelatinolítica de proMMP9 en Fb, TPC-1, 8505c, NThyOri, Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri. Las áreas de actividad proteolítica se muestran como bandas claras en un fondo oscuro. **(C)** Análisis densitométrico del proMMP9 en los CMs de Fb, TPC-1, 8505c, NThyOri y Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri. Se observó un aumento significativo en la actividad de proMMP9 en CMs de Fb-8505c vs. Fb y 8505c (* $p < 0,05$; Kruskal-Wallis test, Dunn's post test). **(D)** Representación esquemática de la obtención de EVs y su posterior incubación con Fb (CMs de Fb+EVs). **(E)** Zimograma representativos de CMs obtenidos a partir de Fb+EVs que muestran la actividad de proMMP9 luego de la estimulación. **(F)** No se detectaron cambios significativos en la actividad de proMMP9 en CMs de Fb+EVs. Se observó una tendencia al aumento en proMMP9 de CMs obtenidos a partir de Fb-8505c frente a 8505c. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres determinaciones independientes. CMs: medios condicionados. CMs de Fb+EVs: medios condicionados de Fb luego de su incubación con EVs. DEVs: medio depletado de EVs que sedimentan a 100.000x g.

3.5. EVs de Fb-TPC-1 inducen un aumento en la actividad de MMP2 en células no tumorales tiroideas

Otras células que forman parte del TME son las células no tumorales, adyacentes al tejido tumoral. Existen diversos trabajos que evidencian modificaciones en el tejido normal debido a la presencia de tejido tumoral. En biopsias obtenidas de pacientes con PTC, se observó una clara segregación, en la expresión de genes que codifican para proteínas que presentan péptido señal (proteínas del secretoma), del tejido normal adyacente al tumor con respecto al tejido de un paciente sano [161]. Dado que EVs provenientes de Fb-TPC-1 produjeron un aumento significativo en la expresión de MMP2 activa en Fb, se estudió el efecto de EVs provenientes de Fb, TPC-1 y NThyOri así como de Fb-TPC-1 y Fb-NThyOri sobre la expresión de MMP2 por células NThyOri, llevando a cabo una estrategia similar a la utilizada en Fb

(sección 2.6 de materiales y métodos). La figura 32B, C muestra el aumento de la actividad de MMP2 en CMs obtenidos de células NThyOri, luego de la incubación con EVs provenientes de Fb-TPC-1 con respecto a TPC-1 ($0,88 \pm 0,23$ vs. n.d.; $p < 0,01$). No se observaron cambios significativos en la actividad de proMMP2 o MMP2 activa en CMs de NThyOri luego de la incubación con EVs provenientes de NThyOri o Fb-NThyOri, ni tampoco luego del estímulo con EVs provenientes de Fb cultivados en forma aislada (Fig. 32B). Estos resultados sugieren un rol de las EVs, provenientes de entornos tumorales tiroideos, en la modificación del secretoma de células no tumorales tiroideas que se encuentren en el TME.

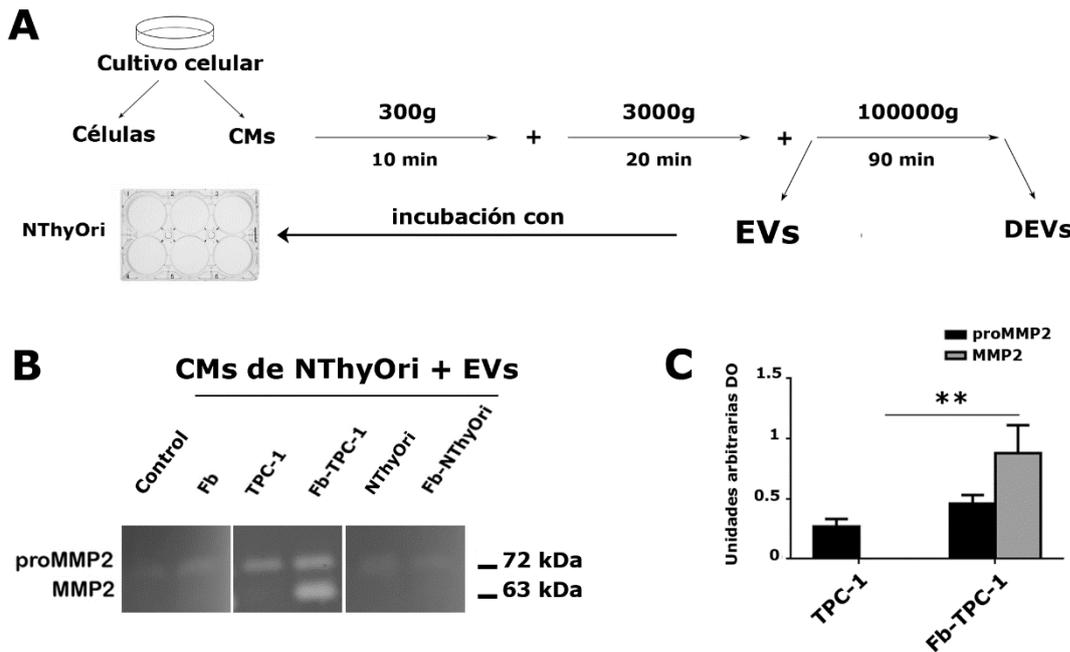


Figura 32. Actividad de proMMP2 y MMP2 en CMs de células NThyOri estimulados con EVs de Fb, células tiroideas aisladas y co-cultivadas. (A) Representación esquemática de la obtención de EVs y su posterior incubación con NThyOri (CMs de NThyOri+EVs). **(B)** Zimograma representativo de CMs obtenidos a partir de NThyOri+EVs que muestran la actividad gelatinolítica de proMMP2 y MMP2 luego de la estimulación. **(C)** Se observó un aumento significativo en la actividad de MMP2 en CMs de NThyOri al ser estimulados con EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1 (** $p < 0,01$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres determinaciones independientes. CMs: medios condicionados. CMs de NThyOri+EVs: medios condicionados de NThyOri luego de su incubación con EVs. DEVs: medio depletado de EVs que sedimentan a 100.000x g.

3.6. La activación de MMP2 en CMs de Fb-TPC-1 se produce aún en ausencia del contacto directo célula-célula entre Fb y TPC-1

En un contexto tumoral, las células tumorales propiamente dichas interactúan de manera directa o indirecta con otras células de su entorno. Con el fin de evaluar si la interacción célula-célula en forma directa, o si factores solubles y/o EVs liberados en un contexto tumoral, participarían en los perfiles de expresión y activación de MMPs, se utilizó la estrategia de co-cultivo contacto-independiente, utilizando placas *transwell* (sección 1.3.2 de materiales y métodos). En este sistema, las células presentes en el inserto y la cámara inferior se hallan separadas físicamente e interactúan a través del medio de cultivo, mencionado a partir de ahora como TW-CMs, el cual es estudiado mediante zimografía para la determinación de la

actividad de MMPs (sección 6.2.1 de materiales y métodos). Los TW-CMs son obtenidos a partir de la cámara inferior del *transwell* y presentan factores liberados por ambos tipos celulares del co-cultivo. Para esto, Fb (sembrados en la cámara inferior del *transwell*) fueron co-cultivados con células TPC-1 o Fb-TPC-1 (en el inserto del *transwell*). Para su mejor comprensión en el texto y figuras las células colocadas entre paréntesis corresponden a las presentes en el inserto, y el co-cultivo contacto independiente se representa en el texto, entre corchetes. El perfil de expresión de proMMP2, MMP2 y proMMP9 en los TW-CMs, refleja el rol de la comunicación mediada por factores solubles y/o EVs en la expresión de estas enzimas en el modelo, y nos permite estudiar si el contacto directo de la célula tumoral con el Fb potencia dicha respuesta. Como control se utilizó el perfil de expresión de estas enzimas en Fb cultivados en forma aislada o cultivando Fb en ambas cámaras del *transwell* [Fb-(Fb)]. Además, a modo de convalidar el sistema, un ensayo equivalente se realizó invirtiendo los componentes celulares en las cámaras de las placas *transwell*. La figura 33.B1 muestra la actividad gelatinolítica de proMMP2, MMP2 activa en los TW-CMs de Fb incubados con medio de cultivo [Fb-(DMEM)], con Fb [Fb-(Fb)], con células TPC-1 aisladas [Fb-(TPC-1)] o co-cultivadas con Fb [Fb-(Fb-TPC-1)] en los respectivos insertos. La figura 33.B2 muestra los resultados obtenidos en los ensayos utilizando células TPC-1 en la cámara inferior del inserto. Los resultados se expresaron como la relación MMP2/proMMP2 en los TW-CMs obtenidos. Dado que los cultivos controles [Fb-(DMEM)] y [Fb-(Fb)] así como [TPC-1-(DMEM)] y [TPC-1-(TPC-1)] no muestran diferencias significativas en el perfil de MMPs detectadas, fueron agrupados como Fb control y TPC control para el análisis estadístico. Como puede observarse, el co-cultivo contacto independiente entre Fb y células TPC-1 promueve la activación de MMP2 de manera significativa al compararse con los resultados obtenidos en los cultivos controles Fb y TPC-1 ($0,46 \pm 0,18$ vs. $0,13 \pm 0,06$ y $0,06 \pm 0,03$, respectivamente; $**p < 0,01$). De igual manera, los cultivos [Fb-(Fb-TPC-1)] y [TPC-1-(Fb-TPC-1)] mostraron resultados equivalentes, con un aumento significativo en la relación MMP2/proMMP2 con respecto al Fb control ($0,5 \pm 0,31$; $*p < 0,05$) y a TPC-1 control ($0,39 \pm 0,28$; $\#p < 0,05$) (Fig. 33C).

Estos resultados apoyan la idea de que la comunicación Fb-célula tumoral tiroidea, incluso en ausencia de contacto directo célula-célula, generarían un TME proteolíticamente modificado que apoya la progresión del tumor. Así como el Fb, las células TPC-1 también demostraron ser una posible fuente de MMPs en ese entorno.

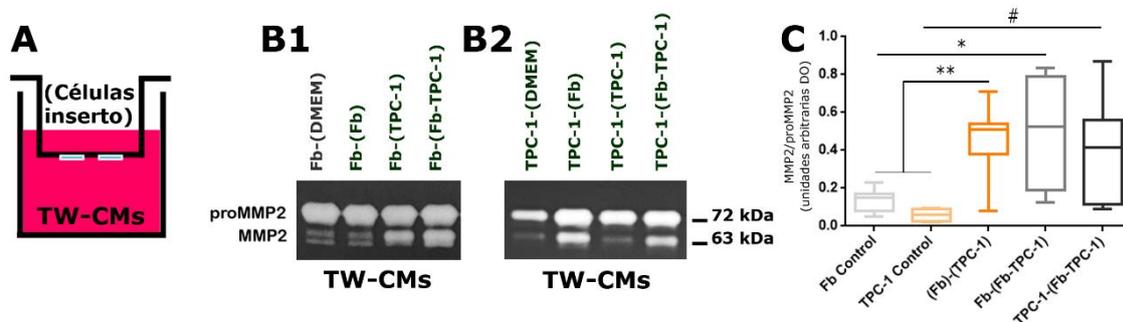


Figura 33. Actividad de proMMP2 y MMP2 en CMs de Fb, células TPC-1 aisladas y co-cultivadas de manera contacto independiente. (A) Representación esquemática de los co-cultivos en *transwell* (contacto-independiente). La notación entre paréntesis representa a las células sembradas en la cámara superior. (B) Zimograma representativo que muestra la actividad gelatinolítica de proMMP2 y MMP2 en CMs de (B1) Fb (sembrado en la cámara inferior) incubado con (Fb), (TPC-1) y (Fb-TPC-1); y (B2) TPC-1 (sembrado en la cámara inferior) incubado con (Fb), (TPC-1) y (Fb-TPC-1). Las áreas de actividad proteolítica se observan mediante bandas claras en un fondo oscuro. (C) Análisis densitométrico de proMMP2 y MMP2 en TW-CMs de Fb y TPC-1. Para la comparación estadística, Fb y Fb-(Fb) se agruparon como Fb control; TPC-1 y TPC-1-(TPC-1) se agruparon como TPC-1 control; Fb-(TPC-1) y TPC-1-(Fb) se agruparon como (Fb)-(TPC-1). Los resultados se expresan como la media de la razón MMP2/proMMP2 \pm SD de al menos cuatro determinaciones independientes. Se observó un aumento significativo de la razón MMP2/proMMP2 en los TW-CMs del co-cultivo en *transwell* (Fb)-(TPC-1) respecto a los controles Fb y TPC-1 (** $p < 0,01$; ANOVA de una vía, Tukey's post test). Del mismo modo, se determinó un aumento significativo de la razón MMP2/proMMP2 en los TW-CMs de Fb-(Fb-TPC-1) y TPC-1-(Fb-TPC-1) en comparación con la razón obtenida a partir del Fb control (* $p < 0,05$; ANOVA de una vía, Tukey's post test) y TPC-1 control (# $p < 0,01$; test de Kruskal-Wallis, Dunn's post test) respectivamente. TW: *transwell*. DO: densidad óptica. u.a.: unidades arbitrarias.

3.7. Los interactores de MMP2 logran diferenciar EVs provenientes de TPC-1, 8505c, Fb-TPC-1 y Fb-8505c de EVs provenientes de Fb aislados, NThyOri y Fb-NThyOri

A partir de los resultados mostrados anteriormente, se pudo observar que en el TME tiroideo tanto los Fb, las células tumorales como no-tumorales, son posibles fuentes de MMPs. Dada la asociación de la funcionalidad de EVs y MMP2 en el modelo, se indagó la presencia de PPI con MMP2 (interactores de MMP2) en el proteoma de las EVs. Utilizando la base de datos String-db en Cytoscape y seleccionando un máximo de 20 interactores de MMP2 (sección 3.6.2 de materiales y métodos), se encontraron 16 proteínas relacionadas a MMP2 (PPI score = 1×10^{-16}) y, a su vez, presentes en el proteoma de las EVs provenientes de Fb, células TPC-1, 8505c y NThyOri así como de sus co-cultivos (Fig. 34A). El análisis de *clustering* jerárquico no supervisado de los valores de correlación de Pearson de los interactores de MMP2 (sección 3.4.4 de materiales y métodos) permitió discriminar las EVs provenientes de células tumorales y sus co-cultivos (TPC-1/8505c y Fb-TPC-1/Fb-8505c) de aquellas provenientes de células no tumorales (Fb, NThyOri y Fb-NThyOri). Además, discriminó las EVs provenientes del co-cultivo de células tumorales tiroideas (Fb-TPC-1 y Fb-8505c) de las EVs provenientes de células tumorales tiroideas aisladas (TPC-1 y 8505c) (Fig. 34B).

También, se indagaron en el proteoma de las EVs las PPI con MMP9 (interactores de MMP9). Al seleccionar para el análisis un máximo de 20 interactores en String-db, sólo 4 de estas proteínas se encontraron en las muestras de EVs. Sin embargo, al seleccionar un máximo de 50, 24 proteínas se encontraron relacionadas a MMP9 (PPI score = 1×10^{-16}) y presentes en el proteoma de las muestras de EVs (Fig. 34C). Sin embargo, el análisis de *clustering* jerárquico no supervisado de los valores de correlación de Pearson con los interactores de MMP9 (sección 3.4.4 de materiales y métodos) no mostró una clara discriminación entre las muestras provenientes de células tumorales con respecto a las no tumorales (Fig. 34D).

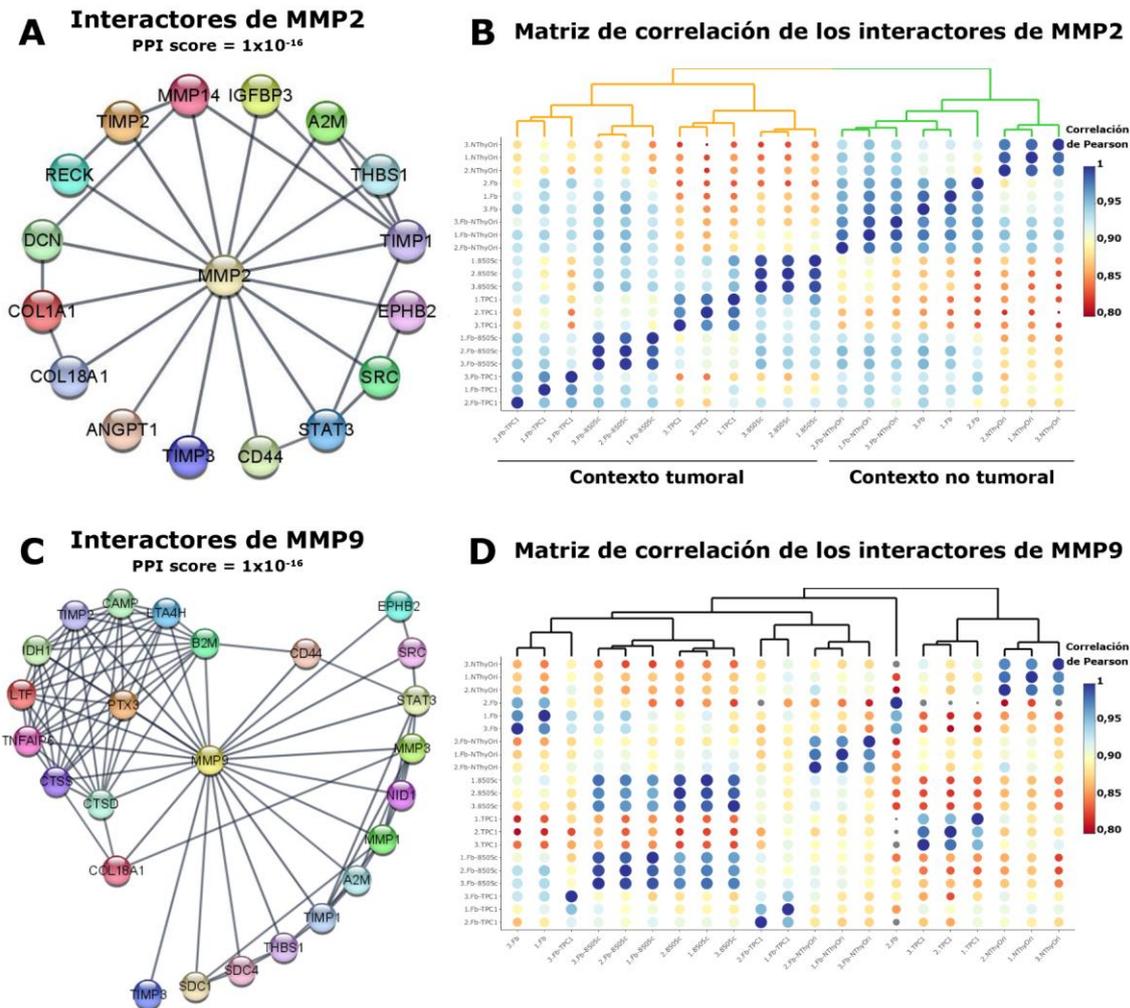


Figura 34. Los interactores de MMP2 y la discriminación de EVs provenientes de células tumorales y no tumorales. (A) Interactores de MMP2 y **(C)** Interactores de MMP9 en EVs obtenidas de Fb y células tiroideas aisladas y co-cultivadas, que registran relaciones reportadas entre estas proteínas y MMP2 o MMP9 (funcionales, experimentales, co-expresión, minería de texto y bases de datos). Estas redes fueron obtenidas utilizando la base de datos String-db y el *software* Cytoscape v.3.8.2. **(B)** Análisis de correlación de Pearson de los interactores de MMP2 y **(D)** MMP9, en EVs provenientes de células aisladas y co-cultivadas; los círculos más grandes y azules representan una mayor correlación entre las muestras. El análisis de *clustering* jerárquico no supervisado y la matriz de correlación de Pearson se realizaron con el *software* R. Los interactores de MMP2, pero no los de MMP9, permiten discriminar entre EVs provenientes de contextos tumorales con respecto a no tumorales. PPI: interacciones proteína-proteína.

3.8. EVs de Fb-TPC-1 producen un aumento en el mRNA de Gal-1 en Fb

Existen reportes que demuestran que CAFs producen GAL-1 en el TME [27]. GAL-1 ha sido relacionada con la creación de un microambiente favorable para las células tumorales, aumentando su proliferación, migración e invasión, es decir, aumentando su agresividad y manteniendo deprimido al sistema inmune [30]. Con el objetivo de evidenciar si la expresión de GAL-1 podría contribuir al conjunto de cambios fenotípicos observados en los Fb en nuestro modelo, se estudió la expresión del mRNA de Gal-1 en los Fb luego de su incubación con EVs provenientes de células TPC-1 y NThyOri, aisladas y/o co-cultivadas. En primer lugar, Fb fueron incubados con EVs provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1 durante 9, 14 y 24hs, siguiendo

los lineamientos descritos en la sección 2.6 de materiales y métodos. Se observó un incremento significativo en la expresión del mRNA de Gal-1 luego de la incubación de Fb con EVs provenientes de Fb-TPC-1 durante 14hs, en relación a los resultados obtenidos con EVs provenientes de células TPC-1 aisladas ($2,1 \pm 0,4$ vs. 1 ± 0 , 11; $p < 0,05$; Fig. 35B). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en la expresión del mRNA de Gal-1 cuando el Fb se incubó con EVs provenientes de NThyOri y Fb-NThyOri ($1,1 \pm 0,2$ vs. $1,3 \pm 0,3$; Fig. 35C) a las 14hs de incubación. Estos resultados contribuyen a considerar a las EVs, liberadas en entornos tumorales tiroideos, como actores importantes de la progresión tumoral dadas las funciones, ampliamente reconocidas, de GAL-1 en la promoción maligna de diversos tumores [30, 31, 34].

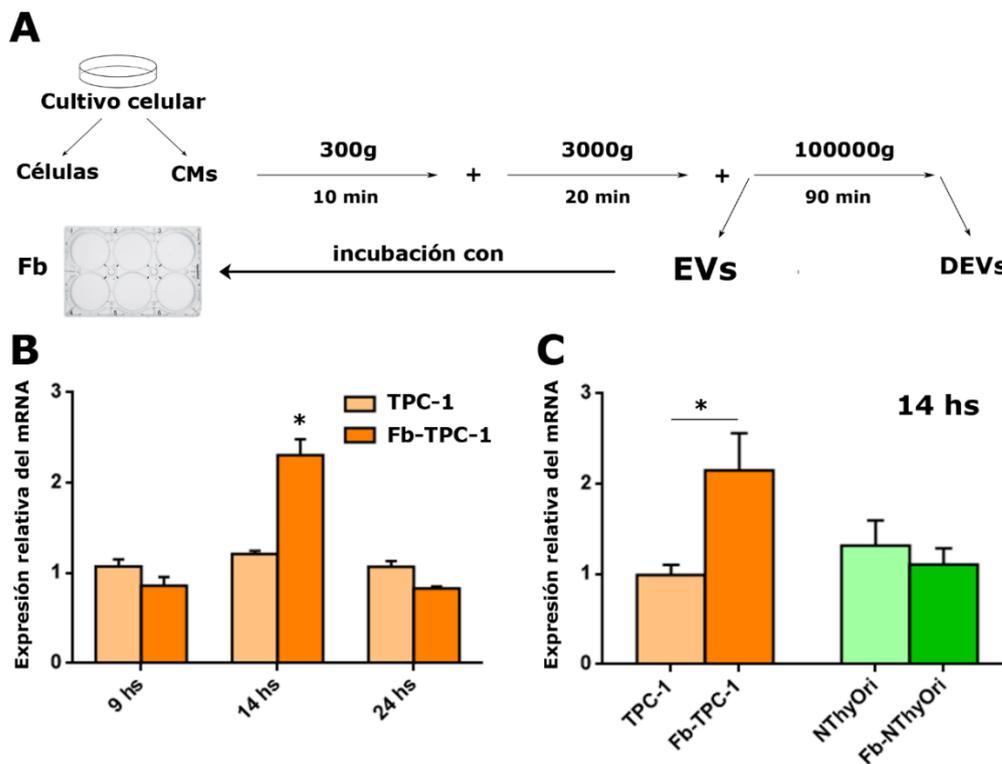


Figura 35. Análisis de la expresión de Gal-1 en Fb incubados con EVs. (A) Representación esquemática de la obtención de EVs y su posterior incubación con Fb. (B) Expresión relativa del mRNA de Gal-1 en Fb a distintos tiempos de incubación con EVs provenientes de TPC-1 y Fb-TPC-1. (C) Expresión relativa del mRNA de Gal-1 en Fb incubados con EVs provenientes de TPC-1, Fb-TPC-1, NThyOri y Fb-NThyOri a 14 hs de incubación. Se observó un aumento significativo en la expresión de GAL-1 en Fb luego de 14 hs de incubación con EVs provenientes de Fb-TPC-1 con respecto a TPC-1 ($*p < 0,05$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres determinaciones independientes.

3.9. Expresión de CD147 en células aisladas y co-cultivadas

Uno de los mecanismos de expresión y activación de MMPs propuestos en la bibliografía, para diversos tipos celulares, considera la participación de CD147 [26]. CD147 es una proteína transmembrana que se expresa en altos niveles sobre la superficie de muchas células con fenotipo tumoral, incluyendo células de carcinoma tiroideo [162, 163]. Además, ha sido demostrado que la interacción de célula tumoral-Fb induce la expresión de CD147 en Fb, produciéndose también su liberación proteolítica y la generación de formas solubles facilitando

su actividad a distancia del tumor primario [164]. Con el objetivo de estudiar la expresión de CD147 en células aisladas y su eventual modificación en células co-cultivadas, dada la interacción célula-célula, se evaluó la expresión de CD147 en la membrana de Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri aisladas y co-cultivadas mediante citometría de flujo (sección 6.3.2 de materiales y métodos). Según se muestra en la figura 36A, un alto porcentaje de células CD147 positivas se observó en las líneas celulares tiroideas TPC-1 ($78,4\pm 4,6$), 8505c ($89,8\pm 1,4$) y NThyOri ($79,1\pm 6,7$) aisladas, lo que no se modificó de manera significativa luego de que las mismas se co-cultivaran con los Fb ($79,7\pm 3,8$; $91,0\pm 2,2$ y $77,4\pm 8,4$, Fb-TPC-1; Fb-8505c; Fb-NThyOri, respectivamente). Por otro lado, se estudió la expresión de CD147 en Fb cultivados en forma aislada y luego de que los mismos estuvieran en contacto con células TPC-1, 8505c y NThyOri. Al igual que lo observado en células tiroideas, el porcentaje de Fb CD147 positivos ($42,6\pm 11,1$) no se alteró significativamente luego de su co-cultivo con TPC-1 ($56,7\pm 6,8$), 8505c ($66,8\pm 10,5$), NThyOri ($72,6\pm 3,2$; $p=0,12$) (Fig. 36B). De la misma manera, tampoco se observaron cambios en la MFI de expresión de CD147 al comparar células TPC-1, 8505c y NThyOri aisladas y/o co-cultivadas (Fig. 36C); ni al comparar la expresión de CD147 en Fb aislados con respecto a Fb co-cultivados con las diferentes líneas tiroideas (Fig. 36D). Estos resultados sugerirían que la interacción del Fb con las células tiroideas, no impacta en la expresión de CD147 a nivel celular. Sin embargo, su expresión en la célula, abre la posibilidad de estudiar el impacto de dicha interacción sobre la carga de CD147 en EVs.

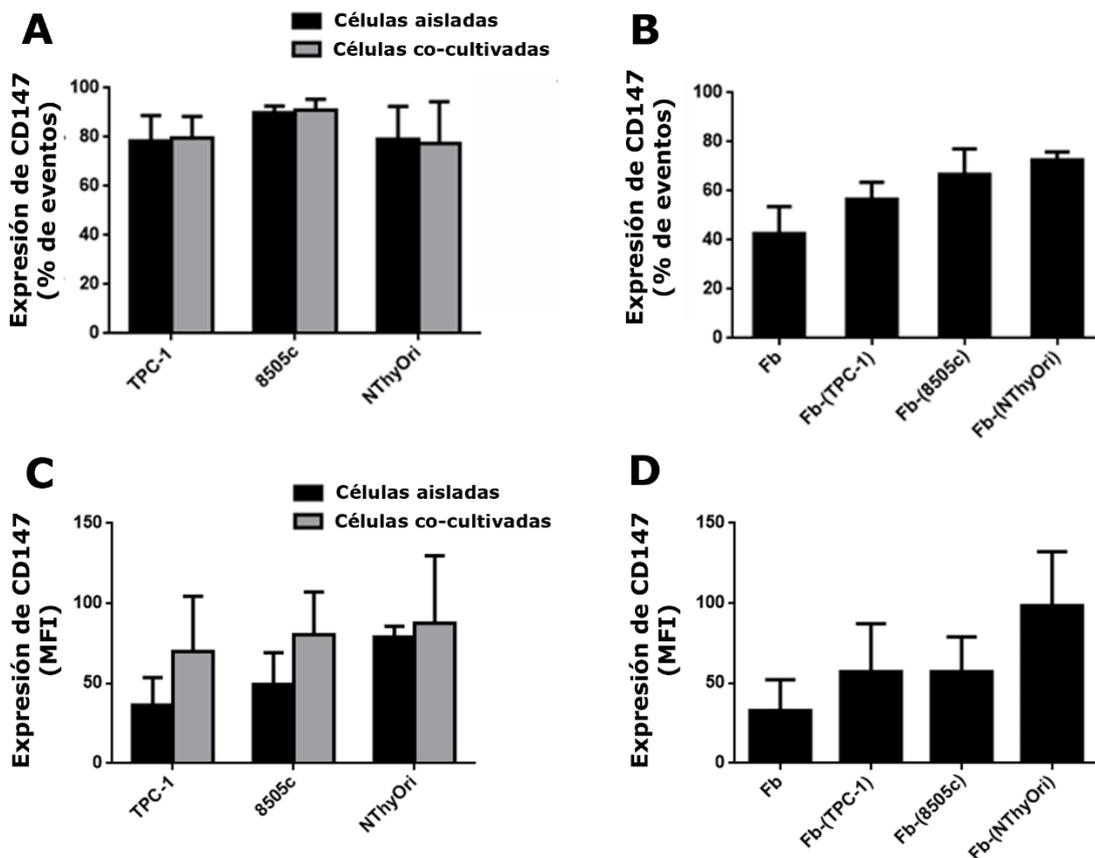


Figura 36. Expresión de CD147 en Fb, células tiroideas y los co-cultivos Fb-células tiroideas.

Los niveles de CD147 en Fb y células TPC-1, 8505c y NThyOri, y sus respectivos co-cultivos con Fb se analizaron por FACS. **(A)** Porcentaje de eventos CD147+ e **(C)** intensidad de fluorescencia media (MFI) en células tiroideas aisladas y co-cultivadas. La expresión de CD147 en Fb aislados, como en Fb co-cultivados con TPC-1, 8505c y NThyOri (Fb-(TPC-1), Fb-(8505c) y Fb-(NThyOri), respectivamente), se expresó como **(B)** porcentaje de eventos CD147+ y **(D)** MFI. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células CD147 positivas ni en la MFI entre Fb y células tiroideas aisladas y co-cultivadas. Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos cuatro determinaciones independientes.

3.10. EVs de Fb-TPC-1 y Fb-8505c presentan una expresión aumentada de CD147

Aunque CD147 fue identificado originalmente en la superficie de las células, muchos trabajos reportan la detección de CD147 en EVs [165]–[168]. Es así que la expresión de CD147 se evaluó en fracciones enriquecidas en EVs, mediante inmunomarcación por TEM (sección 2.2.3 de materiales y métodos), detectándose marca CD147+ en EVs provenientes de Fb, células TPC-1, 8505c y NThyOri aisladas, así como de células tiroideas co-cultivadas con Fb. En la figura 37A se muestran imágenes representativas de la expresión de CD147 en EVs provenientes de Fb-TPC-1 y Fb-8505c. La expresión de CD147 también fue analizada mediante ensayos de western blot (sección 6.1 de materiales y métodos), considerando a EVs provenientes del mismo número de células aisladas como co-cultivadas para su normalización. Como se observa en la Fig. 37B-E, EVs provenientes de Fb-TPC-1 ($0,14 \pm 0,03$) y Fb-8505 ($0,12 \pm 0,01$) mostraron una expresión de CD147 significativamente mayor en comparación a su expresión en EVs obtenidas a partir de TPC-1 ($0,08 \pm 0,01$; $p < 0,05$; Fig. 37C) y 8505c ($0,07 \pm 0,01$; $p < 0,05$; Fig. 37D) cultivadas en forma aislada. Sin embargo, este efecto no se observó al considerar EVs provenientes de NThyOri y Fb-NThyOri (Fig. 37E). En las muestras obtenidas de células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas, CD147 pudo ser detectada en la forma HG-CD147 (52 kDa), reportada en la literatura como la responsable de la expresión y activación de MMPs [26], así como en la que presenta baja glicosilación (32 kDa). Estos resultados introducen, por primera vez, la detección de CD147 en EVs provenientes de entornos tiroideos. Además, abre la posibilidad de su estudio en fluidos biológicos de pacientes con carcinomas tiroideos.

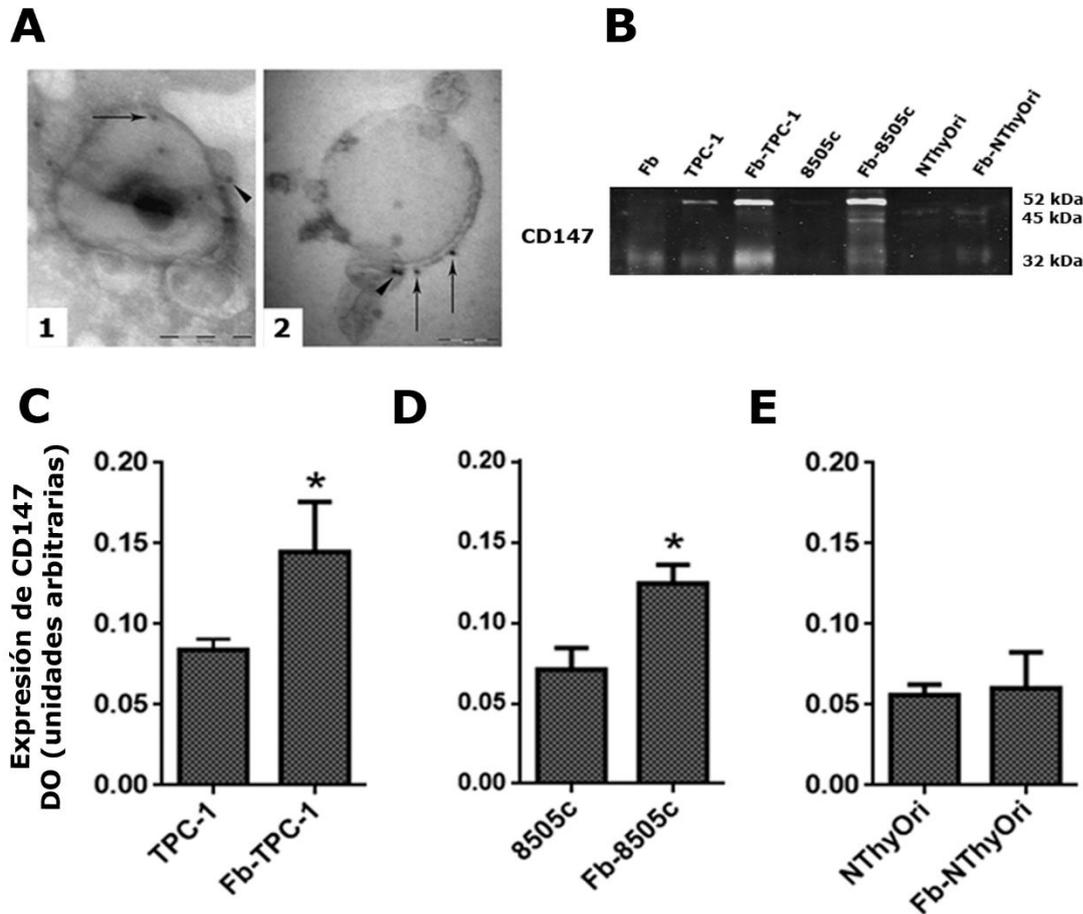


Figura 37. Expresión de CD147 en EVs provenientes de Fb, células tiroideas y los co-cultivos Fb-células tiroideas. (A) Microfotografías representativas de la inmunomarcación de CD147 con partículas de oro coloidal en EVs provenientes de Fb-TPC-1 (A1) y Fb-8505c (A2). CD147 se detecta tanto en EVs pequeñas (cabezas de flecha) como de mayor tamaño (flechas). (B) Western blot representativo de la expresión de CD147 en EVs aisladas de Fb, TPC-1, 8505c, NThyOri y sus co-cultivos Fb-TPC-1, Fb-8505c y Fb-NThyOri, normalizadas según el N° de células productoras al final del cultivo. Se detectó una expresión significativamente aumentada de CD147 en las EVs obtenidas a partir de (C) Fb-TPC-1 y (D) Fb-8505c en comparación con las EVs provenientes de TPC-1 y 8505c aisladas respectivamente (* $p < 0,05$, prueba t de Student). (E) No se detectaron diferencias significativas en la expresión de CD147 en las EVs provenientes de NThyOri y Fb-NThyOri. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres determinaciones independientes. Barras de escala: 200 nm.

III. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados descritos en este capítulo se concluye que:

- En el contexto de los co-cultivos del Fb con las células tumorales tiroideas, el Fb podría activarse y comportarse como CAFs.
- Los co-cultivos de Fb con las células tumorales tiroideas producen MMP2 activa. En el caso de Fb-TPC-1, esta activación se produce aún en ausencia del contacto directo célula-célula, mediado por EVs y/o factores solubles liberados en ese contexto.
- CMs de Fb-8505c presentan un aumento significativo en la actividad de proMMP9.
- EVs de Fb-TPC-1 inducen la activación de MMP2 en CMs de Fb y de la célula no tumoral tiroidea, así como un aumento en el mRNA de Gal-1 en Fb.
- Los interactores de MMP2 logran diferenciar EVs provenientes de células tumorales tiroideas aisladas y co-cultivadas con Fb, de EVs provenientes de la célula no tumoral tiroidea y su co-cultivo.
- La expresión de CD147 no se modifica en Fb ni células tiroideas aisladas o co-cultivadas. Sin embargo, CD147 se detectó en EVs provenientes de células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas y EVs provenientes de células tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb presentaron un aumento en su expresión.

4. CAPÍTULO IV: CAPTACIÓN DE EVs.

En el microambiente tumoral, la comunicación intercelular se produce tanto entre células homólogas, correspondientes al tumor; como entre células heterólogas, es decir entre diferentes células del estroma, o entre éstas con células tumorales y no tumorales. Para que las EVs lleven a cabo su efecto funcional en las células receptoras, éstas deben interactuar o ser incorporadas por las mismas. Según se mencionó en la sección de introducción, han sido descritas diferentes formas de incorporación de las EVs, o de su carga, tales como endocitosis, micropinocitosis, fagocitosis, fusión directa [66, 74].

4.1. Un patrón de marca compatible con la captación de EVs se observa en Fb co-cultivados con Fb y células tiroideas marcadas

Con el objetivo de estudiar la captación de EVs por los Fb, se ensayaron dos estrategias distintas. Inicialmente se analizó la captación de EVs aisladas y marcadas con un colorante fluorescente, siguiendo los lineamientos descritos en la sección 4.1 de materiales y métodos. Esta estrategia no arrojó resultados satisfactorios en nuestro modelo, dado que los controles negativos, es decir Fb incubados con CMs obtenidos de placas libres de células (centrifugados y tratados con colorantes fluorescentes en las mismas condiciones que las utilizadas para colorear las muestras de EVs) mostraron marcación positiva (datos no mostrados). Estos resultados falsos positivos, podrían deberse a que el exceso de colorante no logra ser eliminado eficientemente con los lavados. Como estrategia alternativa se decidió marcar a las células productoras de las EVs con los colorantes lipofílicos DiI y DiO, tal como se describe en la sección 4.2 de materiales y métodos, y de esta manera obtener EVs marcadas en cultivo. Para la realización de los ensayos de captación, los Fb fueron marcados con DiI (rojo) y las células TPC-1, 8505c y NThyOri con DiO (verde). Posteriormente, Fb no marcados fueron incubados de forma contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI+}, TPC-1^{DiO+}, 8505c^{DiO+}, NThyOri^{DiO+} o los co-cultivos, Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+}, Fb^{DiI+}-8505c^{DiO+}, Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+}. Con el objetivo de poner en evidencia la captación de EVs por los Fb receptores, el patrón de marca DiI+ y DiO+ se analizó en los Fb mediante inmunofluorescencia indirecta (sección 5.1.2 de materiales y métodos). La figura 38 muestra un patrón de marca punteado en Fb receptores, característico de la incorporación de EVs y similar al descrito por otros autores en la bibliografía [169]. Los Fb adquirieron marca DiI+ provenientes de Fb^{DiI+} (Fig. 38A) y de los co-cultivos Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+} (Fig. 38C, D, E), Fb^{DiI+}-8505c^{DiO+} y Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+} (imágenes no mostradas). También se observó en Fb receptores marca DiO+, provenientes de TPC-1^{DiO+} (Fig. 38B) y del co-cultivo Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+}, las que se evidenciaron en distintas células (Fig. 38C, D) o dentro de la misma célula (Fig. 38E) respecto a la marca DiI+. Resultados equivalentes se obtuvieron cuando Fb se incubaron con células 8505c^{DiO+}, NThyOri^{DiO+} y los co-cultivos Fb^{DiI+}-8505c^{DiO+} y Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+} (datos no mostrados), lo que sugiere que las EVs se transfieren en todas las situaciones ensayadas. Es importante mencionar que las marcas DiO+ en los Fb incubados con células NThyOri^{DiO+} aisladas y/o co-cultivadas fueron escasas, lo que dificultó su hallazgo en las células (imágenes no mostradas). Fb incubados con células no marcadas con los colorantes lipofílicos se utilizaron como controles de autofluorescencia del experimento (Fig. 38F, Fb incubado con TPC-1 no marcada). Por otro lado, Fb incubados sólo con el colorante

DiI+ o DiO+, colocado en el inserto del *transwell*, muestran un patrón de marca homogéneo o uniforme en la célula, diferente al patrón punteado observado anteriormente (Fig. 38G, H). En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que las marcas punteadas detectadas en los Fb serían compatibles con la captación de EVs marcadas.

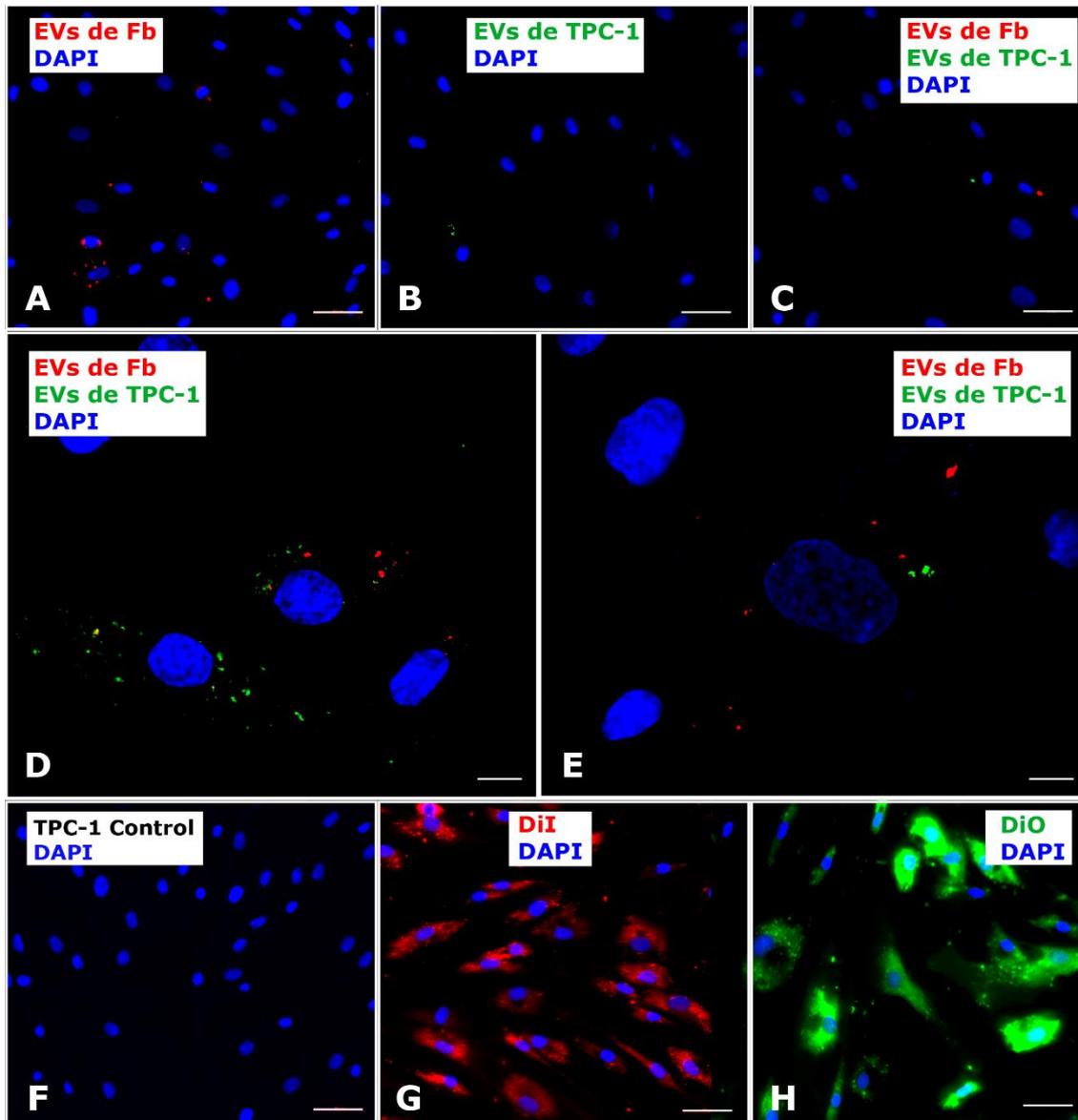


Figura 38. Análisis de la captación de EVs por Fb mediante inmunofluorescencia. Imágenes representativas, por inmunofluorescencia, de la captación de EVs por Fb incubados de forma contacto independiente (en *transwell*) con (A) Fb^{DiI}, (B) TPC-1^{DiO}, (C, D, E) Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO}. El patrón de marca punteado observado en los Fb receptores es compatible con la captación de EVs. La marca DiI+ y DiO+ se observa en (D) células diferentes o (E) en la misma célula. (F) Fb incubados con células TPC-1 no marcadas (control de autofluorescencia), (G) con colorante DiI y (H) con colorante DiO. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 50µm (A, B, C), 10µm (D, E) y 50µm (F, G, H).

4.2. Las EVs son captadas e incorporadas al interior celular del Fb

Con el objetivo de dilucidar si las EVs DiI+ y DiO+ observadas anteriormente se encuentran interaccionando a nivel de la superficie celular o fueron incorporadas al interior del Fb, se analizó la localización de las mismas utilizando microscopía confocal (sección 5.2.1 de

materiales y métodos), la que permitió la obtención de imágenes en dos planos. La figura 39 muestra la expresión de CD81, EEA1, TfR y CD63 en Fb por inmunofluorescencia indirecta (sección 5.1.2 de materiales y métodos). La marca correspondiente a CD81 en Fb, distribuida tanto en citoplasma como en la superficie de la célula, se utilizó para delimitar células únicas y estudiar la posible incorporación de las EVs marcadas en los Fb.

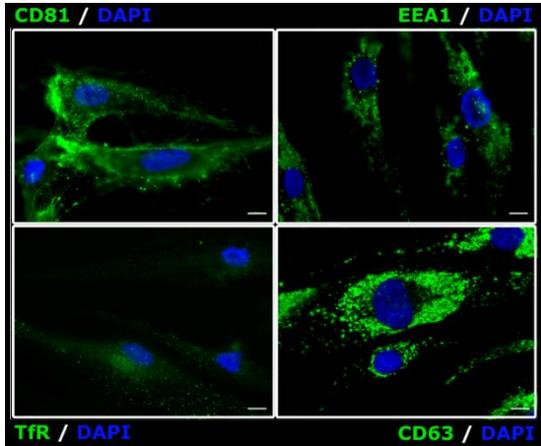


Figura 39. Expresión de CD81, EEA1, CD63 y TfR en Fb. Imágenes representativas, por inmunofluorescencia, de la expresión de CD81, EEA1, CD63 y TfR en Fb. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 10 μ m.

Como se observa en la figura 40A, Fb incubados de forma contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DI+}, mostraron EVs^{DI+} (vista superior, xy), las que se localizan en el interior celular (vista ortogonal, xz). De la misma forma, Fb incubados de forma contacto-independiente con TPC-1^{DI+} mostraron EVs^{DI+} (vista superior, xy) también presentes en el interior celular (vista ortogonal, xy) (Fig. 40B).

La microscopía confocal posee un poder resolutivo óptimo para estudios de co-localización de dos marcas fluorescentes, realizadas con fluoróforos diferentes, y que se encuentran en cercanía a cierta región subcelular. La expresión de EEA1, TfR y CD63 se utilizó a fin de identificar diferentes componentes de la vía endocítica en los Fb, marcadores que identifican endosomas tempranos, endosomas de reciclaje y endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares, respectivamente. En nuestro modelo experimental se analizó la co-localización cualitativa de EVs^{DI+} provenientes de Fb^{DI+}, señal más fácilmente observable, con estructuras EEA1+, TfR+ y CD63+. La figura 40C y D muestran la ausencia de co-localización entre EVs^{DI+} y EEA1^{verde} (proteína marcadora de endosomas tempranos) y entre EVs^{DI+} y TfR^{verde} (proteína marcadora de endosomas de reciclaje). Los gráficos presentes en la parte superior de las imágenes corresponden al perfil de intensidad obtenido para cada fluoróforo, en donde se observa que ambos perfiles de distribución y máximos de intensidad no coinciden entre sí. La figura 40E muestra la co-localización entre EVs^{DI+}, presentes en el citoplasma celular del Fb, y CD63^{verde} (proteína marcadora de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares), la cual se evidencia de color amarillo en la imagen, luego de superponer los canales rojo y verde. Además, los perfiles de intensidad mostrados por cada fluoróforo de manera independiente son muy similares entre sí. Esto sugiere que las EVs fueron captadas e incorporadas al interior celular, por lo que su cargo podría estar siendo liberado en el citoplasma de la célula receptora.

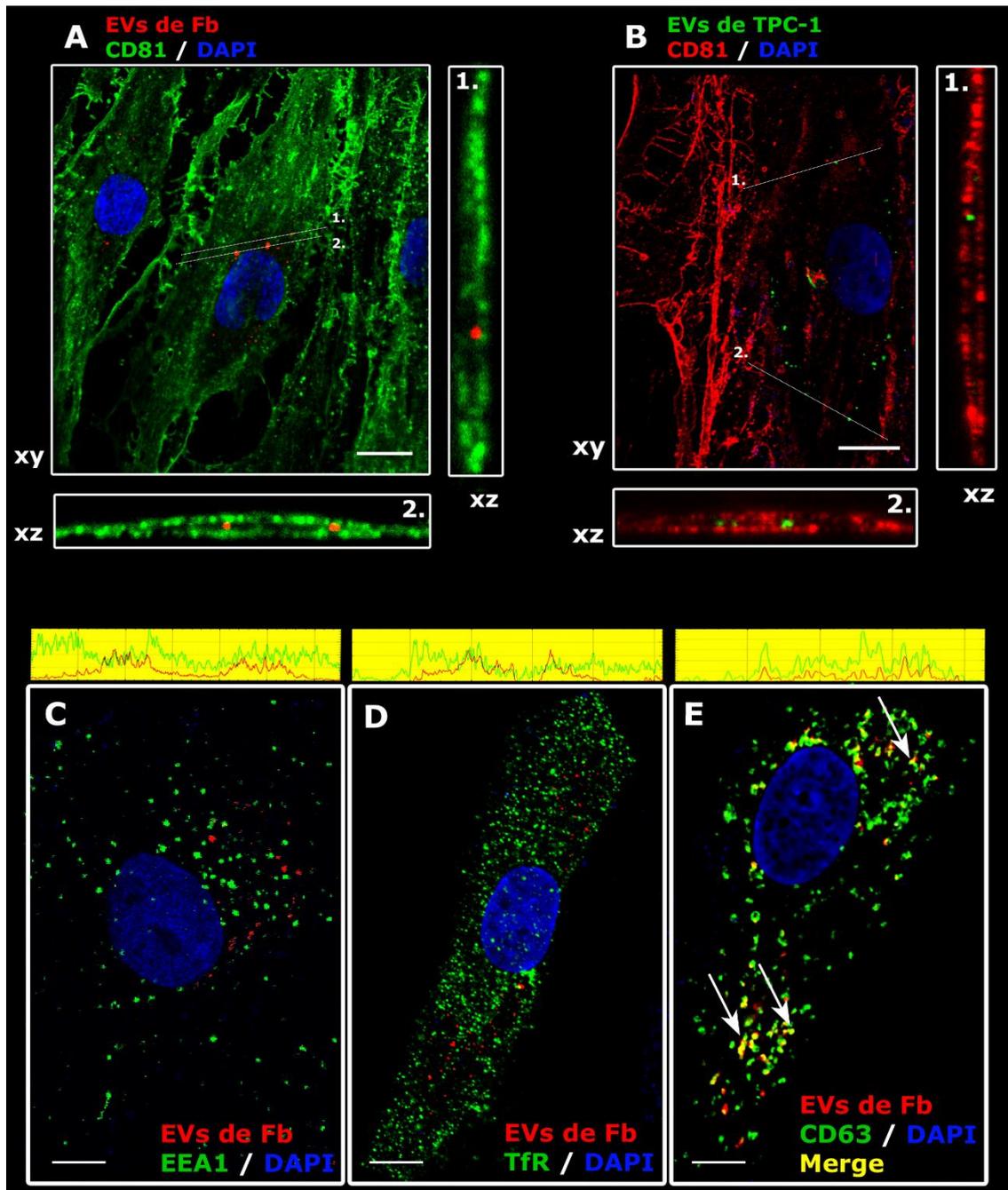


Figura 40. Análisis de la localización intracelular de EVs en Fb receptores. Imágenes representativas, por microscopía confocal, de la captación de EVs por Fb incubados de forma contacto-independiente (en *transwell*) con **(A)** Fb^{DII} y **(B)** TPC-1^{DIO} y posterior marcación de la superficie celular con CD81. Vista superior (xy) y vista ortogonal (xz). La vista ortogonal (xz) permite la visualización de las EVs en el interior de los Fb receptores **(A1, A2, B1, B2)**. Imágenes representativas de la co-localización de EVs^{DII+} con **(C)** EEA1 (marcador de endosomas tempranos), **(D)** TfR (marcador de endosomas de reciclaje) y **(E)** CD63 (marcador de endosomas tardíos/cuerpo multivesicular) en Fb receptores. Se observó una clara co-localización entre EVs^{DII+} (rojo) y CD63 (verde), representada por las marcas amarillas (indicadas por las flechas blancas) obtenidas al superponer las imágenes de ambos canales (merge). Los histogramas (panel superior) muestran el perfil de intensidad para cada fluoróforo, y la co-localización se evidencia por un perfil de distribución similar. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 12µm (A, B) y 8µm (C, D, E).

4.3. Los Fb incorporan más eficientemente EVs producidas por células tumorales tiroideas

Considerando los resultados obtenidos previamente que sugieren la presencia de EVs en el interior celular, y con el objetivo de profundizar los hallazgos obtenidos mediante microscopía de fluorescencia y confocal, se llevó a cabo la cuantificación de la señal fluorescente observada en los Fb receptores mediante citometría de flujo (sección 6.3 de materiales y métodos). Para ello, se evaluó el % de Fb que adquirieron EVs^{DiI+} (Fb DiI⁺), EVs^{DiO+} (Fb DiO⁺), así como la MFI obtenida al finalizar el cultivo. La figura 41 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de Fb DiI⁺, al ser incubados de forma contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI+}, Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+}, Fb^{DiI+}-8505c^{DiO+} y Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+}. Como puede observarse, el % de Fb DiI⁺, medido por el desplazamiento del pico de fluorescencia, fue de aproximadamente un 50% en todas las situaciones experimentales ensayadas (Fig. 41A, B). A su vez, no se observaron diferencias significativas en la MFI obtenidas (gráfico no mostrado) en las condiciones experimentales utilizadas.

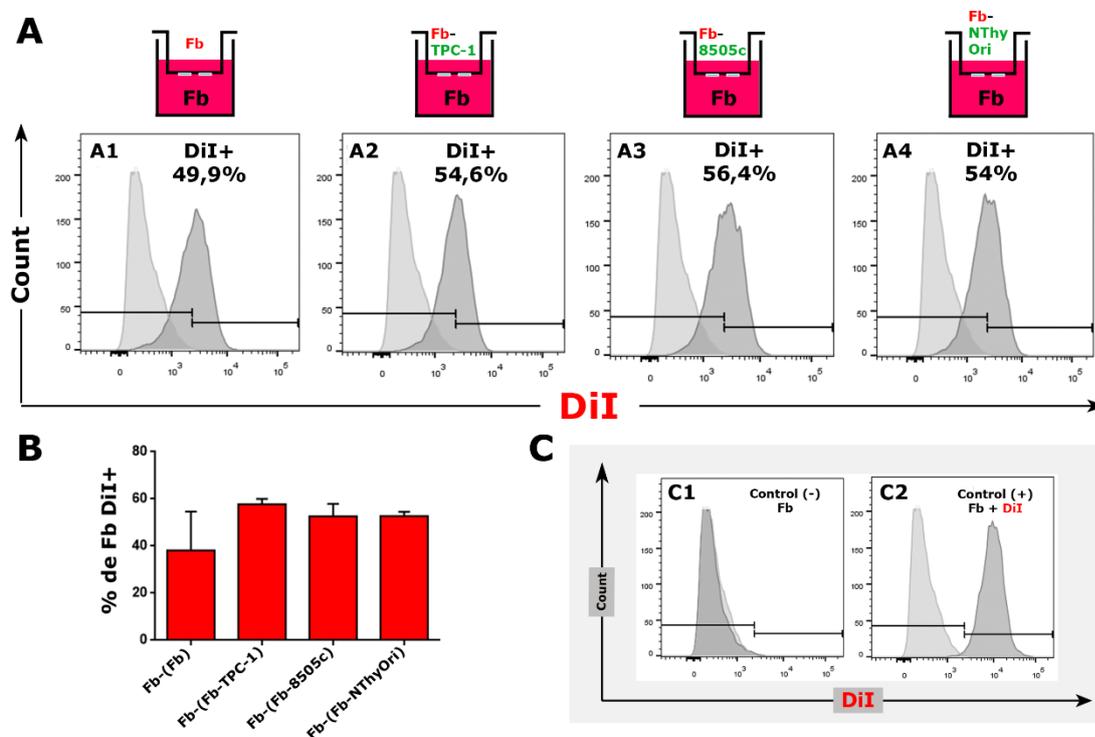


Figura 41. Cuantificación de la captación de EVs^{DiI+} por Fb receptores. (A) Histogramas representativos de la captación de EVs DiI⁺, mediante FACS, por Fb incubados de forma contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI} aislados (**A1**); Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO} (**A2**); Fb^{DiI}-8505c^{DiO} (**A3**); Fb^{DiI}-NThyOri^{DiO} (**A4**). **(B)** Fb captan EVs provenientes de Fb aislados y/o co-cultivados de modo equivalente. La captación se expresó como el porcentaje de Fb DiI⁺ (media ± SEM) a tiempo final de cultivo, a partir de tres experimentos independientes. La notación entre paréntesis indica las células presentes en el inserto del *transwell*. **(C)** Controles negativo (**C1**, Fb no marcados) y positivo (**C2**, Fb incubados con el colorante DiI), utilizados para la selección de la población de células.

En la figura 42 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de Fb DiO⁺, luego de la incubación de forma contacto-independiente (en *transwell*) con TPC-1^{DiO+}, 8505c^{DiO+} y NThyOri^{DiO+} aisladas o co-cultivadas con Fb. Dado que el % de Fb DiO⁺ obtenidos luego de la

incubación con células tiroideas aisladas o co-cultivadas no varía significativamente, ambos valores se unieron como representativos de un mismo entorno celular (Fig. 42A, B). Como muestra la figura 42B, el % de Fb DiO⁺ aumentó significativamente al incubar Fb con TPC-1^{DiO+} y TPC^{DiO+}-Fb^{DiI+} (entorno tumoral de TPC-1) respecto a los resultados obtenidos luego de la incubación con NThyOri^{DiO+} y NThyOri^{DiO+}-Fb^{DiI+} (entorno no tumoral) ($5,2 \pm 0,7$ vs. $1,5 \pm 0,3$; $p < 0,05$). Una tendencia similar se obtuvo al comparar los resultados obtenidos en Fb incubados con 8505c^{DiO+} y 8505c^{DiO+}-Fb^{DiI+} (entorno tumoral de 8505c) vs. NThyOri^{DiO+} y NThyOri^{DiO+}-Fb^{DiI+} ($4,45 \pm 0,9$ vs. $1,5 \pm 0,3$), aunque sin alcanzar significancia estadística. Al analizar la MFI de las poblaciones de Fb DiO⁺, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las condiciones ensayadas (gráfico no mostrado). Estos resultados sugieren que los Fb presentarían una mayor avidéz por EVs producidas por células tiroideas en un entorno tumoral con respecto a EVs producidas en un entorno no-tumoral. A su vez, EVs provenientes de células tumorales tiroideas podrían mediar una comunicación más eficiente con los Fb que EVs provenientes de células no tumorales tiroideas.

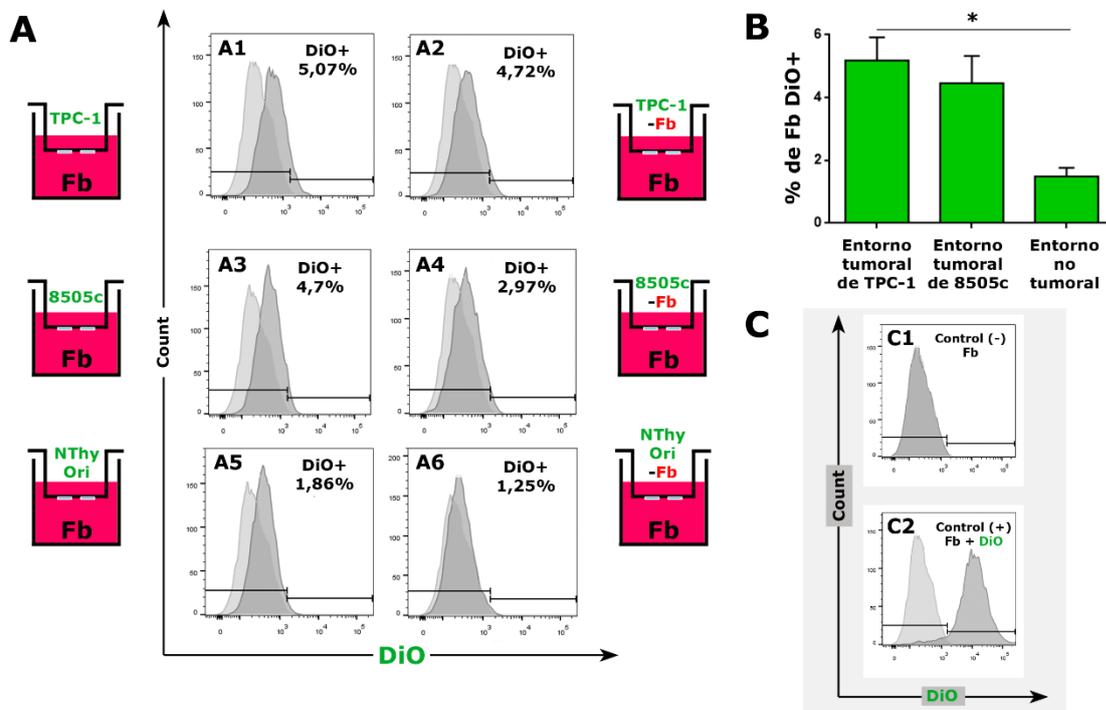


Figura 42. Cuantificación de la captación de EVs^{DiO+} por Fb receptores. (A) Histogramas representativos de la captación de EVs DiO⁺, mediante FACS, por Fb incubados en forma contacto independiente (en *transwell*) con TPC-1^{DiO} (A1); Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO} (A2); 8505c^{DiO} (A3); Fb^{DiI}-8505c^{DiO} (A4); NThyOri^{DiO} (A5); Fb^{DiI}-NThyOri^{DiO} (A6). **(B)** Se observó un aumento significativo en el porcentaje de Fb DiO⁺ tras su co-cultivo en *transwell* con TPC-1^{DiO} o Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO} (entorno tumoral de TPC-1) respecto a Fb incubados con NThyOri^{DiO} o Fb^{DiI}-NThyOri^{DiO} (entorno no tumoral) ($p < 0,05$; Kruskal Wallis test, Dunn's post test). La captación se expresó como el porcentaje de Fb DiO⁺ (media \pm SEM) a tiempo final de cultivo, a partir de tres experimentos independientes. **(C)** Controles negativo (C1, Fb no marcados) y positivo (C2, Fb incubados con el colorante DiO), utilizados para la selección de la población de células.

4.4. Un patrón de marca compatible con la captación de EVs se observa en células TPC-1 co-cultivadas con Fb y células tiroideas marcadas

Así como se demostró que los Fb incorporan diferencialmente EVs provenientes de entornos tumorales y no tumorales, también se analizó la incorporación de EVs por células TPC-1. Para ello, células TPC-1, no marcadas, fueron incubadas de forma contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI+}, TPC-1^{DiO+}, NThyOri^{DiO+}, o sus co-cultivos Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+} y Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+} (sección 4.2 de materiales y métodos), y el patrón de marca DiI+ y DiO+ se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta (sección 5.1.2 de materiales y métodos). Al igual que lo observado en Fb, un patrón de marca punteado se evidenció en las células TPC-1 receptoras, característico de la incorporación de EVs. Las células TPC-1 adquirieron marca DiI+ provenientes de Fb^{DiI+} (Fig. 43A, C), como de Fb^{DiI+} co-cultivados con células tiroideas, Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+} (Fig. 43B, E) y Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+} (imagen no mostrada). También se observó en células TPC-1 receptoras, marca DiO+ proveniente de TPC-1^{DiO+} (Fig. 43D) y de Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+}. La marca DiI+ y DiO+ pudo evidenciarse en diferentes células (Fig. 43B, E; *) o en posiciones similares dentro de la misma célula (Fig. 43B; flechas). De la misma manera, células TPC-1 adquirieron marca DiO+ provenientes de NThyOri^{DiO+} y de Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+} (imágenes no mostradas). La figura 43F corresponde a células TPC-1 incubadas con Fb no marcados, control de autofluorescencia del experimento. Las figuras 43G y H, por su parte, corresponden a células TPC-1 que se incubaron con los colorantes DiI y DiO en el inserto del *transwell*, respectivamente, evidenciando un patrón de marca diferente al patrón punteado observado anteriormente.

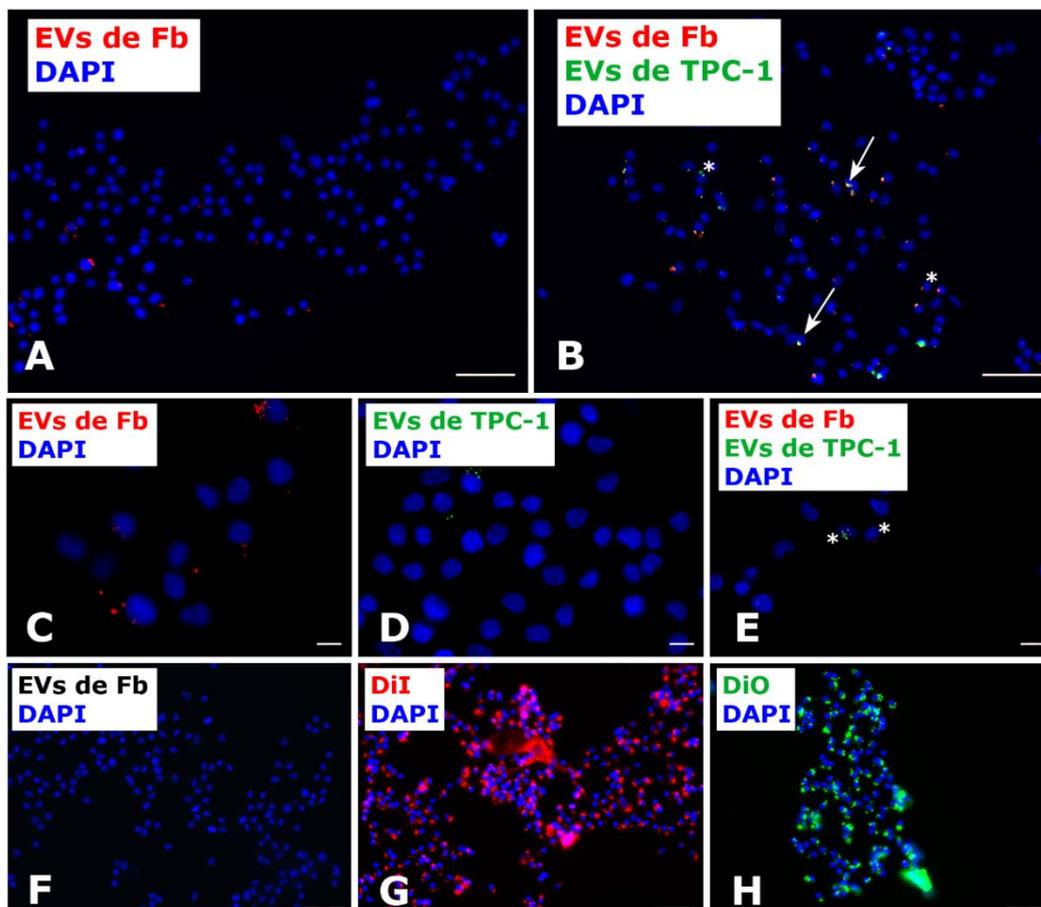


Figura 43. Análisis de la captación de EVs por TPC-1 mediante inmunofluorescencia.

Imágenes representativas, por inmunofluorescencia, de la captación de EVs por células TPC-1 incubadas en *transwell* con (A) Fb^{DiI}, (B) Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO}, (C) Fb^{DiI}, (D) TPC-1^{DiO}, (E) Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO}. El patrón de marca punteado observado en las TPC-1 receptoras es compatible con la captación de EVs. (F) TPC-1 incubadas con Fb no marcados (control de autofluorescencia), (G) con colorante DiI y (H) con colorante DiO. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 50µm (A, B, F, G, H) y 10µm (C, D, E). Los asteriscos indican la presencia de marcas DiI+ y marca DiO+ ubicadas en células diferentes. Las flechas blancas indican la presencia de marcas DiI+ y DiO+ en la misma célula.

4.5. Las EVs son captadas e incorporadas al interior celular de TPC-1

Con el objetivo de demostrar si las EVs DiI+ y DiO+, observadas en los ensayos de inmunofluorescencia, se encuentran en el interior de la célula TPC-1, se analizó la localización de las mismas utilizando microscopía confocal (sección 5.2.1 de materiales y métodos). La figura 44A, B muestra el patrón de marcación correspondiente a CD81 y a CD63 en TPC-1, respectivamente. Al igual que lo realizado en el caso de Fb, la marca correspondiente a CD81, distribuida tanto en citoplasma como en la superficie de la célula, se utilizó para delimitar células únicas y estudiar la posible incorporación de las EVs marcadas en células TPC-1. La figura 44C muestra células TPC-1, incubadas de forma contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI+}, que presentan EVs^{DiI+} (vista superior, xy) en el interior celular (vista ortogonal, xz). Por otro lado, la expresión de CD63 se utilizó como marcador de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares, para los estudios de co-localización cualitativa con EVs^{DiI+} y EVs^{DiO+}, provenientes de Fb^{DiI+} y de TPC-1^{DiO+}. En la figura 44D las flechas indican zonas de co-localización (amarillo) entre EVs^{DiI+}, presentes en el citoplasma celular de TPC-1 y CD63^{verde} (merge). De la misma manera, en la Fig 44E las flechas señalan la co-localización (amarillo) entre EVs^{DiO+}, presentes en el citoplasma celular de TPC-1, y CD63^{roja} (merge). Los gráficos D1 y E1 muestran los perfiles de intensidades obtenidos para cada fluoróforo, en las células seleccionadas (recuadros d1 y e1 en las fotografías), los que son muy similares entre sí. Esto sugiere que las EVs provenientes de Fb y TPC-1 fueron captadas e incorporadas al interior celular de TPC-1 y su cargo podría estar siendo liberado en el citoplasma de esta célula.

4.6. Células TPC-1 incorporan de manera equivalente EVs provenientes de células tiroideas tumorales y no tumorales

Con el objetivo de profundizar en los hallazgos obtenidos en células TPC-1 mediante microscopía de fluorescencia, se llevó a cabo la cuantificación de las señales DiI+ y DiO+ mediante citometría de flujo (sección 6.3.1 de materiales y métodos). La incubación de células TPC-1 de manera contacto-independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI+}, Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+}, Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+}, dio como resultado alrededor de un 80% de TPC-1 DiI+, en todas las situaciones experimentales ensayadas (Fig. 45A, C). A su vez, tampoco se observaron diferencias significativas en la MFI obtenidas (datos no mostrados). Dado que el % de TPC-1 DiO+ obtenidos luego de la incubación con células tiroideas aisladas o co-cultivadas no varía significativamente, ambos valores se unieron como representativos de un mismo entorno celular. Como puede observarse en la figura 45B, D, la incubación de células TPC-1 con TPC-1^{DiO+} y Fb^{DiI+}-TPC-1^{DiO+} (entorno tumoral de TPC-1) así como con NThyOri^{DiO+} y Fb^{DiI+}-NThyOri^{DiO+} (entorno no tumoral) dio como resultado alrededor de un 4% TPC-1 DiO+,

independientemente del tipo celular que origina a las EVs^{DiO+}, no observándose diferencias significativas ni en el % de células DiO+ ni en la MFI (dato no mostrado). Los controles utilizados para la citometría se muestran en la figura 45E.

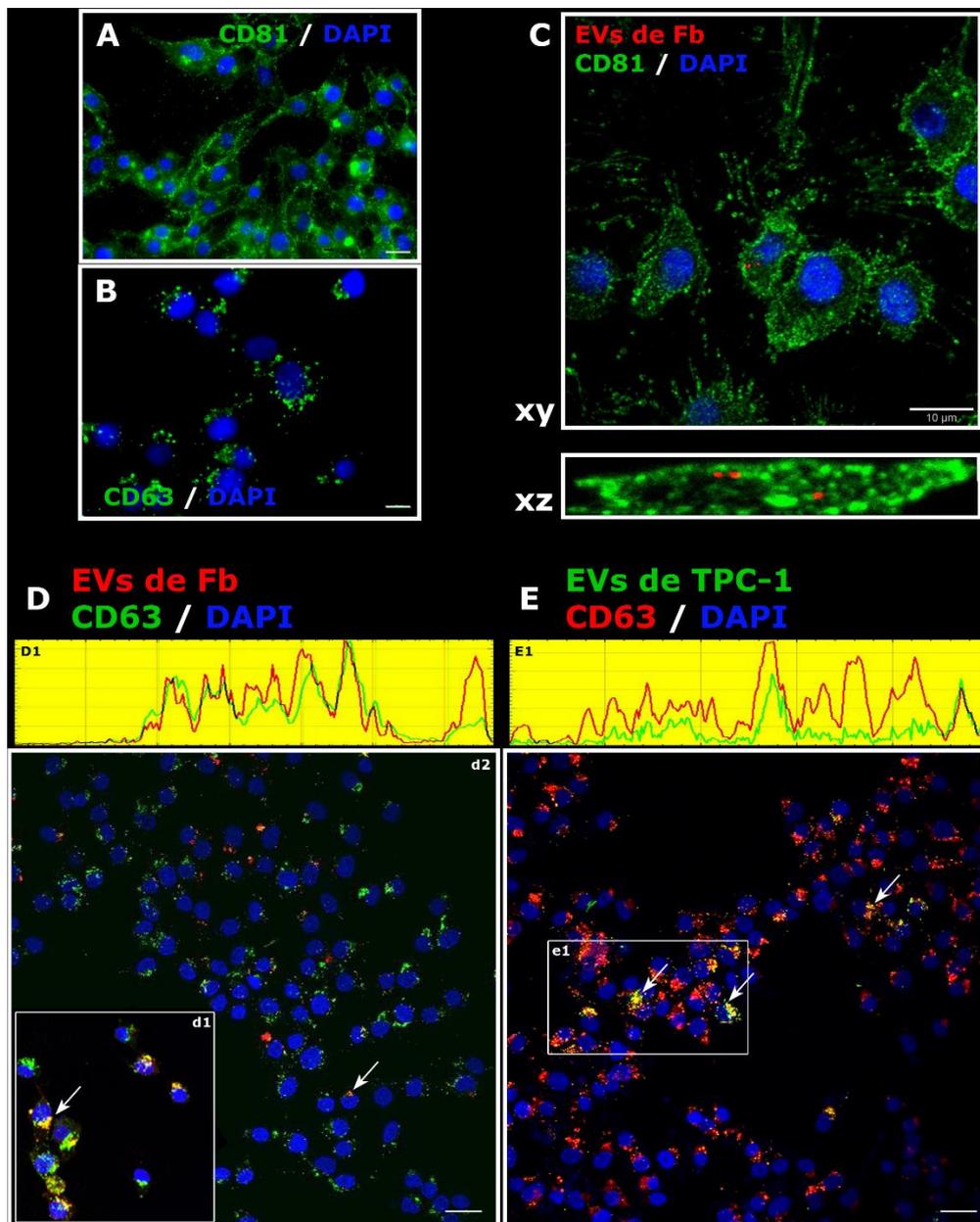


Figura 44. Análisis de la localización intracelular de EVs en TPC-1 receptores. Imágenes representativas, por inmunofluorescencia, de la expresión de **(A)** CD81 y **(B)** CD63 en células TPC-1. Imágenes representativas, por microscopía confocal, de la captación de EVs por células TPC-1 incubadas de manera contacto independiente (en *transwell*) con **(C)** Fb^{DiI} y posterior marcación de la superficie celular con CD81. Vista superior (xy) y vista ortogonal (xz), esta última permite la visualización de las EVs en el interior de las células TPC-1 receptoras. Imágenes representativas de la co-localización de **(D)** EVs^{DiI+} con CD63 (**d1 y d2**) y **(E)** EVs^{DiO+} con CD63 en TPC-1 receptoras. Se observó una clara co-localización entre EVs^{DiI+} (rojo) y CD63 (verde) así como EVs^{DiO+} (verde) y CD63 (rojo), representada por las marcas amarillas (indicadas por las flechas blancas) obtenidas al superponer las imágenes de ambos canales (merge). Los histogramas (panel superior) **(D1 y E1)** muestran el perfil de intensidad para cada fluoróforo, en las células seleccionadas por los rectángulos blancos (**d1 y e1**) y la co-localización se evidencia por un perfil de distribución similar. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 10 μm (A, B, C, D, E).

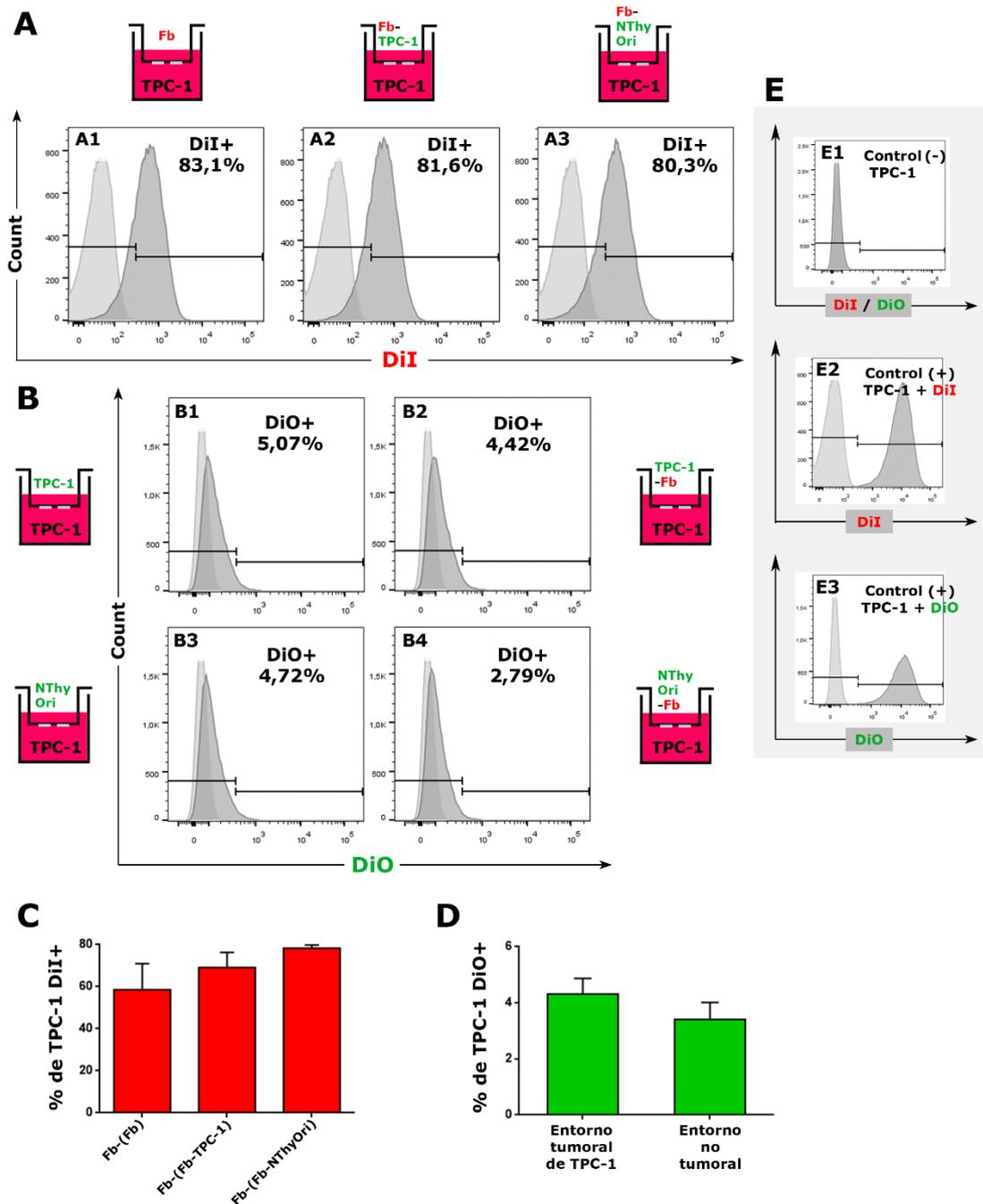
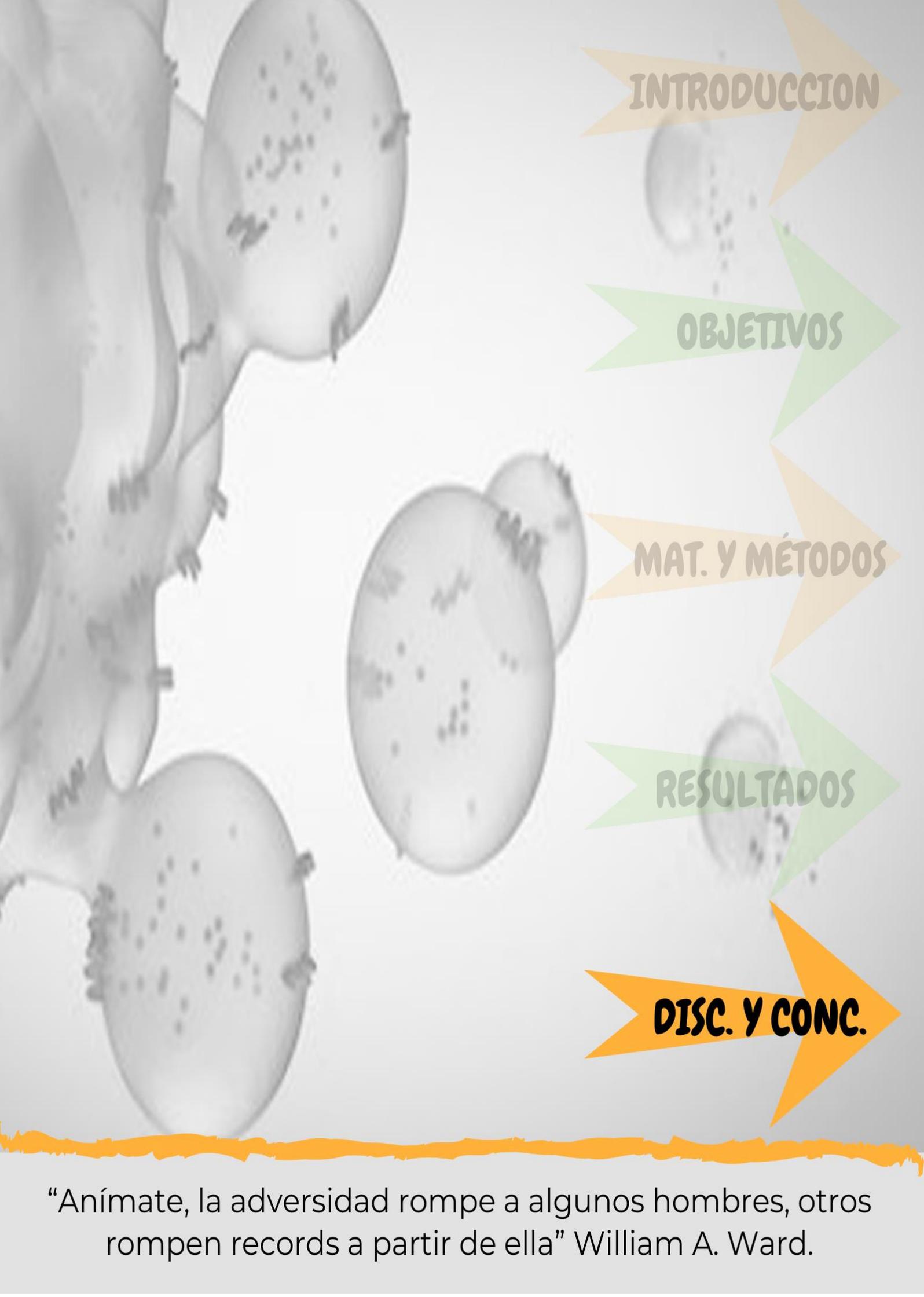


Figura 45. Cuantificación de la captación de EVs^{DiI+} y EVs^{DiO+} por TPC-1 receptores. (A) Histogramas representativos de la captación de EVs DiI+, mediante FACS, por células TPC-1 incubadas de manera contacto independiente (en *transwell*) con Fb^{DiI} aislados (**A1**); Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO} (**A2**); Fb^{DiI}-NThyOri^{DiO} (**A3**). **(B)** Histogramas representativos de la captación de EVs DiO+, mediante FACS, por células TPC-1 incubadas de manera contacto independiente (en *transwell*) con TPC-1^{DiO} (**B1**); Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO} (**B2**); NThyOri^{DiO} (**B3**); Fb^{DiI}-NThyOri^{DiO} (**B4**). **(C)** Células TPC-1 captan EVs DiI+ provenientes de Fb aislados y/o co-cultivados de modo equivalente. **(D)** Células TPC-1 captan EVs DiO+ provenientes de TPC-1^{DiO} o Fb^{DiI}-TPC-1^{DiO} (entorno tumoral de TPC-1) y NThyOri^{DiO} o Fb^{DiI}-NThyOri^{DiO} (entorno no tumoral) de modo equivalente. La captación se expresó como el porcentaje de TPC-1 DiI+ o DiO+ (media ± SEM) a tiempo final de cultivo, a partir de tres experimentos independientes. La notación entre paréntesis indica las células presentes en el inserto del *transwell*. **(E)** Control negativo para la selección de la población de células (**E1**, Control (-) TPC-1); control positivo DiI, (**E2**, Control TPC-1 + colorante DiI); control positivo DiO, (**E3**, Control TPC-1 + colorante

IV. CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados descritos en este capítulo se concluye que:

- Tanto Fb como células TPC-1 presentan un patrón de marca compatible con la captación de EVs provenientes de Fb, células tiroideas y sus co-cultivos.
- Las EVs son captadas e incorporadas al interior celular de Fb y TPC-1, por lo que su cargo podría estar siendo liberado en el citoplasma de la célula receptora para que su efecto fenotípico pueda ser llevado a cabo.
- Células TPC-1 incorporan EVs provenientes de células tiroideas tumorales y no tumorales de manera equivalente.
- Los Fb presentan una mayor captación de EVs provenientes de células tumorales tiroideas respecto a células no tumorales, lo que sugiere una comunicación más eficiente, a través de EVs, con células tumorales tiroideas.



INTRODUCCION

OBJETIVOS

MAT. Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISC. Y CONC.

“Anímate, la adversidad rompe a algunos hombres, otros rompen records a partir de ella” William A. Ward.

En el presente trabajo de tesis doctoral, utilizando un modelo de cultivo *in vitro* que consiste en cultivos contacto-dependiente de Fb normales y células tumorales tiroideas, se dilucidó el rol crítico del Fb, y su comunicación con las células tumorales tiroideas, en la secreción de EVs. Además, se evidenció el impacto de las EVs en la actividad proteolítica del TME, influenciando la secreción de proteasas e, indirectamente, la migración de células tumorales tiroideas. La caracterización del proteoma de EVs derivadas de Fb, células tumorales y no tumorales tiroideas así como de sus co-cultivos, sugirió que la interacción de células tumorales tiroideas con Fb impactaría en el cargo de las EVs que se producen en ese entorno, es decir, en el mensaje ubicuo que transportan y su funcionalidad. Los principales resultados en nuestro modelo, resumidos en la **figura 46**, muestran que en el TME la eficiente comunicación entre Fb y células tumorales tiroideas, produce EVs con un proteoma biológicamente relevante para el cáncer de tiroides, participando en la remodelación de la ECM y la degradación del colágeno contenido en la misma. Por el contrario, los estudios realizados en el contexto no tumoral sugieren que la comunicación entre Fb y células no tumorales tiroideas no proporcionaría una ventaja funcional a las EVs secretadas, conservando su mensaje original relacionado con el metabolismo celular y la homeostasis del tejido. En el TME tiroideo, estas EVs desempeñan un rol activo en la síntesis y activación de MMPs, facilitando la degradación de la ECM y, potencialmente, la migración e invasión de las células tumorales, promoviendo la agresividad y progresión del tumor.

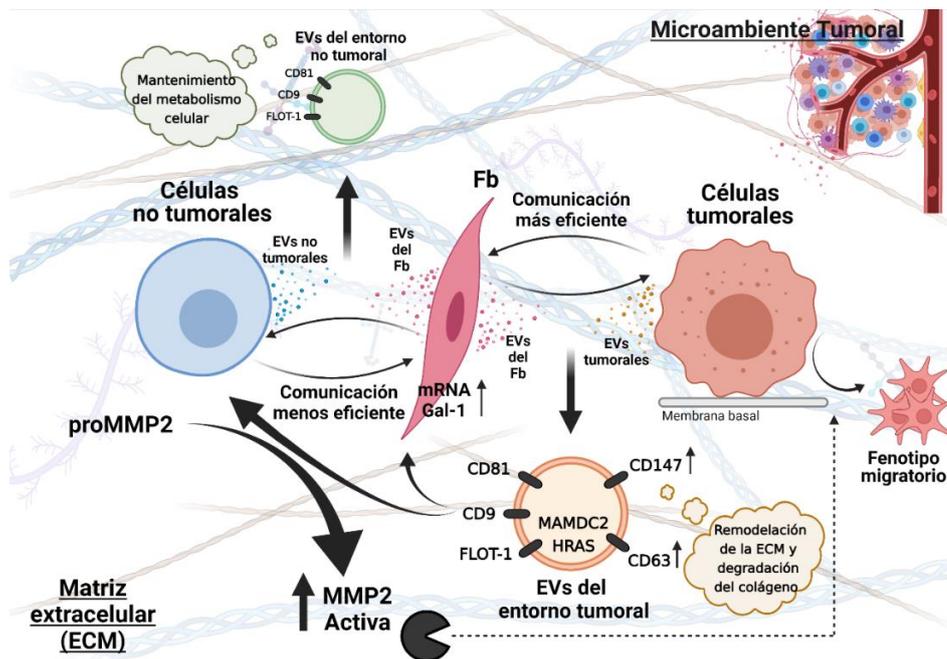


Figura 46. La comunicación entre Fb y células tumorales produce EVs con un cargo proteico vinculado con la remodelación de la ECM. Modelo propuesto que describe el rol de la comunicación, entre Fb y células tumorales tiroideas, en la liberación de EVs especializadas en la degradación de la ECM y del colágeno contenido en la misma. En EVs de carcinoma papilar tiroideo, se destaca la presencia enriquecida de MAMDC2, HRAS y CD147, las que podrían resultar biológicamente relevantes en cáncer de tiroides. El papel funcional de estas EVs, en el TME tiroideo, conduce a la secreción/activación de MMP2, por Fb y células no tumorales, así como a la expresión de Gal-1 en Fb, favoreciendo la degradación de la ECM y, potencialmente, la migración e invasión de las células tumorales, promoviendo la agresividad y progresión del tumor.

Un hallazgo interesante en el desarrollo de este trabajo fue que **la interacción del Fb con células tumorales tiroideas promueve la secreción de MMPs y estimulan su actividad**. Estudios realizados en biopsias de pacientes con distintas patologías tumorales, describen una clara asociación entre un incremento de la actividad de MMP2 y MMP9 con la agresividad y progresión del tumor, así como con el mal pronóstico del paciente. En cáncer de ovario, la expresión de proMMP2 y proMMP9, así como del uPA y su inhibidor tipo 1 incrementaron significativamente en el tejido tumoral, obteniendo las expresiones más altas en carcinomas metastásicos avanzados, en comparación a adenomas benignos. Además, la enzima MMP2 activa se detectó solamente en tejido tumoral y metástasis, sin mostrar expresión en adenoma benigno y tumores potencialmente malignos [170]. En cáncer de mama, la expresión de MMP2 y MMP9 en tejido neoplásico fue significativamente mayor que la de los tejidos normales adyacentes al tumor y, además, su expresión se mostró estrechamente relacionada con metástasis en ganglios linfáticos y una disminución en la supervivencia en los pacientes [171]. Un meta-análisis en cáncer de mama, publicado más recientemente, demostró que la sobreexpresión de ambas enzimas se asociaron con un estadio clínico más avanzado de la enfermedad, pudiendo considerárselas como prometedores marcadores pronóstico [172]. El aumento en la expresión de MMP2 en células tumorales y estromales también estuvo relacionada con la progresión tumoral y metástasis en cáncer de próstata [173]. Concordantemente, nuestro grupo de trabajo también reportó un incremento significativo en la actividad de proMMP9 en tejidos humanos de cáncer de próstata en comparación con la actividad de esta enzima en hiperplasia prostática benigna [174]. En cuanto al papel de las MMPs en cáncer de tiroides, un incremento en la expresión de MMP2 y MMP9 en tejidos tumorales se asoció con metástasis en ganglios linfáticos en pacientes con PTC [175]. En este sentido, se ha descrito que los niveles de MMP2 en suero son un factor relevante en la evaluación pronóstica de los pacientes con PTC y niveles preoperatorios de MMP2 constituirían un factor predictivo de metástasis en ganglios linfáticos y de la persistencia/recurrencia de la enfermedad en pacientes varones [176]. Más recientemente, estudios similares demostraron que los niveles preoperatorios de MMP2, MMP9 y sus inhibidores, TIMP1 y TIMP2, en sangre periférica de pacientes con DTC, fueron significativamente mayores que los medidos en pacientes con nódulos tiroideos benignos. Además, niveles postoperatorios de estas moléculas en la sangre de pacientes con DTC, fueron significativamente más bajos; demostrando de esta manera el rol predictivo de MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2 en el diagnóstico y pronóstico de DTC [177]. Además del rol de las MMPs en la degradación de la ECM, estas también participan en la EMT, como en las señales que controlan la migración inicial de células epiteliales. En células tumorales, MMP2 y MMP9 suelen estar relacionadas con la ruptura de la membrana basal, por lo que están implicadas en los procesos de metástasis. En este sentido, ambas enzimas demostraron ser efectores críticos de la invasión en líneas celulares de carcinoma papilar y folicular tiroideo, por lo que el uso de inhibidores de MMPs se consideró como un enfoque terapéutico para el tratamiento de carcinomas tiroideos agresivos [178]. Es así que existe una amplia y demostrada importancia de la expresión de MMP2 y MMP9 en distintos tipos de tumores. Particularmente en cáncer de tiroides, nuestros resultados sugieren que **el**

Fb, y más específicamente, la interacción Fb-célula tumoral proporcionaría un entorno favorable para la expresión y activación de MMPs en el TME tiroideo.

Los CAFs representan uno de los principales componentes estromales del TME y están implicados en todas las capacidades adquiridas por las células al transformarse en tumorales [179]. La capacidad del Fb de promover la progresión y agresividad tumoral se ha demostrado en varios tipos de tumores como el de próstata [180], mama [181], pulmón [182] e hígado [183]. Específicamente en cáncer de tiroides, los CAFs se encontraron aumentados en comparación con Fb del tejido tiroideo normal, y la mayoría de los estudios correlaciona la expresión de marcadores de activación de estas células con características clínicas y patológicas agresivas [84]. En nuestro modelo experimental, pudimos observar que **en el contexto de los co-cultivos de Fb con las líneas tumorales tiroideas, el Fb podría activarse y comportarse como CAFs.** En este sentido, nuestro grupo reportó previamente que una línea celular de Fb humanos, MRC-5, adquirió un fenotipo de CAFs al ponerse en contacto con CMs provenientes de células 8505c y, además, el cambio fenotípico fue acompañado de una activación de la vía Src/Akt. Por su parte, la inducción de proteínas marcadoras de fenotipo CAFs, α -SMA y PDGFR- β , también pudo observarse en Fb tiroideos humanos luego de ser cultivados en contacto con CMs de 8505c [101]. Más recientemente, la expresión de la lisil oxidasa [184], la síntesis y depósito de colágeno (COL1A1) y la presencia simultánea de CAFs, en asociación con características clinicopatológicas más agresivas, también se han descrito en muestras humanas de cáncer de tiroides [102]. En diferentes entornos tumorales, varios autores recapitulaban la importancia de la comunicación dinámica y bidireccional entre Fb y células tumorales, así como la liberación y la actividad de las EVs debido a esta interacción [8, 185]. Las EVs, como clásicos mediadores de la comunicación intercelular en el TME, impactan en el comportamiento de todas las células que conforman el mismo. Sin embargo, evidencias que relacionan el *crossstalk* entre Fb y células tumorales tiroideas, con la secreción de EVs, su carga y potencial funcionalidad, están comenzando a ser exploradas.

En nuestro modelo de interacción Fb-célula tiroidea, **se evidenció la liberación de EVs a los sobrenadantes de cultivo de Fb y células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas.** Dado que no existe una técnica *gold standard* para su aislamiento, y siguiendo los lineamientos descritos por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares [47], **se seleccionó la centrifugación diferencial como técnica para la obtención de EVs a partir los CMs**, la que permite un rendimiento intermedio de recuperación de EVs con una calidad/especificidad intermedia, de la misma manera que otros métodos como la cromatografía de exclusión por tamaño, la filtración de flujo tangencial, entre otras. Un trabajo adecuado en el campo requiere la caracterización de las EVs utilizando técnicas diferentes y complementarias. De esta manera, utilizando TEM, se evidenció la morfología característica de EVs en nuestro modelo, obtenidas a partir de Fb y células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas. El estudio subsiguiente, realizado sobre las preparaciones de EVs mediante **DLS, resultó concordante con los análisis morfométricos realizados por TEM y confirmó el aislamiento de EVs, utilizando centrifugación diferencial.** Sin embargo, la caracterización definitiva, morfométrica y cuantitativa del *pellet* de EVs utilizado en este trabajo se realizó utilizando TEM

y NTA. De este modo, el denominado **pellet 100K de EVs**, y referenciado como EVs a lo largo del trabajo, **resultó en el aislamiento de una población enriquecida en EVs con un tamaño entre 50-200nm en todas las condiciones experimentales ensayadas**. En cuanto a la cantidad de EVs liberadas, estudios realizados en diferentes modelos tumorales reportaron que células neoplásicas liberan mayor cantidad de EVs que sus contrapartes no tumorales [186–188]. Del mismo modo, reportes preliminares de Rappa y col., destacaron un número significativamente mayor de EVs en muestras de plasma de pacientes con cáncer de tiroides en comparación con controles sanos [118]. Sin embargo, **el número de EVs liberadas por células tumorales tiroideas aisladas (TPC-1, 8505c) y co-cultivadas con Fb (Fb-TPC-1 y Fb-8505c) en nuestro modelo experimental, no mostró diferencias significativas con respecto al número de EVs derivadas de células no tumorales aisladas o co-cultivadas (NThyOri y Fb-NThyOri)**. En línea, otros autores tampoco evidenciaron diferencias significativas en el número de EVs liberadas en pacientes con cáncer de próstata, con respecto a hiperplasia benigna [189], ni en EVs de pacientes con melanoma en función de su estadio clínico [190]. No obstante, el co-cultivo **Fb-TPC-1 liberó una cantidad significativamente mayor de EVs con respecto a las obtenidas a partir de Fb y TPC-1 aisladas**. En relación con estos hallazgos, evidencias experimentales sugieren que el aumento en la liberación de EVs por células tumorales podría estar influenciado por señales intracelulares y del microambiente. La activación de vías de señalización oncogénicas, así como condiciones ambientales alteradas, son algunas de las causas de la desregulación de la liberación de EVs en cáncer [191]. En este sentido, la activación de vías de señalización oncogénicas, como por ejemplo a través de EGFRvIII y de H-RASV12, aumenta la producción de EVs por las células tumorales [192, 193]. Otro aspecto relevante en el estudio de EVs, es su caracterización mediante diferentes marcadores bioquímicos. Dado que las técnicas empleadas para su purificación co-aislan diferentes subpoblaciones de EVs y que todavía no es posible proponer marcadores específicos que pudieran discriminar entre éstas, todas las preparaciones de EVs deberían caracterizarse con al menos tres proteínas marcadoras: una transmembrana, una citosólica (con o sin capacidad de unión a lípidos o proteínas de membrana) y una asociada a componentes intracelulares (como marcador negativo) [47]. Recientemente, Jeppesen y col. introdujeron la subclasificación de las *small-EVs* (vesículas cuyos tamaños oscilan entre 50-200 nm) en exosomas clásicos y no clásicos, basándose en la presencia de los marcadores CD63, CD81 y CD9 [53]. En nuestro modelo experimental, marcadores de exosomas clásicos **CD63, CD9, CD81, FLOT-1 y también CAV-1, están enriquecidas en las EVs con respecto a los lisados celulares**. Curiosamente, **CD63 aparece enriquecido en EVs de Fb-TPC-1 y Fb-8505c respecto a EVs de células TPC-1 y 8505c aisladas**. En su conjunto, la expresión de estos marcadores permite **clasificar a las EVs obtenidas en nuestro modelo como enriquecidas en “exosomas clásicos”**.

Hasta la actualidad, los estudios relacionados con EVs en carcinoma tiroideo se centraron principalmente en el análisis de microRNAs presentes en EVs [104], mientras que trabajos que consideran a otras biomoléculas continúan siendo limitados [120]. La alta sensibilidad, así como los pequeños volúmenes requeridos en el análisis, han posicionado a la nLC-MS/MS para la realización de estudios proteómicos en EVs, los que revelaron enriquecimientos de ciertas

proteínas útiles para entender diversos roles fisiopatológicos, así como para describir nuevos biomarcadores en diversas enfermedades [50, 194]. En el presente trabajo, se caracterizó por primera vez **el proteoma de EVs provenientes de Fb, TPC-1, 8505c y NThyOri aisladas, así como de sus co-cultivos con Fb. Más del 90% de las proteínas identificadas en las EVs se reportaron en bases de datos disponibles (ExoCarta y Vesiclepedia)**, siendo esto un indicador del adecuado aislamiento de EVs en nuestro modelo. Por otro lado, **un 78% de las proteínas identificadas no presentaron péptido señal predicho en su secuencia polipeptídica**. En línea con esto, al analizar la presencia del péptido señal en las 100 proteínas más frecuentemente identificadas en Vesiclepedia, se observó que sólo un 9% de éstas presentan péptido señal, lo cual concuerda con el hecho de que las células utilizan a las EVs como vía de secreción no clásica de proteínas al medio extracelular [156]. Además, se reportó que secretomas tumorales, provenientes de esferoides realizados a partir de líneas celulares de cáncer colorrectal y una línea celular de Fb humanos, presentan grandes cantidades de proteínas liberadas, como factores solubles o en EVs, de forma no convencional, es decir, en ausencia del péptido señal [195]. Si bien su papel ha sido controversial, existen varias especulaciones acerca de las vías secretoras no clásicas. Una de ellas menciona que podría ser un mecanismo utilizado por la célula como una forma de economizar energía durante el diseño y la síntesis proteica. También se especula que podrían constituir una estrategia para aumentar la pleiotropía de los genes, de manera que una determinada proteína presente ciertas funciones intracelulares y, a su vez, sea capaz de ejercer funciones alternativas en el espacio extracelular [196].

En el estudio del rol funcional de las EVs asociado al cargo proteico que presentan, el análisis GO:CC del proteoma de las EVs asoció a las **proteínas identificadas principalmente con EVs, citosol y membrana celular**, lo cual se condice con las rutas biosintéticas que las mismas presentan [56]. **Otras categorías enriquecidas corresponden a proteínas que participan en uniones EVs-ECM** (por ej. integrinas de adhesiones focales) **y diversos componentes de matriz** (por ej. colágeno). En este sentido, los análisis GO:BP, GO:MF y Reactome demostraron que **EVs provenientes de células tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb, presentan un perfil proteómico característico, cuyas funcionalidades convergen en la remodelación de la ECM** (incluyendo organización y estructura, degradación e interacciones). Específicamente, **en el entorno de Fb-TPC-1, el Fb aportaría al direccionamiento de esta potencial funcionalidad de las EVs**. Además, **14 DEPs exclusivamente enriquecidas en Fb-TPC-1 vs TPC-1, centran su función en la degradación del colágeno y como constituyentes estructurales de la ECM**. En conjunto, estos interesantes enriquecimientos funcionales sugieren que el Fb, y su comunicación bidireccional con TPC-1, proporcionarían una ventaja funcional a las EVs obtenidas, especializándolas en su comunicación con la ECM. En este sentido, un nuevo paradigma sobre la actividad de las EVs en el TME contempla la existencia de una comunicación activa y directa con la ECM [197]. De esta manera, las EVs podrían considerarse elementos constitutivos e integrales de la ECM, transportando sus componentes, así como diferentes enzimas implicadas en la reorganización de esta compleja red proteica, incluyendo su entrecruzamiento y degradación. Además, se ha propuesto el papel funcional de EVs

residentes en la ECM, ancladas directamente a sus componentes, las que funcionarían como reservorios de señales intercelulares y que podrían ser liberadas luego de la remodelación de la ECM por células transeúntes. Las EVs residentes en la ECM mejor caracterizadas son las que participan en mineralización ósea y reparación tisular, tomando el nombre de vesículas de matriz. Aunque el estudio de la importancia de las EVs se centró principalmente en su participación en mecanismos de comunicación intercelular, sus funciones dentro de la ECM serían igual de importantes. A pesar de que las vesículas de matriz se reportaron hace décadas, su relevancia está siendo actualmente reconsiderada y es necesario obtener en el futuro una visión más amplia de las mismas, en relación a diversas enfermedades como el cáncer [198]. Por otro lado, **las DEPs en EVs de 8505c aisladas se asociaron directamente con remodelación de la ECM y no se detectaron proteínas exclusivamente enriquecidas en EVs provenientes de Fb-8505c vs 8505c**. Estos resultados sugieren que los Fb en un tumor de alta agresividad, como el ATC, no aportarían una ventaja funcional en el cargo proteico de las EVs producidas en este entorno. Por último, **EVs provenientes del co-cultivo de Fb-NThyOri, presentaron funcionalidades potencialmente asociadas con el mantenimiento del metabolismo celular** (incluyendo glicólisis, gluconeogénesis y transducción de proteínas) **y no mostraron diferencias en sus capacidades funcionales respecto a las EVs de NThyOri aisladas**.

Al profundizar en el análisis de los datos proteómicos, en la búsqueda de proteínas con potencial impacto biológico en el entorno de Fb-TPC-1, **HRAS y MAMDC2 se detectaron exclusivamente enriquecidas en EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1**. HRAS es una proteína proto-oncogénica que participa en las vías de señalización de MAPK y PI3K-Akt y, su desregulación ha sido ampliamente explorada en tumores [199]. Específicamente en cáncer de tiroides, HRAS se asoció con progresión y agresividad tumoral y hasta el 70% de los carcinomas tumorales tiroideos son causados por mutaciones que activan específicamente la vía de señalización RAS/ERK [89]. Existen ideas controvertidas sobre la transferencia horizontal, entre células tumorales y no tumorales, de oncogenes y oncoproteínas a través de EVs, con trabajos apoyando esta teoría [192] y otros argumentando que estos efectos son restringidos en alcance y duración, y son incapaces de desencadenar la conversión tumorigénica de células normales [200]. Por otro lado, MAMDC2 es una proteína con estudios muy limitados en cáncer. Entre estos trabajos, su expresión aumentada se relacionó con mal pronóstico en cáncer gástrico [201]. Además, la base de datos *The Human Protein atlas* (HPA, por sus siglas en inglés), que utiliza datos moleculares de pacientes provenientes de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, por sus siglas en inglés), muestra la asociación positiva entre MAMDC2 y agresividad tumoral, describiendo a esta proteína como un marcador pronóstico desfavorable en cáncer de tiroides. Sin embargo, su papel es controvertido dado que la disminución de la expresión celular de MAMDC2 en cáncer de mama ha sido propuesta como un potencial biomarcador de agresividad tumoral, otorgándole a esta proteína un rol supresor tumoral [202]. Serán necesarios análisis más profundos en nuestro modelo para informar acerca de la importancia funcional de la presencia de HRAS en EVs, así como para considerar el estudio de MAMDC2, como un posible biomarcador pronóstico, en pacientes con PTC.

La caracterización de las EVs, mediante WB y nLC-MS/MS, **reveló el enriquecimiento de CD63 en EVs de células tumorales tiroideas co-cultivadas con Fb**. La tetraspanina CD63 participa en la biosíntesis de ciertas subpoblaciones de EVs [54, 61] y se utiliza para la identificación y obtención de las mismas. Aunque su rol funcional continúa siendo debatido, se ha demostrado que la composición de las EVs se altera tras la eliminación o el silenciamiento del gen que codifica para las tetraspaninas, lo que sugeriría un papel específico para cada miembro de esta familia, en biosíntesis, liberación e internalización de EVs por células receptoras [61, 63, 204]. Las tetraspaninas también han sido asociadas con la progresión tumoral y la metástasis, es así que microdominios enriquecidos en estas proteínas agregan y coordinan la función de receptores de adhesión, enzimas y otras moléculas de señalización, a nivel de la membrana plasmática de células tumorales, que promueven múltiples etapas del tumor [205–207]. Otras proteínas relevantes, enriquecidas en las EVs de los co-cultivos de células tumorales tiroideas, son las integrinas y el uPA. Las integrinas, presentes en las EVs, facilitan la interacción de las vesículas con componentes de la ECM, tales como laminina [208] y fibronectina [209]. Además, ciertos patrones de expresión de integrinas en las EVs podrían predecir los sitios de metástasis de las células tumorales, funcionando como formadoras del nicho premetastásico en tejidos blanco, como los pulmones, el hígado o el cerebro, dictando la adhesión de las EVs tanto a células específicas como a moléculas de la ECM [210].

La comunicación entre las células que conforman el TME, a través de EVs, requiere de su liberación y disponibilidad para interactuar o ser internalizadas por las células receptoras donde ejercen su acción. En el presente trabajo, se evidenció la **mayor avidéz celular de los Fb en la internalización de EVs derivadas de contextos tumorales con respecto al no tumoral**, sugiriendo una comunicación más eficiente entre Fb y células tumorales, con respecto a la que se produciría con células no tumorales tiroideas. Este hallazgo, aunque preliminar, sugiere que la diferente captación de EVs por parte de los Fb, podría estar relacionada con el cargo específico que presentan. En concordancia con nuestros resultados, Lee y col. [200] demostraron que células estromales, particularmente Fb, capturan un mayor número de EVs derivadas de células tumorales en comparación con EVs de células epiteliales normales y este tráfico intercelular constituye un regulador clave de la transdiferenciación de los Fb a su forma activada. En resumen, nuestros hallazgos sugieren un **rol crítico del Fb, y su comunicación con las células tumorales, sobre el perfil proteómico de las EVs obtenidas** lo que impacta en **el mensaje ubicuo que transportan y su funcionalidad**, relacionada a mecanismos de remodelación de la ECM en el TME.

En los tejidos tumorales, la ECM proporciona un nicho apropiado para la viabilidad de las células tumorales. En este contexto, células tumorales y estromales generan un hábitat favorable, liberando factores solubles y EVs que modifican el TME y les permite crecer, invadir y desplazarse. La intrincada y densa red de proteínas presentes en la ECM abre interrogantes sobre la capacidad de las EVs para penetrar a través de ella de forma eficiente. En este sentido, adquieren relevancia ciertas proteinasas, como las MMPs, transportadas por las EVs o inducidas y activadas por células presentes en el TME. Estas enzimas participan en la degradación de la membrana basal y de otros componentes de la ECM, asistiendo a la invasión celular durante la angiogénesis y la progresión tumoral [198]. En nuestro modelo

experimental, la incubación de Fb normales con **EVs provenientes de Fb-TPC-1 indujo la activación de MMP2 en los CMs. Un fenómeno similar se evidenció utilizando EVs de Fb-8505c, junto al aumento en la expresión de proMMP9.** Según se comentó anteriormente, numerosos trabajos en pacientes con cáncer reportaron una asociación positiva entre el incremento en la actividad de MMP2 y MMP9 con un aumento en la agresividad, progresión y metástasis tumoral. En distintos modelos experimentales de tumor, los CAFs regulan la expresión y activación de MMPs, como MMP2 y MMP9, siendo estas enzimas sugestivas de la activación del Fb en el TME [5]. En este sentido, EVs provenientes de una línea celular de carcinoma hepatocelular activaron a células estrelladas hepáticas normales, las que se transforman en CAFs, caracterizadas por la expresión de MMP2 y MMP9, entre otras moléculas [211]. De la misma manera, EVs provenientes de líneas celulares de osteosarcoma, fueron captadas por una línea celular de Fb murinos, los que presentaron niveles de expresión significativamente mayores de MMP9, así como de otras moléculas, otorgándole a los Fb capacidades proliferativas y de supervivencia mejoradas, un aumento de la migración, la adhesión y la capacidad de crecer de forma independiente de anclaje [212]. La actividad proteolítica de MMP2 y MMP9 se lleva a cabo sobre colágeno nativo tipo I, IV, V, VII, X, XI [16]. En nuestro modelo, las DEPs en EVs de Fb-TPC-1 vs TPC-1 evidenciaron una funcionalidad relacionada con la degradación del colágeno. En su conjunto, los resultados mencionados anteriormente validan funcionalmente los datos proteómicos obtenidos a partir de las EVs, demostrando, además, el rol del Fb como una de las posibles fuentes de MMPs en el TME tiroideo. Por otro lado, dado que las células no tumorales tiroideas también forman parte del TME en tiroides, se llevaron a cabo experimentos equivalentes que demostraron el **aumento significativo en MMP2 activa en los CMs de NThyOri luego de su estimulación con EVs provenientes de Fb-TPC-1.** Esta capacidad de modificación del fenotipo de células receptoras, llevada a cabo por EVs obtenidas de entornos tumorales, también fue evidenciada, por otros autores, con EVs provenientes de células madre tumorales tiroideas. Hardin y col. [213] demostraron que estas EVs eran capaces de modificar el fenotipo de células NThyOri, aumentando su proliferación, capacidad invasiva e induciendo la transición epitelio-mesénquima. En línea con esto, se observaron claras modificaciones en el secretoma del tejido tiroideo normal adyacente al tumor con respecto al tejido de un paciente sano [161].

Por otro lado, en cáncer de mama, la expresión de MMP2 se asoció a un fenotipo invasivo y un crecimiento independiente de anclaje desencadenados por la expresión de HRAS. Además, la invasividad mediada por HRAS se inhibe significativamente cuando se disminuye la expresión de MMP2 o se bloquea su actividad [214]. Posteriormente, el mismo grupo reportó la inducción de MMP2 activa cuando células epiteliales de mama, HRAS positivas, eran cultivadas en un gel bidimensional de colágeno tipo I, lo que no se evidenció con células NRAS positivas. Dado que MT1-MMP de membrana y TIMP2, principales proteínas involucrados en la activación de proMMP2, fueron sobreexpresados por HRAS, y no por NRAS, se sugirió que HRAS era la que conducía a la activación de esta enzima en el modelo [215]. Sin embargo, todavía se necesita información detallada acerca de los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la actividad de las MMPs en el TME tiroideo y que, entre otras

funciones, regulan y restringen la penetración *in vivo* de las EVs, a través de la red intrincada, densa y fibrosa de la ECM, hasta llegar a las células blanco.

Otra observación interesante en nuestro modelo de estudio fue **la inducción de MMP2 activa en el co-cultivo de Fb-TPC-1, incluso independientemente del contacto directo célula-célula**, lo que sugiere que factores solubles y/o EVs, producidos en este contexto, podrían estar involucrados en los eventos observados. En relación a este punto, Kim y col. [216] reportaron que co-cultivos contacto-independientes entre una línea de células endoteliales y de cáncer de mama, resultan en un aumento en la expresión de MMP2 en las células tumorales co-cultivadas. Sin embargo, trabajos realizados por otros autores utilizando cultivos contacto-independiente de células de carcinoma cervical con Fb normales o CAFs no evidenciaron un aumento en la secreción y activación de MMP2, la cual sólo se produce cuando estas células interactúan de manera contacto dependiente [217]. Nuestro trabajo es el primero en reportar que cultivos contacto-independiente de Fb y células tumorales tiroideas producen la activación de MMP2. Además, de manera interesante, **el análisis realizado con los interactores de MMP2 discriminó aquellas EVs provenientes de células tumorales y de sus co-cultivos con el Fb, de aquellas provenientes de células no tumorales**. Considerando **el entorno tumoral**, el análisis mencionado **discriminó las EVs que proceden de células aisladas de las EVs que surgen a partir de la interacción del Fb con las células tumorales**. Estos hallazgos enfatizan aún más el rol de EVs de entornos tumorales tiroideos en la secreción y activación de MMP2. Por el contrario, **los interactores de MMP9 no lograron discriminar entre estas categorías**, lo cual podría estar sugiriendo de que las EVs no estarían particularmente involucradas en la regulación de esta enzima.

En los últimos años, muchos estudios han apoyado el rol y la importancia de las EVs en la progresión y desarrollo tumoral, dado su cargo específico con factores promotores del tumor [218]. En este trabajo demostramos que la activación de MMP2 en el TME tiroideo, podría ser mediada por EVs provenientes del co-cultivo del Fb con las células tumorales tiroideas, principalmente TPC-1. **CD147 es una proteína que aumentó significativamente en poblaciones de EVs obtenidas de TPC-1 y 8505c co-cultivadas con Fb, en comparación con aquellas obtenidas a partir de cultivos aislados de estas células**. La sobreexpresión de CD147 ha sido descrita en muchos tipos de cáncer y la misma se correlacionó con una menor probabilidad de supervivencia [219]. CD147 ha sido principalmente relacionada con la secreción de MMPs, principalmente de MMP2 y su activación [220], así como con el *crossstalk* del tumor con el estroma, y particularmente con Fb [164]. En este sentido, el aumento en la expresión de MMP2 en Fb cercanos a células tumorales que expresan CD147, sin estar en contacto directo célula-célula, fue descrito en pacientes con linfoma T del adulto [221]. Otros reportes muestran que el co-cultivo de Fb y células tumorales aumenta significativamente la expresión de MMP2 en Fb, via CD147, al co-cultivar dos líneas celulares de sarcoma epiteloide con Fb humanos [222]. Por otra parte, se ha descrito la presencia de CD147 en EVs aisladas de varias líneas celulares tumorales y células derivadas de tumores primarios, vinculando esta proteína a interacciones celulares heterotípicas. Es así que, EVs provenientes de células de cáncer de ovario, que portan CD147, han sido relacionadas con la actividad proangiogénica en células endoteliales humanas [166]. Más recientemente,

fue reportado que CD147 presente en EVs provenientes de células de sarcoma, está involucrado en la regulación de la producción de MMP2 por parte de Fb que se encuentran distantes a las células tumorales [223]. También, EVs CD147 positivas, provenientes de líneas celulares de glioblastoma son capaces de producir un incremento en la secreción de MMP9 por astrocitos humanos [224]. En la glándula tiroidea, CD147 aumenta su expresión significativamente en carcinomas tiroideos en comparación a los hallazgos en tejido normal o bocio nodular. Además, la expresión de CD147 correlaciona directamente con diversas características clinicopatológicas como un menor grado de diferenciación celular, la invasión extratiroidea, metástasis en ganglios linfáticos y disminución en la supervivencia de los pacientes. Por lo tanto, su expresión podría ser útil para predecir el pronóstico de los pacientes con carcinoma tiroideo diferenciado, tanto papilar como folicular [163, 225, 226]. Paralelamente, carcinomas tiroideos indiferenciados presentan una mayor expresión de CD147 en células tumorales tiroideas con respecto a formas diferenciadas de la enfermedad [227]. Además, el análisis de la expresión de CD147 y MMP2 en tejidos de carcinomas tiroideos diferenciados evidenció que ambos marcadores se expresan principalmente en tejidos tumorales, observándose una correlación positiva significativa en sus niveles de expresión [228]. Por último, a partir de un meta-análisis se evidenció que la expresión de CD147 se correlaciona estrechamente con la progresión del tumor tiroideo y que estaría participando de las señales relacionadas con la ECM, la adhesión celular y las interacciones célula-célula. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares específicos que involucran a CD147 con la agresividad tumoral tiroidea [229]. De la misma manera, en nuestro modelo, se requerirán futuros estudios para profundizar en la caracterización del rol de CD147 en el TME tiroideo.

Otra proteína vinculada con motilidad, invasión y progresión tumoral es GAL-1. En nuestro modelo, **EVs de Fb-TPC-1 produjeron un aumento significativo en el mRNA de Gal-1 en Fb**. La sobreexpresión de Gal-1 ha sido ampliamente reportada en cáncer, y además de ser expresada por las células tumorales y secretada a la ECM, también se ha reportado su expresión en diversos componentes estromales, incluyendo los Fb [230]. Un aumento en su expresión influye en la progresión tumoral dado su rol pleiotrópico en transformación celular, proliferación celular, angiogénesis, adhesión, invasión celular, e inmunosupresión, es decir, vinculada directamente con parámetros de mal pronóstico como agresividad tumoral, metástasis, estadio avanzado del tumor y menor supervivencia del paciente, en diversos tipos de cáncer [231, 232]. Además, varios autores describen un aumento en la expresión de Gal-1 en CAFs en comparación con Fb del tejido normal adyacente en cáncer de mama, participando en migración e invasión celular [233]; en cáncer gástrico, participando en angiogénesis, EMT y metástasis [234, 235]; en cáncer de ovario, modulando la invasión de células tumorales a través de MMP2 [31] y en cáncer de páncreas, donde incrementa la proliferación e invasión del tumor debido al aumento en la expresión de MMP2 y MMP9 en las células tumorales [32]. En cáncer de tiroides, la expresión de Gal-1 aumenta en líneas celulares tumorales y se demostró que la misma está implicada en la biología del PTC y ATC [236]. Más recientemente, se evaluaron los efectos de su inhibición en seis líneas celulares de cáncer de tiroides, observándose inhibiciones significativas en la proliferación, migración e invasión en todas las

líneas que expresaban niveles elevados de Gal-1 [237]. Otros autores también reportaron altos niveles de GAL-1 en suero de pacientes diagnosticados con carcinoma tiroideo diferenciado [238]. Sin embargo, en nuestro modelo aún se desconocen los mecanismos por los que se induce la expresión de Gal-1 en Fb, cuyo esclarecimiento, así como el de su rol funcional, requerirá de estudios futuros.

En la búsqueda de biomarcadores, la utilización de modelos *in vitro* de interacción tumor-estroma, podrían adquirir relevancia y ser de mucha utilidad para el estudio proteómico de EVs que, dada esta interacción, modifican su cargo y se encuentran transportando proteínas de interés, que reflejan las características del tumor. Estas proteínas, debido a su baja abundancia, podrían resultar enmascaradas cuando la técnica proteómica se realiza directamente en la complejidad proteica de EVs derivadas de fluidos biológicos de pacientes con cáncer. Nuestro modelo de interacción tumor-Fb para la obtención, caracterización y estudio de EVs, aunque continúa siendo una versión simplificada del TME que considera interacciones en dos dimensiones entre dos células, nos resultó de mucha utilidad para **demostrar por primera vez la relevancia de la interacción tumor-estroma en la liberación de una subpoblación diferente de EVs** en el TME tiroideo. Por otro lado, aunque es aún desconocido el mecanismo molecular de la activación de MMP2 en Fb y NThyOri por EVs provenientes de contextos tumorales, el presente trabajo de tesis doctoral **introduce la expresión de MAMDC2, HRAS y CD147 en EVs** y abre la posibilidad de su estudio y detección en EVs provenientes de pacientes con cáncer de tiroides, con el importante impacto traslacional que esto presentaría en salud humana. Los resultados obtenidos, en el presente trabajo sientan una base amplia que podría ser utilizada en estudios futuros para profundizar en aspectos relacionados a como los Fb podrían modificar el cargo de las EVs provenientes del TME tiroideo y, específicamente, el proteoma de las mismas. En conclusión, el conocimiento del cargo proteico en EVs, y la comprensión de su función biológica en el TME tiroideo, contribuirían al diseño de nuevas estrategias de tratamiento y ofrecerían oportunidades en el uso de procedimientos mínimamente invasivos, que involucran el descubrimiento de biomarcadores en biopsia líquida, para la evaluación diagnóstica y el seguimiento de los pacientes con cáncer de tiroides.

ANEXO

Tabla 1. DEPs utilizadas en el análisis ORA

A. TPC-1 vs. NThyOri				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P10124	SRGN	Serglycin	9.6E-08	4.02
Q9GZM7	TINAGL1	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	0.00087	3.74
P10909	CLU	Clusterin	1.9E-09	3.59
P24821	TNC	Tenascin	3.4E-09	3.57
O00468	AGRN	Agrin	1.9E-09	3.41
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1 chain	9.4E-09	3.25
P23142	FBLN1	Fibulin-1	3.2E-08	3.23
P05067	APP	Amyloid-beta precursor protein	5.2E-07	3.03
P56696	KCNQ4	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4	3.8E-07	2.89
Q14112	NID2	Nidogen-2	3.1E-06	2.86
Q9NQ84	GPRC5C	G-protein coupled receptor family C group 5 member C	2.1E-05	2.84
O15230	LAMA5	Laminin subunit alpha-5	8.9E-09	2.81
P13611	VCAN	Versican core protein	4.2E-08	2.76
Q05639	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2	5.6E-07	2.72
P11047	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	5.4E-09	2.63
P21741	MDK	Midkine	7.9E-05	2.53
P19021	PAM	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	0.00089	2.47
P14543	NID1	Nidogen-1	7.8E-08	2.46
O95336	PGLS	6-phosphogluconolactonase	0.00029	2.37
Q16610	ECM1	Extracellular matrix protein	3.8E-05	2.36
P10646	TFPI	Tissue factor pathway inhibitor	1.7E-05	2.33
Q16270	IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	0.00061	2.32
P07942	LAMB1	Laminin subunit beta-1	7E-07	2.24
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	2.2E-07	2.23
Q9Y4K0	LOXL2	Lysyl oxidase homolog 2	2.8E-05	2.22
P98160	HSPG2	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	1.3E-06	2.12
O94985	CLSTN1	Calsyntenin-1	6.4E-06	2.08
P51003	PAPOLA	Poly polymerase alpha	0.00064	2.08
P04920	SLC4A2	Anion exchange protein 2	0.00015	2.00
P08603	CFH	Complement factor H	1.3E-05	1.89
P18084	ITGB5	Integrin beta-5	7.9E-07	1.85
Q8N3E9	PLCD3	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-3	2.3E-05	1.84
Q68BL8	OLFML2B	Olfactomedin-like protein 2B	0.00078	1.84
O60437	PPL	Periplakin	9.7E-05	1.78
Q13751	LAMB3	Laminin subunit beta-3	0.00021	1.76
P00749	PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	9.6E-05	1.71
P26022	PTX3	Pentraxin-related protein	0.00046	1.61
Q06481	APLP2	Amyloid-like protein 2	7.9E-05	1.56
P21980	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	0.00057	1.54
P18827	SDC1	Syndecan-1	0.00025	1.53

P11169	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	6.9E-05	1.51
Q16394	EXT1	Exostosin-1	0.00044	1.49
Q9Y240	CLEC11A	C-type lectin domain family 11 member A	0.00026	1.48
P02751	FN1	Fibronectin	3.2E-05	1.41
Q6YHK3	CD109	CD109 antigen	0.00062	1.38
Q8NG11	TSPAN14	Tetraspanin-14	0.00019	1.37
Q9UHF1	EGFL7	Epidermal growth factor-like protein 7	0.00033	1.36
P55268	LAMB2	Laminin subunit beta-2	7.7E-05	1.16
P13164	IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1	0.00047	1.14
Q99459	CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	0.0009	1.12
P35556	FBN2	Fibrillin-2	0.0009	1.09
Q14517	FAT1	Protocadherin Fat 1	0.00017	1.07
Q9BXP8	PAPPA2	Pappalysin-2	0.00082	1.06
B. NThyOri vs. TPC-1				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P49736	MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	0.00047	-1.06
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	0.00071	-1.07
Q99961	SH3GL1	Endophilin-A2	0.00099	-1.12
Q9Y3U8	RPL36	60S ribosomal protein L36	0.00029	-1.13
O75369	FLNB	Filamin-B	0.0009	-1.13
P10768	ESD	S-formylglutathione hydrolase	0.00092	-1.15
P08195	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	0.0008	-1.15
P11586	MTHFD1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	0.00039	-1.18
P07900	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	0.00061	-1.23
O00159	MYO1C	Unconventional myosin-Ic	0.00064	-1.23
P56192	MARS1	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	0.00044	-1.25
Q16543	CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37	0.00058	-1.27
P09622	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	0.0008	-1.28
P43686	PSMC4	26S proteasome regulatory subunit 6B	0.00079	-1.29
Q9NR12	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	0.0001	-1.29
P62195	PSMC5	26S proteasome regulatory subunit 8	1.7E-05	-1.31
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein	3.8E-05	-1.31
P12004	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	0.0009	-1.34
P31939	ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein	0.00014	-1.34
P35237	SERPINB6	Serpin B6	0.00014	-1.36
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	6.4E-06	-1.37
P09525	ANXA4	Annexin A4	0.00019	-1.37
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	8.2E-05	-1.37
P28065	PSMB9	Proteasome subunit beta type-9	6.3E-05	-1.38
Q14247	CTTN	Src substrate cortactin	0.00028	-1.38
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	0.0005	-1.39
P67809	YBX1	Y-box-binding protein 1	0.00029	-1.39
P34932	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	5.6E-05	-1.40
P12429	ANXA3	Annexin A3	6.1E-05	-1.43
Q9Y315	DERA	Deoxyribose-phosphate aldolase	0.00017	-1.44
P40121	CAPG	Macrophage-capping protein	0.00098	-1.45

P00338	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	0.00037	-1.45
O43633	CHMP2A	Charged multivesicular body protein 2a	0.00044	-1.46
P07585	DCN	Decorin	0.00074	-1.48
E9PAV3	NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	0.00059	-1.48
Q9Y696	CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4	0.0002	-1.49
P05026	ATP1B1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	7.7E-05	-1.50
P27824	CANX	Calnexin	0.00064	-1.50
P58546	MTPN	Myotrophin	0.00047	-1.50
P22314	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	0.00012	-1.55
O43324	EEF1E1	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	0.00065	-1.55
Q14315	FLNC	Filamin-C	0.0002	-1.56
P08174	CD55	Complement decay-accelerating factor	0.00076	-1.57
Q5JWF2	GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha isoforms XLas	0.00051	-1.58
Q9UGV2	NDRG3	Protein NDRG3	1.4E-05	-1.58
Q9UNX3	RPL26L1	60S ribosomal protein L26-like 1	0.00026	-1.58
PODMV8	HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A	0.0001	-1.59
P35613	BSG	Basigin	0.00013	-1.60
P51148	RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	6.4E-05	-1.60
Q6NZ12	CAVIN1	Caveolae-associated protein 1	6.8E-05	-1.61
Q9BUF5	TUBB6	Tubulin beta-6 chain	2.6E-05	-1.62
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent	8E-05	-1.63
P04216	THY1	Thy-1 membrane glycoprotein	0.00028	-1.63
Q8N1F7	NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93	0.00071	-1.63
P55060	CSE1L	Exportin-2	0.00064	-1.64
P22626	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	0.00042	-1.64
Q99829	CPNE1	Copine-1	7.5E-05	-1.65
Q13547	HDAC1	Histone deacetylase 1	0.00076	-1.66
P00966	ASS1	Argininosuccinate synthase	4.3E-05	-1.66
Q5VW32	BROX	BRO1 domain-containing protein BROX	7.1E-06	-1.67
P37802	TAGLN2	Transgelin-2	8.2E-05	-1.67
P50395	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	5.5E-05	-1.67
P62750	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	0.00063	-1.68
P05787	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	1.4E-05	-1.69
Q9NZT2	OGFR	Opioid growth factor receptor	0.00034	-1.69
P62269	RPS18	40S ribosomal protein S18	0.00081	-1.69
P67936	TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	0.00065	-1.69
Q08499	PDE4D	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D	4.4E-06	-1.70
P18621	RPL17	60S ribosomal protein L17	0.00026	-1.70
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	0.0002	-1.72
O75390	CS	Citrate synthase	0.00097	-1.72
P38646	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	3.5E-05	-1.73
P17858	PFKL	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	0.00082	-1.74
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2.1E-05	-1.76
P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	1.7E-05	-1.76
Q15019	SEPTIN2	Septin-2	1.9E-06	-1.77

P35579	MYH9	Myosin-9	2.8E-05	-1.77
Q8N9N7	LRRC57	Leucine-rich repeat-containing protein 57	3.6E-05	-1.82
Q9H4M9	EHD1	EH domain-containing protein 1	4.1E-05	-1.82
P23526	AHCY	Adenosylhomocysteinase	4.5E-05	-1.83
P62266	RPS23	40S ribosomal protein S23	0.00059	-1.83
P05387	RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	0.00032	-1.83
P32970	CD70	CD70 antigen	3.7E-05	-1.84
Q08431	MFGE8	Lactadherin	2.6E-05	-1.84
P29692	EEF1D	Elongation factor 1-delta	3.8E-05	-1.86
Q6P2Q9	PRPF8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	4.1E-05	-1.87
P62258	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	4E-05	-1.87
Q15365	PCBP1	Poly-binding protein 1	1.3E-05	-1.88
Q01813	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	2E-05	-1.88
P54709	ATP1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	0.0006	-1.89
Q07021	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	0.0009	-1.90
P09651	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	5.9E-07	-1.93
Q01518	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	6.7E-05	-1.94
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	1.6E-06	-1.95
Q15645	TRIP13	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	7.3E-05	-1.95
P43490	NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	6.1E-05	-1.95
Q15366	PCBP2	Poly-binding protein 2	0.00071	-1.96
P20908	COL5A1	Collagen alpha-1 chain	0.00012	-1.96
Q7Z7A1	CNTRL	Centriolin	0.0003	-1.98
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.9E-07	-2.01
Q8IWA5	SLC44A2	Choline transporter-like protein 2	0.00015	-2.01
O60443	GSDME	Gasdermin-E	0.00054	-2.03
P07237	P4HB	Protein disulfide-isomerase	1.6E-05	-2.04
P14618	PKM	Pyruvate kinase PKM	2.3E-05	-2.05
P60866	RPS20	40S ribosomal protein S20	2.1E-05	-2.08
P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	5E-06	-2.08
P49321	NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein	1.7E-05	-2.09
Q99536	VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	1.7E-05	-2.10
Q99733	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4	0.0009	-2.10
Q9BQE3	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	6.9E-05	-2.11
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	1.7E-05	-2.14
O00299	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	6.9E-06	-2.15
Q04760	GLO1	Lactoylglutathione lyase	0.00064	-2.19
Q9NQ86	TRIM36	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM36	7.9E-05	-2.21
P42766	RPL35	60S ribosomal protein L35	0.00013	-2.21
Q9ULV4	CORO1C	Coronin-1C	5.2E-07	-2.21
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	1.6E-06	-2.23
PODP24	CALM2	Calmodulin-2	0.00047	-2.23
P07737	PFN1	Profilin-1	1.3E-05	-2.26
O75340	PDCD6	Programmed cell death protein 6	9.8E-06	-2.27
Q9UBV8	PEF1	Peflin	0.00033	-2.28
Q9BPU6	DPYSL5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1.5E-06	-2.29

P06493	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	1.6E-06	-2.32
P00492	HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	0.00013	-2.32
P36405	ARL3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	0.0001	-2.32
P60953	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	5.3E-05	-2.34
Q9UBQ5	EIF3K	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	2.8E-05	-2.36
P08754	GNAI3	Guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha-3 alpha-3	7.8E-08	-2.36
P30050	RPL12	60S ribosomal protein L12	3.7E-06	-2.37
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	8.5E-07	-2.39
P06753	TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	0.00039	-2.41
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	1.4E-05	-2.43
P05023	ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	9.7E-07	-2.44
Q9UBI6	GNG12	Guanine nucleotide-binding protein G/G/G subunit gamma- 12	1.4E-05	-2.45
P05388	RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0	0.00063	-2.46
P05362	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	1.8E-06	-2.47
P62857	RPS28	40S ribosomal protein S28	1.7E-05	-2.49
P07355	ANXA2	Annexin A2	1E-06	-2.50
P06733	ENO1	Alpha-enolase	1.4E-07	-2.51
P53990	IST1	IST1 homolog	6.5E-05	-2.52
O75821	EIF3G	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	0.00088	-2.55
P00751	CFB	Complement factor B	1.8E-06	-2.58
P52907	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	0.00047	-2.59
P23528	CFL1	Cofilin-1	7.9E-07	-2.59
P63208	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	3.5E-05	-2.62
P31946	YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	6.4E-06	-2.64
P08133	ANXA6	Annexin A6	1.6E-07	-2.64
P04899	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha-2	1E-06	-2.71
P08670	VIM	Vimentin	3.4E-08	-2.73
P55010	EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	1.6E-05	-2.78
P25398	RPS12	40S ribosomal protein S12	0.0002	-2.80
P27348	YWHAQ	14-3-3 protein theta	5.8E-08	-2.93
P09493	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	1.3E-05	-2.93
P80723	BASP1	Brain acid soluble protein 1	3.9E-06	-3.00
P60903	S100A10	Protein S100-A10	3.5E-05	-3.02
Q9C0H2	TTYH3	Protein tweety homolog 3	4.1E-05	-3.02
P00441	SOD1	Superoxide dismutase	0.00013	-3.08
P61353	RPL27	60S ribosomal protein L27	1.9E-09	-3.20
P60174	TPI1	Triosephosphate isomerase	6.4E-07	-3.23
O14974	PPP1R12A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	0.00045	-3.24
P09936	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	0.0001	-3.27
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	6.6E-07	-3.32
Q8NC51	SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	2.9E-05	-3.35
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1 chain	3.4E-09	-3.40
P08758	ANXA5	Annexin A5	6.4E-07	-3.47
P15121	AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1 member B1	1.2E-05	-3.62
P43487	RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein	3.8E-06	-3.69

O43854	EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	8.2E-08	-3.75
P01889	HLA-B	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	0.00013	-4.24
Q86XP3	DDX42	ATP-dependent RNA helicase	8E-05	-4.62
P29966	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	2.7E-07	-4.91

Tabla 2. DEPs utilizadas en el análisis ORA

A. Fb-TPC-1 vs. Fb-NThyOri				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P24821	TNC	Tenascin	2.4E-07	2.75
P10909	CLU	Clusterin	1.7E-07	2.74
P10124	SRGN	Serglycin	2.4E-05	2.70
O95336	PGLS	6-phosphogluconolactonase	0.00034	2.45
Q9NQ84	GPRC5C	G-protein coupled receptor family C group 5 member C	0.00037	2.23
Q72304	MAMDC2	MAM domain-containing protein 2	1.3E-06	2.10
P05067	APP	Amyloid-beta precursor protein	9E-05	2.02
Q13751	LAMB3	Laminin subunit beta-3	0.00012	2.00
P49902	NT5C2	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	0.00011	1.95
O00560	SDCBP	Syntenin-1	1.2E-05	1.95
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3 chain	1.2E-05	1.94
O00468	AGRN	Agrin	3.3E-06	1.93
O15230	LAMA5	Laminin subunit alpha-5	2.7E-06	1.90
P12110	COL6A2	Collagen alpha-2 chain	5.6E-05	1.89
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1 chain	1.7E-05	1.87
P52789	HK2	Hexokinase-2	0.00018	1.86
Q8NG11	TSPAN14	Tetraspanin-14	2.5E-05	1.81
P53801	PTTG1IP	Pituitary tumor-transforming gene 1 interacting protein	0.00014	1.79
Q9Y240	CLEC11A	C-type lectin domain family 11 member A	9.3E-05	1.75
P27701	CD82	CD82 antigen	4.6E-05	1.71
P00749	PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	0.00024	1.65
Q8WUM4	PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	0.00051	1.60
P18084	ITGB5	Integrin beta-5	1.2E-05	1.57
Q05639	EEF1A2	Elongation factor 1-alpha 2	0.00037	1.54
Q93063	EXT2	Exostosin-2	0.00063	1.49
P11047	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	1.2E-05	1.48
P23142	FBLN1	Fibulin-1	0.00034	1.44
P26006	ITGA3	Integrin alpha-3	0.00039	1.34
P14543	NID1	Nidogen-1	0.00028	1.23
P11169	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	0.00091	1.19
P08962	CD63	CD63 antigen	0.00031	1.08
B. Fb-NThyOri vs. Fb-TPC-1				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P62195	PSMC5	26S proteasome regulatory subunit 8	0.00031	-1.03
P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase p97 subunit	0.00061	-1.04
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	0.00018	-1.05
P50991	CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	0.00084	-1.07

P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	0.00079	-1.12
P34932	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	0.00067	-1.12
P06744	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	0.00031	-1.16
P07954	FH	Fumarate hydratase, mitochondrial	0.00019	-1.20
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	0.00061	-1.21
P31939	ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC	0.00039	-1.26
P61978	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0.00071	-1.27
P07900	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	0.00048	-1.31
P13667	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	0.00019	-1.31
O00339	MATN2	Matrilin-2	0.00024	-1.31
P08670	VIM	Vimentin	0.0002	-1.31
P67809	YBX1	Y-box-binding protein 1	0.00062	-1.33
P00966	ASS1	Argininosuccinate synthase	0.00051	-1.34
Q9UG63	ABCF2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	9.2E-05	-1.36
P62424	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	0.00073	-1.38
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	0.00061	-1.38
Q14315	FLNC	Filamin-C	0.00087	-1.38
Q9ULV4	CORO1C	Coronin-1C	0.00016	-1.39
P01024	C3	Complement C3	0.00019	-1.41
Q6NZI2	CAVIN1	Caveolae-associated protein 1	0.00037	-1.42
Q9BUF5	TUBB6	Tubulin beta-6 chain	0.00018	-1.43
P18669	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	0.00033	-1.45
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	6.2E-05	-1.45
Q8WZ42	TTN	Titin	0.00031	-1.45
Q08431	MFGE8	Lactadherin	0.00031	-1.51
Q9Y383	LUC7L2	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	4.5E-05	-1.51
P07910	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	0.00019	-1.52
P22392	NME2	Nucleoside diphosphate kinase B	0.00044	-1.53
Q15019	SEPTIN2	Septin-2	2.4E-05	-1.54
Q99536	VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	0.0005	-1.54
Q9UNX3	RPL26L1	60S ribosomal protein L26-like 1	0.00042	-1.56
Q00610	CLTC	Clathrin heavy chain 1	9.2E-05	-1.57
P06493	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	0.00019	-1.57
P14866	HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	0.00019	-1.57
P08133	ANXA6	Annexin A6	9.7E-05	-1.58
P29692	EEF1D	Elongation factor 1-delta	0.0003	-1.60
P61421	ATP6V0D1	V-type proton ATPase subunit d 1	9.2E-05	-1.60
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent	0.00018	-1.60
P14618	PKM	Pyruvate kinase PKM	0.00039	-1.61
O60313	OPA1	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	0.00032	-1.62
Q99873	PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1	0.00087	-1.62
P61353	RPL27	60S ribosomal protein L27	8.9E-06	-1.64
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	0.00084	-1.66
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0.0004	-1.67
P04899	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha-2	0.00031	-1.68
Q01518	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	0.00037	-1.70

P02458	COL2A1	Collagen alpha-1	0.00033	-1.71
P20908	COL5A1	Collagen alpha-1 chain	0.00062	-1.71
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	7.6E-05	-1.72
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	0.00031	-1.72
P39748	FEN1	Flap endonuclease 1	0.00048	-1.72
P09622	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	9E-05	-1.74
P35579	MYH9	Myosin-9	7.6E-05	-1.74
O94760	DDAH1	N,N-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	0.00067	-1.74
Q9BPU6	DPYSL5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	6.8E-05	-1.74
P31948	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	0.00062	-1.75
P08238	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	5E-05	-1.78
O15143	ARPC1B	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	0.00037	-1.79
P60866	RPS20	40S ribosomal protein S20	0.00015	-1.83
Q15257	PTPA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	0.00047	-1.83
Q9UBI6	GNG12	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-12	0.00037	-1.83
Q01813	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	5.6E-05	-1.84
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	0.00013	-1.86
Q8IWA5	SLC44A2	Choline transporter-like protein 2	0.00043	-1.88
Q5QNW6	H2BC18	Histone H2B type 2-F	0.00019	-1.88
P49321	NASP	Nuclear autoantigenic sperm protein	9.2E-05	-1.90
P62805	H4C1; ...; H4C16	Histone H4	6.7E-06	-1.90
P49913	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	6.7E-06	-1.92
Q15365	PCBP1	Poly -binding protein 1	2.2E-05	-1.92
P05362	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	5.6E-05	-1.97
Q9H7D7	WDR26	WD repeat-containing protein 26	3.6E-05	-1.97
P05023	ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	2.6E-05	-1.97
P60174	TPI1	Triosephosphate isomerase	0.00022	-1.98
P62750	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	0.00022	-1.98
P18621	RPL17	60S ribosomal protein L17	0.00011	-1.98
P84098	RPL19	60S ribosomal protein L19	0.00018	-2.05
Q8N1G4	LRRC47	Leucine-rich repeat-containing protein 47	0.00031	-2.05
P27348	YWHAQ	14-3-3 protein theta	8.9E-06	-2.06
P61247	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	9.4E-05	-2.08
P55209	NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	0.00085	-2.09
P08758	ANXA5	Annexin A5	0.00025	-2.10
P22314	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	1.2E-05	-2.10
P02533	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	0.00025	-2.12
P06733	ENO1	Alpha-enolase	2.4E-06	-2.15
P36405	ARL3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	0.00033	-2.16
P04406	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.3E-07	-2.27
P07437	TUBB	Tubulin beta chain	8.6E-05	-2.30
Q9UBV8	PEF1	Peflin	0.00041	-2.32
Q12841	FSTL1	Follistatin-related protein 1	5.1E-05	-2.35
P43487	RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein	0.00051	-2.37
P07355	ANXA2	Annexin A2	3.8E-06	-2.44
Q15631	TSN	Translin	0.00063	-2.46

Q8NC51	SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	0.00081	-2.47
P15121	AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1 member B1	0.00056	-2.54
O60353	FZD6	Frizzled-6	0.00096	-2.56
P23528	CFL1	Cofilin-1	1.8E-06	-2.67
P30050	RPL12	60S ribosomal protein L12	2E-06	-2.73
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	8E-05	-2.86
P68104	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	0.00062	-2.87
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1 chain	9.8E-08	-2.93
P05161	ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15	0.00031	-2.96
P60903	S100A10	Protein S100-A10	8E-05	-3.00
O43854	EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	1.8E-06	-3.20
P55010	EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	1.7E-06	-3.76
P00751	CFB	Complement factor B	9.8E-08	-3.87
P01889	HLA-B	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	0.00043	-3.90
P68366	TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	0.00012	-5.02

Tabla 3. DEPs utilizadas en el análisis ORA

A. 8505c vs. NThyOri				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	3.2E-10	3.96
P03956	MMP1	Interstitial collagenase	7.4E-08	3.63
Q96QD8	SLC38A2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	4.8E-07	3.37
P15260	IFNGR1	Interferon gamma receptor 1	0.00022	3.11
Q8N474	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	0.00031	3.06
P21589	NT5E	5'-nucleotidase	1.9E-07	2.79
P13987	CD59	CD59 glycoprotein	7.9E-05	2.68
P26022	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	1.4E-05	2.55
P24821	TNC	Tenascin	5.7E-07	2.51
P49913	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	2.9E-07	2.5
O43653	PSCA	Prostate stem cell antigen	0.00022	2.47
P35442	THBS2	Thrombospondin-2	2.2E-07	2.37
Q92633	LPAR1	Lysophosphatidic acid receptor 1	0.00018	2.34
P48307	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	1.9E-05	2.34
P00750	PLAT	Tissue-type plasminogen activator	4.4E-06	2.29
Q9UGM3	DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	0.00088	2.21
Q9NQ30	ESM1	Endothelial cell-specific molecule 1	8.5E-05	2.18
Q06481	APLP2	Amyloid-like protein 2	8.7E-06	2.16
O15230	LAMA5	Laminin subunit alpha-5	5.7E-07	2.15
Q9NRX5	SERINC1	Serine incorporator 1	2.3E-05	2.12
Q92743	HTRA1	Serine protease HTRA1	0.0001	2.06
P07942	LAMB1	Laminin subunit beta-1	1.2E-05	1.96
Q13501	SQSTM1	Sequestosome-1	4.3E-05	1.95
P53801	PTTG1IP	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	0.00022	1.84
P00749	PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	0.00023	1.79
P11047	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	3.9E-06	1.68
P08069	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	0.00069	1.65

P29279	CCN2	CCN family member 2	0.00011	1.45
P13497	BMP1	Bone morphogenetic protein 1	0.00076	1.44
P11169	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	0.00044	1.44
O00468	AGRN	Agtrin	0.0004	1.29
P13164	IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1	0.00082	1.24
P53618	COPB1	Coatomer subunit beta	0.00044	1.16
B. NThyOri vs. 8505c				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P27701	CD82	CD82 antigen	0.00088	-1.33
P08133	ANXA6	Annexin A6	0.00082	-1.37
P09622	DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	0.00078	-1.49
P01024	C3	Complement C3	0.00023	-1.49
P13611	VCAN	Versican core protein	0.00011	-1.55
Q08431	MFGE8	Lactadherin	0.00044	-1.59
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1 chain	6.2E-08	-3.02

Tabla 4. DEPs utilizadas en el análisis ORA

A. Fb-8505c vs. Fb-NThyOri				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
Q8N474	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	1.1E-05	4.11
Q96QD8	SLC38A2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	2.2E-07	3.84
P03956	MMP1	Interstitial collagenase	2.2E-07	3.41
P15260	IFNGR1	Interferon gamma receptor 1	9.4E-05	3.35
P24821	TNC	Tenascin	2.4E-07	2.75
Q16695	H3-4	Histone H3.1t	0.0005	2.74
P13726	F3	Tissue factor	7E-05	2.58
P49902	NT5C2	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	1.1E-05	2.53
O15230	LAMA5	Laminin subunit alpha-5	2.2E-07	2.43
O15041	SEMA3E	Semaphorin-3E	0.00051	2.41
P21589	NT5E	5'-nucleotidase	1.3E-06	2.4
P13987	CD59	CD59 glycoprotein	0.00028	2.33
P53801	PTTG1IP	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein	1.4E-05	2.32
Q9NRX5	SERINC1	Serine incorporator 1	1E-05	2.27
O43653	PSCA	Prostate stem cell antigen	0.00053	2.2
Q92633	LPAR1	Lysophosphatidic acid receptor 1	0.00028	2.19
P11279	LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	4.2E-06	2.16
P07093	SERPINE2	Glia-derived nexin	7E-05	2.12
P48307	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	6.9E-05	2.09
P11169	SLC2A3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	8.4E-06	2.09
P00749	PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	5.2E-05	2.07
P07942	LAMB1	Laminin subunit beta-1	8.5E-06	2.03
P26022	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	0.00023	1.99
Q92743	HTRA1	Serine protease HTRA1	0.00019	1.94
O95832	CLDN1	Claudin-1	0.00028	1.89

O60437	PPL	Periplakin	0.00052	1.71
P00750	PLAT	Tissue-type plasminogen activator	0.00024	1.61
P16070	CD44	CD44 antigen	0.00084	1.59
P26006	ITGA3	Integrin alpha-3	0.00026	1.53
O00560	SDCBP	Syntenin-1	0.00026	1.5
P40227	CCT6A	T-complex protein 1 subunit zeta	0.00024	1.48
P11047	LAMC1	Laminin subunit gamma-1	1.9E-05	1.46
Q06481	APLP2	Amyloid-like protein 2	0.00063	1.43
Q13219	PAPPA	Pappalysin-1	0.00091	1.41
Q15582	TGFBI	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	0.00042	1.4
P13497	BMP1	Bone morphogenetic protein 1	0.00089	1.39
P35442	THBS2	Thrombospondin-2	0.00023	1.32
O00468	AGRN	Agrin	0.00068	1.19
P50991	CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	0.00077	1.19
P08962	CD63	CD63 antigen	0.0003	1.16
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	0.00084	1.16
B. Fb-NThyOri vs. Fb-8505c				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P07954	FH	Fumarate hydratase, mitochondrial	0.00023	-1.29
Q8WZ42	TTN	Titin	0.00094	-1.39
P01024	C3	Complement C3	9.5E-06	-2.00
Q7L7X3	TAOK1	Serine/threonine-protein kinase TAO1	7E-05	-2.17
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1 chain	1.8E-06	-2.26
Q15751	HERC1	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	0.00029	-2.49
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	0.00035	-2.58
P13611	VCAN	Versican core protein	2.2E-07	-2.64
P00751	CFB	Complement factor B	2.9E-06	-2.79

Tabla 5. DEPs utilizadas en el análisis ORA

Fb-TPC-1 vs. TPC-1				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3 chain	1.2E-08	-3.67
P12110	COL6A2	Collagen alpha-2 chain	6E-08	-3.60
P29966	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	0.00137	-2.69
Q7Z304	MAMDC2	MAM domain-containing protein 2	6E-08	-2.66
P03956	MMP1	Interstitial collagenase	8.1E-06	-2.61
P07585	DCN	Decorin	2.1E-05	-2.55
P98095	FBLN2	Fibulin-2	4E-07	-2.29
Q99733	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4	0.00621	-2.11
Q9NQ86	TRIM36	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM36	0.00152	-2.01
P52789	HK2	Hexokinase-2	0.00093	-1.83
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent	0.00073	-1.66
P07093	SERPINE2	Glia-derived nexin	0.00321	-1.54
P61353	RPL27	60S ribosomal protein L27	6.2E-05	-1.53
P08123	COL1A2	Collagen alpha-2 chain	0.0017	-1.49
P15144	ANPEP	Aminopeptidase N	0.00486	-1.31

P01112	HRAS	GTPase HRas	0.00073	-1.30
P35442	THBS2	Thrombospondin-2	0.00093	-1.24
Q9Y6C2	EMILIN1	EMILIN-1	0.00182	-1.04
Q99715	COL12A1	Collagen alpha-1 chain	0.00982	-1.04
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	0.0017	-1.00
Fb-8505c vs. 8505c				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P07585	DCN	Decorin	2.3E-05	-2.73
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	4.4E-06	-1.91
P24821	TNC	Tenascin	0.00544	-1.39
P98095	FBLN2	Fibulin-2	0.00294	-1.27
Fb-NThyOri vs. NThyOri				
Entry	Gene	Protein name	p adj.	logFC
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	4.8E-08	-2.94
P21810	BGN	Biglycan	1.1E-05	-2.73
P49913	CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	1.4E-06	-2.43
P12109	COL6A1	Collagen alpha-1 chain	1.1E-05	-2.14
P08123	COL1A2	Collagen alpha-2 chain	0.00015	-1.96
P02461	COL3A1	Collagen alpha-1 chain	0.00015	-1.74
P07585	DCN	Decorin	0.00173	-1.71
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent	0.0008	-1.64
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	1.1E-05	-1.62
P09871	C1S	Complement C1s subcomponent	0.00132	-1.60
Q99459	CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	0.00034	-1.58
P16035	TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	0.00151	-1.55
P12111	COL6A3	Collagen alpha-3 chain	0.00193	-1.36
P13611	VCAN	Versican core protein	0.0016	-1.30
P24821	TNC	Tenascin	0.00882	-1.15

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [2] D. Hanahan, L.M. Coussens, Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment, *Cancer Cell*. 21 (2012) 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>.
- [3] M. De Palma, D. Hanahan, The biology of personalized cancer medicine: Facing individual complexities underlying hallmark capabilities, *Mol. Oncol.* 6 (2012) 111–127. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.011>.
- [4] M. Nurmik, P. Ullmann, F. Rodriguez, S. Haan, E. Letellier, In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers, *Int. J. Cancer*. 146 (2020) 895–905. <https://doi.org/10.1002/ijc.32193>.
- [5] R. Kalluri, The biology and function of fibroblasts in cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 16 (2016) 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.
- [6] L. Bu, H. Baba, N. Yoshida, K. Miyake, T. Yasuda, T. Uchihara, P. Tan, T. Ishimoto, Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment, *Oncogene*. 38 (2019) 4887–4901. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0765-y>.
- [7] G. Ishii, A. Ochiai, S. Neri, Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (2016) 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.07.007>.
- [8] E. Sahai, I. Astsaturov, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Puré, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, Z. Werb, A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts, *Nat. Rev. Cancer*. 20 (2020) 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.
- [9] R. Roy, J. Yang, M.A. Moses, Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 5287–5297. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556>.
- [10] J. Winkler, A. Abisoye-Ogunniyan, K.J. Metcalf, Z. Werb, Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis, *Nat. Commun.* 11 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>.
- [11] K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment, *Cell*. 141 (2010) 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>.
- [12] J. GROSS, C.M. LAPIERE, Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48 (1962) 1014–1022. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>.
- [13] H.E. Van Wart, H. Birkedal-Hansen, The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 5578–5582. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5578>.
- [14] W. Bode, C. Fernandez-Catalan, H. Nagase, K. Maskos, Endoproteinase-protein inhibitor interactions, *Apmis*. 107 (1999) 3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01520.x>.
- [15] G. Murphy, H. Nagase, Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: Destruction or repair?, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4 (2008) 128–135. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0727>.
- [16] G.A. Cabral-Pacheco, I. Garza-Veloz, C.C.D. La Rosa, J.M. Ramirez-Acuña, B.A. Perez-Romero, J.F. Guerrero-Rodriguez, N. Martinez-Avila, M.L. Martinez-Fierro, The roles of matrix

- metalloproteinases and their inhibitors in human diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–53. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.
- [17] A. Kaczorowska, N. Miękus, J. Stefanowicz, E. Adamkiewicz-Drożyńska, Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and their inhibitor (TIMP-2) in adult and pediatric cancer, *Diagnostics*. 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10080547>.
- [18] M. Najafi, B. Farhood, K. Mortezaee, Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 2782–2790. <https://doi.org/10.1002/jcb.27681>.
- [19] A. García-Pardo, G. Opdenakker, Nonproteolytic functions of matrix metalloproteinases in pathology and insights for the development of novel therapeutic inhibitors, *Met. Med.* 2 (2015) 19. <https://doi.org/10.2147/mnm.s63629>.
- [20] G. Shay, C.C. Lynch, B. Fingleton, Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis, *Matrix Biol.* 44–46 (2015) 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.019>.
- [21] M.D. Sternlicht, Z. Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 463–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>.
- [22] K. V Lu, K.A. Jong, A.K. Rajasekaran, T.F. Cloughesy, P.S. Mischel, Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line, *Lab. Investig.* 84 (2004) 8–20. <https://doi.org/10.1038/sj.labinvest.3700003>.
- [23] H. Sato, T. Takino, Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion, *Cancer Sci.* 101 (2010) 843–847. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01498.x>.
- [24] J. Hakulinen, L. Sankkila, N. Sugiyama, K. Lehti, J. Keski-Oja, Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes, *J. Cell. Biochem.* 105 (2008) 1211–1218. <https://doi.org/10.1002/jcb.21923>.
- [25] N. Garbacki, E. di Valentin, V.A. Huynh-Thu, P. Geurts, A. Irrthum, C. Crahay, T. Arnould, C. Deroanne, J. Piette, D. Cataldo, A. Colige, MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: A relationship with mRNAs targets, *PLoS One.* 6 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016509>.
- [26] T. Muramatsu, Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners, *J. Biochem.* 159 (2016) 481–490. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv127>.
- [27] N. Martínez-Bosch, P. Navarro, Galectins in the Tumor Microenvironment: Focus on Galectin-1, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1259 (2020) 17–38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43093-1_2.
- [28] D. Tang, Q. Wu, J. Zhang, H. Zhang, Z. Yuan, J. Xu, Y. Chong, Y. Huang, Q. Xiong, S. Wang, Y. Tian, Y. Lu, X. Ge, W. Shen, D. Wang, Galectin-1 expression in activated pancreatic satellite cells promotes fibrosis in chronic pancreatitis/pancreatic cancer via the TGF- β 1/Smad pathway, *Oncol. Rep.* 39 (2018) 1347–1355. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6202>.
- [29] N. Martínez-Bosch, M.G. Fernández-Barrena, M. Moreno, E. Ortiz-Zapater, J. Munné-Collado, M. Iglesias, S. Andr e, H.J. Gabius, R.F. Hwang, F. Coise Poirier, C. Navas, C. Guerra, M.E. Fernández-Zapico, P. Navarro, Galectin-1 drives pancreatic carcinogenesis through stroma remodeling and hedgehog signaling activation, *Cancer Res.* 74 (2014) 3512–3524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3013>.
- [30] C.A. Orozco, N. Martínez-Bosch, P.E. Guerrero, J. Vinaixa, T. Dalotto-Moreno, M. Iglesias, M. Moreno, M. Djurec, F. Poirier, H.J. Gabius, M.E. Fernández-Zapico, R.F. Hwang, C. Guerra, G.A. Rabinovich, P. Navarro, Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor–stroma crosstalk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E3769–E3778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722434115>.
- [31] H.J. Kim, H.K. Jeon, Y.J. Cho, Y.A. Park, J.J. Choi, I.G. Do, S.Y. Song, Y.Y. Lee, C.H. Choi, T.J.

- Kim, D.S. Bae, J.W. Lee, B.G. Kim, High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion, *Eur. J. Cancer*. 48 (2012) 1914–1921. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.005>.
- [32] D. Tang, J. Zhang, Z. Yuan, J. Gao, S. Wang, N. Ye, P. Li, S. Gao, Y. Miao, D. Wang, K. Jiang, Pancreatic satellite cells derived galectin-1 increase the progression and less survival of pancreatic ductal adenocarcinoma, *PLoS One*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090476>.
- [33] X. Xue, Z. Lu, D. Tang, J. Yao, Y. An, J. Wu, Q. Li, W. Gao, Z. Xu, Z. Qian, C. Dai, J. Wei, Y. Miao, K. Jiang, Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: An in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Pancreas*. 40 (2011) 832–839. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318217945e>.
- [34] A. Salajegheh, E. Dolan-Evans, E. Sullivan, S. Irani, M.A. Rahman, H. Vosgha, V. Gopalan, R.A. Smith, A.K.Y. Lam, The expression profiles of the galectin gene family in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma with particular emphasis on galectin-1 and galectin-3 expression, *Exp. Mol. Pathol*. 96 (2014) 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.02.003>.
- [35] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends, *J. Cell Biol*. 200 (2013) 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.
- [36] M. Yáñez-Mó, P.R.M. Siljander, Z. Andreu, A.B. Zavec, F.E. Borràs, E.I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colás, A. Cordeiro-Da Silva, S. Fais, J.M. Falcon-Perez, I.M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N.H.H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E.M. Krämer-Albers, S. Laitinen, C. Lässer, T. Lener, E. Ligeti, A. Line, G. Lipps, A. Llorente, J. Lötvall, M. Manček-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E.N.M. Nolte-’t Hoen, T.A. Nyman, L. O’Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, É. Pállinger, H.A. Del Portillo, J. Reventós, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sánchez-Madrid, N. Santarém, K. Schallmoser, M.S. Ostendorf, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S.G. Van Der Grein, M. Helena Vasconcelos, M.H.M. Wauben, O. De Wever, Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *J. Extracell. Vesicles*. 4 (2015) 1–60. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.
- [37] E. CHARGAFF, R. WEST, The biological significance of the thromboplastic protein of blood., *J. Biol. Chem*. 166 (1946) 189–197. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34997-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34997-9).
- [38] P. Wolf, The nature and significance of platelet products in human plasma., *Br. J. Haematol*. 13 (1967) 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>.
- [39] H.C. Anderson, Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage., *J. Cell Biol*. 41 (1969) 59–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.1.59>.
- [40] N. Crawford, The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet- free Plasma, *Br. J. Haematol*. 21 (1971) 53–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1971.tb03416.x>.
- [41] A.J. Dalton, Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus like” particles, *J. Natl. Cancer Inst*. 54 (1975) 1137–1148. <https://doi.org/10.1093/jnci/54.5.1137>.
- [42] H.D. Homesley, G.J. Doellgast, Binding of Specific Peroxidase-labeled Antibody to Placental-type Phosphatase on Tumor-derived Membrane Fragments, *Cancer Res*. 40 (1980) 4064–4069.
- [43] D.D. Poutsika, E.W. Schroder, D.D. Taylor, E.M. Levy, P.H. Black, Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages., *J. Immunol*. 134 (1985) 138–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578042> (accessed September 18, 2021).
- [44] B.T. Pan, K. Teng, C. Wu, M. Adam, R.M. Johnstone, Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes, *J. Cell Biol*. 101 (1985) 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>.

- [45] R.M. Johnstone, M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, C. Turbide, Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)., *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7).
- [46] L. Zitvogel, A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, S. Amigorena, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes, *Nat. Med.* 4 (1998) 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>.
- [47] C. Théry, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, D.C. Ayre, J.M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borràs, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, M. Brennan, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L.D. Broekman, J.F. Bromberg, P. Bryl-Górecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzás, J.B. Byrd, G. Camussi, D.R.F. Carter, S. Caruso, L.W. Chamley, Y.T. Chang, A.D. Chaudhuri, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A.R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R.J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F.A.W. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M.F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, P. de Candia, E.F. De Santana, O. De Wever, H.A. del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A.P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M.R. Dourado, T.A.P. Driedonks, F. V. Duarte, H.M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekström, S. EL Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrügger, J.M. Falcón-Pérez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Försonits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gámez-Valero, C. Gardiner, K. Gärtner, R. Gaudin, Y.S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C.I. Goberdhan, A. Görgens, S.M. Gorski, D.W. Greening, J.C. Gross, A. Gualerzi, G.N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R.A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A.F. Hill, F.H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A.G.E. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H.K. Jackson, S. Jacobsen, S.M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, J.C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S. ichi Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E.T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K.P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn, D.J. Klinke, M. Kornek, M.M. Kosanović, Á.F. Kovács, E.M. Krämer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I. V. Kurochkin, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, L.R. Languino, J. Lannigan, C. Lässer, L.C. Laurent, G. Lavieu, E. Lázaro-Ibáñez, S. Le Lay, M.S. Lee, Y.X.F. Lee, D.S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I.T.S. Li, K. Liao, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Linē, K. Linnemannstöns, A. Llorente, C.A. Lombard, M.J. Lorenowicz, Á.M. Lőrincz, J. Lötvall, J. Lovett, M.C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T.R. Lunavat, S.L.N. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E.S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M.C. Martinez, V.R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L.K. McGinnis, M.J. McVey, D.G. Meckes, K.L. Meehan, I. Mertens, V.R. Minciocchi, A. Möller, M. Møller Jørgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D.C. Muth, K.H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsun, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J.P. Nolan, E.N.M. Nolte-’t Hoen, N. Noren Hooten, L. O’Driscoll, T. O’Grady, A. O’Loughlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L.A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Ostegaard, M. Ostrowski, J. Park, D.M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M.W. Pfaffl, D.G. Phinney, B.C.H. Pieters, R.C. Pink, D.S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I.K.H. Poon, B.H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R.L. Raffai, S. Raimondo, J. Rak, M.I. Ramirez, G. Raposo, M.S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F.L. Ricklefs, P.D. Robbins, D.D. Roberts, S.C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K.M.A. Rouschop, A. Rughetti, A.E. Russell, P. Saá, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sánchez, J.A. Saugstad, M.J. Saul, R.M. Schiffelers, R. Schneider, T.H. Schøyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma,

- O. Shatnyeva, F. Shekari, G.V. Shelke, A.K. Shetty, K. Shiba, P.R.M. Siljander, A.M. Silva, A. Skowronek, O.L. Snyder, R.P. Soares, B.W. Sódar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P.D. Stahl, W. Stoorvogel, S.L. Stott, E.F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W.S. Toh, R. Tomasini, A.C. Torrecilhas, J.P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B.W.M. van Balkom, S.G. van der Grein, J. Van Deun, M.J.C. van Herwijnen, K. Van Keuren-Jensen, G. van Niel, M.E. van Royen, A.J. van Wijnen, M.H. Vasconcelos, I.J. Vechetti, T.D. Veit, L.J. Vella, É. Velot, F.J. Verweij, B. Vestad, J.L. Viñas, T. Visnovitz, K. V. Vukman, J. Wahlgren, D.C. Watson, M.H.M. Wauben, A. Weaver, J.P. Webber, V. Weber, A.M. Wehman, D.J. Weiss, J.A. Welsh, S. Wendt, A.M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yáñez-Mó, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Žėkas, J. ye Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A.R. Zheutlin, A.M. Zickler, P. Zimmermann, A.M. Zivkovic, D. Zocco, E.K. Zuba-Surma, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J. Extracell. Vesicles.* 7 (2018). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- [48] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Théry, Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication, *Nat. Cell Biol.* 21 (2019) 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>.
- [49] E. Willms, C. Cabañas, I. Mäger, M.J.A. Wood, P. Vader, Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression, *Front. Immunol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00738>.
- [50] R. Bandu, J.W. Oh, K.P. Kim, Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology, *Exp. Mol. Med.* 51 (2019). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0218-2>.
- [51] H. Zhang, D. Freitas, H.S. Kim, K. Fabijanic, Z. Li, H. Chen, M.T. Mark, H. Molina, A.B. Martin, L. Bojmar, J. Fang, S. Rampersaud, A. Hoshino, I. Matei, C.M. Kenific, M. Nakajima, A.P. Mutvei, P. Sansone, W. Buehring, H. Wang, J.P. Jimenez, L. Cohen-Gould, N. Paknejad, M. Brendel, K. Manova-Todorova, A. Magalhães, J.A. Ferreira, H. Osório, A.M. Silva, A. Massey, J.R. Cubillos-Ruiz, G. Galletti, P. Giannakakou, A.M. Cuervo, J. Blenis, R. Schwartz, M.S. Brady, H. Peinado, J. Bromberg, H. Matsui, C.A. Reis, D. Lyden, Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation, *Nat. Cell Biol.* 20 (2018) 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>.
- [52] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Théry, Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>.
- [53] D.K. Jeppesen, A.M. Fenix, J.L. Franklin, J.N. Higginbotham, Q. Zhang, L.J. Zimmerman, D.C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, W.H. Fissell, J.G. Patton, L.H. Rome, D.T. Burnette, R.J. Coffey, Reassessment of Exosome Composition, *Cell.* 177 (2019) 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>.
- [54] G. Van Niel, G. D’Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- [55] S. Anand, M. Samuel, S. Kumar, S. Mathivanan, Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1867 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.005>.
- [56] H. Kalra, G.P.C. Drummen, S. Mathivanan, Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>.
- [57] D. Cesselli, P. Parisse, A. Aleksova, C. Veneziano, C. Cervellin, A. Zanello, A.P. Beltrami,

- Extracellular vesicles: How drug and pathology interfere with their biogenesis and function, *Front. Physiol.* 9 (2018) 1394. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01394>.
- [58] S. Mathivanan, C.J. Fahner, G.E. Reid, R.J. Simpson, *ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids*, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr828>.
- [59] H. Kalra, R.J. Simpson, H. Ji, E. Aikawa, P. Altevogt, P. Askenase, V.C. Bond, F.E. Borràs, X. Breakefield, V. Budnik, E. Buzas, G. Camussi, A. Clayton, E. Cocucci, J.M. Falcon-Perez, S. Gabrielsson, Y.S. Gho, D. Gupta, H.C. Harsha, A. Hendrix, A.F. Hill, J.M. Inal, G. Jenster, E.M. Krämer-Albers, S.K. Lim, A. Llorente, J. Lötvall, A. Marcilla, L. Mincheva-Nilsson, I. Nazarenko, R. Nieuwland, E.N.M. Nolte-’t Hoen, A. Pandey, T. Patel, M.G. Piper, S. Pluchino, T.S.K. Prasad, L. Rajendran, G. Raposo, M. Record, G.E. Reid, F. Sánchez-Madrid, R.M. Schiffelers, P. Siljander, A. Stensballe, W. Stoorvogel, D. Taylor, C. Thery, H. Valadi, B.W.M. van Balkom, J. Vázquez, M. Vidal, M.H.M. Wauben, M. Yáñez-Mó, M. Zoeller, S. Mathivanan, *Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation*, *PLoS Biol.* 10 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>.
- [60] M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- [61] Z. Andreu, M. Yáñez-Mó, *Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function*, *Front. Immunol.* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>.
- [62] S.N. Hurwitz, M.M. Conlon, M.A. Rider, N.C. Brownstein, D.G. Meckes, *Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis*, *J. Extracell. Vesicles.* 5 (2016). <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31295>.
- [63] H. Suárez, Z. Andreu, C. Mazzeo, V. Toribio, A.E. Pérez-Rivera, S. López-Martín, S. García-Silva, B. Hurtado, E. Morato, L. Peláez, E.A. Arribas, T. Tolentino-Cortez, G. Barreda-Gómez, A.I. Marina, H. Peinado, M. Yáñez-Mó, *CD9 inhibition reveals a functional connection of extracellular vesicle secretion with mitophagy in melanoma cells*, *J. Extracell. Vesicles.* 10 (2021). <https://doi.org/10.1002/jev2.12082>.
- [64] O. Moreno-Gonzalo, I. Fernandez-Delgado, F. Sanchez-Madrid, *Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting*, *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2690-y>.
- [65] K. O’Brien, K. Breyne, S. Ughetto, L.C. Laurent, X.O. Breakefield, *RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 585–606. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>.
- [66] R. Kalluri, V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*, *Science* (80-.). 367 (2020). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
- [67] E. Lázaro-Ibáñez, C. Lässer, G.V. Shelke, R. Crescitelli, S.C. Jang, A. Cvjetkovic, A. García-Rodríguez, J. Lötvall, *DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology*, *J. Extracell. Vesicles.* 8 (2019). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1656993>.
- [68] E.Z. Malkin, S. V. Bratman, *Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles*, *Cell Death Dis.* 11 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02803-4>.
- [69] C. Villarroya-Beltri, F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid, M. Mittelbrunn, *Sorting it out: Regulation of exosome loading*, *Semin. Cancer Biol.* 28 (2014) 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.009>.
- [70] P. Kucharzewska, M. Belting, *Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress*, *J. Extracell. Vesicles.* 2 (2013). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20304>.
- [71] A. Möller, R.J. Lobb, *The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer*,

- Nat. Rev. Cancer. 20 (2020) 697–709. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00299-w>.
- [72] C. Han, H. Kang, J. Yi, M. Kang, H. Lee, Y. Kwon, J. Jung, J. Lee, J. Park, Single-vesicle imaging and co-localization analysis for tetraspanin profiling of individual extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles*. 10 (2021). <https://doi.org/10.1002/jev2.12047>.
- [73] G. Bordanaba-Florit, F. Royo, S.G. Kruglik, J.M. Falcón-Pérez, Using single-vesicle technologies to unravel the heterogeneity of extracellular vesicles, *Nat. Protoc.* 16 (2021) 3163–3185. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00551-z>.
- [74] G. Pedrioli, P. Paganetti, Hijacking Endocytosis and Autophagy in Extracellular Vesicle Communication: Where the Inside Meets the Outside, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2021). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.595515>.
- [75] P. Fuentes, M. Sesé, P.J. Guijarro, M. Emperador, S. Sánchez-Redondo, H. Peinado, S. Hümmer, S. Ramón y. Cajal, ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells, *Nat. Commun.* 11 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18081-9>.
- [76] K.E. Richards, A.E. Zeleniak, M.L. Fishel, J. Wu, L.E. Littlepage, R. Hill, Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells, *Oncogene*. 36 (2017) 1770–1778. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.353>.
- [77] Y. Hu, C. Yan, L. Mu, K. Huang, X. Li, D. Tao, Y. Wu, J. Qin, Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125625>.
- [78] V. Luga, L. Zhang, A.M. Vitoria-Petit, A.A. Ogunjimi, M.R. Inanlou, E. Chiu, M. Buchanan, A.N. Hosein, M. Basik, J.L. Wrana, Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration, *Cell*. 151 (2012) 1542–1556. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.024>.
- [79] D. Tokarz, R. Cisek, A. Golaraei, S.L. Asa, V. Barzda, B.C. Wilson, Ultrastructural features of collagen in thyroid carcinoma tissue observed by polarization second harmonic generation microscopy, *Biomed. Opt. Express*. 6 (2015) 3475. <https://doi.org/10.1364/boe.6.003475>.
- [80] L. MacDonald, J. Jenkins, G. Purvis, J. Lee, A.T. Franco, The Thyroid Tumor Microenvironment: Potential Targets for Therapeutic Intervention and Prognostication, *Horm. Cancer*. 11 (2020) 205–217. <https://doi.org/10.1007/s12672-020-00390-6>.
- [81] G. Ishii, A. Ochiai, S. Neri, Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (2016) 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.07.007>.
- [82] T. Kondo, S. Ezzat, S.L. Asa, Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia, *Nat. Rev. Cancer*. 6 (2006) 292–306. <https://doi.org/10.1038/nrc1836>.
- [83] M.E. Cabanillas, D.G. McFadden, C. Durante, Thyroid cancer, *Lancet*. 388 (2016) 2783–2795. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30172-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30172-6).
- [84] L. Fozzatti, S.Y. Cheng, Tumor cells and cancer-associated fibroblasts: A synergistic crosstalk to promote thyroid cancer, *Endocrinol. Metab.* 35 (2020) 673–680. <https://doi.org/10.3803/ENM.2020.401>.
- [85] L. Rahib, B.D. Smith, R. Aizenberg, A.B. Rosenzweig, J.M. Fleshman, L.M. Matrisian, Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states, *Cancer Res*. 74 (2014) 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>.
- [86] R.L. Siegel, K.D. Miller, H.E. Fuchs, A. Jemal, Cancer Statistics, 2021, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
- [87] C.M. Kitahara, J.A. Sosa, Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer, *Nat. Rev. Endocrinol.* 16 (2020) 617–618. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00414-9>.

- [88] C.M. Kitahara, J.A. Sosa, The changing incidence of thyroid cancer, *Nat. Rev. Endocrinol.* 12 (2016) 646–653. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.110>.
- [89] M.A. Zaballos, A. Acuña-Ruiz, M. Morante, P. Crespo, P. Santisteban, Regulators of the RAS-ERK pathway as therapeutic targets in thyroid cancer, *Endocr. Relat. Cancer.* 26 (2019) R319–R344. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0098>.
- [90] Y.E. Nikiforov, M.N. Nikiforova, Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer, *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (2011) 569–580. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142>.
- [91] T.Y. Kim, W.B. Kim, Y.S. Rhee, J.Y. Song, J.M. Kim, G. Gong, S. Lee, S.Y. Kim, S.C. Kim, S.J. Hong, Y.K. Shong, The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma, *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 65 (2006) 364–368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02605.x>.
- [92] Y. García-Ibáñez, G. Riesco-Eizaguirre, P. Santisteban, B. Casar, P. Crespo, Ras subcellular localization inversely regulates thyroid tumor growth and dissemination, *Cancers (Basel).* 12 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers12092588>.
- [93] G.M. Howell, S.P. Hodak, L. Yip, RAS Mutations in Thyroid Cancer, *Oncologist.* 18 (2013) 926–932. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0072>.
- [94] Y. Liu, A. Marti, C. Umbricht, Molecular diagnosis of thyroid tumors, *Otorinolaringologia.* 63 (2013) 39–52. <https://doi.org/10.5858/2010-0664-rair.1>.
- [95] G. Tallini, S.L. Asa, RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma, *Adv. Anat. Pathol.* 8 (2001) 345–354. <https://doi.org/10.1097/00125480-200111000-00005>.
- [96] J.A. Fagin, S.A. Wells, Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1054–1067. <https://doi.org/10.1056/nejmra1501993>.
- [97] L. Fozzatti, S. Cheng, Tumor Cells and Cancer-Associated Fibroblasts: A Synergistic Crosstalk to Promote Thyroid Cancer, *Endocrinol. Metab.* 35 (2020) 673. <https://doi.org/10.3803/ENM.2020.401>.
- [98] O. Saitoh, N. Mitsutake, T. Nakayama, Y. Nagayama, Fibroblast-mediated in vivo and in vitro growth promotion of tumorigenic rat thyroid carcinoma cells but not normal fisher rat thyroid follicular cells, *Thyroid.* 19 (2009) 735–742. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0017>.
- [99] L.A. Jolly, S. Novitskiy, P. Owens, N. Massoll, N. Cheng, W. Fang, H.L. Moses, A.T. Franco, Fibroblast-mediated collagen remodeling within the tumor microenvironment facilitates progression of thyroid cancers driven by brafv600e and pten loss, *Cancer Res.* 76 (2016) 1804–1813. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2351>.
- [100] J.G. Cho, H.K. Byeon, K.H. Oh, S.K. Baek, S.Y. Kwon, K.Y. Jung, J.S. Woo, Clinicopathological significance of cancer-associated fibroblasts in papillary thyroid carcinoma: a predictive marker of cervical lymph node metastasis, *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology.* 275 (2018) 2355–2361. <https://doi.org/10.1007/s00405-018-5061-x>.
- [101] L. Fozzatti, V.A. Alamino, S. Park, L. Giusiano, X. Volpini, L. Zhao, C.C. Stempin, A.C. Donadio, S. yann Cheng, C.G. Pellizas, Interplay of fibroblasts with anaplastic tumor cells promotes follicular thyroid cancer progression, *Sci. Rep.* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44361-6>.
- [102] E. Minna, S. Brich, K. Todoerti, S. Pilotti, P. Collini, E. Bonaldi, P. Romeo, L. De Cecco, M. Dugo, F. Perrone, A. Busico, A. Vingiani, I. Bersani, A. Anichini, R. Mortarini, A. Neri, G. Pruneri, A. Greco, M.G. Borrello, Cancer associated fibroblasts and senescent thyroid cells in the invasive front of thyroid carcinoma, *Cancers (Basel).* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12010112>.
- [103] M. Ryder, M. Gild, T.M. Hohl, E. Pamer, J. Knauf, R. Ghossein, J.A. Joyce, J.A. Fagin, Genetic and Pharmacological Targeting of CSF-1/CSF-1R Inhibits Tumor-Associated Macrophages and Impairs BRAF-Induced Thyroid Cancer Progression, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054302>.
- [104] Y. Wang, F. Xu, J.Y. Zhong, X. Lin, S.K. Shan, B. Guo, M.H. Zheng, L.Q. Yuan, Exosomes as

- Mediators of Cell-to-Cell Communication in Thyroid Disease, *Int. J. Endocrinol.* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/4378345>.
- [105] K. Jiang, G. Li, W. Chen, L. Song, T. Wei, Z. Li, R. Gong, J. Lei, H. Shi, J. Zhu, Plasma exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are potential biomarkers for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinomas, *Onco. Targets. Ther.* 13 (2020) 1311–1319. <https://doi.org/10.2147/OTT.S231361>.
- [106] W. Ye, X. Deng, Y. Fan, Exosomal mirna423-5p mediated oncogene activity in papillary thyroid carcinoma: A potential diagnostic and biological target for cancer therapy, *Neoplasma.* 66 (2019) 516–523. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180824N643.
- [107] K. Feng, R. Ma, L. Zhang, H. Li, Y. Tang, G. Du, D. Niu, D. Yin, The Role of Exosomes in Thyroid Cancer and Their Potential Clinical Application, *Front. Oncol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.596132>.
- [108] M. Boufraqueh, L. Zhang, M. Jain, D. Patel, R. Ellis, Y. Xiong, M. He, N. Nilubol, M.J. Merino, E. Kebebew, MiR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3, *Endocr. Relat. Cancer.* 21 (2014) 517–531. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0077>.
- [109] S. Rajabi, M.H. Dehghan, R. Dastmalchi, F.J. Mashayekhi, S. Salami, M. Hedayati, The roles and role-players in thyroid cancer angiogenesis, *Endocr. J.* 66 (2019) 277–293. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0537>.
- [110] F. Wu, F. Li, X. Lin, F. Xu, R.R. Cui, J.Y. Zhong, T. Zhu, S.K. Shan, X.B. Liao, L.Q. Yuan, Z.H. Mo, Exosomes increased angiogenesis in papillary thyroid cancer microenvironment, *Endocr. Relat. Cancer.* 26 (2019) 525–538. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0008>.
- [111] L. Zhu, P. Gangadaran, S. Kalimuthu, J.M. Oh, S.H. Baek, S.Y. Jeong, S.W. Lee, J. Lee, B.C. Ahn, Novel alternatives to extracellular vesicle-based immunotherapy—exosome mimetics derived from natural killer cells, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) S166–S179. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1489824>.
- [112] E. Minna, S. Brich, K. Todoerti, S. Pilotti, P. Collini, E. Bonaldi, P. Romeo, L. De Cecco, M. Dugo, F. Perrone, A. Busico, A. Vingiani, I. Bersani, A. Anichini, R. Mortarini, A. Neri, G. Pruneri, A. Greco, M.G. Borrello, Cancer associated fibroblasts and senescent thyroid cells in the invasive front of thyroid carcinoma, *Cancers (Basel).* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12010112>.
- [113] R. Tanos, A.R. Thierry, Clinical relevance of liquid biopsy for cancer screening, *Transl. Cancer Res.* 7 (2018) S105–S129. <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.01.31>.
- [114] W. Yu, J. Hurley, D. Roberts, S.K. Chakraborty, D. Enderle, M. Noerholm, X.O. Breakefield, J.K. Skog, Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges, *Ann. Oncol.* 32 (2021) 466–477. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>.
- [115] G. Brock, E. Castellanos-Rizaldos, L. Hu, C. Coticchia, J. Skog, Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring, *Transl. Cancer Res.* 4 (2015) 280–290. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.05>.
- [116] I. Heidrich, L. Ačkar, P. Mossahebi Mohammadi, K. Pantel, Liquid biopsies: Potential and challenges, *Int. J. Cancer.* 148 (2021) 528–545. <https://doi.org/10.1002/ijc.33217>.
- [117] C. Alix-Panabières, The future of liquid biopsy, *Nature.* 579 (2020) S9. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00844-5>.
- [118] G. Rappa, C. Puglisi, M.F. Santos, S. Forte, L. Memeo, A. Lorico, Extracellular vesicles from thyroid carcinoma: The new frontier of liquid biopsy, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20051114>.
- [119] D. Dai, Y. Tan, L. Guo, A. Tang, Y. Zhao, Identification of exosomal miRNA biomarkers for diagnosis of papillary thyroid cancer by small RNA sequencing, *Eur. J. Endocrinol.* 182 (2019) 111–121. <https://doi.org/10.1530/EJE-19-0524>.
- [120] D. Luo, S. Zhan, W. Xia, L. Huang, W. Ge, T. Wang, Proteomics study of serum exosomes from

- papillary thyroid cancer patients, *Endocr. Relat. Cancer.* 25 (2018) 879–891. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0547>.
- [121] C.C. Bavisotto, C. Cipolla, G. Graceffa, R. Barone, F. Bucchieri, D. Bulone, D. Cabibi, C. Campanella, A.M. Gammazza, A. Pitruzzella, R. Porcasi, P.L.S. Biagio, G. Tomasello, E.C. De Macario, A.J.L. Macario, F. Cappello, F. Rappa, Immunomorphological pattern of molecular chaperones in normal and pathological thyroid tissues and circulating exosomes: Potential use in clinics, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20184496>.
- [122] C. Le Clainche, M.F. Carlier, Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 489–513. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2007>.
- [123] R.D.C. Bravo-Miana, A.B. Della Vedova, A.L. De Paul, M.M. Remedi, M.L. Guantay, M.B. Gilardoni, C.G. Pellizas, A.C. Donadio, Thyroid tumor cells–fibroblasts crosstalk: Role extracellular vesicles, *Endocr. Connect.* 9 (2020) 506–518. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0113>.
- [124] V. Salvatore, G. Teti, S. Focaroli, M.C. Mazzotti, A. Mazzotti, M. Falconi, The tumor microenvironment promotes cancer progression and cell migration, *Oncotarget.* 8 (2017) 9608–9616. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14155>.
- [125] K. Das, R. Prasad, S.A. Ansari, A. Roy, A. Mukherjee, P. Sen, Matrix metalloproteinase-2: A key regulator in coagulation proteases mediated human breast cancer progression through autocrine signaling, *Biomed. Pharmacother.* 105 (2018) 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.155>.
- [126] R.E. Schweppe, J.P. Klopfer, C. Korch, U. Pugazhenth, M. Benezra, J.A. Knauf, J.A. Fagin, L.A. Marlow, J.A. Copland, R.C. Smallridge, B.R. Haugen, Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 4331–4341. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1102>.
- [127] Primary Fibroblast Culture From Human Skin Biopsy | PDF | Cell Culture | Biopsy, (n.d.). <https://es.scribd.com/document/226455927/Primary-Fibroblast-Culture-From-Human-Skin-Biopsy> (accessed August 30, 2021).
- [128] M. Tkach, J. Kowal, C. Théry, Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373 (2018). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0479>.
- [129] L.M. Desrochers, F. Bordeleau, C.A. Reinhart-King, R.A. Cerione, M.A. Antonyak, Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms11958>.
- [130] A.L. De Paul, A.M. Attademo, R.W. Carón, M. Soaje, A.I. Torres, G.A. Jahn, M.E. Celis, Neuropeptide glutamic-isoleucine (NEI) specifically stimulates the secretory activity of gonadotrophs in primary cultures of female rat pituitary cells, *Peptides.* 30 (2009) 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.08.022>.
- [131] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids, *Curr. Protoc. Cell Biol.* 30 (2006). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
- [132] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential - What they are and what they are not?, *J. Control. Release.* 235 (2016) 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- [133] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates, *Pharm. Res.* 27 (2010) 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- [134] J. Webber, A. Clayton, How pure are your vesicles?, *J. Extracell. Vesicles.* 2 (2013). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19861>.
- [135] M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein

- Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [136] J.R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nat. Methods.* 6 (2009) 359–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>.
- [137] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M.Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data, *Nat. Methods.* 13 (2016) 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
- [138] M. Pathan, S. Keerthikumar, D. Chisanga, R. Alessandro, C.S. Ang, P. Askenase, A.O. Batagov, A. Benito-Martin, G. Camussi, A. Clayton, F. Collino, D. di Vizio, J.M. Falcon-Perez, P. Fonseca, P. Fonseka, S. Fontana, Y.S. Gho, A. Hendrix, E. Nolte-T Hoen, N. Iraci, K. Kastaniegaard, T. Kislinger, J. Kowal, I. V. Kurochkin, T. Leonardi, Y. Liang, A. Llorente, T.R. Lunavat, S. Maji, F. Monteleone, A. Øverbye, T. Panaretakis, T. Patel, H. Peinado, S. Pluchino, S. Principe, G. Ronquist, F. Royo, S. Sahoo, C. Spinelli, A. Stensballe, C. Théry, M.J.C. van Herwijnen, M. Wauben, J.L. Welton, K. Zhao, S. Mathivanan, A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data, *J. Extracell. Vesicles.* 6 (2017). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1321455>.
- [139] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [140] T.N. Petersen, S. Brunak, G. Von Heijne, H. Nielsen, SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat. Methods.* 8 (2011) 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- [141] R: a language and environment for statistical computing, (n.d.). <https://www.gbif.org/es/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing> (accessed August 30, 2021).
- [142] Y. Zhu, L.M. Orre, Y.Z. Tran, G. Mermelekas, H.J. Johansson, A. Malyutina, S. Anders, J. Lehtiö, DEqMS: A method for accurate variance estimation in differential protein expression analysis, *Mol. Cell. Proteomics.* 19 (2020) 1047–1057. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001646>.
- [143] U. Raudvere, L. Kolberg, I. Kuzmin, T. Arak, P. Adler, H. Peterson, J. Vilo, G:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update), *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) W191–W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>.
- [144] J. Reimand, R. Isserlin, V. Voisin, M. Kucera, C. Tannus-Lopes, A. Rostamianfar, L. Wadi, M. Meyer, J. Wong, C. Xu, D. Merico, G.D. Bader, Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap, *Nat. Protoc.* 14 (2019) 482–517. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0103-9>.
- [145] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.* 13 (2003) 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- [146] D. Szklarczyk, A.L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N.T. Doncheva, J.H. Morris, P. Bork, L.J. Jensen, C. Von Mering, STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- [147] I. Mus, -Veteau Editor, Heterologous Expression of Membrane Proteins *Methods in Molecular Biology* 1432, (2016). <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4939-3637-3.pdf> (accessed September 15, 2021).
- [148] A.C. Donadio, M.M. Remedi, S. Susperreguy, S. Frede, M.B. Gilardoni, Y. Tang, C.G. Pellizas, L. Yan, Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and matrix metalloproteinases

- (MMPs) as regulators of tumor-host interaction in a spontaneous metastasis model in rats, *Histochem. Cell Biol.* 130 (2008) 1155–1164. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0496-6>.
- [149] P. CHOMZYNSKI, Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
- [150] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods.* 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [151] D.F. Quail, J.A. Joyce, Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis, *Nat. Med.* 19 (2013) 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- [152] E. Sahai, I. Astsaturov, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Puré, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, Z. Werb, A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts, *Nat. Rev. Cancer.* 20 (2020) 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.
- [153] S.L.N. Maas, X.O. Breakefield, A.M. Weaver, Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles, *Trends Cell Biol.* 27 (2017) 172–188. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003>.
- [154] P. Walter, R. Gilmore, G. Blobel, Protein translocation across the endoplasmic reticulum, *Cell.* 38 (1984) 5–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90520-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90520-8).
- [155] I. Mellman, G. Warren, The road taken: Past and future foundations of membrane traffic, *Cell.* 100 (2000) 99–112. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81687-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81687-6).
- [156] W. Nickel, The mystery of nonclassical protein secretion: A current view on cargo proteins and potential export routes, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 2109–2119. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03577.x>.
- [157] Z. Andreu, M. Yáñez-Mó, Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function, *Front. Immunol.* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>.
- [158] M.W. Yeh, J.P. Rougier, J.W. Park, Q.Y. Duh, M. Wong, Z. Werb, O.H. Clark, Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A, *Endocr. Relat. Cancer.* 13 (2006) 1173–1183. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01226>.
- [159] M. Shimoda, R. Khokha, Metalloproteinases in extracellular vesicles, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864 (2017) 1989–2000. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.027>.
- [160] A. Becker, B.K. Thakur, J.M. Weiss, H.S. Kim, H. Peinado, D. Lyden, Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis, *Cancer Cell.* 30 (2016) 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>.
- [161] J.L. Robinson, A. Feizi, M. Uhlén, J. Nielsen, A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome, *Cell Rep.* 26 (2019) 2622–2635.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.025>.
- [162] L. Xiong, C.K. Edwards, L. Zhou, The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: A review of the current scientific literature, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17411–17441. <https://doi.org/10.3390/ijms151017411>.
- [163] P. Huang, L.F. Mao, Z.P. Zhang, W.W. Lv, X.P. Feng, H.J. Liao, C. Dong, B. Kaluba, X.F. Tang, S. Chang, Down-Regulated miR-125a-5p Promotes the Reprogramming of Glucose Metabolism and Cell Malignancy by Increasing Levels of CD147 in Thyroid Cancer, *Thyroid.* 28 (2018) 613–623. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0401>.
- [164] Y. Tang, P. Kesavan, M.T. Nakada, L. Yan, Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback Regulation of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Expression and Matrix

- Metalloproteinase-Dependent Generation of Soluble EMMPRIN, *Mol. Cancer Res.* 2 (2004) 73–80.
- [165] S.S. Sidhu, A.T. Mengistab, A.N. Tauscher, J. LaVail, C. Basbaum, The microvesicle as a vehicle for EMMPRin in tumor-stromal interactions, *Oncogene.* 23 (2004) 956–963. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207070>.
- [166] D. Millimaggi, M. Mari, S. D’Ascenzo, E. Carosa, E.A. Jannini, S. Zucker, G. Carta, A. Pavan, V. Dolo, Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells, *Neoplasia.* 9 (2007) 349–357. <https://doi.org/10.1593/neo.07133>.
- [167] M. Hatanaka, Y. Higashi, T. Fukushige, N. Baba, K. Kawai, T. Hashiguchi, J. Su, W. Zeng, X. Chen, T. Kanekura, Cleaved CD147 shed from the surface of malignant melanoma cells activates MMP2 produced by fibroblasts, *Anticancer Res.* 34 (2014) 7091–7096.
- [168] K. Menck, C. Scharf, A. Bleckmann, L. Dyck, U. Rost, D. Wenzel, V.M. Dhople, L. Siam, T. Pukrop, C. Binder, F. Klemm, Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN, *J. Mol. Cell Biol.* 7 (2015) 143–153. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju047>.
- [169] E. Lázaro-Ibáñez, M. Neuvonen, M. Takatalo, U. Thanigai Arasu, C. Capasso, V. Cerullo, J.S. Rhim, K. Rilla, M. Yliperttula, P.R.M. Siljander, Metastatic state of parent cells influences the uptake and functionality of prostate cancer cell-derived extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles.* 6 (2017). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1354645>.
- [170] B. Schmalfeldt, D. Prechtel, K. Härting, K. Späthe, S. Rutke, E. Konik, R. Fridman, U. Berger, W. Kuhn, E. Lengyel, E. Lengyel, Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2396–2404.
- [171] H. Li, Z. Qiu, F. Li, C. Wang, The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis, *Oncol. Lett.* 14 (2017) 5865–5870. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6924>.
- [172] H. Jiang, H. Li, Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis, *BMC Cancer.* 21 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07860-2>.
- [173] N.P. Murray, E. Reyes, P. Tapia, L. Badínez, N. Orellana, Differential Expression of Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Disseminated Tumor Cells and Micrometastasis in Bone Marrow of Patients with Nonmetastatic and Metastatic Prostate Cancer: Theoretical Considerations and Clinical Implications—An Immunocy, *Bone Marrow Res.* 2012 (2012) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/259351>.
- [174] M.B. Gilardoni, M.M. Remedi, M. Oviedo, T. Dellavedova, J.P. Sarría, L. Racca, M. Dominguez, C.G. Pellizas, A.C. Donadio, Differential expression of Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP-1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in prostate gland: From normal to malignant lesions, *Pathol. Res. Pract.* 213 (2017) 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.11.008>.
- [175] L.L. Huang, Z. Wang, C.J. Cao, Z.F. Ke, F. Wang, R. Wang, C.Q. Luo, X. Lu, L.T. Wang, AEG-1 associates with metastasis in papillary thyroid cancer through upregulation of MMP2/9, *Int. J. Oncol.* 51 (2017) 812–822. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4074>.
- [176] Y. Shi, C. Su, H. Hu, H. Yan, W. Li, G. Chen, D. Xu, X. Du, P. Zhang, Serum MMP-2 as a potential predictive marker for papillary thyroid carcinoma, *PLoS One.* 13 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198896>.
- [177] W.J. Zhang, B. Song, T. Yang, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in the peripheral blood of patients with differentiated thyroid carcinoma, *Cancer Manag. Res.* 11 (2019) 10675–10681. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S233776>.
- [178] M.W. Yeh, J.P. Rougier, J.W. Park, Q.Y. Duh, M. Wong, Z. Werb, O.H. Clark, Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation

- of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A, *Endocr. Relat. Cancer*. 13 (2006) 1173–1183. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01226>.
- [179] G. Biffi, D.A. Tuveson, Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts, *Physiol. Rev.* 101 (2021) 147–176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2019>.
- [180] H. Qin, Y. Yang, B. Jiang, C. Pan, W. Chen, W. Diao, M. Ding, W. Cao, Z. Zhang, M. Chen, J. Gao, X. Zhao, X. Qiu, H. Guo, SOX9 in prostate cancer is upregulated by cancer-associated fibroblasts to promote tumor progression through HGF/c-Met-FRA1 signaling, *FEBS J.* (2021). <https://doi.org/10.1111/febs.15816>.
- [181] B. Chen, Y. Sang, X. Song, D. Zhang, L. Wang, W. Zhao, Y. Liang, N. Zhang, Q. Yang, Exosomal miR-500a-5p derived from cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell proliferation and metastasis through targeting USP28, *Theranostics*. 11 (2021) 3932–3947. <https://doi.org/10.7150/THNO.53412>.
- [182] S. Lee, J.H. Hong, J.S. Kim, J.S. Yoon, S.H. Chun, S.A. Hong, E.J. Kim, K. Kang, J. Lee Kang, Y.H. Ko, Y.H. Ahn, Cancer-associated fibroblasts activated by miR-196a promote the migration and invasion of lung cancer cells, *Cancer Lett.* 508 (2021) 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.03.021>.
- [183] S. Affo, A. Nair, F. Brundu, A. Ravichandra, S. Bhattacharjee, M. Matsuda, L.K. Chin, A. Filliol, W. Wen, X. Song, A. Decker, J. Worley, J.M. Caviglia, L. Yu, D. Yin, Y. Saito, T. Savage, R.G. Wells, M. Mack, L. Zender, N. Arpaia, H.E. Remotti, R. Rabadan, P. Sims, A.L. Leblond, A. Weber, M.O. Riener, B.R. Stockwell, J. Gaublot, J.M. Llovet, R. Kalluri, G.K. Michalopoulos, E. Seki, D. Sia, X. Chen, A. Califano, R.F. Schwabe, Promotion of cholangiocarcinoma growth by diverse cancer-associated fibroblast subpopulations, *Cancer Cell*. 39 (2021) 866–882.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.012>.
- [184] M. Boufraquech, D. Patel, N. Nilubol, A. Powers, T. King, J. Shell, J. Lack, L. Zhang, S.K. Gara, V. Gunda, J. Klubo-Gwiedzinska, S. Kumar, J. Fagin, J. Knauf, S. Parangi, D. Venzon, M. Quezado, E. Kebebew, Lysyl oxidase is a key player in BRAF/MAPK pathway-driven thyroid cancer aggressiveness, *Thyroid*. 29 (2019) 79–92. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0424>.
- [185] I. Shoucair, F.W. Mello, J. Jabalee, S. Maleki, C. Garnis, The role of cancer-associated fibroblasts and extracellular vesicles in tumorigenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms21186837>.
- [186] D. Osti, M. Del Bene, G. Rappa, M. Santos, V. Matafora, C. Richichi, S. Faletti, G. V. Beznoussenko, A. Mironov, A. Bachi, L. Fornasari, D. Bongetta, P. Gaetani, F. DiMeco, A. Lorico, G. Pelicci, Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients, *Clin. Cancer Res.* 25 (2019) 266–276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1941>.
- [187] L. König, S. Kasimir-Bauer, A.K. Bittner, O. Hoffmann, B. Wagner, L.F. Santos Manvailer, R. Kimmig, P.A. Horn, V. Rebmann, Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy, *Oncoimmunology*. 7 (2018). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1376153>.
- [188] L. De Luca, G. D’Arena, V. Simeon, S. Trino, I. Laurenzana, A. Caivano, F. La Rocca, O. Villani, G. Mansueto, S. Deaglio, I. Innocenti, L. Laurenti, S. Molica, G. Pietrantuono, A. De Stradis, L. Del Vecchio, P. Musto, Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia, *Leuk. Lymphoma*. 58 (2017) 1424–1432. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1243790>.
- [189] M. Clos-Garcia, A. Loizaga-Iriarte, P. Zuñiga-Garcia, P. Sánchez-Mosquera, A. Rosa Cortazar, E. González, V. Torrano, C. Alonso, M. Pérez-Cormenzana, A. Ugalde-Olano, I. Lacasa-Viscasillas, A. Castro, F. Royo, M. Unda, A. Carracedo, J.M. Falcón-Pérez, Metabolic alterations in urine extracellular vesicles are associated to prostate cancer pathogenesis and progression, *J. Extracell. Vesicles*. 7 (2018). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1470442>.

- [190] H. Peinado, M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C.M. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal, B.A. Garcia, M.K. Callahan, J. Yuan, V.R. Martins, J. Skog, R.N. Kaplan, M.S. Brady, J.D. Wolchok, P.B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg, D. Lyden, Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET, *Nat. Med.* 18 (2012) 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>.
- [191] M.P. Bebelman, M.J. Smit, D.M. Pegtel, S.R. Baglio, Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer, *Pharmacol. Ther.* 188 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>.
- [192] K. Al-Nedawi, B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha, J. Rak, Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 619–624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>.
- [193] T.H. Lee, S. Chennakrishnaiah, E. Audemard, L. Montermini, B. Meehan, J. Rak, Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451 (2014) 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.109>.
- [194] X.L. Yang, Y. Shi, D.D. Zhang, R. Xin, J. Deng, T.M. Wu, H.M. Wang, P.Y. Wang, J. Bin Liu, W. Li, Y.S. Ma, D. Fu, Quantitative proteomics characterization of cancer biomarkers and treatment, *Mol. Ther. - Oncolytics.* 21 (2021) 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.04.006>.
- [195] M.J. Lamberti, M. Rettel, J. Krijgsveld, V.A. Rivarola, N.B. Rumie Vittar, Secretome profiling of heterotypic spheroids suggests a role of fibroblasts in HIF-1 pathway modulation and colorectal cancer photodynamic resistance, *Cell. Oncol.* 42 (2019) 173–196. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-00418-8>.
- [196] G.S. Butler, C.M. Overall, Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 935–948. <https://doi.org/10.1038/nrd2945>.
- [197] S. Lewin, S. Hunt, D.W. Lambert, Extracellular vesicles and the extracellular matrix: A new paradigm or old news?, *Biochem. Soc. Trans.* 48 (2020) 2335–2345. <https://doi.org/10.1042/BST20200717>.
- [198] K. Rilla, A.M. Mustonen, U.T. Arasu, K. Härkönen, J. Matilainen, P. Nieminen, Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix, *Matrix Biol.* 75–76 (2019) 201–219. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.003>.
- [199] A.K. Murugan, M. Grieco, N. Tsuchida, RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine, *Semin. Cancer Biol.* 59 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.007>.
- [200] T.H. Lee, S. Chennakrishnaiah, B. Meehan, L. Montermini, D. Garnier, E. D’Asti, W. Hou, N. Magnus, T. Gayden, N. Jabado, K. Eppert, L. Majewska, J. Rak, Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras, *Oncotarget.* 7 (2016) 51991–52002. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10627>.
- [201] K.Z. Wu, X.H. Xu, C.P. Zhan, J. Li, J.L. Jiang, Identification of a nine-gene prognostic signature for gastric carcinoma using integrated bioinformatics analyses, *World J. Gastrointest. Oncol.* 12 (2020) 975–991. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i9.975>.
- [202] H. Lee, B.C. Park, J. Soon Kang, Y. Cheon, S. Lee, P. Jae Maeng, MAM domain containing 2 is a potential breast cancer biomarker that exhibits tumour-suppressive activity, *Cell Prolif.* 53 (2020). <https://doi.org/10.1111/cpr.12883>.
- [203] H. Suárez, Z. Andreu, C. Mazzeo, V. Toribio, A.E. Pérez-Rivera, S. López-Martín, S. García-Silva, B. Hurtado, E. Morato, L. Peláez, E.A. Arribas, T. Tolentino-Cortez, G. Barreda-Gómez, A.I. Marina, H. Peinado, M. Yáñez-Mó, CD9 inhibition reveals a functional connection of extracellular vesicle secretion with mitophagy in melanoma cells, *J. Extracell. Vesicles.* 10 (2021) e12082.

- <https://doi.org/10.1002/jev2.12082>.
- [204] D. Perez-Hernandez, C. Gutiérrez-Vázquez, I. Jorge, S. López-Martín, A. Ursa, F. Sánchez-Madrid, J. Vázquez, M. Yañez-Mó, The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 11649–11661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>.
- [205] M.E. Hemler, Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages, *Nat. Rev. Cancer.* 14 (2014) 49–60. <https://doi.org/10.1038/nrc3640>.
- [206] F. Schaper, A.B. van Spruiel, Antitumor immunity is controlled by tetraspanin proteins, *Front. Immunol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01185>.
- [207] X.Y. Zhang, Y.M. Sheng, B.W. Li, Q. Wang, X.T. Liu, J.Q. Han, Ovarian cancer derived PKR1 positive exosomes promote angiogenesis by promoting migration and tube formation in vitro, *Cell Biochem. Funct.* 39 (2021) 308–316. <https://doi.org/10.1002/cbf.3583>.
- [208] W. Mu, S. Rana, M. Zöller, Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness, *Neoplasia (United States)*. 15 (2013) 875–887. <https://doi.org/10.1593/neo.13786>.
- [209] B.H. Sung, T. Ketova, D. Hoshino, A. Zijlstra, A.M. Weaver, Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion, *Nat. Commun.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms8164>.
- [210] A. Hoshino, B. Costa-Silva, T.L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, S. Singh, C. Williams, N. Soplop, K. Uryu, L. Pharmed, T. King, L. Bojmar, A.E. Davies, Y. Ararso, T. Zhang, H. Zhang, J. Hernandez, J.M. Weiss, V.D. Dumont-Cole, K. Kramer, L.H. Wexler, A. Narendran, G.K. Schwartz, J.H. Healey, P. Sandstrom, K. Jørgen Labori, E.H. Kure, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M. De Sousa, S. Kaur, M. Jain, K. Mallya, S.K. Batra, W.R. Jarnagin, M.S. Brady, O. Fodstad, V. Muller, K. Pantel, A.J. Minn, M.J. Bissell, B.A. Garcia, Y. Kang, V.K. Rajasekhar, C.M. Ghajar, I. Matei, H. Peinado, J. Bromberg, D. Lyden, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature.* 527 (2015) 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
- [211] Y. Zhou, H. Ren, B. Dai, J. Li, L. Shang, J. Huang, X. Shi, Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0965-2>.
- [212] E. Urciuoli, E. Giorda, M. Scarsella, S. Petrini, B. Peruzzi, Osteosarcoma-derived extracellular vesicles induce a tumor-like phenotype in normal recipient cells, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 6158–6172. <https://doi.org/10.1002/jcp.26464>.
- [213] H. Hardin, H. Helein, K. Meyer, S. Robertson, R. Zhang, W. Zhong, R. V. Lloyd, Thyroid cancer stem-like cell exosomes: regulation of EMT via transfer of lncRNAs, *Lab. Investig.* 98 (2018) 1133–1142. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0065-0>.
- [214] A. Moon, M.S. Kim, T.G. Kim, S.H. Kim, H.E. Kim, Y.Q. Chen, H.R.C. Kim, H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: A role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype, *Int. J. Cancer.* 85 (2000) 176–181. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(2000115\)85:2%3C176::AID-IJC5%3E3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(2000115)85:2%3C176::AID-IJC5%3E3.0.CO;2-E).
- [215] I.Y. Kim, S.J. Jeong, E.S. Kim, H.K. Seung, A. Moon, Type I collagen-induced pro-MMP-2 activation is differentially regulated by H-Ras and N-Ras in human breast epithelial cells, *J. Biochem. Mol. Biol.* 40 (2007) 825–831. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.5.825>.
- [216] E.S. Kim, S.M. Nam, H.K. Song, S. Lee, K. Kim, H.K. Lim, H. Lee, K.T. Kang, Y.J. Kwon, Y.J. Chun, S.Y. Park, J. Jung, A. Moon, CCL8 mediates crosstalk between endothelial colony forming cells and triple-negative breast cancer cells through IL-8, aggravating invasion and tumorigenicity, *Oncogene.* 40 (2021) 3245–3259. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01758-w>.
- [217] A. Fullár, J. Dudás, L. Oláh, P. Hollósi, Z. Papp, G. Sobel, K. Karászi, S. Paku, K. Baghy, I.

- Kovalszky, Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression, *BMC Cancer*. 15 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1272-3>.
- [218] R. Xu, A. Rai, M. Chen, W. Suwakulsiri, D.W. Greening, R.J. Simpson, Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (2018) 617–638. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0036-9>.
- [219] K. Nabeshima, H. Iwasaki, K. Koga, H. Hojo, J. Suzumiya, M. Kikuchi, Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression, *Pathol. Int.* 56 (2006) 359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01972.x>.
- [220] W. Tang, S.B. Chang, M.E. Hemler, Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1, *Mol. Biol. Cell.* 15 (2004) 4043–4050. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-05-0402>.
- [221] K. Nabeshima, J. Suzumiya, M. Nagano, K. Ohshima, B.P. Toole, K. Tamura, H. Iwasaki, M. Kikuchi, Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas, *J. Pathol.* 202 (2004) 341–351. <https://doi.org/10.1002/path.1518>.
- [222] K. Koga, K. Nabeshima, M. Aoki, T. Kawakami, M. Hamasaki, B.P. Toole, J. Nakayama, H. Iwasaki, Emmprin in epithelioid sarcoma: Expression in tumor cell membrane and stimulation of MMP-2 production in tumor-associated fibroblasts, *Int. J. Cancer.* 120 (2007) 761–768. <https://doi.org/10.1002/ijc.22412>.
- [223] M. Aoki, K. Koga, M. Hamasaki, N. Egawa, K. Nabeshima, Emmprin, released as a microvesicle in epithelioid sarcoma, interacts with fibroblasts, *Int. J. Oncol.* 50 (2017) 2229–2235. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3986>.
- [224] N.W. Colangelo, E.I. Azzam, Extracellular vesicles originating from glioblastoma cells increase metalloproteinase release by astrocytes: The role of CD147 (EMMPRIN) and ionizing radiation, *Cell Commun. Signal.* 18 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0494-4>.
- [225] Y. Aratake, K. Marutsuka, K. Kiyoyama, T. Kuribayashi, T. Miyamoto, K. Yakushiji, S. Ohno, Y. Miyake, T. Sakaguchi, T.K. Kobayashi, A. Okayama, K. Tamura, E. Ohno, EMMPRIN (CD147) expression and differentiation of papillary thyroid carcinoma: Implications for immunocytochemistry in FNA cytology, *Cytopathology.* 21 (2010) 103–110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2009.00716.x>.
- [226] H. Tan, K. Ye, Z. Wang, H. Tang, CD147 expression as a significant prognostic factor in differentiated thyroid carcinoma, *Transl. Res.* 152 (2008) 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2008.07.005>.
- [227] P. Huang, S. Chang, X. Jiang, J. Su, C. Dong, X. Liu, Z. Yuan, Z. Zhang, H. Liao, RNA interference targeting CD147 inhibits the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of thyroid carcinoma cells by down-regulating glycolysis, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 309–318. [/pmc/articles/PMC4348865/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24348865/) (accessed August 31, 2021).
- [228] H. Tan, K. Ye, Z. Wang, H. Tang, Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical CD147 and MMP-2 expression in differentiated thyroid carcinoma, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 38 (2008) 528–533. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyn065>.
- [229] W.P. Guo, D. Tang, Y.Y. Pang, X.J. Li, G. Chen, Z.G. Huang, X.Z. Tang, Q.Q. Lai, J.Y. Gan, X.L. Huang, X.F. Liu, Z.X. Wei, W. Ma, Immunohistochemical basigin expression level in thyroid cancer tissues, *World J. Surg. Oncol.* 18 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12957-020-01975-9>.
- [230] N.N. Rigoglio, A.C.S. Rabelo, J. Borghesi, G. de Sá Schiavo Matias, P. Fratini, P.H.D.M. Prazeres, C.M.M.M. Pimentel, A. Birbrair, M.A. Miglino, The tumor microenvironment: Focus on extracellular matrix, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1245 (2020) 1–38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40146-7_1.
- [231] L. Astorgues-Xerri, M.E. Riveiro, A. Tijeras-Raballand, M. Serova, C. Neuzillet, S. Albert, E. Raymond, S. Faivre, Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer, *Cancer Treat.*

- Rev. 40 (2014) 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.07.007>.
- [232] E. Raymond, OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis, *Eur. J. Cancer*. 50 (2014) 2463–2477. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.06.015>.
- [233] X. Zhu, K. Wang, K. Zhang, F. Xu, Y. Yin, L. Zhu, F. Zhou, Galectin-1 knockdown in carcinoma-associated fibroblasts inhibits migration and invasion of human MDA-MB-231 breast cancer cells by modulating MMP-9 expression, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 48 (2016) 462–467. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw019>.
- [234] D. Tang, J. Gao, S. Wang, N. Ye, Y. Chong, Y. Huang, J. Wang, B. Li, W. Yin, D. Wang, Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression, *Tumor Biol*. 37 (2016) 1889–1899. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3942-9>.
- [235] Y. Chong, D. Tang, Q. Xiong, X. Jiang, C. Xu, Y. Huang, J. Wang, H. Zhou, Y. Shi, X. Wu, D. Wang, Galectin-1 from cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition through β 1 integrin-mediated upregulation of Gli1 in gastric cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 35 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0449-1>.
- [236] V. Arcolia, F. Journe, A. Wattier, E. Leteurtre, F. Renaud, H.J. Gabius, M. Rimmelink, C. Decaestecker, A. Rodriguez, S. Boutry, S. Laurent, S. Saussez, Galectin-1 is a diagnostic marker involved in thyroid cancer progression, *Int. J. Oncol*. 51 (2017) 760–770. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4065>.
- [237] L. Gheysen, L. Soumoy, A. Trelcat, L. Verset, F. Journe, S. Saussez, New Treatment Strategy Targeting Galectin-1 against Thyroid Cancer, *Cells*. 10 (2021) 1112. <https://doi.org/10.3390/cells10051112>.
- [238] S. Saussez, D. Glinier, G. Chantrain, F. Pattou, B. Carnaille, S. André, H.J. Gabius, G. Laurent, Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease, *Thyroid*. 18 (2008) 705–712. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0361>.

ABREVIATURAS

Ab: anticuerpo

ATC: carcinoma anaplásico tiroideo

BSA: albúmina sérica bovina

CAFs: fibroblastos asociados al tumor

cfDNA: DNA libre de células

cfRNA: RNA libre de células

CMs: medios condicionados

CTCs: células tumorales circulantes

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole

DEqMS: *differential expression analysis of quantitative mass spectrometry data*

DEVs: medio depletado de EVs que sedimentan a 100.000x g.

DLS: *Dinamic Light Scattering*

DTC: carcinoma tiroideo diferenciado

ECM: matriz extracelular

EMMPRIN o CD147: inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular

EMT: transición epitelio-mesénquima

ESCRT: *endosomal sorting complexes required for transport*

EVs: vesículas extracelulares

FA: ácido fórmico

Fb: fibroblastos

FC: *fold change*

FDR: *false discovery rate*

FTC: carcinoma folicular tiroideo

GF: factores de crecimiento

GO: ontología génica

GO:BP: ontología génica según función o proceso biológico

GO:CC: ontología génica según componentes celulares

GO:MF: ontología génica según función molecular

HPA: *The Human Protein atlas*

HRP: peroxidasa de rabanito

ILVs: vesículas intraluminales

ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

LFQ: cuantificación en ausencia de sondas

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MFI: intensidad de fluorescencia media

MISEV: requisitos experimentales mínimos para el estudio de EVs

MMPs: metaloproteinasas de matriz

MVB: cuerpo multivesicular

nLC-MS/MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas

NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*

ORA: *over-representation analysis*

PBS: buffer fosfato salino

PDTC: carcinoma tiroideo pobremente diferenciado

PFA: p-formaldehído

PPI: interacciones proteína-proteína

PTC: carcinoma papilar tiroideo

PTM: modificación postraducciona

qPCR: PCR en tiempo real

RT: transcripción reversa

TA: temperatura ambiente

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TEPs: plaquetas educadas por el tumor

TIMPs: inhibidoras tisulares de las MMPs

TME: microambiente tumoral

TSH: hormona estimulante de la tiroides

TW-CMs: CMs de la cámara inferior del *transwell*

uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

AGRADECIMIENTOS

Durante el camino del doctorado cada situación y experiencia te presenta y rodea de personas, sin las cuales lo alcanzado no hubiera sido posible. Espero que a lo largo de estos años mis **AGRADECIMIENTOS** hacia cada uno en particular hayan llegado de una u otra manera, y si así no lo fue, puedan recibirlo a través de estas líneas.

A mi Directora, **Dra. Ana Carolina Donadio**, por darme la oportunidad y, desde un primer momento, la confianza para desenvolverme libremente y para encarar este proyecto, asumido como un gran desafío para ambas. Agradezco también el lugar para opinar, decidir, expresarme y aprender que gracias a los distintos puntos de vista es cuando más se crece, tanto académica como personalmente.

A mi co-directora de beca, la **Dra. Claudia Pellizas**, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su amable recibimiento, por aportar desde su experiencia a mi crecimiento y por darme el lugar para dar ese importante primer paso de la carrera científica.

A la **Facultad de Ciencias Químicas** de la **Universidad Nacional de Córdoba**, por brindarme el espacio físico de trabajo, la oportunidad de ser alumna de doctorado y, a su vez, desempeñar actividades de docencia.

A mi Comisión Asesora de tesis, **Dr. Alejandro Vilcaes**, **Dra. Flavia Bollati** y **Dra. Claudia Pellizas** por la enriquecedora experiencia de discutir los resultados obtenidos, incluso más allá de las reuniones de tesis anuales. Por su valioso aporte durante el desarrollo, evaluación y corrección de esta tesis.

A las distintas organizaciones como el **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)** y la **Fundación Sales** que me permitieron avocarme exclusivamente al desarrollo de este proyecto y que, además, lo financiaron. A la **Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)** que financió mi estadía de investigación en el extranjero.

Al **Dr. Juan Manuel Falcón-Pérez** por su invaluable aporte científico a mi trabajo, por recibirme en el Laboratorio de Exosomas del CIC bioGUNE, por su humildad, predisposición para colaborar y darme la posibilidad de profundizar mi formación en el campo de las EVs. A todo el grupo de trabajo, **Dr. Félix Royo**, **Dra. Esperanza González**, **Jone**, **María** y **Marc**, por la excelente predisposición, ayuda y hermosas experiencias compartidas durante mi estadía en España.

A todo el **personal de apoyo** y **miembros del CIBICI-CONICET**, porque el trabajo diario no sería posible sin su colaboración. En especial, a **Estela Salde** (IFEC-CONICET) y **Dr. Gastón Bisig** (CIQUIBIC-CONICET) por su disponibilidad y confianza para el uso de la ultracentrífuga tan necesaria para este proyecto de tesis.

A la **Dra. Ana De Paul**, **Dra. Carolina Leimgruber** (INICSA-CONICET), **Dra. Mónica Remedi** (IUCBC-CONICET) y **Dr. Carlos Más** (CEMINCO-CONICET) por su colaboración, enseñanza y experiencia para poder llevar a cabo los distintos tipos de microscopías abordadas en este trabajo.

Al **Dr. Danilo Ceschin** (IUCBC-CONICET) por su enorme predisposición a la enseñanza y acompañamiento durante los análisis bioinformáticos de los datos proteómicos, su total disponibilidad, escucha, aportes e invaluable guía durante todo ese proceso de análisis y escritura.

Al **Dr. Martin Theumer** por abrirme las puertas en la asignatura de Microbiología de los Alimentos y por su confianza plena para desempeñarme como docente, lo cual aportó mucho a mi formación. A mis compañeros **Pilar**, **Vero**, **Santi** y **Gisel** por recibirme como una más desde el primer momento y por lo compartido desde la docencia.

A todas las demás personas que forman y formaron parte del ex Lab. 116, **Dra. María del Mar Montesinos**, **Dra. Mónica Gilardoni**, **Dra. Laura Fozzatti**, **Dra. Ana María Masini de Repiso** y **Dr. Juan Pablo Nicola**, por sus consejos y enseñanzas tanto científicos, académicos como personales.

En especial a todos mis compañeros y amigos del Lab. quienes supieron apoyar, ayudar desinteresadamente y escuchar durante todos estos años. El día a día entre experimentos que no salen, limitaciones de financiamiento, resolución de diferentes problemas que se presentan y largas horas de trabajo, no hubiera sido igual de llevadero sin cada uno de ellos. **Luci, Flor, Vicky, Marian, Romi, Danu, Edu, Vani y Fabi.** Me llevo cada charla de catarsis "intra-lab", cada "after lab", los viajes, salidas y congresos compartidos.

En el camino doctoral se aprende de ciencia, pero todavía más acerca de uno mismo. Se transita por muchos de los sentimientos y emociones que la vida, en algún momento, nos pone al frente. Se aprende, quizás como nunca antes, acerca de las frustraciones, la perseverancia y la paciencia. Se aprende acerca de la superación diaria, la sinceridad y honestidad, el apoyo mutuo, el trabajo en equipo, la importancia de la escucha y la vocación. Toda finalización de etapa nos lleva en retrospectiva a distintas personas que, muchas veces sin entender verdaderamente los procesos, se hicieron presentes de una u otra manera. Llegué a Córdoba con un sinfín de expectativas de crecimiento científico y profesional, termino esta etapa resaltando y valorando, especialmente, eso que sin buscarlo me encontré.

A mi familia en Córdoba, el **Coro Capuchinos**, ese lugar que cuando sentía caer volvía a hacerme creer que los sueños son verdaderamente posibles cuando se ama lo que se hace. Ese grupo de personas tan humano, humilde, generoso, con una sonrisa y un abrazo siempre dispuesto para motivar, acompañar y apoyar. Ese lugar que, desde la música y el arte, se volvía mi cable a tierra y me permitía sacar siempre lo mejor de mí, inclusive en los momentos más grises.

A mis amigos de Córdoba y compañeros de camino, porque quizás hoy no hubiera llegado hasta aquí sin su apoyo. Gracias **Vir** por nunca dejarme bajar los brazos, por escuchar y sostener, por tu amistad sincera, transparente y por enseñarme que cuando anteponemos el corazón toda circunstancia, cualquiera sea, se modifica para bien. Gracias **Cami** por tu incondicionalidad y alegría. Gracias **Luci** por tu escucha, apoyo y compañía, viajes, momentos y recuerdos compartidos. Gracias **Pau** por tus consejos, tu escucha atenta y ayuda. Gracias **Rebe** y **Pingüi** por sostener y recordarme siempre ese Norte muy fuerte, que me espera y acompaña.

A mis amigos de toda la vida, **Fer, Noe, Santi, Mili, Belén**, que se alegraron con cada acierto y estuvieron siempre al pie del cañón desde cerca o lejos. Por enseñarme a confiar en mí y por llenar toda esta etapa de innumerables anécdotas.

A mi familia, las personas más importantes de mi vida, **Mamá, Papá, Lorena y Hernán**, porque desde el primer día lejos de casa supieron apoyarme en cada caída y alegrarse por cada acierto, supieron sostener, confiar y dar esas alas necesarias para crecer y ese lugar al que siempre volver. Como así también, gracias al resto de mi familia por todo su apoyo y cariño.

A esa personita que me cuida desde el cielo, que forma parte de mi identidad, de mi historia, que se vuelve ese combustible inagotable que hoy me hace ser quien soy, desde mi vocación y pasión por el conocimiento y la búsqueda de la verdad desde la ciencia.

A **Dios**, por sostener mis búsquedas, mi crecimiento, por enseñarme a confiar, haciéndose presente de muchas maneras en mi vida. Por ser ese Norte fuerte al que, pase lo que pase, siempre vuelvo.