



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de la variabilidad de RNAs pequeños provenientes
de muestras de suero fetal bovino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Filiberto Augusto Bautista Moreno

TUTOR

Dr. Carlos Fabián Flores Jasso

Ciudad de México 2021



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Bautista
Moreno
Filiberto Augusto
55 4094 6159
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
414054279

2. Datos del tutor

Dr.
Carlos Fabián
Flores
Jasso

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Erika
Chavira
Suárez

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Armando
Hernández
García

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Ana María
Salazar
Martínez

7. Datos del trabajo escrito.

Análisis de la variabilidad de RNAs pequeños provenientes de muestras de suero fetal bovino
54p
2021

Agradecimientos.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Consorcio de Metabolismo de RNA y Vesículas Extracelulares del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), México.

Agradezco a:

Los doctores C. Fabián Flores Jasso y Selma Eréndira Avendaño Vázquez por aceptarme en su laboratorio, introducirme en el quehacer científico y mostrarme como hacer ciencia rigurosa y objetiva.

A los doctores miembros de mi jurado de titulación. Les agradezco por sus comentarios, consejos, correcciones y sugerencias que enriquecieron el presente trabajo. Gracias por dedicar su tiempo y esfuerzo en ayudarme a mejorar el contenido y presentación de mi escrito de tesis.

A la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte. Le agradezco mucho por las charlas que sostuvimos, por el apoyo, por darme ánimos y por abrir un espacio en su agenda para escucharme y aconsejarme. No sabe lo infinitamente bien que me hizo saberme escuchado y comprendido por una científica como usted. Gracias por mostrarme que la academia no está tan mal.

A la Dra. Vilma Maldonado y Dr. Jorge Melendez, ya que gracias a ellos y a su taller conocí el INMEGEN y me adentré en el mundo de la genómica.

A la Dra. Mariana flores Torres, quien fue parte fundamental en el desarrollo de la presente investigación, ya que sin sus habilidades bioinformáticas la conclusión de este trabajo no sería posible. Gracias también por los consejos, enseñanzas y regaños que me diste en su momento.

Al Dr. Iván Augusto Restrepo Ángulo, quien fuera compañero y mentor durante parte de mi estancia en el INMEGEN.

A mis compañeros estudiantes del CRVE: Omar, Diana, Alejandro, Perlita y el Dr. Bustos. Gracias por las discusiones diarias, las observaciones, los aprendizajes y por hacer llevadera mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Armando, a Juanito, a Hugo, a la Dra. Nora, la Dra. Magali, a Edna y Alfredo, al Dr. Víctor y a todas aquellas manos amables que nunca me negaron el uso de sus centrifugas, pipetores, balanzas, multilectores o el préstamo de unos microlitros de dNTPs, unas pastillas de PBS, algún vial de ladder o cualquier otro equipo o reactivo de los cuales sufríamos una profunda carencia. Agradezco infinitamente su amabilidad y paciencia ante mi constante ir y venir (casi) diario por sus laboratorios. Sin su ayuda, este proyecto jamás se hubiera llevado a cabo.

A **Viridiana Huitrón** por su presencia siempre constante y su apoyo incansable durante las interminables horas de trabajo. Gracias por las largas y esclarecedoras discusiones (sobre todo durante esa etapa en la que no tenía a nadie más con quien discutir temas técnicos). Gracias por tanto cariño y tantos momentos compartidos. En fin, gracias por todo el soporte científico, emocional y térmico. Espero seguir cosechando logros a tu lado.

Dedicatoria.

A mis padres a quienes todo les debo.
Con amor, este resultado es para ustedes.

Índice

Índice de ilustraciones.....	V
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VIII
1.0 Introducción.....	1
1.1 Comunicación intercelular.....	1
1.2 Definición y clasificación de las vesículas extracelulares.....	2
1.2 Mecanismos involucrados en la biogénesis de las VEs.....	4
1.3 Composición y caracterización de las VEs.....	9
2.0 Antecedentes.....	11
3.0 Planteamiento del problema.....	12
4.0 Hipótesis.....	14
5.0 Objetivos.....	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6.0 Métodos.....	15
6.1 Purificación de VEs.....	15
6.2 Caracterización de las vesículas extracelulares.....	17
6.3 Secuenciación masiva (RNAseq).....	18
6.4 Análisis de datos.....	20
7.0 Resultados y discusión.....	22
7.1 PE-SEC, un nuevo método para aislar vesículas extracelulares ultra purificadas.....	22
7.2 El método PE-SEC es útil para enriquecer las VEs en más de 40 veces.....	25
7.3 Las VEs obtenidas mediante PE-SEC tienen características típicas de exosomas.....	28
7.4 Distintas presentaciones de SFB contienen diferentes proporciones de clases de RNAs.....	31
7.5 Los miRNAs están más representados en las fracciones de VEs-UP.....	33
7.6 No todos los miRNAs se comparten entre las fracciones vesicular y no-vesicular del suero.....	35
7.7 No hay diferencias entre las poblaciones de miRNAs presentes en las VEs con respecto a los miRNAs presentes en el suero completo.....	36
7.8 En el SFB no hay diferencias entre las poblaciones de 3'-NTA-isomiRs presentes al interior y exterior de las VEs.....	38
8.0 Conclusiones.....	40
9.0 Perspectivas.....	43
10.0 Referencias.....	44
11. Anexos.....	50
11.1 Anexo técnico.....	50
11.2 Imágenes suplementarias.....	51

Índice de ilustraciones

Figura 1: Las VEs se clasifican en exosomas o microvesículas de acuerdo con la ruta mediante la cual son generadas.....	4
Figura 2: PE-SEC, un nuevo método para obtener vesículas extracelulares altamente purificadas.	24
Figura 3: Eficacia de la SEC en seis muestras de SFB.....	26
Figura 4: Eficacia del método PE-SEC.....	28
Figura 5: Las vesículas purificadas por SEC y precipitación con Vn96 tienen tamaños típicos de exosomas.....	30
Figura 6: En el SFB se encuentran representadas las principales familias de RNAs.....	32
Figura 7: Algunas clases de RNAs se encuentran enriquecidas en las VEs-UP.....	34
Figura 8: Hay un set de miRNAs exclusivo de la fracción vesicular del SFB.....	36
Figura 9: Los miRNAs detectados en VEs Son similares a los detectados en suero completo..	37
Figura 10: Seqlogo que muestra las proporciones relativas de las adiciones de nucleótidos en el extremo 3' de todos los miRNAs observados en las fracciones de los sueros Corning y ByProducts.....	39

Abreviaturas

AGO	11
Proteína Argonauta.....	11
ATP	5
Adenosin trifosfato.....	5
Bta-WBC	27
Células blancas de bovino (Bos Taurus), p.s.i. Bos taurus white blood cells.....	27
CMV	5
Cuerpo multivesicular.....	5
DLS	29
Dispersión de luz dinámica, p.s.i. dynamic light scattering.....	29
DUBs	6
Deubiquitinasa.....	6
ESCORT	5
complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte, p.s.i. Endosomal sorting complex required for transport.....	5
exRNAs	12
RNAs extracelulares.....	12
HRP	50
Peroxidasa de rábano, p.s.i. horseradish peroxidase.....	50
ISEV	2
Sociedad Internacional para el Estudio de las Vesículas Extracelulares, p.s.i. international society of extracellular vesicles.....	2
lncRNAs	10
RNAs largos no codificantes.....	10
MET	28
Microscopía electrónica de transmisión.....	28
miRNAs	10
micro RNAs.....	10
mRNAs	10
RNAs mensajeros.....	10
MVs	3
Microvesículas.....	3
PAGE-SDS	17
Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, p.s.i. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.....	17
PBS	15
Amortiguador de fosfatos, p.s.i. Phosphate buffer Saline.....	15
PBST	17
amortiguador de fosfatos con tween, p.s.i. phosphate buffer saline tween.....	17
PE-SEC	23
Cromatografía de exclusión por tamaños mejorada con péptidos, p.s.i. peptide-enhanced size exclusion chromatography.....	23
piRNAs	31
RNAs que interactúan con la proteína Piwi p.s.i. Piwi interacting RNAs.....	31
RISC	11
Complejo de silenciamiento inducido por RNA, p.s.i. "RNA-induced silencing complex".....	11
RNA	VIII
Ácido ribonucleico, p.s.i. ribonucleic acid.....	VIII

RNAi	
RNA de interferencia.....	11
RNPs	
Complejos ribonucleoproteicos.....	11
RPKM	
Lecturas por kilobase por millón, p.s.i. Reads per kilobase per million.....	20
RPM	
Lecturas por millón, p.s.i. reads per million.....	20
SEC	
Cromatografía de exclusión por tamaños, p.s.i. size exclusion chromatography.....	11
snoRNAs	
RNAs pequeños nucleolares, p.s.i. Small nucleolar RNAs.....	33
sRNAs	
RNAs pequeños, p.s.i. small RNAs.....	VIII
tRNAs	
RNAs de transferencia.....	10
UC	
Ultracentrifugación.....	11
VEg	
Vesículas Extracelulares Grandes.....	3
VEp	
Vesículas extracelulares pequeñas.....	3
VEs	
Vesículas Extracelulares.....	2
VEs-UP	
Vesículas extracelulares ultra-purificadas.....	16
VILs	
Vesículas intraluminales.....	5

Resumen

El contenido de las vesículas extracelulares (VEs) ha sido ampliamente estudiado con intención de identificar especies de **sRNAs** que pudieran ser empleadas como biomarcadores para el diagnóstico temprano de condiciones patológicas. Sin embargo la purificación de las VEs es un proceso poco estandarizado y altamente demandante de tiempo y recursos, lo que dificulta su uso rutinario en la práctica clínica. En este trabajo se evaluaron las diferencias en la cantidad e identidad de los sRNAs que pueden ser detectados por secuenciación masiva en muestras de **RNA** purificado a partir de VEs provenientes de suero y suero completo. El objetivo de este trabajo fue determinar si la purificación de VEs previo a la extracción de RNA es un paso necesario en el flujo de trabajo para la identificación clínica de biomarcadores de RNA en muestras de suero, o si puede ser omitido sin comprometer la calidad de los resultados. Para abordar esta pregunta y para evitar las desventajas de las técnicas actuales para purificar VEs, se montó un flujo de trabajo en el que se acoplaron dos técnicas de aislamiento de VEs para aprovechar de la mejor forma posible las cualidades de ambos procesos y obtener Ves con un alto grado de purificación. Posteriormente se secuenció y analizó el RNA presente en las VEs purificadas, en el suero completo y en la fracción resultante de separar las VEs del suero. Como resultado se obtuvo un método para obtener Ves con un alto grado de purificación a un bajo costo y que no requiere del empleo de equipos muy especializados. Además, a partir del análisis bioinformático comparativo de las bibliotecas de RNA generadas se pudo observar que la purificación de VEs es un proceso que hace más fácil la detección de firmas moleculares de RNA. Sin embargo, dado que los RNAs contenidos en las VEs también pueden ser detectados en bibliotecas de suero completo es posible suponer que la purificación de Ves no es un proceso indispensable una vez que la firma de RNAs ya ha sido establecida. Conocer esta sutil diferencia podría ayudar a hacer más sencillos y asequibles los protocolos empleados en la práctica clínica durante el diagnóstico de firmas de RNAs contenidos en VEs.

1.0 Introducción

Las células que componen a los organismos no viven aisladas si no que han evolucionado múltiples métodos para mantenerse comunicadas tanto con otras células como con su ambiente^{1,2}. Como resultado, cada proceso de comunicación intercelular impacta en la coordinación y/o regulación de prácticamente todos los aspectos de la actividad celular, desde su proliferación hasta su muerte³.

1.1 Comunicación intercelular

Para comunicarse las células emplean varios métodos. Se sabe por ejemplo que algunas células (como las células nerviosas) pueden transmitir señales eléctricas en forma de un flujo de iones a través de sus membranas plasmáticas. Otras pueden responder a estímulos mecánicos como el contacto entre dos células a través de receptores específicos que pueden censar la presión en sus membranas. O finalmente, a través de la liberación de un amplio surtido de sustancias químicas, las cuales se unen a receptores muy específicos en las membranas o en el interior de las células diana. Sin embargo, cualquiera que sea la forma de comunicación, esta normalmente culmina al desencadenar complejas cascadas de señalización que muy comúnmente finalizan con la activación de vías metabólicas o la expresión o represión de genes específicos en el núcleo de la célula diana⁴.

La comunicación intercelular a través de moléculas señalizadoras se clasifica de acuerdo con la distancia que estas tienen que viajar desde la célula emisora para alcanzar su célula diana. Por un lado, si la molécula señalizadora (o ligando) se une a receptores en la misma célula que lo libera se conoce como comunicación autócrina. Si el ligando actúa a un nivel local sobre receptores de células cercanas se dice que es comunicación parácrina. Finalmente, si el

ligando entra a circulación sanguínea para actuar sobre células que se encuentren muy alejadas de la célula emisora, entonces se dice que es una señal endócrina^{4,5}.

Existe una vía de comunicación que fue propuesta hace relativamente poco tiempo. Esta es la comunicación mediada por la transferencia de vesículas extracelulares (VEs), las cuales transportan en su interior moléculas de origen muy diverso — como proteínas y ácidos nucleicos — que constituyen un mensaje. Dicho mensaje es transmitido cuando las VEs son endocitadas o se fusionan con la membrana de las células receptoras, liberando así su contenido directamente en el citoplasma de la célula diana⁶.

1.2 Definición y clasificación de las vesículas extracelulares

De acuerdo con la Sociedad Internacional para el Estudio de las Vesículas Extracelulares (ISEV), se definen como vesículas extracelulares aquellas partículas que: i) son liberadas de forma natural por las células, ii) están delimitadas por una membrana lipídica y, iii) no son capaces de autorreplicarse (y que por lo tanto carecen de un núcleo funcional)⁷. Dentro de esta definición tienen lugar partículas que son secretadas por las células de prácticamente todas las formas conocidas de la vida^{8,9}, y se encuentran en todos los biofluidos, como sangre —y sus derivados: suero y plasma—, lágrimas, sudor y orina.

Las VEs fueron originalmente descritas en un par de artículos del año 1983^{10,11} en los que casi simultáneamente y de forma independiente dos grupos de investigación describieron las dos rutas de producción de VEs mientras estudiaban la pérdida de receptores de transferrina en reticulocitos. Al principio se creyó que la formación de VEs era una forma en la que las células se deshacían de aquellos componentes celulares que ya no necesitaban¹². Sin embargo, pronto nuevos estudios fueron develando que más que servir como un método de desecho, las VEs

son importantes ya que podrían fungir como un novedoso medio de comunicación intercelular^{6,13-17}.

Tradicionalmente se ha clasificado a las VEs en dos categorías principales: exosomas y microvesículas (MVs). Estos dos tipos de VEs se diferencian por su tamaño y por la forma en que se originan. Por un lado los exosomas tienen un tamaño típico entre 40 y 100 nm de diámetro y se originan al interior de la célula en cuerpos multivesiculares para posteriormente ser exocitados al medio extracelular; mientras que las MVs se originan por gemación de la membrana plasmática y suelen tener un diámetro mayor a los 100 nm **Figura 1**.

Al respecto de esta clasificación, en el 2018 la ISEV ha hecho pública la segunda edición de los requerimientos mínimos para la validación y publicación de trabajos sobre VEs⁷. En dicha publicación se aborda la problemática que existe al momento de clasificar las VEs en cualquiera de sus subtipos tradicionales, ya que no existe un consenso sobre los marcadores moleculares que caractericen de forma exclusiva a ninguno de los subtipos de VEs. Por lo tanto, cuando en la práctica son purificadas es imposible asegurar con¹⁸ suficiente nivel de certeza el origen de las VEs, tanto si provienen del endosoma o de la membrana plasmática. Es por ello que en el mencionado documento se exhorta a la comunidad científica a intercambiar los términos exosomas y MVs por VEs pequeñas (**VEp**) y VEs grandes (**VEg**) respectivamente, o bien a llamarlas acorde a los marcadores moleculares que las describan (VEs CD9+ por ejemplo)⁷.

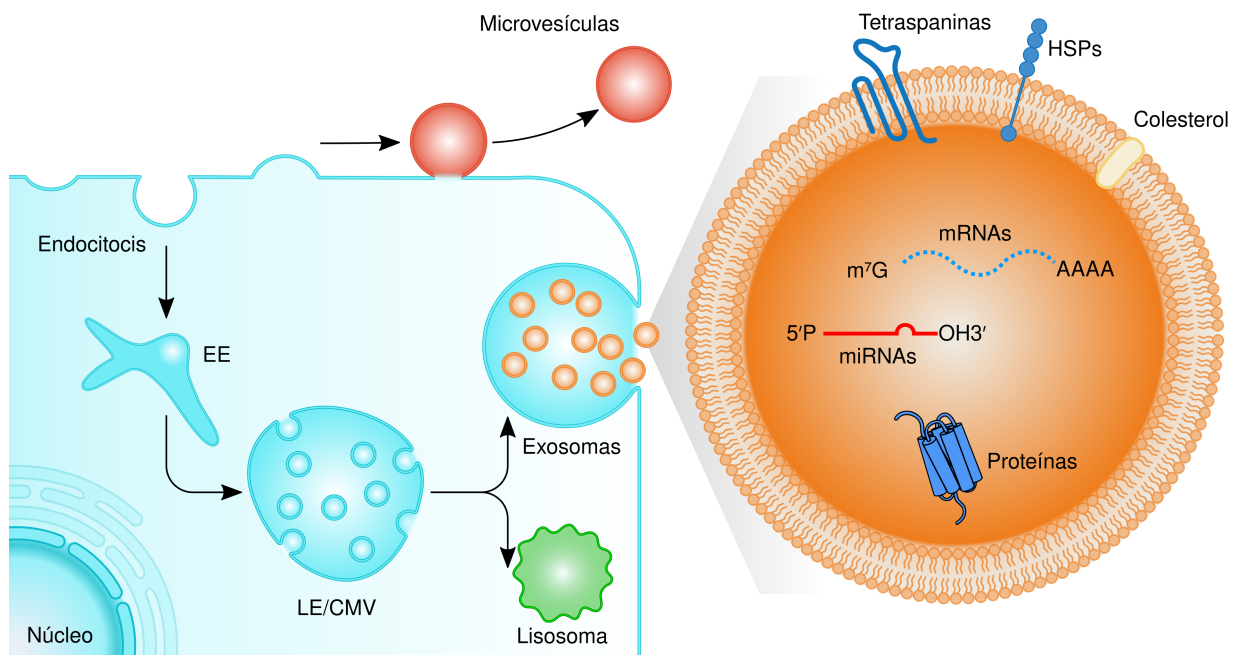


Figura 1: Las VEs se clasifican en exosomas o microvesículas de acuerdo con la ruta mediante la cual son generadas. LE Endosoma tardío p.s.i. Late Endosome, CMV cuerpo multivesicular, EE endosoma temprano p.s.i. Early Endosome.

1.2 Mecanismos involucrados en la biogénesis de las VEs

Exosomas

Los exosomas son generados dentro de la vía endocítica¹⁷⁻¹⁹ (Figura 1). En un principio se forma el endosoma temprano como resultado de la fusión de múltiples vesículas endocíticas^{20,21}, las cuales se originan de la membrana plasmática a través de la vía dependiente de clatrina y otras vías accesorias como la caveolar-dependiente, GEEC-dependiente y ARF6-dependiente^{20,22}. Posteriormente los endosomas tempranos comienzan un proceso de maduración para de este modo convertirse en endosomas tardíos. Este proceso de maduración involucra la acidificación del contenido de su lumen, el recambio en los componentes de su membrana, la migración de

la periferia celular al área perinuclear, y formación de vesículas intraluminales (VILs)^{20,21}. Dichas vesículas se forman por invaginación de la membrana del endosoma y contienen en su interior un pequeño fragmento del citoplasma. Al endosoma tardío que contiene un número significativo de VILs en su interior se le llama cuerpo multivesicular (CMV), y cuando ha alcanzado el punto cumbre en su maduración puede seguir dos vías: por un lado puede fusionarse con un lisosoma de tal forma que su contenido sea degradado. O bien, pueden fusionarse con la membrana plasmática y que las VILs que contiene sean liberadas al medio en forma de exosomas^{17,18,20,23} (Figura 1).

Formación de VILs dependientes del sistema de complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte (ESCRT)

La formación de las vesículas intraluminales que eventualmente se liberarán como exosomas es procesada de forma primaria por los complejos proteicos ESCRT^{17,23,24}. Esta maquinaria se compone de cuatro complejos diferentes (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III) los cuales actúan de manera secuencial. Primero ESCRT-0 junto con proteínas clatrininas se encarga de reconocer y reclutar proteínas marcadas con ubiquitina (Ub) —las cuales formarán parte de la carga del exosoma—. Al reclutar dichas proteínas se generan microdominios en la membrana que limita al endosoma. ESCRT-0 también se encarga de reclutar a ESCRT-I y este a su vez recluta a ESCRT-II. Estos dos complejos proteicos son los encargados de comenzar con la deformación de la membrana y de reclutar a ESCRT-III, el cual forma una especie de collar en espiral en el cuello de la invaginación y permite la formación de la vesícula como tal. Finalmente, la ATPasa Vps4 se encarga de desmontar al complejo ESCRT-III en un proceso dependiente de ATP, simultáneo al cual, la vesícula en nacimiento se desprende de la membrana y se convierte en una VIL²⁵⁻²⁹. Alternativamente, la vía anterior puede llevarse a cabo de forma reducida, ya que la proteína sintenina-1 puede encargarse de formar microdominios al reclutar, por un lado, proteínas que constituirán la carga del exosoma (provenientes de la membrana plasmática)

unidas a sindecan (por ejemplo el complejo FGF:FGFR), y por el otro a la proteína ALIX (ALG-2 interacting protein X) que se encarga de reclutar a ESCRT-III (se une a la subunidad CHMP4). De tal forma que Sintenin1 y sindecan se encargan de comenzar la invaginación de la membrana mientras que ESCRT-III se encarga de la escisión de la VIL como en la vía canónica^{30,31}.

Es importante mencionar que casi al final del proceso de formación de las VILs, algunas proteínas accesorias se encargan de reclutar deubiquitininas (**DUBs**) que se encargan de eliminar el marcaje con Ub de las proteínas de la carga. Ya que si bien, la ubiquitinación es importante durante el reclutamiento de las proteínas de la carga, la desubiquitinación de estas proteínas antes de la escisión de la VIL también es importante, porque asegura la liberación de Ubs de vuelta al citoplasma y por lo tanto su disponibilidad para futuros ciclos de ubiquitinación. La proteína ALIX en específico —y en interacción con la subunidad TSG101 (Bro1 en levaduras) del ESCRT-I y la subunidad CHMP4 del ESCRT-III— se encarga de reclutar las DUBs AMSH y UBPY (Doa4 en levaduras)^{26-28,31}.

Formación de VILs independientes de ESCRT

A pesar de que el mecanismo de formación de VILs dependiente de ESCRT ha sido ampliamente estudiado y corroborado, la depleción de estos complejos no inhibe completamente la formación de VILs ni la liberación de exosomas. Esto sugiere mecanismos alternativos independientes de ESCRT para la formación de exosomas³⁰.

Uno de los mecanismos propuestos requiere la generación de ceramida a partir de la hidrólisis de esfingomielina por la esfingomielinasa tipo II. La acumulación de ceramidas induce la generación de microdominios donde espontáneamente y debido a la geometría cónica de la ceramida se genera una curvatura negativa en la membrana del endosoma tardío, lo que culmina en la formación de una VIL³². De manera similar —y aunque los mecanismos

subyacentes no se han terminado de comprender — se ha observado la participación de ciertas tetraspaninas en la biogénesis de exosomas de manera independiente a ESCRT. Sobre todo las tetraspaninas CD63, CD9, CD81, CD82. Se hipotetiza que estas proteínas (al igual que las ceramidas) forman microdominios en la membrana endosómica y derivado de su forma cónica, estas tetraspaninas pueden generar la invaginación de la membrana e inducir la formación de VILs¹⁷.

Liberación de los exosomas

Como ya se mencionó, una vez que el CMV se ha formado puede fusionarse con un lisosoma y ser degradado, o bien puede migrar a la periferia celular y fusionarse con la membrana plasmática de tal forma que los exosomas sean liberados al medio extracelular. Para que ocurra esta segunda opción es necesaria la existencia de mecanismos que permitan seleccionar ciertos CMVs y evitar que se fusionen con lisosomas. Aunque poco es lo que se sabe de los mecanismos que dirigen dicha selección^{17,23}, se conocen ciertos eventos que parecen intervenir en este proceso. Uno de ellos involucra el marcaje de la subunidad TSG101 del ESCRT-1 con la proteína similar a ubiquitina (p.s.i. UBLp) ISG15. Cuando ISG15 se une covalentemente al TSG101 se promueve la agregación de los complejos ESCRT-1 y la fusión del CMV con los lisosomas y por lo tanto se reduce la secreción de exosomas³³. Por lo tanto, se ha sugerido que, la ISG15 de TSG101 sirve como regulador negativo de la liberación de exosomas. Otros trabajos menos exhaustivos sugieren la participación como reguladores negativos de la liberación de exosomas a proteínas como SIRT1 y SIRT2³⁴.

Después de evitar la degradación mediada por lisosomas el CMV migra de la zona perinuclear a la membrana plasmática a través de los microtúbulos del citoesqueleto. Este proceso es regulado por los miembros de la familia Rab de GTPasas Rab7, Rab11, Rab27a/b y Rab35³⁵⁻³⁸. Finalmente, el CMV se fusiona con la membrana plasmática y libera su contenido de exosomas

al medio extracelular. Este último paso es llevado a cabo gracias a la participación de los receptores de proteínas de fijación soluble de NSF o **SNARE** (p.s.i. soluble NSF attachment protein receptor) ^{39,40}.

Microvesículas

La biogénesis de las microvesículas parece ser más sencilla que la de los exosomas. Sin embargo, este proceso ha sido mucho menos estudiado y por lo tanto permanece en muchos sentidos incomprendido. Lo que se conoce del proceso indica que la formación de vesículas es mediada por cambios en los lípidos que componen la membrana plasmática. Sobre todo de aquellos que están involucrados en la asimetría de la misma como el colesterol⁴¹, la esfingomielina y las ceramidas⁴².

Se ha propuesto que ante ciertos estímulos se puede desencadenar una elevación en los niveles de calcio intracelulares, lo que a su vez ocasiona la activación de la proteína "escramblasa", la cual transloca fosfolípidos inespecíficamente hacia ambas caras de la membrana plasmática, rompiendo así con su asimetría^{43,44}. Este proceso deriva en la acumulación de ciertos lípidos en la cara externa de la membrana, específicamente en la acumulación de la Fosfatidilamina (**PS**) y Fosfatidiletanolamina (**PE**)^{43,45} que debido a su forma cónica y a su carga aniónica generan un cambio la curvatura de la membrana plasmática y dan inicio a la generación de MVs⁴⁶.

La escisión de las MVs de la membrana plasmática ocurre gracias a la intervención del complejo ESCRT-III de manera similar a lo que ocurre con los exosomas⁴⁶. Aunque este último paso también puede ocurrir por intervención del citoesqueleto. Se ha observado una vía alternativa en la que interviene el factor de ADP-ribosilación 6 (p.s.i. **ARF6**), una proteína conocida por sus implicaciones en la invasión de células tumorales. ARF6 en un ciclo de unión a GTP/GDP regula la liberación de MVs ya que se encarga de activar a la fosfolipasa D (p.s.i. **PLD**) gracias a la cual

la proteína **ERK** es reclutada en la membrana plasmática donde se encarga de fosforilar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (p.s.i. **MLCK**). MLCK a su vez fosforila la cadena ligera de la miosina ocasionando que esta se “contraiga” y permita la liberación de las VEs al medio extracelular⁴⁷.

1.3 Composición y caracterización de las VEs

A la fecha no existe un consenso sobre cuáles son los marcadores que definen y diferencian a las MVs de los exosomas⁷. El estudio de las VEs ha constituido un gran reto ya que aún las preparaciones mas puras suelen tener una mezcla de diferentes poblaciones y tipos de vesículas^{14,17,48}. Además, se sabe que el contenido de las VEs —aun dentro del mismo tipo de vesículas— varía dependiendo del tipo celular en el cual se originan e inclusive debido al estado fisiológico presente al momento de su formación⁴⁸. Pese a los problemas antes expuestos, y como resultado de años de extenso trabajo de caracterización, hoy se sabe que la membrana de las VEs en general está enriquecida en lípidos como esfingomiélin, colesterol, lípidos disaturados, gangliósido GM3, fosfatidil serina, y ceramidas^{6,13-15}. Estos lípidos —además de jugar un papel en la biogénesis de las VEs— le confieren rigidez a su membrana otorgándole mayor estabilidad en el espacio extracelular^{6,13}.

En lo que a proteínas se refiere, estas también suelen estar asociadas a los mecanismos relativos a la biogénesis de las VEs. Por ejemplo, algunas proteínas que se encuentran habitualmente son miembros de los complejos ESCRT. También son comunes aquellas pertenecientes a la familia Rab (como RAB27A y RAB11B) que son proteínas reguladoras del tráfico vesicular al interior de la célula; y también, las proteínas relacionadas tanto con la endocitosis como con la internalización de membrana plasmática, como es el caso de la proteína ARF6^{14,15}.

Particularmente, los exosomas suelen estar enriquecidos en tetraspaninas tales como CD63, CD81 y CD9 las cuales participan en los procesos de tráfico vesicular, transducción de señales y adhesión celular respectivamente. Otras proteínas que clásicamente se encuentran en las VEs son las **HSPs** (p.s.i. Heat shock proteins), las cuales comprenden un grupo amplio de chaperonas que se expresan bajo condiciones de estrés^{14,15,17}. También son comunes las proteínas syntenin-1, EHD4 y annexin XI. Todas ellas son proteínas relacionadas con el rearrreglo del citoesqueleto y de la membrana. Además se encuentra ADAM10, una metaloproteasa relacionada con uniones intercelulares^{6,13}. Por su parte, las microvesículas o IEVs suelen contener proteínas del citoesqueleto como la actina. También se ha reportado la presencia de mitofilina, un marcador de membrana interna mitocondrial^{12,14}.

Contenido de las VEs

Independientemente de la composición típica de las VEs, éstas suelen llevar una carga en su interior o asociada a su membrana. La carga consiste en una pequeña cantidad de citoplasma que puede contener muestras de prácticamente todas las biomoléculas de las células que las originaron tales como DNA, RNA, lípidos y proteínas^{6,13,14,17,49}.

Debido a la existencia de la carga en las VEs es que se ha propuesto que estas funcionan como un mecanismo de comunicación intercelular. Según este modelo las VEs actúan transportando moléculas directamente de una célula donadora a una célula receptora^{6,12-15,17,18,50,51}. Entre las cargas más comunes —y más estudiadas— de las VEs se encuentran las proteínas y distintas clases de RNA, tales como RNAs largos no codificantes (**lncRNAs**), RNAs de transferencia (**tRNAs**), RNAs mensajeros (**mRNAs**) y micro RNAs (**miRNAs**). De todos los tipos de RNA que las VEs pueden transportar los miRNAs son especialmente interesantes, ya que pueden regular la expresión de mRNAs específicos en la célula receptora^{52,53}.

2.0 Antecedentes

Debido a la importancia fisiológica de las VEs —pero sobre todo debido a su uso potencial como biomarcadores asociados a eventos patológicos— el estudio de las vesículas extracelulares ha experimentado un incremento exponencial durante los últimos años. Este incremento se ve reflejado en el gran número de trabajos publicados donde se analiza su composición, así como sus funciones —tanto fisiológicas como en la enfermedad—^{6,54}. Debido a lo anterior se han desarrollado nuevas técnicas de aislamiento de VEs, con el objetivo de poder recuperar fracciones con alto grado de pureza de cada uno de los subtipos de VEs conocidos.

Una encuesta aplicada de forma internacional en el 2016⁵⁵ develó que el método más empleado (en más del 80 % de los casos) sigue siendo la ultracentrifugación (**UC**). Sin embargo, la aplicación de esta técnica tiene varias limitantes que pueden afectar negativamente el rendimiento de cualquier investigación. Por un lado, los equipos de UC son costosos su uso en diagnóstico clínico es restringido. Por otro lado, el tiempo necesario para separar las vesículas por medio de UC es largo (hasta >12h). Estos factores hacen que esta técnica sea difícil de aplicar en laboratorios clínicos o con presupuestos bajos y además, ralentiza el flujo de la investigación⁵⁶.

Adicionalmente, se ha demostrado que las vesículas recuperadas mediante UC suelen estar deformadas o fusionadas por la fuerza recibida durante la centrifugación y contaminadas con componentes no vesiculares como lipoproteínas, agregados de proteínas y complejos ribonucleoproteicos o **cRNPs**, —como el complejo llamado **RISC** que consta de un miRNA y una proteína Argonauta (**AGO**), y que es el complejo efector del fenómeno conocido como RNA de interferencia (**RNAi**)—⁵⁷⁻⁵⁹. La contaminación con componentes no vesiculares podría, por lo tanto, comprometer el uso del contenido de las VEs como biomarcadores. En años recientes, ha tenido auge el uso de la cromatografía de exclusión por tamaños (p.s.i. **SEC**) para la purificación de VEs, ya que permite obtener VEs con un alto grado de pureza sin interferir en su

funcionalidad biológica ni en su morfología^{60,61}. Dichas ventajas sumadas a la facilidad y rapidez con que esta técnica puede ser realizada y a que no necesita de equipo especializado para su aplicación hacen de la SEC una buena opción para purificar VEs. Especialmente cuando se requiere procesar un volumen elevado de muestras y obtener VEs con alto grado de pureza.

3.0 Planteamiento del problema

El estudio de las VEs ha crecido mucho durante las últimas décadas en un esfuerzo por identificar nuevos biomarcadores para muchas condiciones patológicas que todavía resultan difíciles de detectar de manera temprana. Este crecimiento es debido a los numerosos trabajos que identifican a las VEs como mediadoras de un exquisito y complejo mecanismo de comunicación intercelular muy activo, plástico y reactivo ante cambios de las condiciones ambientales y fisiológicas.

Los RNAs contenidos en VEs aisladas a partir de suero humano han recibido especial atención debido a la facilidad con que estas muestras pueden ser obtenidas y a lo poco invasivo del proceso. Sin embargo, las VEs no son la única fuente de RNAs que existe en el suero ya que en esa matriz existen al menos dos subconjuntos de RNAs extracelulares (p.s.i. **exRNAs**) con potencial para ser usados como biomarcadores en el diagnóstico oportuno de enfermedades. Un subconjunto corresponde a los miRNAs asociados a VEs, mientras que el otro se asocia a cRNPs, como aquellos constituidos por miRNAs asociados a lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL) o a proteínas argonauta (AGO)^{62,63}. De hecho, múltiples estudios han mostrado que la identificación de biomarcadores de RNA puede realizarse a partir de suero completo sin necesidad de purificar las VEs previamente⁶⁴⁻⁶⁷. Además en algunos trabajos se ha reportado que la cantidad de RNAs presentes en las VEs es mucho menor a lo que se había reportado previamente⁶⁸ y que la mayor parte de los miRNAs se encuentran asociados no a VEs, si no a complejos ribonucleoprotéicos^{63,69}. Esta discrepancia podría deberse a que — como ya se mencionó —, la UC (que es la técnica empleada en más del 80% de los trabajos

sobre VEs a nivel mundial⁵⁵) recupera VEs contaminadas con agregados proteicos. Por lo que los resultados de aquellos trabajos en los que se ha empleado UC como método de purificación de VEs, con la intención de proponer biomarcadores de RNA para el diagnóstico de distintas patologías, podrían estar sesgados por la presencia de aquellos RNAs que son acarreados por complejos ribonucleoproteicos.

Los trabajos antes descritos ponen en duda la utilidad de emplear preparaciones de VEs en la búsqueda de biomarcadores de RNA, dado que mismos resultados podrían ser obtenidos purificando RNA a partir de muestras de suero completo. De esta manera se disminuiría el aumento de costo y tiempo que conlleva purificar las VEs previo a la extracción de RNA de muestras. Por lo que sería importante determinar si existe una diferencia real entre los resultados obtenidos con ambos protocolos.

Para evaluar esta posibilidad es necesario: 1) obtener VEs aisladas de suero con un nivel de pureza tan alto que cualquier contaminación con cRNPs pueda ser considerada despreciable y, 2) contrastar los contenidos de RNAs presentes en las VEs contra aquellos presentes en el suero completo. De tal forma que se pueda obtener información acerca de la contribución real de los RNAs que aportan las VEs al suero completo y se demuestre si existe una diferencia en la calidad y cantidad de los RNAs que pueden ser observados cuando el RNA se aísla a partir de VEs contra los que se aíslan directamente de suero.

4.0 Hipótesis

La cantidad e identidad del RNA obtenido de vesículas de SFB con un alto grado de purificación tienen diferencias significativas con el RNA circulante no asociados a VEs en muestras de SFB

5.0 Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si existen diferencias entre la población de RNAs contenida en el interior de vesículas extracelulares y los RNAs circulantes no asociados a dichas VEs en muestras de SFB.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener VEs con un alto grado de purificación a partir de muestras de suero fetal bovino.
2. Evaluar el grado de pureza de las VEs aisladas con respecto a las fracciones no vesiculares.
3. Caracterizar el contenido de RNAs de las fracciones obtenidas por medio de RNAseq.
4. Comparar las bibliotecas obtenidas de la secuenciación de RNA.

6.0 Métodos

6.1 Purificación de VEs

Pre-procesamiento del suero: A partir de de 6 marcas diferentes de SFB: ATCC (cat. 30-2020), ByProductos (cat. 90020), Corning (cat. 35-010-CV), HyClone Characterized (GE Healthcare, cat. SH30071.03), Performance (Gibco, cat. 26140-079) y Performance Plus (Gibco, cat. 16000-044), se emplearon 300mL de cada una para purificar las VEs. En cada caso el suero fue filtrado una vez para eliminar aquellas partículas que se producen como resultado de la lisis celular, para ello se empleó un filtro con tamaño de poro de 0.22 μm (Merck Millipore). Para reducir el volumen de trabajo, el suero fue concentrado por ultrafiltración a un quinto de su volumen original usando filtros Amicon Ultra 15™ con un tamaño de poro de 100 kDa (Merck Millipore, cat. UFC910024) y en rondas de centrifugación a 2000Xg por 40 minutos cada vez.

Aislamiento de VEs con alta pureza: El suero previamente concentrado fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular. Dicha técnica se realizó con una columna qEV10 (ison science) especialente dieñada para purificar VEs de fluidos biológicos. Previamente, la columna fue equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos (**PBS**) recién filtrada (0.22 μm). Posteriormente, el SFB fue cargado en la columna en rondas de 10 ml y eluído en PBS adicionado con inhibidores de proteasas al 2X (Roche cOmplete Cat:11697498001). Un total de veintiséis fracciones de 5 ml cada una fueron colectadas cada vez. Después de cada ronda de cromatografía la columna fue regenerada con 100 ml de PBS. Además, durante la transición en el cargado entre cada marca de los distintos sueros, la columna fue higienizada. Primero con 10 ml de NaOH 0.5 M y despues con 300 ml de PBS.

Inmediatamente posterior a la cromatografía, se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones colectadas de la siguiente manera: 1) De cada una de las veintiséis fracciones se obtuvo una alícuota de 1 ml, misma que se almacenó a 4°C hasta su uso. 2) una segunda alícuota —esta vez de 100 µl— fue tomada de cada una de las 26 fracciones y mezclada en relación 1:1 con una solución de lisis al 2X (300 mM de cloruro de sodio, 2.0 % Triton X-100, 100 mM Tris pH 8.0). Dichas alícuotas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para ser analizadas, las fracciones cromatográficas de cada uno de los sueros empleados se trataron de la siguiente manera:

- 1) De la fracción 1 a la 3 se desecharon ya que constituyen el volumen muerto de la columna.
- 2) Las fracciones 4 a la 11 con contenido de VEs fueron mezcladas entre ellas y concentradas nuevamente por ultrafiltración (30 kDa; Merck millipore cat. UFC903024) hasta obtener un volumen final de 8 ml. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con péptido Vn96 (**ver anexo técnico**) a una concentración final de 1 mg/ml a 4°C y en rotación constante por una noche para permitir la agregación de las VEs. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 xg por 15 min y los pellets resultantes —que contenían las VEs ultra-purificadas o **Ves-UP**— fueron lavados con 1 ml de PBS dos veces y resuspendidos en 50 µl de PBS con inhibidores de proteasas al 1X (Roche cOmplete Cat:11697498001).
- 3) Las fracciones 12-26 que contenían las proteínas solubles del suero y otros componentes no vesiculares fueron mezcladas también entre ellas, se tomó una alícuota de 50 ml y ésta fue concentrada nuevamente por ultrafiltración (30 kDa) hasta quedar un volumen final de 10 ml. Las muestras de Ves-UP y componentes no vesiculares fueron almacenadas a 4°C para su posterior extracción de RNA.

6.2 Caracterización de las vesículas extracelulares

PAGE-SDS y Western blot: Para realizar el perfil de proteínas de cada una de las fracciones obtenidas por SEC se emplearon 20 µl de cada una de las fracciones previamente tratadas con solución de lisis (ver arriba). Las muestras fueron mezcladas, en proporción 1:1, con solución de Laemmli (Bio-Rad #1610737) adicionado con 10% de beta-mercaptoetanol (Sigma M6250) y hervidas por 5 minutos para desnaturalizar a las proteínas. Posteriormente el total de la muestra fue cargada en un gel de poliacrilamida con gradiente 4-20% marca miniprotean TGX (Bio-rad #4561096) y corrido en electroforesis a 60 mV por 50 min y 90 mV por 50 minutos. Los geles fueron revelados con Coomassie blue usando el EZBlue™ Gel Staining Reagent (Sigma G1041) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La detección de marcadores de VEs se realizó por WesternBlot. Para ello, la cantidad de proteína total en cada muestra se determinó por la técnica de Bradford (Bio-Rad #5000006) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se realizaron las PAGE-SDS, siguiendo el protocolo explicado arriba, pero cargando el volumen equivalente a 10 o 100 µg de proteína total de acuerdo al caso. Posterior a la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con leche libre de grasa (Santa Cruz Biotechnology) al 5% en PBS, lavadas con PBS adicionado con Tween 20 (sigma) al 0.3% (**PBST**) durante 10 minutos (x3) y expuestas a los anticuerpos correspondientes (**ver anexo técnico**) según sea el caso de acuerdo al siguiente esquema: 2 horas de exposición al anticuerpo primario (1:1000 en PBS adicionado con leche al 1% y Tween 20 0.1%) y una hora con el anticuerpo secundario (1:10,000), entre cada anticuerpo y al finalizar la membrana fue lavada con 10 ml de PBST por 10 min (x3).

La adquisición de las imágenes de WB así como las de Azul de Coomassie fue realizada en un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ Image System™ con el software ImageLab 5.0. Las densitometrías fueron realizadas manualmente usando el software ImageJ v1.52a⁷⁰.

Análisis de tamaño de partículas: El análisis de tamaños de partículas fue realizado por la técnica de dispersión de luz dinámica o (DLS) en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Veinte microlitros de cada muestra fueron cargados en una cubeta de cuarzo y leído por triplicado a temperatura ambiente y con los ajustes por default del equipo. En el caso de las vesículas altamente purificadas estas fueron previamente tratadas con proteinasa K. para ello, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente con 5 mg/ml de proteinasa K por una hora. En cada caso, muestras de PBS filtrado a 100 kDa fueron empleadas como blanco.

Microscopía electrónica: Diez microlitros de cada muestra fueron colocados sobre una rejilla para microscopía electrónica de transmisión (MET), se dejó sedimentar por 1 minuto y se secó el exceso de líquido. Posteriormente se realizó una tinción negativa con ácido fosfotúngstico por 2 min y se realizaron dos lavados de un minuto cada uno con agua milliQ ultrafiltrada (30 kDa). Las muestras fueron observadas en un Microscopio Jeol Modelo JEM 1010 perteneciente a la central de instrumentación de microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional..

6.3 Secuenciación masiva (RNAseq)

Purificación de RNA: Las vesículas extracelulares altamente purificadas fueron lisadas con 1 ml de triReagent (ambion AM9738) y el RNA extraído de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de proteína soluble así como 10 ml de cada suero (previamente filtrado

0.22 um para eliminar debris celular) fueron tratados con tres veces su volumen de triReagent y el RNA extraído usando el kit miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen 217184).

Preparación de bibliotecas y secuenciación: La secuenciación se llevó a cabo en dos lotes diferentes. Por una parte, las bibliotecas correspondientes a las muestras provenientes del suero completo y fracciones de los sueros ByProductos, Corning, y HyClone fueron preparadas usando el kit TruSeq Small RNA kit (Illumina); mientras que para las muestras correspondientes a los sueros ATCC, Performace, y Performance Plus, se usó el kit NextFLEX small RNA-Seq kit v.3 (Bioo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas preparadas con el kit de Illumina fueron secuenciadas a 150 ciclos *single end* en un secuenciador NextSeq 500 (illumina) en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Las bibliotecas preparadas con el kit de BiooScientific fueron secuenciadas a 75 ciclos *paired end* en un secuenciador NextSeq 500 (illumina) en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos).

Análisis de datos de secuenciación: Los archivos obtenidos de la secuenciación, fueron sometidos a un análisis de control de calidad con el programa FastQC⁷¹, y sólo se conservaron aquellas secuencias con un FredScore menor o igual a 20. Posteriormente, se removieron las secuencias de los adaptadores y aquellas que fueran menores a 18 nt, usando el software Cutadapt⁷², después de lo cual las bibliotecas fueron sometidas a una segunda ronda de control de calidad con el programa FastQC. Las secuencias resultantes fueron alineadas contra el genoma de referencia de *Bos taurus* (BosTau8 UCSC) empleando el programa BWA para secuencias cortas⁷³. Para describir las familias de RNAs presentes en las muestras se empleó el script UNITAS⁷⁴. Por último, el perfil de miRNAs se obtuvo empleando el BCGSC miRNA Profiling Pipeline⁷⁵ en conjunto con los datos de las secuencias maduras de los miRNAs para *B. taurus* contenidos en la base de datos online miRBase V.29⁷⁶.

6.4 Análisis de datos.

Para poder comparar la abundancia de miRNAs, los resultados de la secuenciación fueron normalizados a cuentas (o lecturas) por millón (p.s.i **RPM**). Las cuentas correspondientes a cada miRNA se multiplicaron por un millón y posteriormente se dividieron entre el número total de cuentas de la biblioteca completa a la que pertenecen. Todos los análisis fueron realizados en el ambiente estadístico R 3.5.3⁷⁷.

Análisis de diversidad: La biodiversidad es definida como la variación de la vida en todos sus niveles de organización⁷⁸ y es un concepto empleado en ecología para estudiar la estructura de las comunidades biológicas. En este trabajo se empleó el concepto de diversidad para describir la estructura de las bibliotecas de secuenciación obtenidas y poder compararlas como alternativa a un análisis de expresión diferencial.

Para analizar la diversidad de RNAs en las muestras se decidió emplear el índice de Simpson (D), ya que este índice toma en cuenta no solamente la identidad de las especies analizadas si no también su abundancia medida como la proporción de eventos observados de una especie con respecto al total. El índice de Simpson se define como:

$$D = \sum_{i=1}^S P_i^2$$

Donde S es el número de especies observadas y P_i es la proporción que ocupa la especie "i" del total. En el presente trabajo se empleó el índice de Simpson adaptado para ser empleado en análisis de expresión génica de acuerdo con Zhang y colaboradores (2015)⁷⁹ pero empleando RPMs en lugar de lecturas por kilobase por millón (p.s.i. **RPKM**s) ya que en nuestro caso al

tratarse de RNAs pequeños no es posible calcular ese valor. De tal forma que S =Número de especies de RNAs o Genes observados dependiendo el caso, y P_i =proporción de la expresión de una especie de RNA o de un gén (medida en RPMs) con respecto al total. Por lo tanto, el índice de Simpson expresa la probabilidad de que al realizar en un muestreo aleatorio sin reemplazo se obtengan dos miembros de la misma familia de RNAs, de tal forma que entre más cercano a la unidad sea D menos diversa (en especies de RNAs) es la biblioteca⁸⁰. El análisis fue realizado empleando el paquete Vegan para R 5.2.⁸¹ Para comparar la diversidad de RNAs entre tipos de muestra (VEs-UP, Proteína, y suero completo), se empleó un análisis de Wilcoxon por pares, como alternativa a una ANOVA de una vía.

Todos los scripts empleados para realizar los análisis estadísticos se encuentran depositados en <https://github.com/FilibertoBM/TesisEVs>

7.0 Resultados y discusión

7.1 PE-SEC, un nuevo método para aislar vesículas extracelulares ultra purificadas

Con la intención de obtener VEs con el mayor grado de pureza posible probamos el método que ha sido reportado como el más eficiente para separar las vesículas de las proteínas solubles: la cromatografía de exclusión por tamaños^{82,83}. Para evaluar la eficacia de dicha técnica se midió la proporción de albúmina residual en las fracciones vesiculares recuperadas después de fraccionar SFB concentrado en una columna qEV10 (iZon science). Al ser la albúmina la proteína más abundante en el SFB y además al no estar asociada a las VEs es un buen marcador de contaminación por proteínas solubles. Sin embargo, observamos que las vesículas purificadas por esta técnica conservan una alta cantidad de albúmina **Figura 2A**. Esto sugiere que la SEC por sí sola no es el método ideal para la obtención de VEs-UP de muestras con una alta carga proteica como lo es el suero, ya que así como una gran cantidad de albúmina persiste en las muestras purificadas con esta técnica muchas RNPs también podrían seguir presentes y por lo tanto sesgar los resultados de una futura secuenciación de RNA, al añadir secuencias de RNAs que no están asociados a VEs.

Con la intención de mejorar el rendimiento de la SEC decidimos añadir un segundo paso de purificación que fuera fácil y rápido. Previamente, en el 2014 Ghosh y colaboradores⁸⁴ reportaron un péptido sintético (Vn96). El cual había sido diseñado para unirse a una región altamente conservada de los miembros de la familia de proteínas HSP70 conocido como SBD- β (p.s.i. Substrate Binding Domain β). La región SBD- β altamente hidrofóbica y sirve como sitio de anclaje con su sustrato o con otras proteínas chaperonas. Las HSP70 son un grupo de proteínas que típicamente se encuentran presentes en las VEs y que por ello son usados como

marcadores de éstas. Sin embargo, es importante mencionar que estas proteínas no son exclusivas de EVs y pueden encontrarse en otros compartimentos celulares.

La interacción de las VEs con este péptido induce la formación de agregados de VEs, los cuales pueden ser precipitados fácilmente por centrifugación en una centrífuga de mesa. Por lo tanto este método permite precipitar las VEs HSP70-positivas en pocos minutos y sin necesidad de equipo muy especializado. Además razonamos que el emplear este método que fue diseñado para enriquecer una fracción específica de VEs (aquellas que en su membrana cuentan con miembros de las HSP70) tendría la ventaja que las diferencias entre la fracción purificada y el suero completo serían mayores y por lo tanto, de ser verdadera nuestra hipótesis, estas diferencias deberían de ser más fáciles de observar.

Después de probar el péptido Vn96 observamos que por sí mismo no es eficiente para separar las VEs de las proteínas solubles en fluidos concentrados y con alta carga proteica como el suero **Figura 2B**. Sin embargo, inferimos que acoplado al *output* de la SEC, cuando gran parte de las proteínas no vesiculares han sido ya removidas, el péptido Vn96 debería permitir la separación de las VEs de las proteínas solubles residuales con alta eficiencia **Figura 2C**. Este simple protocolo de dos pasos (SEC + Precipitación con VN96) pretendía optimizar la purificación de VEs a partir del fraccionamiento por SEC de fluidos con alta carga proteica — como el suero—, es por ello que le llamamos *Peptide-Enhanced Size exclusion Chromatography* o PE-SEC.

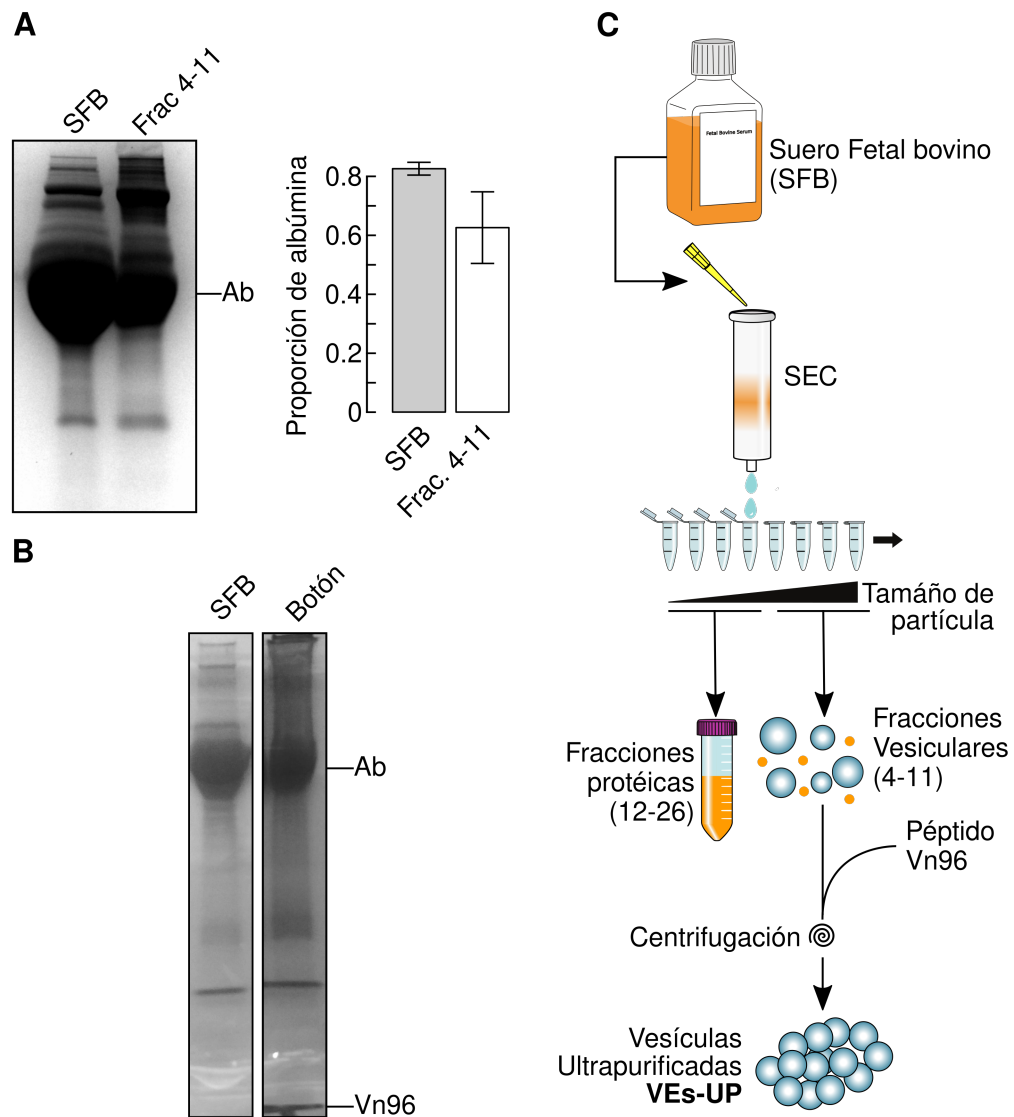


Figura 2: PE-SEC, un nuevo método para obtener vesículas extracelulares altamente purificadas.
(A) PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie que muestra el perfil de proteínas del suero fetal bovino(Corning), y las fracciones correspondientes a VEs, purificadas por SEC. 100 µg de proteína total fueron cargados en cada línea.
(B) PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie que muestra el perfil de proteínas del suero fetal bovino(Corning) y pellet de VEs obtenido tras centrifugar suero incubado con péptido Vn96 por una noche. El pellet fue resuspendido en el volumen inicial de suero empleado, y volúmenes equivalentes fueron cargados en cada línea.
(C) Esquema general del método PE-SEC.
 Ab = Albúmina. SFB = suero fetal bovino.

7.2 El método PE-SEC es útil para enriquecer las VEs en más de 40 veces.

Utilizando el método PE-SEC se fraccionaron 300ml de suero fetal bovino de la marca Corning y la eficiencia de este método de purificación de VEs se evaluó tras cada paso del protocolo. Primero se corroboró el adecuado funcionamiento de la SEC observando la curva de elución de proteínas la cual nos indica cuando la columna empleada funciona de forma reproducible. Como se puede observar en la **Figura 3**, cuando una muestra con un alto contenido de proteínas (como el SFB concentrado) pasa por una columna de SEC optimizada para purificar VEs, la cantidad de proteína presente en la muestra consigue —en ocasiones— retrasar la columna varias fracciones. Esto ocurre sobre todo cuando el pico de elución de proteína llega a su máximo valor posible alrededor de la fracción 13. Sin embargo, las primeras fracciones que contienen las partículas de mayor tamaño (como las VEs) eluyen de manera reproducible. Al observar el perfil de proteínas presentes en la muestra tras cada paso del protocolo PE-SEC fue evidente que la proporción de albúmina disminuye dramáticamente a lo largo del protocolo lo que resulta en un enriquecimiento en otras proteínas, principalmente las de tamaños pequeños menores a 60 kDa **Figura 4A superior**.

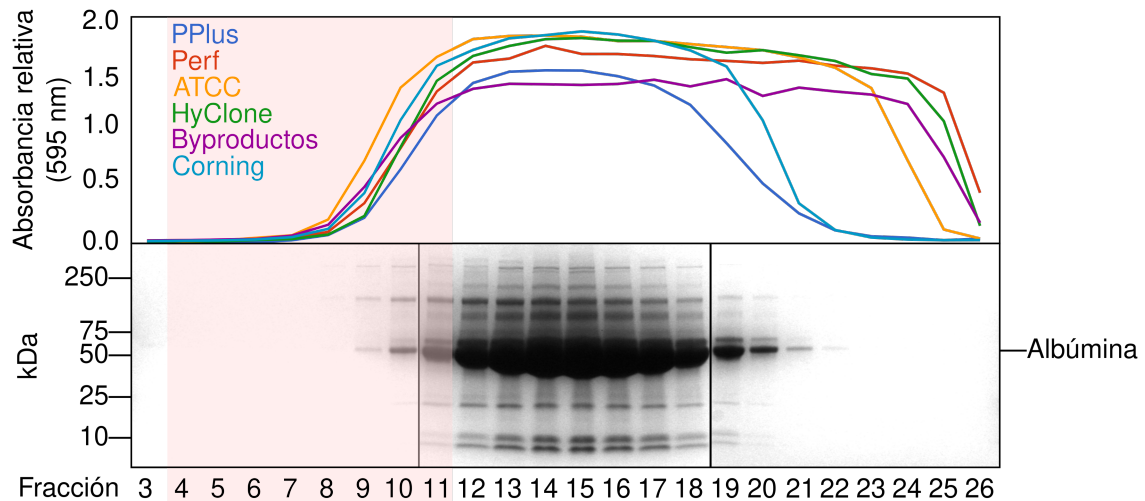


Figura 3: Eficacia de la SEC en seis muestras de SFB.

Arriba se muestra la curva de elución de los ensayos de cromatografía obtenida después de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Absorbancia relativa = absorbancia de la muestra – Absorbancia del blanco). Cada curva es el promedio de tres ensayos diferentes. Abajo, perfil de proteínas (azul de coomassie) de cada fracción obtenida por SEC (kDa = kilo Daltons); imagen representativa de las fracciones obtenidas para el suero Corning. En rojo se muestran las fracciones contenedoras de VEs.

Además de la disminución en la albúmina, también observamos un enriquecimiento en proteínas marcadores de vesículas extracelulares como Sintenina-1 y Ago2 —la proteína efectora del RNA de interferencia— **Figura 4A**. La intensidad de las bandas observadas para sintenina-1 en las VEs-UP es muy superior a la observada en pasos previos del proceso de purificación, donde no puede ser distinguida a simple vista incluso cuando la cantidad de proteína es 10 veces mayor tal como se puede observar en las últimas dos líneas de la **Figura 4A**. Algo similar ocurre al examinar la proteína Ago2. La única diferencia es que, cuando la cantidad de proteína es aumentada en 10 veces en las fracciones provenientes de SEC y previo a la precipitación con VN96 si es posible observar una banda tenue.

Tras evaluar por densitometría las proporciones de Ago2 y Sintenina-1 en las vesículas precipitadas con VN96 con respecto a la cantidad de albúmina, se observó que estas fueron respectivamente 80 y 40 veces superiores a la proporción presente en el suero completo; y 16 y 8 veces superiores a la proporción observada tras emplear solamente la SEC **Figura 4C**. Sin

embargo, hay que considerar que aunque estos valores nos dan una idea de la eficiencia de la PE-SEC, el rendimiento real de esta técnica no pudo ser determinada por éste método. Ya que en el suero completo la cantidad de albúmina es tan alta que enmascara al resto de las proteínas impidiendo su adecuada cuantificación, por lo que la eficacia real de la PE-SEC podría ser muchas veces superior al reportado.

Curiosamente, en las células blancas (leucocitos) de bovino (Bta WBC, p.s.i. *Bos taurus* White Blood Cells) que fueron usadas como control para realizar los western blots con los cuales se detectó a los marcadores de VEs, la banda de Sintenina-1 aparece alrededor de 10 kDa abajo de lo esperado **Figura 4B**. Sin embargo, en un experimento complementario donde se empleó el mismo set de anticuerpos pero en distintas matrices, la presencia de Sintenina-1 pudo ser observada en proteínas provenientes de células MCF7 (humano), y posición de dicha banda fue invariable en la posición reportada por la literatura. Este resultado sugiere que la banda observada en el control **Bta WBC** efectivamente corresponde a Sintenina-1, y que, aunque no ha sido reportado, en *Bos taurus* dicha proteína presenta un tamaño más reducido comparado con su homólogo de humano. Esta inesperada variación no afecta la interpretación de los resultados, los cuales en conjunto indican que la PE-SEC es un método adecuado, rápido y fácil para obtener VEs-UP a partir de muestras con una alta carga de proteínas (como el suero), donde la SEC por sí misma es insuficiente. Además, con nuestro método es posible obtener VEs al menos 40 veces más limpias de albúmina (y por lo tanto proteínas solubles) que si se emplea únicamente la SEC.

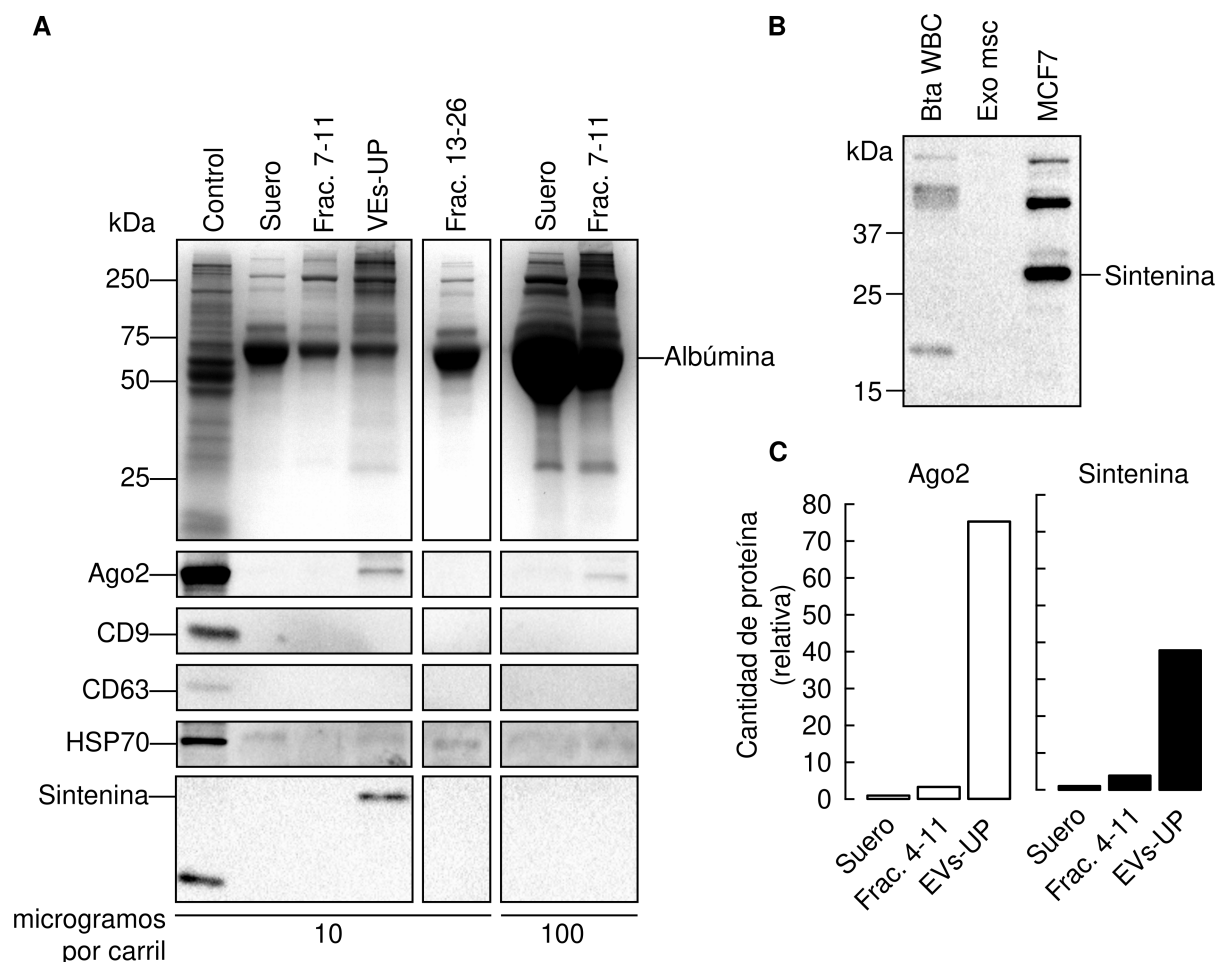


Figura 4: Eficacia del método PE-SEC

(A) En la parte superior, tinción con azul de Coomassie que muestra el perfil de proteínas en cada paso del protocolo de purificación PE-SEC. Nótese la disminución en la cantidad de albúmina. En la parte inferior, Western blots anti Ago2, y los principales marcadores de VEs. Control = Células sanguíneas blancas de vaca, el resto de las muestras tal y como aparecen en Figura 2c

(B) Western blot anti Syntenin, en las células blancas de vaca usadas como control en A (BTA WBC), medio condicionado de células madre mesenquimales de ratón (Exo msc), y Células MCF7.

(C) Densitometría de los carriles señalados en A. Intensidad de la banda (WB)/proteína total (Coomassie)

7.3 Las VEs obtenidas mediante PE-SEC tienen características típicas de exosomas

Con la intención de corroborar la presencia de VEs en las muestras de suero Corning tratado con la técnica PE-SEC se observaron —mediante la técnica de MET— muestras representativas del resultado obtenido tras cada paso de nuestro protocolo de purificación. Esta observación efectivamente corroboró la presencia de VEs **Figura 5B** y además, permitió obtener un registro de las formas y tamaño de las VEs obtenidas. Las VEs observadas presentaron en

general formas redondeadas, la única excepción ocurrió en los agregados de VEs-UP donde las VEs se observaron deformadas lo que se atribuyó a la cercanía entre ellas y la interacción que sostienen unas con otras. Esta suposición se corroboró al observar las muestras de VEs-UP que fueron tratadas con proteinasa K ya que en dichas muestras las VEs recuperan su forma redondeada.

Cuando se midió el tamaño de las VEs observadas en MET se encontró que este se distribuye entre los 10 y los 100 nm cuando sólo se ha aplicado la SEC (Frac. 4-11) y disminuye después de la precipitación con Vn96. De tal forma que en las VEs-UP la media de tamaños se encuentra alrededor de los 30 nm. Por otra parte, también se evaluó la proporción de tamaños para las mismas muestras observadas en TEM más el suero completo, usando para esto la técnica llamada *Dinamic Light Scattering (DLS)*. Como era de esperar, en el SFB que solamente fue filtrado para eliminar el *debris* celular, los tamaños de las partículas presentes son muy variados **Figura 5A**. Sin embargo, después de la SEC (Frac. 4-11) esta distribución se restringe a partículas entre 30-300 nm de diámetro. Después de precipitar con el péptido Vn96 el precipitado resultante contiene agregados de vesículas ultra purificadas (VEs-UP) que presentan tamaños de más de 1µm de diámetro. Cuando los agregados de VEs-UP son tratados con proteinasa K para disgregarlos el porcentaje de partículas mayores a 1 µm disminuye e incrementa el de partículas de 100 nm de diámetro (VEs-UP+ PK). Estos resultados indican que las VEs-UP, obtenidas por PE-SEC tienen tamaños que coinciden con los reportado para sEVs; y en conjunto con los marcadores observados previamente parecen sugerir que la población de VEs-UP recuperada con el método PE-SEC está enriquecida en exosomas.

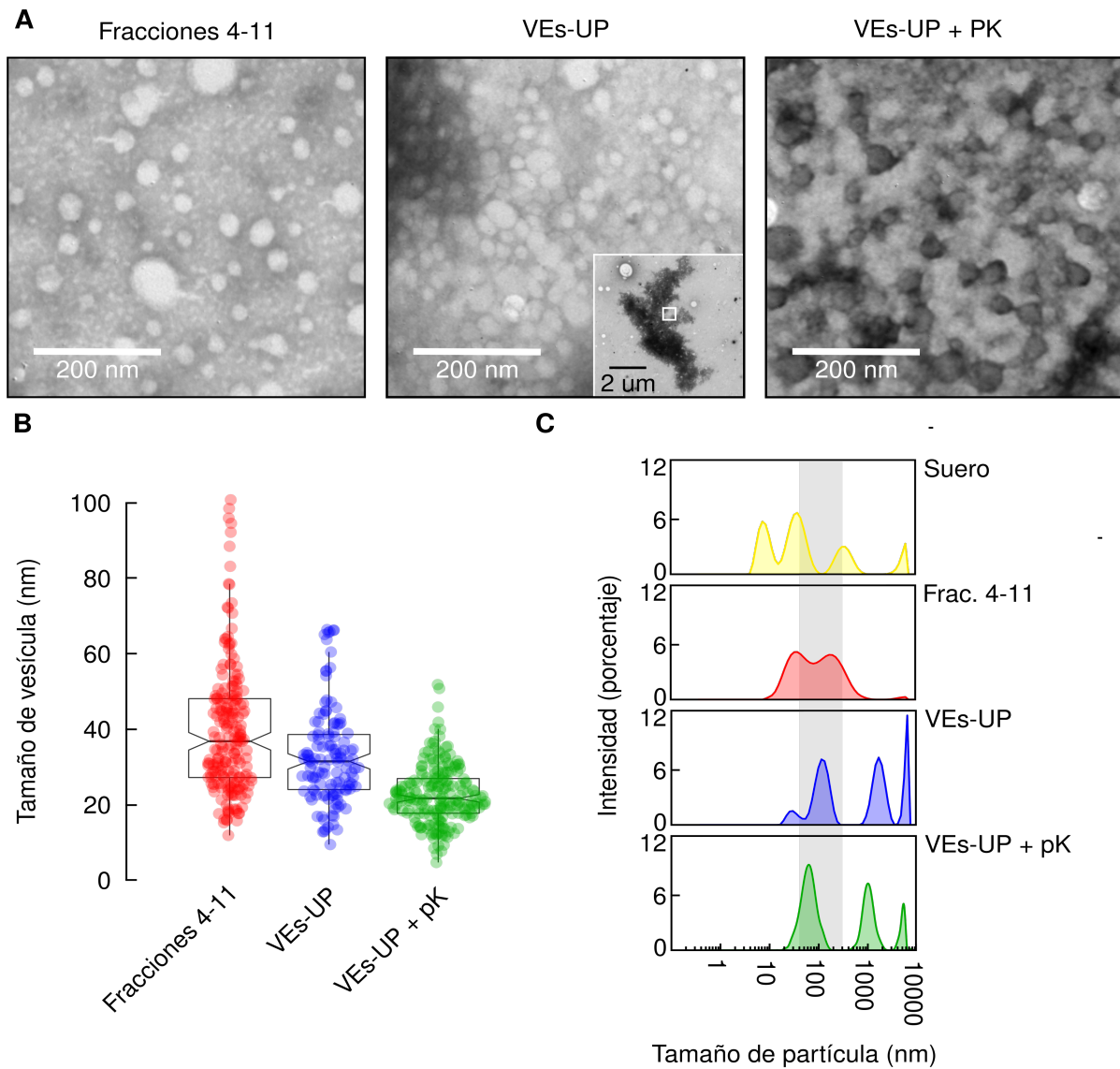


Figura 5: Las vesículas purificadas por SEC y precipitación con Vn96 tienen tamaños típicos de exosomas.

Las vesículas recuperadas tras cada paso en el protocolo de purificación PE-SEC, fueron medidas de diferentes formas.

(A) Micrografías obtenidas por MET

(B) Distribución de tamaños de las vesículas observadas en A, Fracciones 4-11 n=200, Agregados n=128, Agregados + pK n=200.

(C) Distribución de tamaño de partículas tras cada paso de purificación, medido con la técnica DLS. Resultado consenso de tres mediciones, con tres repicas técnicas de 30s cada una.

7.4 Distintas presentaciones de SFB contienen diferentes proporciones de clases de

RNAs

Después de haber comprobado que la fracción de VEs-UP obtenida mediante la técnica de PE-SEC contiene solamente un mínimo de proteínas solubles no-vesiculares, se concluyó que la pureza de nuestras preparaciones era suficiente para poder observar el RNA que contienen con suficiente nivel de certeza de que los RNAs observados no estuvieran contaminados con RNAs asociados a proteínas no vesiculares. Para tener un panorama más amplio del contenido de RNAs presente en el SFB se fraccionaron 300 ml de 5 marcas de suero adicionales: ATCC, ByProductos, Hyclone, Performance, y Performance Plus (Gibco). Posteriormente se purificaron y secuenciaron los RNAs contenidos en cada una de las fracciones obtenidas (VEs-UP y proteína) así como de una alícuota de cada uno de los sueros completos.

De manera general los tamaños de las secuencias obtenidas fueron bastante homogéneos entre todas las muestras, y en todos los casos las distribuciones de tamaños presentaron picos alrededor de los ~2, ~30 y ~35nt **Figura S2a**. Estos picos son comunes en la secuenciación de exRNAs provenientes de suero o plasma, y los más pequeños suelen atribuirse a un enriquecimiento en RNAs asociados al fenómeno de RNAi, como los miRNAs, y los piRNAs (p.s.i. Piwi interacting RNAs) respectivamente^{85,86}, mientras que las secuencias entre 34 y 40 nt pueden deberse a la presencia de fragmentos de tRNAs o YRNAs (una clase de RNA citoplasmático)^{87,88}.

Tanto en el suero completo, como en ambas fracciones (VEs-UP y Proteína), se encuentran representantes de prácticamente todas las familias de RNAs conocidas **Figura 6**. En la mayoría de las bibliotecas, excepto en los sueros completos de las marcas ByProductos, Corning, HyClone y PP la especie de RNA más abundante fue la de los RNAs no anotados. Es decir, aquellos de los cuales se conoce su ubicación en el genoma pero que no han sido asociados a una función y por lo tanto se desconoce qué tipo de transcritos conforman. Estos RNAs no

anotados constituyen de un 20 % del RNA total presente en los sueros completos Corning y Hyclone a más del 90 % en el suero completo Performance de Gibco, las fracciones de proteína de Corning, y de proteína y VEs-UP de HyClone y ByProductos. Tal abundancia de secuencias no anotadas en nuestras bibliotecas de RNA podría deberse sencillamente a que no se ha estudiado en profundidad el genoma de *Bos taurus* y por ello, muchas secuencias permanecen sin ser anotadas aunque si lo hayan sido sus homólogos en humano. Por lo tanto, inferimos que gran parte de esas secuencias no anotadas deberían de distribuirse de manera homogénea entre todas las demás familias de RNAs una vez que su función sea dilucidada.

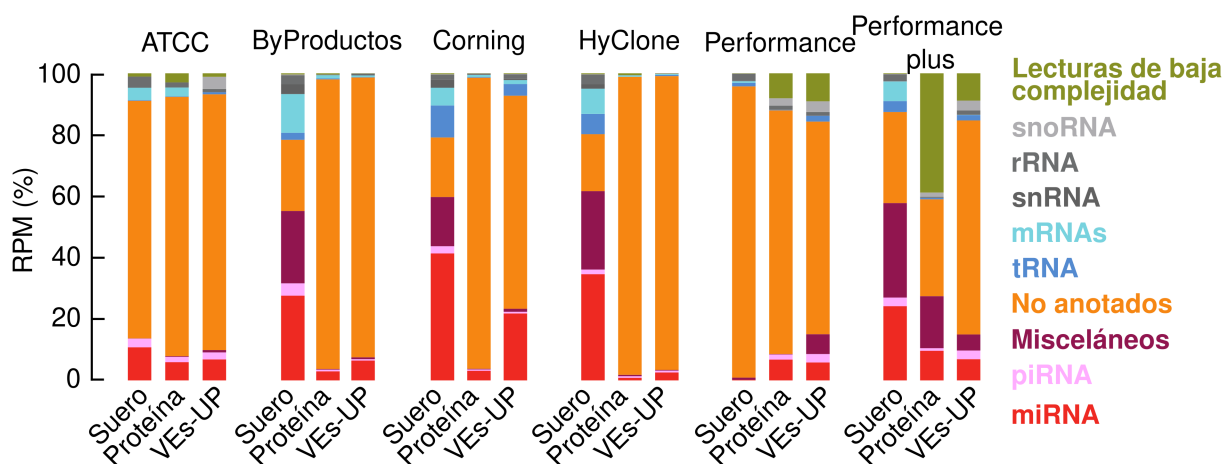


Figura 6: En el SFB se encuentran representadas las principales familias de RNAs.

Barras apiladas que muestran el porcentaje de representación (RPM) de cada un de las principales familias de RNA en cada uno de los seis sueros estudiados, así como los RNAs asociados a proteínas solubles, y a vesículas (VEs-UP) obtenidas de dichos sueros al ser fraccionados por PE-SEC.

Es notable la diferencia en las proporciones de los RNAs que existe entre las bibliotecas de los sueros completos y las de las fracciones recuperadas de ellos. Para explorar esta diferencia se empleó un análisis de diversidad alfa que nos permitió evaluar la variación entre los distintos tipos de muestras analizadas (suero completo, VEs-UP y contenido de proteínas solubles). Dicho análisis reveló que la mayor diversidad de RNAs se encuentra en las muestras de suero completo, mientras que la menor diversidad la poseen las muestras de VEs-UP y proteínas

solubles respectivamente **Figura S2b**. Esta pérdida de diversidad podría deberse a la separación asimétrica del total de RNAs del suero al momento de ser fraccionado y a la inevitable pérdida de aquellas secuencias que eluyen con las proteínas de menor peso molecular durante la SEC.

7.5 Los miRNAs están más representados en las fracciones de VEs-UP

Al explorar las diferencias en la proporción de las distintas clases de RNAs presentes en las muestras secuenciadas se observó que algunas familias de RNAs se encontraban más representadas en las muestras de VEs-UP con respecto a las muestras de proteína soluble. Presumiblemente los RNAs pequeños nucleolares (**snoRNAs**), pero sobre todo los miRNAs serían la clase de RNAs que presenta la mayor diferencia en su enriquecimiento en las muestras de VEs-UP **Figura 7a**. Algunos otros RNAs como los mRNAs parecen estar más representados en las fracciones correspondientes a proteína soluble sin embargo su nivel de representación es tan bajo que es difícil de analizar.

Para poder comparar las bibliotecas se empleó un análisis de diversidad como el descrito en la sección anterior. Los resultados parecen indicar que existe una tendencia en donde los miRNAs presentes en VEs-UP son más diversos que aquellos presentes en las proteínas solubles. Esta observación sugiere una acumulación en el número de especies de miRNAs en las VEs-UP lo que se traduciría en una población más rica que aquella contenida en las proteínas solubles. En conjunto estos resultados parecen soportar la idea de que el fraccionamiento del suero por PE-SEC efectivamente resulta en la separación de dos poblaciones de RNAs, una de mayor diversidad y abundancia contenida en las VEs-UP y otra de menores cualidades contenida en las proteínas solubles.

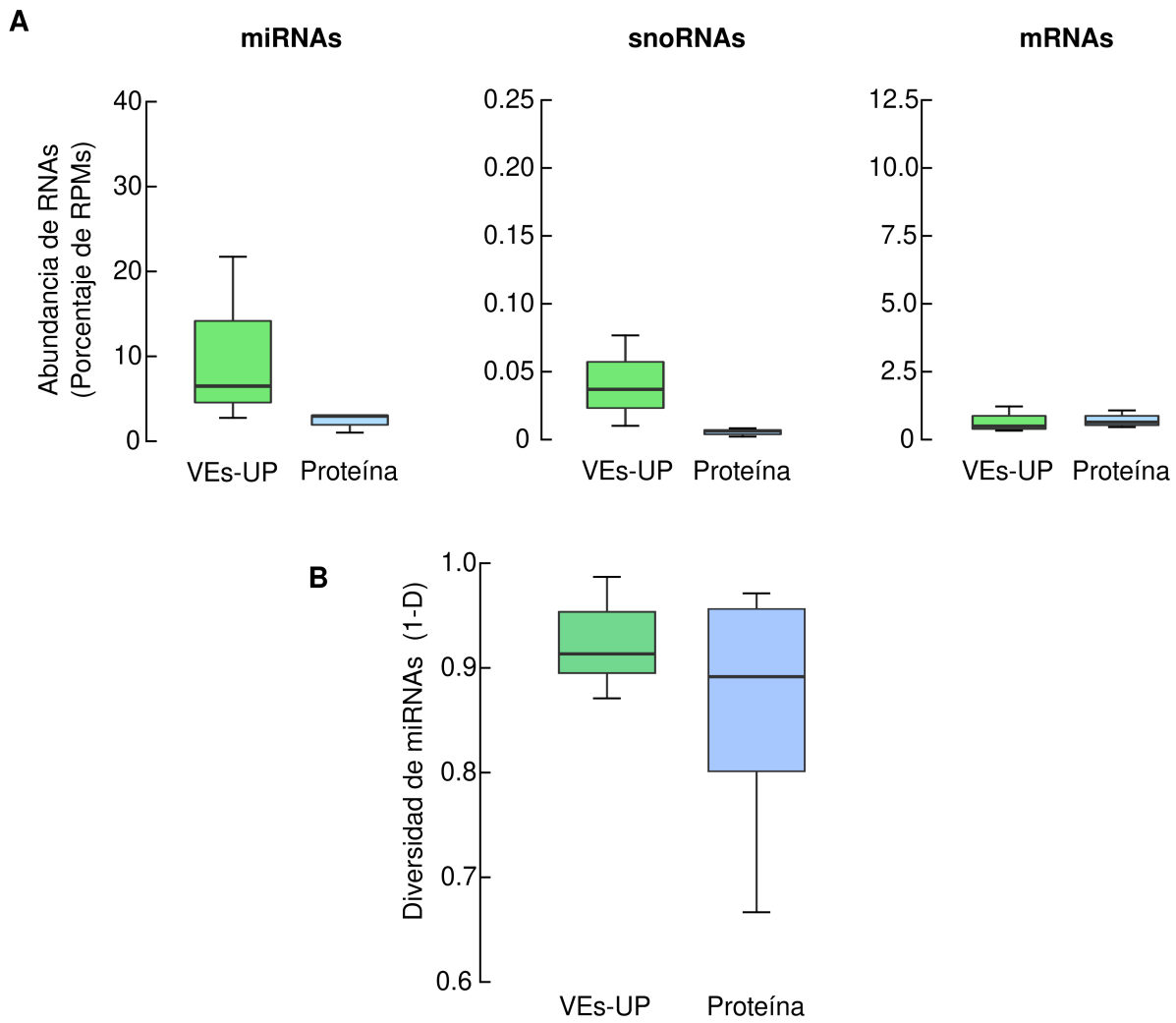


Figura 7: Algunas clases de RNAs se encuentran enriquecidas en las VEs-UP.

(A) Proporción de algunas familias de RNAs contenidas en VEs-UP y proteína solubles

(B) Diversidad alfa de miRNAs presentes en VEs-UP y proteínas solubles, el índice de Simpson se representa como 1-D para hacer la representación más intuitiva.

7.6 No todos los miRNAs se comparten entre las fracciones vesicular y no-vesicular del suero

Para profundizar más en el entendimiento de la estructura de las poblaciones de miRNAs presentes en los distintos tipos de muestras secuenciadas se analizó la identidad de los miRNAs observados en las fracciones de cada suero, como se puede observar en la **Figura 8**. Cuando se comparan las poblaciones de miRNAs presentes en las fracciones de cada suero por separado es evidente que existe un conjunto de miRNAs presente de manera exclusiva cada una de las fracciones analizadas. Sin embargo, la identidad de este conjunto es inherente de cada uno de los sueros ya que de los miRNAs exclusivos de la fracción vesicular son pocos los que se comparten entre los diferentes sueros, y ninguno está presente en todos **Figura S3**. Esto puede deberse a lo heterogéneo de la procedencia de los sueros ya que la identidad de los miRNAs circulantes es determinada por las condiciones celulares y ambientales presentes al momento de realizar la colecta^{89,90}. La identificación de un subconjunto de miRNAs exclusivo de cada una de las dos fracciones obtenidas de cada suero en conjunto con los resultados antes expuestos parece soportar la idea de que la población de RNAs al interior de las VEs es lo suficientemente diferente de los RNAs asociados a componentes no vesiculares del suero como para ser diferenciada a través de RNAseq y al componer un “mensaje” distinto es necesario emplear técnicas de purificación lo suficientemente eficaces como para evitar mezclar estas dos poblaciones y por lo tanto, hacer más fácil la detección de señales que puedan ser empleadas como biomarcadores para la identificación de condiciones fisiológicas o patológicas.

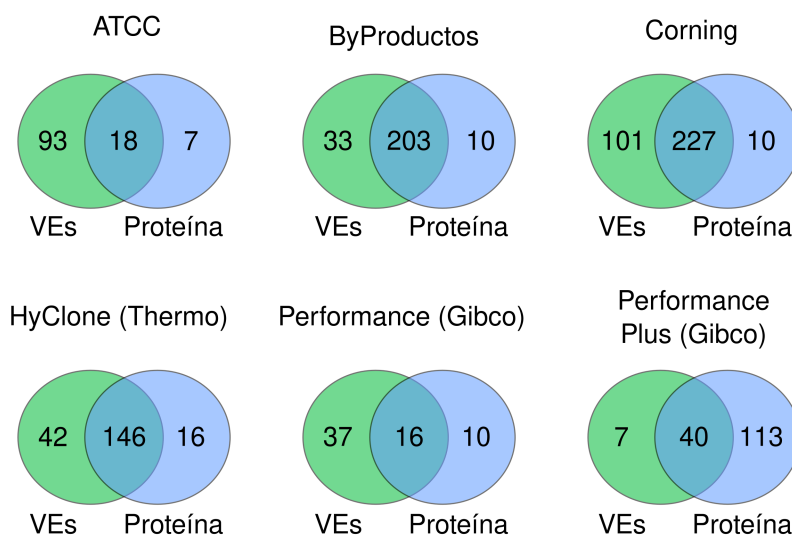


Figura 8: Hay un set de miRNAs exclusivo de la fracción vesicular del SFB.

Diagramas de Venn que muestran el número de miRNAs encontrados de forma exclusiva en las fracciones de SFB secuenciadas.

7.7 No hay diferencias entre las poblaciones de miRNAs presentes en las VEs con respecto a los miRNAs presentes en el suero completo.

Para explorar las diferencias entre la expresión de miRNAs presentes en las VEs con respecto al suero, se emparejaron los miRNAs que se encontraron presentes en al menos una de las dos muestras y se comparó su distribución mediante una prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Para ello solamente se emplearon las bibliotecas de suero completo y VEs provenientes de los sueros ByProductos, Corning y HyClone ya que estas bibliotecas fueron las más homogéneas en número de lecturas y además, fueron las que presentaron las secuencias de mayor calidad (Figura S4). El análisis mostró que no existe diferencias significativas en la distribución de la abundancia de los miRNAs presentes en las VEs de los sueros Corning y Byproductos cuando se compara con su distribución en los sueros completos (Corning $K=0.13$, ByProductos $K=0.1$). Sin embargo si se observa una diferencia significativa en la comparación de los miRNAs del suero HyClone ($K=2.39e-9$). A pesar de este dato, visualmente la distribución de los miRNAs muestra una tendencia muy similar en los tres sueros

(Figura 9a). Es por ello que para ampliar nuestro entendimiento de este hecho realizamos un análisis de correlación entre las abundancias en RPMs de los miRNAs en ambas fracciones de los tres sueros (Figura 9B). El resultado mostró que efectivamente existe una correlación significativa en la abundancia de los miRNAs presentes en la fracción de VEs-UP y suero completo (Comring $\rho=0.7$ $p<0.2e-16$; Byproductos $\rho=0.6$ $p=4.2e-12$; HyClone $\rho=0.4$ $p=4.7e-5$). Estos resultados en conjunto sugieren que no hay diferencias entre los miRNAs que pueden ser detectados por secuenciación a partir de VEs purificadas cuando se comparan con los miRNAs aislados directamente del suero completo.

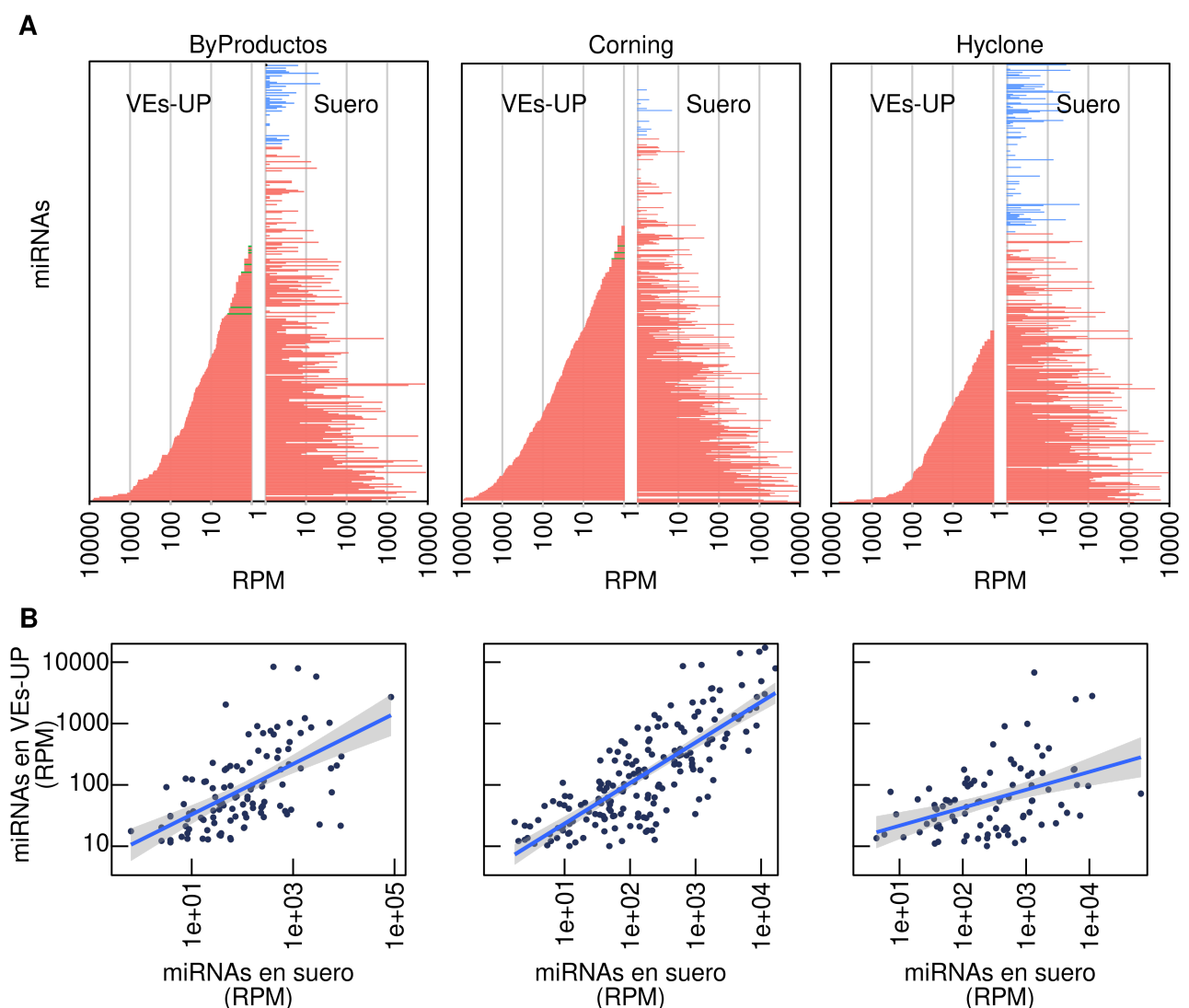


Figura 9: Los miRNAs detectados en VEs Son similares a los detectados en suero completo.

(A) Comparación entre las distribuciones de la abundancia de miRNAs en sueros Comring, HiClone y ByProductos.
 (B) Gráfica de correlación entre la abundancia de miRNAs de VEs y Suero completo (Spearman). RPM = cuentas por millón.

7.8 En el SFB no hay diferencias entre las poblaciones de 3'-NTA-isomiRs presentes al interior y exterior de las VEs.

La similitud entre la identidad y distribución de los miRNAs asociados y no asociados a VEs observada en el análisis anterior es contundente e innegable. Sin embargo, razonamos que existe la posibilidad que aunque ambas fracciones del suero analizado contengan miRNAs similares, estos hayan seguido de vías celulares diferentes y tengan significados biológicos distintos. Corroborar este razonamiento podría ayudarnos a confirmar parcialmente nuestra hipótesis (que hay diferencia entre los miRNAs que se pueden detectar en EVs y en Suero completo) y haría más urgente la necesidad de replicar los resultados de este trabajo en muestras de suero humano.

En el 2014 Koppers-Ialic y colaboradores⁹¹ describieron un mecanismo celular en el cual mediante adiciones de nucleótidos en el extremo 3' de los miRNAs se define si estos permanecen al interior celular o si son cargados en vesículas extracelulares para su liberación al medio extracelular. Brevemente, en ese trabajo se observó que en proporción una mayor parte de los miRNAs presentes en exosomas se encuentran mono, di- o triuridilados en su extremo 3', mientras que los miRNAs que persisten al interior celular contienen una mayor proporción de adenilaciones en su extremo 3'. Dado que el SFB es un medio muy manipulado durante su proceso de fabricación supusimos que entre aquellos componentes no asociados a VEs deberían de contarse en abundancia restos de células muertas o apoptóticas. Por lo tanto, razonamos que las marcas del extremo 3' de la población de miRNAs presente en las muestras de proteína soluble debería semejar a aquellas que se encuentra al interior celular. Estas marcas nos permitirían diferenciar si los miRNAs observados en nuestras muestras pese a ser similares provienen de distintas vías celulares.

Para probar dicha hipótesis se analizaron todas las variaciones de miRNAs (**isomiRs**) derivados de adiciones en el extremo 3' para la totalidad de miRNAs identificados en las bibliotecas de

VEs-UP y proteínas del suero Corning y ByProductos. Sin embargo, no se observaron diferencias en el patrón de adiciones presente entre las muestras **Figura 10**. Para averiguar si este resultado podría estar influenciado por los miRNAs menos representados se analizaron por separado los isomiRs de los 9 miRNAs más abundantes de las bibliotecas de suero Corning **Figura S5**. Además ésta vez se graficó la proporción de cada modificación como parte del total de lecturas, el resultado fue similar al anterior ya que no se observa una diferencia entre la proporción de adenilaciones y uridilaciones en ninguna de las bibliotecas analizadas. Además, se observó que solamente un bajo porcentaje de las lecturas de los miRNAs evaluados presentan alguna modificación en su extremo 3' y de estas variantes la mayoría parece corresponder a adenilaciones.

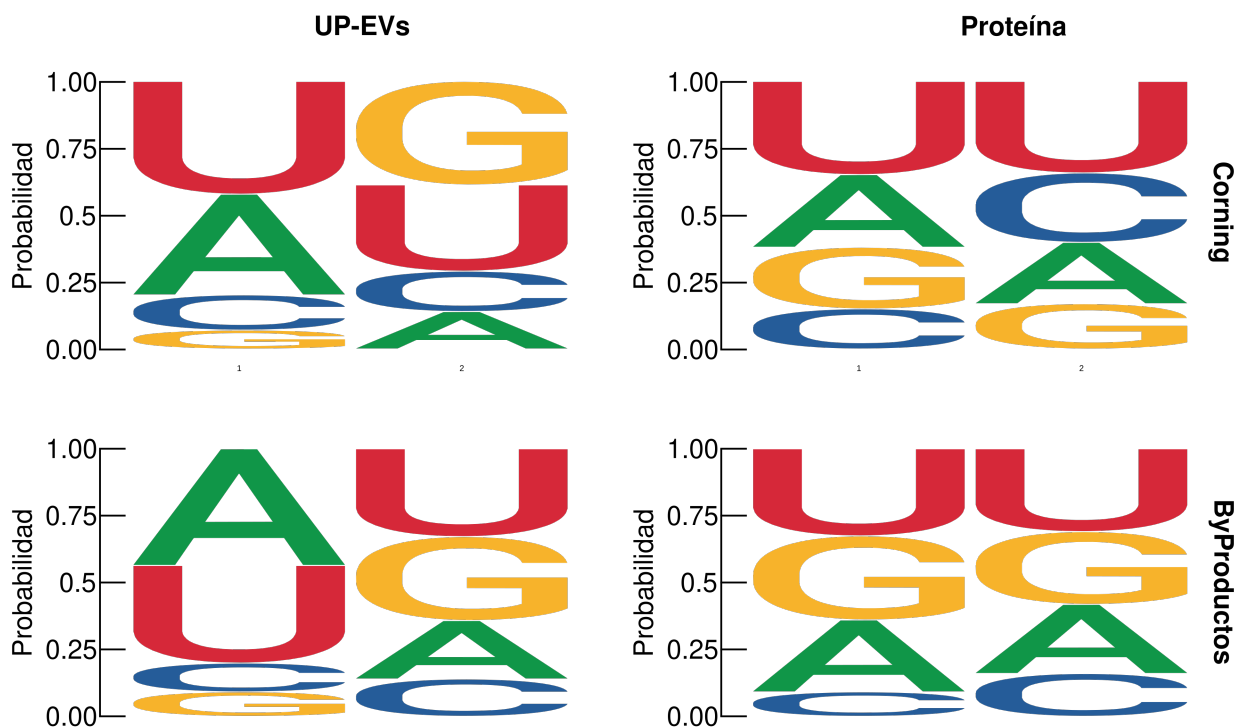


Figura 10: Seqlogo que muestra las proporciones relativas de las adiciones de nucleótidos en el extremo 3' de todos los miRNAs observados en las fracciones de los sueros Corning y ByProductos

8.0 Conclusiones

En este trabajo se montó el método de aislamiento de VEs denominado PE-SEC con el cual es posible obtener VEs de tamaño homogéneo, con características que tradicionalmente se asocian con exosomas y —más importante— con un alto grado de purificación (ya que contienen aproximadamente 40 veces menos proteínas no vesiculares) a partir de muestras con una concentración alta de material proteico. Lo anterior permite que al realizar análisis de RNAseq a las VEs obtenidas, las bibliotecas resultantes posean muy poca contaminación con RNAs no-vesiculares y por lo tanto los “mensajes” moleculares resultantes de la separación asimétrica de los RNAs cargados en las VEs pueden ser interpretados adecuadamente con un bajo nivel de ruido de fondo.

También se corroboró que el SFB contiene representantes de las principales familias de RNAs, aunque los RNAs más abundantes en el mismo corresponden a secuencias no anotadas ya que el genoma de *Bos taurus* no ha sido completamente dilucidado, suponemos que conforme nuevos estudios elucidan el rol de cada una de las secuencias que ahora no se encuentran anotadas, poco a poco la proporción de secuencias no anotadas comenzará a repartirse entre las otras familias de RNAs y muy posiblemente los miRNAs serán la clase más abundante en nuestras bibliotecas.

Gracias a la eficiencia del sistema PE-SEC fue posible observar las diferencias que existen entre los miRNAs al interior y exterior de las VEs del SFB, corroborando la existencia de grupos de miRNAs presentes de manera exclusiva en una u otra matriz. Además de que, de manera global, las VEs poseen una mayor diversidad de miRNAs lo que sugiere un amplio catálogo de mensajes moleculares. Es entonces clara la importancia de la purificación de las VEs previo a

cualquier análisis en el campo del diagnóstico molecular con RNAs, ya que al omitir ese paso, el RNA resultante contendrá una mezcla de los miRNAs con valor diagnóstico así como de aquellos no relacionados con los mismos mecanismos moleculares. Lo anterior podría resultar en la inadecuada interpretación de sus niveles de expresión.

De manera contrastante, pese a haberse observado grupos de miRNAs contenidos preferentemente en las VEs obtenidas con respecto a los miRNAs encontrados en la fracción correspondiente a proteína soluble, cuando se comparó la identidad de los miRNAs presentes en VEs con aquellos que pueden ser detectados directamente en suero, no se encontraron diferencias significativas. De hecho, la distribución de los miRNAs en el suero completo es similar a la distribución de los miRNAs presentes en VEs y la abundancia relativa de los miRNAs en ambas muestras posee un alto grado de correlación. Estos resultados parecen apoyar la idea que —cuando se conocen de antemano los miRNAs que caracterizan determinado estado clínico— no es necesario realizar complicadas purificaciones de VEs para poder observar firmas de miRNAs con potencial biomarcador, ya que la misma distribución en la expresión de los miRNAs puede ser observada al analizar RNA purificado directamente del suero sin necesidad de purificar VEs. Una excepción sería en el caso de que los miRNAs de interés sean muy poco abundantes en la muestra de suero, ya que su expresión podría ser enmascarada por la de otras secuencias no asociadas a VEs.

De los resultados observados se puede hipotetizar que la purificación de VEs previo a la purificación de RNA es un paso que puede ser crucial en la investigación de biomarcadores nuevos para el diagnóstico oportuno de enfermedades. Sin embargo, una vez que los biomarcadores han sido identificados, se puedan estandarizar los flujos de trabajo para de tal forma que, en clínica, sea posible la identificación de dichos biomarcadores omitiendo la

purificación de las VEs, lo que reduciría drásticamente el costo económico y temporal de la prueba diagnóstica.

Finalmente, no se pudieron replicar los resultados de Koppers-lalic y colaboradores⁹¹, quienes propusieron un mecanismo de cargado diferencial de miRNAs dependiendo de modificaciones postranscripcionales en su extremo 3'. Una explicación posible a este hecho es que dicho fenómeno no sea un carácter conservado entre todos los mamíferos si no más bien que haya sido adquirido recientemente en la evolución del hombre. También es probable que el SFB con el alto grado de manipulación resultante del proceso industrial al cual es sometido para ser distribuido en los laboratorios de investigación, no sea una matriz que conserve la totalidad de sus características biológicas. Es sobre todo conocido que durante el proceso de degradación de los miRNAs ocurre una serie de eventos conocida como "*tailing-and-trimming*"^{92,93}. Durante el *tailing and trimming* se añaden y/o retiran nucleótidos en el extremo 3' del miRNA. Este proceso altera cualquier modificación previa, y dado que los miRNAs contenidos en EVs se encuentran protegidos del medio es posible que los miRNAs de las fracciones no vesiculares hayan sido mas afectadas por este proceso. Para poder contrastar estas ideas es necesario el desarrollo de nuevos trabajos de investigación que empleen el método PE-SEC en distintas matrices humanas y en otros modelos biológicos y de esta manera probar su utilidad en el campo del diagnóstico molecular.

9.0 Perspectivas

Este trabajo sentó las bases en la elucidación del uso de VEs como fuente de moléculas con potencial biomarcador. Sin embargo, hacen falta más trabajos que comprueben y amplíen las observaciones aquí realizadas, empleando el recurso generado en este trabajo (método **PE-SEC**) para aislar VEs de muestras clínicas y poder reproducir los resultados aquí obtenidos.

También es necesario que al reproducir este trabajo en muestras clínicas se considere la planeación de réplicas técnicas suficientes, de tal forma que sea posible realizar análisis bioinformáticos de expresión diferencial de RNAs más robustos que ayuden a probar las hipótesis con mayor certeza que lo que hace este trabajo.

Finalmente, este proyecto se centró en el uso de RNA como biomarcador. Sin embargo, dado que las VEs pueden acarrear moléculas de muy distintos tipos, hace falta corroborar si con otras biomoléculas como las proteínas que acarrear las VEs se pueden replicar los resultados aquí mostrados.

10.0 Referencias

1. Kriete, A. *et al.* Biological Foundations of Signal Transduction, Systems Biology and Aberrations in Disease. *Comput. Syst. Biol.* 45–64 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-405926-9.00004-6.
2. LaPointe, V. L. S., de Boer, J. & Engler, A. J. Cellular Signaling. *Tissue Eng.* 111–148 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00004-3.
3. Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z. & Kong, D. Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell. Signal.* **21**, 1541–1547 (2009).
4. Feher, J. & Feher, J. Cell Signaling. *Quant. Hum. Physiol.* 205–217 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-800883-6.00019-7.
5. Uzman, A. Molecular biology of the cell (4th ed.): Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **31**, 212–214 (2003).
6. Maas, S. L. N., Breakefield, X. O. & Weaver, A. M. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology* (2017) doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003.
7. Théry, C. *et al.* 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* **8**, 1535750 (2019).
8. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620 EP- (2015).
9. Deatherage, B. L. & Cookson, B. T. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect. Immun.* **80**, 1948 LP – 1957 (2012).
10. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
11. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–78 (1983).
12. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262**, 9412–9420 (1987).
13. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 27066 (2015).
14. Colombo, M. Biogenesis , Secretion , and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. 255–292 (2014) doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

15. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* vol. 200 373–383 (2013).
16. Niel, G. Van, Porto-carreiro, I. & Simoes, S. JB Minireview — Membrane Traffic in Physiology and Pathology Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. **21**, 13–21 (2006).
17. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213 (2018).
18. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* vol. 367 (2020).
19. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
20. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* **30**, 3481–3500 (2011).
21. Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geuze, H. J., Oorschot, V. & Schwartz, A. L. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**, 417–27 (1991).
22. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 8 603–612 (2007).
23. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 75 193–208 (2018).
24. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology* vol. 21 9–17 (2019).
25. Cocucci, E. & Meldolesi, J. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology* vol. 25 364–372 (2015).
26. Hurley, J. H. The ESCRT complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* vol. 45 463–487 (2010).
27. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* vol. 458 445–452 (2009).
28. Hanson, P. I., Shim, S. & Merrill, S. A. Cell biology of the ESCRT machinery. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 21 568–574 (2009).
29. Babst, M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 23 452–457 (2011).
30. Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H. & Brech, A. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* **10**, 925–937 (2009).
31. Odorizzi, G. The multiple personalities of Alix. *J. Cell Sci.* **119**, 3025–3032 (2006).
32. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (80-.)*. **319**, 1244–1247 (2008).

33. Villarroya-Beltri, C. *et al.* ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* **7**, 1–11 (2016).
34. Lee, B. R., Sanstrum, B. J., Liu, Y. & Kwon, S. H. Distinct role of Sirtuin 1 (SIRT1) and Sirtuin 2 (SIRT2) in inhibiting cargo-loading and release of extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **9**, 1–8 (2019).
35. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. & Colombo, M. I. Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic* **6**, 131–143 (2005).
36. Rocha, N. *et al.* Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150Glued and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* **185**, 1209–1225 (2009).
37. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* **12**, 19–30 (2010).
38. Hsu, C. *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* **189**, 223–232 (2010).
39. Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. & Boutros, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1036–1045 (2012).
40. Koles, K. *et al.* Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J. Biol. Chem.* **287**, 16820–16834 (2012).
41. Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. & López, J. A. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**, 1604–1611 (2005).
42. Menck, K. *et al.* Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane. *J. Extracell. Vesicles* **6**, 1378056 (2017).
43. Williamson, P. Phospholipid Scramblases. *Lipid Insights* **2015**, 41–44 (2015).
44. Bucki, R., Bachelot-Loza, C., Zachowski, A., Giraud, F. & Sulpice, J. C. Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry* **37**, 15383–15391 (1998).
45. Taylor, J. & Bebawy, M. Proteins Regulating Microvesicle Biogenesis and Multidrug Resistance in Cancer. *Proteomics* **19**, 1800165 (2019).
46. Wehman, A. M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B. D. & Nance, J. The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol.* **21**, 1951–1959 (2011).
47. Muralidharan-Chari, V. *et al.* ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr. Biol.* **19**, 1875–1885 (2009).

48. Abels, E. R. & Breakefield, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 301–312 (2016).
49. Kanada, M. *et al.* Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E1433–E1442 (2015).
50. Zhang, J., Li, S., Mi, S. & Li, L. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. **13**, 17–24 (2015).
51. Vlassov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Biochimica et Biophysica Acta Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *BBA - Gen. Subj.* **1820**, 940–948 (2012).
52. Pegtel, D. M. *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010) doi:10.1073/pnas.0914843107.
53. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **9**, (2007).
54. Roy, S., Hochberg, F. H. & Jones, P. S. Extracellular vesicles: the growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 7 (2018).
55. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles* **5**, (2016).
56. Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V & Laktionov, P. P. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res. Int.* **2018**, 8545347 (2018).
57. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **30**, 3.22.1-3.22.29 (2006).
58. György, B. *et al.* Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* **117**, (2011).
59. Rood, I. M. *et al.* Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **78**, 810–816 (2010).
60. Böing, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* **3**, 23430 (2014).
61. Gámez-Valero, A. *et al.* Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
62. Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B. & Kahn, C. R. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* **30**, 656–673 (2019).

63. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–5008 (2011).
64. Pascut, D. *et al.* A comparative characterization of the circulating miRNome in whole blood and serum of HCC patients. *Sci. Rep.* **9**, 8265 (2019).
65. Umu, S. U. *et al.* A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biol.* **15**, 242–250 (2018).
66. Zhou, Z. *et al.* Extracellular RNA in a single droplet of human serum reflects physiologic and disease states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 19200–19208 (2019).
67. Max, K. E. A. *et al.* Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E5334–E5343 (2018).
68. Chevillet, J. R. *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014) doi:10.1073/pnas.1408301111.
69. Wei, Z., Batagov, A. O., Carter, D. R. F. & Krichevsky, A. M. Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Sci. Rep.* **6**, 31175 (2016).
70. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
71. Andrews, S. FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. (2010).
72. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12 (2011).
73. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
74. Gebert, D., Hewel, C. & Rosenkranz, D. unitas: the universal tool for annotation of small RNAs. doi:10.1186/s12864-017-4031-9.
75. Chu, A. *et al.* Large-scale profiling of microRNAs for The Cancer Genome Atlas. *Nucleic Acids Res.* **44**, e3–e3 (2016).
76. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D68–D73 (2014).
77. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2020).
78. Gaston, K. J. & Spicer, J. I. *Biodiversity: an introduction*. (John Wiley & Sons, 2013).
79. Zhang, F., Cui, L. & Kuo, M. D. Diversity of Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **13**, 377–382 (2015).
80. Moreno, C. E. *Métodos para medir la biodiversidad*. (M&T- Manuales y Tesis SEA, 2001).
81. Oksanen, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. (2019).

82. Böing, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* **3**, (2014).
83. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles* (2016) doi:10.3402/jev.v5.32945.
84. Ghosh, A. *et al.* Rapid isolation of extracellular vesicles from cell culture and biological fluids using a synthetic peptide with specific affinity for heat shock proteins. *PLoS One* **9**, e110443 (2014).
85. Umu, S. U. *et al.* A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biol.* **15**, 242–250 (2018).
86. Yuan, T. *et al.* Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
87. Coenen-Stass, A. M. L. *et al.* Comprehensive RNA-Sequencing Analysis in Serum and Muscle Reveals Novel Small RNA Signatures with Biomarker Potential for DMD. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **13**, 1–15 (2018).
88. Dhahbi, J. M., Spindler, S. R., Atamna, H., Boffelli, D. & Martin, D. I. K. Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5' tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer. *Biomark. Cancer* **6**, BIC.S20764 (2014).
89. Keller, A. *et al.* Sources to variability in circulating human miRNA signatures. *RNA Biol.* **14**, 1791–1798 (2017).
90. Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med.* **14**, 143 (2016).
91. Koppers-Lalic, D. *et al.* Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* **8**, 1649–1658 (2014).
92. Sheu-Gruttadauria, J. *et al.* Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation. *Mol. Cell* **75**, 1243-1255.e7 (2019).
93. Yang, A. *et al.* AGO-bound mature miRNAs are oligouridylated by TUTs and subsequently degraded by DIS3L2. *Nat. Commun.* **11**, 2765 (2020).

11. Anexos

11.1 Anexo técnico.

Péptido Vn96: Se adquirieron cien miligramos de péptido Vn96 liofilizado (Sigma-aldrich). Este péptido fue resuspendido en dos mililitros de agua grado biología molecular (Coming) con 5% ácido acético (Sigma-Aldrich) para lograr una concentración de 50 µg/µl. Posteriormente, del total de la solución se prepararon alícuotas de 20 µl cada una y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Secuencia del péptido Vn96 **PSQGKGRGLSLSRFSWGALTLGEFLKL**

Anticuerpos empleados:

Anticuerpos primarios.

Blanco	Hospedero	Marca	No. de catálogo
hAgo2/eiF2C2	Conejo (monoclonal)	Abcam	ab186733
Sintenina	Conejo (policlonal)	NovusBio	NBP1-31136
CD9	Ratón (Monoclonal)	NovusBio	NB500-494
CD63	Ratón (monoclonal)	Abcam	ab193349
HSP70	Ratón (monoclonal)	Abcam	ab2787

Anticuerpos secundarios.

Blanco	Hospedero	Conjugado	Marca	No. de catálogo
IgG de conejo	Cabra	HRP*	Abcam	ab6721
IgG de ratón	Conejo	HRP	Abcam	ab6728

*Peroxidasa de rábano, p.s.i. horseradish peroxidase

11.2 Imágenes suplementarias

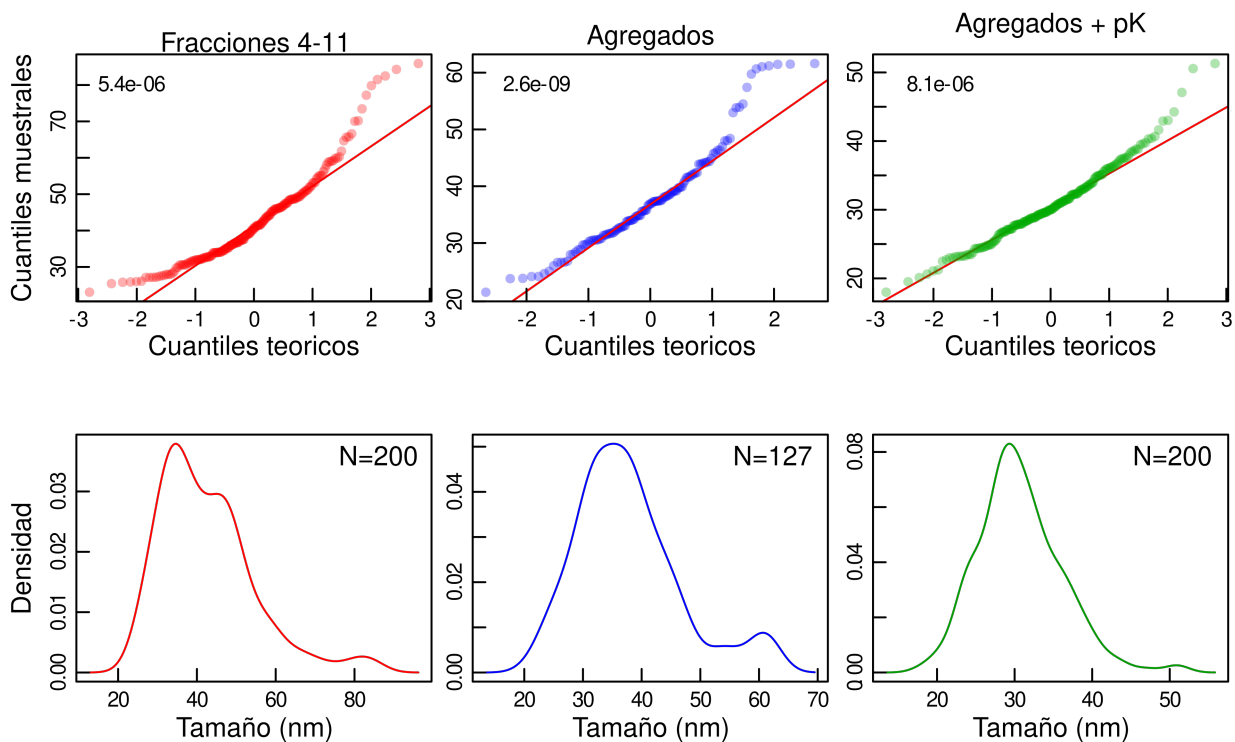


Figura S1: El tamaño de las VEs observadas por microscopía electrónica no se distribuyen de manera normal. Arriba QQplot de tamaños, en la esquina superior izquierda el valor de p obtenido al aplicar el test de shapiro wilk, abajo, distribución de tamaños.

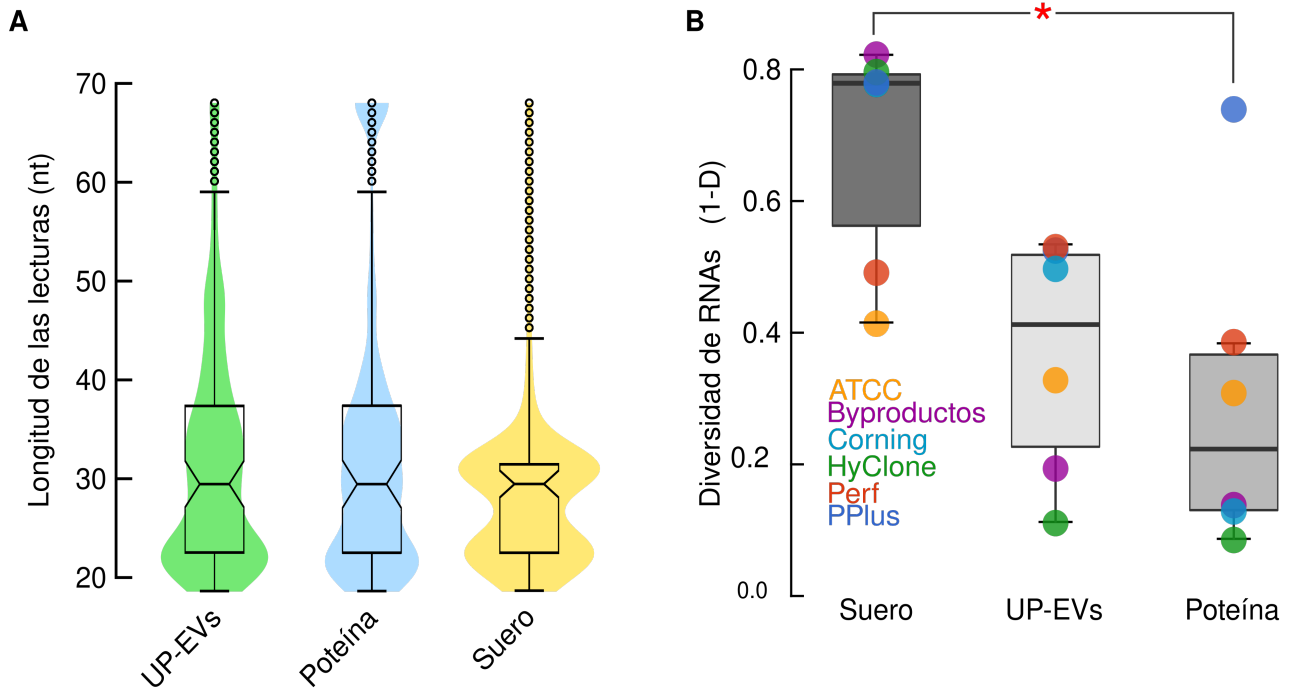


Figura S2: Breve caracterización de la secuenciación de RNAs presentes en 6 sueros diferentes. A. Longitud de las secuencias obtenidas. B. Diversidad de RNAs presentes en los tres tipos de muestras secuenciadas.

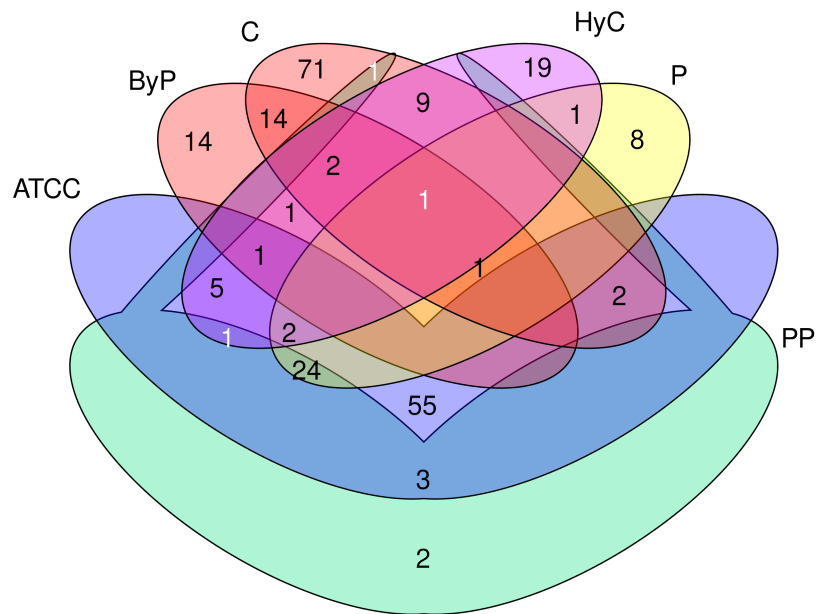


Figura S3: Los miRNAs exclusivos de VEs-UP no se comparten entre sueros.

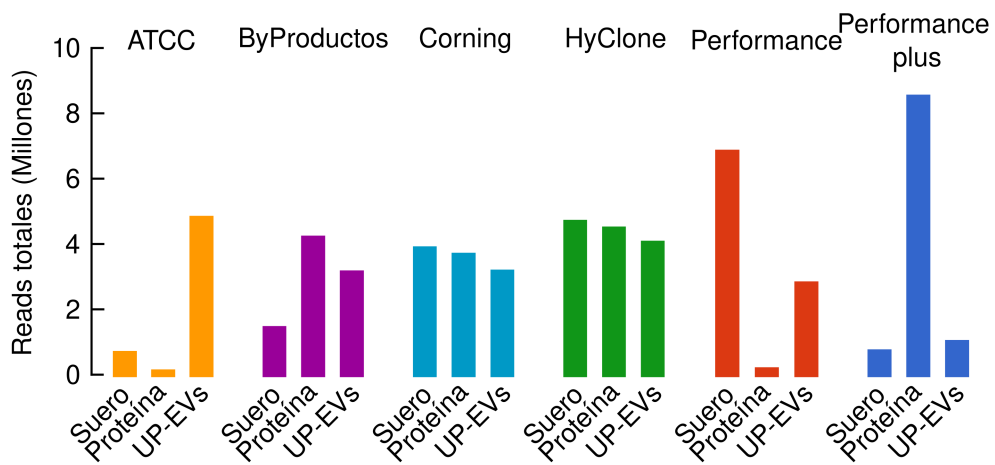


Figura S4: Lecturas totales de cada una de las bibliotecas secuenciadas en este trabajo.

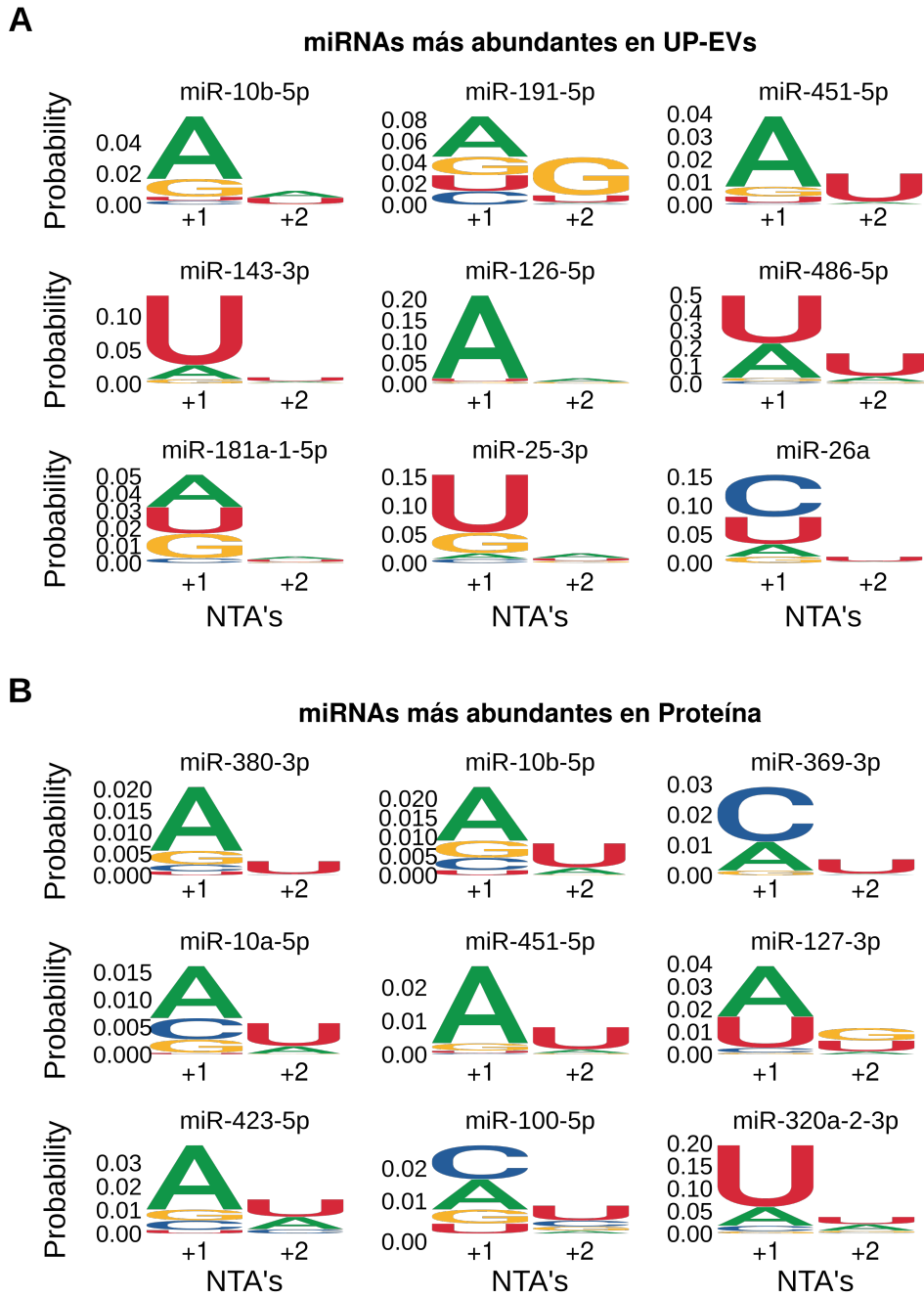


Figura S5: SeqLogos que muestran la proporción de nucleótidos añadidos en el extremo 3' de los 9 miRNAs más abundantes en suero Comring.