



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis del contenido molecular de lipoproteínas y
albúmina e identificación de marcadores exosomales
en vesículas extracelulares de plasma de individuos
humanos sanos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA FERNANDA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

TUTORA

CYNTHIA PAOLA LÓPEZ PACHECO



Cd. Mx. 2024



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.

1. Datos del alumno.

Sánchez
González
María Fernanda
55 87 97 66 58
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
313569795

2. Datos del tutor.

Dra.
López
Pacheco
Cynthia Paola

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Ponce
Castañeda
Verónica

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Ortega
Soto
Enrique

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Maravillas
Montero
José Luis

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Martin
Castellanos
Saint
Abril

3. Datos de la tesis.

Análisis del contenido molecular de
lipoproteínas y albúmina e identificación
de marcadores exosomales en vesículas
extracelulares de plasma de individuos
humanos sanos
76 p.
2024

4. Palabras clave

vesículas extracelulares
exosomas
aislamiento
purificación
lipoproteínas

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Verónica Ponce Castañeda

Secretario: Dr. Enrique Ortega Soto

Vocal: Dra. Cynthia Paola López Pacheco

1° Suplente: Dr. José Luis Maravillas Montero

2° Suplente: Dra. Abril Saint Martin Castellanos

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio A019, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédica,
Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cynthia Paola López Pacheco, por ser mi tutora de tesis, brindarme su conocimiento, tiempo y dedicación en la realización de este trabajo. Agradezco su dirección y discusión científica, la cual fue crucial para la realización de este trabajo.

A la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo, por recibirme en su laboratorio y permitirme desarrollarme en su línea de investigación. La Dra. Soldevila contribuyó con la dirección de esta línea de investigación y fue fundamental en la discusión científica para la realización de este trabajo. Además, agradezco por compartirme su conocimiento y experiencia.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, por sus valiosas observaciones y aportaciones académicas. Además de que su revisión crítica enriqueció este trabajo escrito.

Al M. en C. Óscar Hernández Campos, por su apoyo técnico y administrativo los cuales se requirieron para el desarrollo de la tesis.

A la QFB. Naray Alejandra Acevedo Domínguez, por su apoyo en la toma de muestras a los individuos que participaron en este trabajo y su aportación en la discusión científica, la cual fue muy importante en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Abril Saint Martin Castellanos, porque su experiencia fue de gran ayuda para la realización de los experimentos de biología molecular, así como su revisión crítica, permitió una mejor discusión en el trabajo escrito.

Al Dr. Juan Sebastián Herrera Noreña y a la Dra. Irene Vergara Bahena, por su experiencia académica compartida y contribución a la discusión de este trabajo y al Dr. José Antonio García Espinoza, por su apoyo y conocimiento brindado para el análisis de datos.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT), por brindar la infraestructura y conocimiento científico necesario para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a sus profesores por mi formación académica.

A la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en especial al M. en C. Rodolfo Paredes por su apoyo en la adquisición de imágenes por microscopía electrónica de transmisión.

A CONAHCYT, por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo que forma parte del PRONACE-Fordecyt Conahcyt, #303070 titulado "*Caracterización*

fenotípica y funcional de exosomas tumorales como predictores de metástasis mediante nanocitometría de flujo”.

En especial, agradezco a todos los individuos que consintieron y participaron en este proyecto proporcionando las muestras de plasma sanguíneo. Sin ellos, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico con cariño y admiración a las personas que han estado a mi lado y ocupan un lugar especial en mi vida.

Quiero dedicar este trabajo a Olga González, mi mamá, quien es mi compañera de vida y mejor amiga. Gracias por darme tu amor incondicional, contagiarme de tu alegría y apoyarme en todos mis proyectos. Me has enseñado a no rendirme por difíciles que las cosas sean y a dar mi mejor esfuerzo en todo. Sin ti nada de esto hubiera sido posible, lo logramos juntas.

Le dedico este trabajo a Ana Martin, por ser un pilar para mí y enseñarme a afrontar la vida. Se que soñabas con esto y aunque no estes físicamente con nosotros te llevé siempre conmigo. Estoy muy orgullosa de poder cumplir la promesa que te hice. Te recuerdo diario.

Quiero dedicar este trabajo a Mauricio Callejas, por estar a mi lado todos estos años, siempre darme ánimos para seguir adelante y ayudarme a creer en mí misma. Siempre has sido una fuente de inspiración para mí y me enseñaste que todo es más sencillo si tienes un gran compañero a lado.

A mis amigos: Sergio, Juan, Ela, Daniela, Magaly y Natalia que me han dado su cariño, apoyo y han compartido esta etapa conmigo. Gracias por estar, escucharme y ayudarme a divertirme cuando más lo necesite.

A la Dra. Cynthia López, por enseñarme con tanta paciencia lo que es estar en un laboratorio y ser un ejemplo de científica y mujer para mí.

A mis amigos del laboratorio, porque con ustedes el camino fue más fácil, siempre me regalaban una risa o un consejo para continuar e hicieron del laboratorio mi lugar favorito.

A Nara y Brenda, por ser dos amigas extraordinarias que me acompañan y me demuestran su cariño a diario.

Finalmente, pero con mucho cariño dedico el presente trabajo a mi familia, gracias por confiar en mí, procurar mi bienestar y desearme lo mejor. En especial a los dos pequeños regalos que me dio la vida Víctor Enrique y Amaya, ustedes son mis hermanos del corazón.

Gracias a todos ustedes, por tanto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. Comunicación celular y mensajeros extracelulares.....	12
2. Vesículas extracelulares.....	13
2.1. Generalidades	13
2.2. Tipos de Vesículas extracelulares: microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas	13
3. Exosomas: definición	15
3.1. Primeros estudios de los exosomas.....	15
3.2. Características biológicas de los exosomas.....	17
3.3. Principales biomarcadores asociados a exosomas	18
3.4. Tetraspaninas	19
3.5. Características moleculares de las tetraspaninas	19
4. Biogénesis de los exosomas	20
4.1. Determinación del contenido vesicular.....	21
5. Mecanismos de acción de las VEs	23
6. Importancia y relevancia del estudio de los exosomas en la homeostasis y la enfermedad.....	24
6.1. VEs en la homeostasis	24
6.2. VEs en la enfermedad	25
6.3. VEs como biomarcadores.....	26
6.4. Importancia de las vesículas extracelulares en el estudio del cáncer.....	27
7. Métodos de estudio de las vesículas extracelulares	28
7.1. Métodos de aislamiento y purificación de VEs	28
8. VEs en el plasma humano.....	31
8.1. Composición bioquímica del plasma humano	31
8.2. Contaminantes en el plasma.....	32
8.3. Lipoproteínas como principales agregados particulados	32
9. Análisis fenotípico y morfológico de vesículas extracelulares (NTA, WB, TEM, citometría de flujo.....	33

ANTECEDENTES.....	35
1. La cromatografía de exclusión molecular permite el enriquecimiento de las VEs, pero no excluye a proteínas del mismo peso molecular	35
2. La combinación de ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular favorece el enriquecimiento de VEs aisladas a partir de medio condicionado	36
3. Las vesículas extracelulares requieren de técnicas específicas de aislamiento para realizar análisis individualizados.....	37
JUSTIFICACIÓN.....	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	39
Objetivo General	39
Objetivos particulares.....	39
METODOLOGÍA.....	40
1. Obtención de la muestra	40
2. Aislamiento y purificación de exosomas de plasma humano	40
2.1 Preparación de soluciones.....	40
2.2 Pre-tratamiento de la sefarosa CL-2b	41
2.3 Preparación de la columna de sefarosa.....	41
2.4 Separación de las VEs por UF-SEC	41
2.5 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).....	42
3. Cuantificación de proteínas en las VEs por ensayo colorimétrico del ácido bicinonínico	42
3.1 Lisis de vesículas extracelulares.....	42
3.2 Curva estándar de BSA	43
3.3 Preparación de las muestras de proteína total previo a la cuantificación	43
3.4 Cuantificación de las proteínas en preparaciones de VEs.....	43
4. Western Blot.....	43
4. 1 Preparación del gel SDS-PAGE Tris Glicina	43
4.2 Preparación de las muestras	44
4.3 Corrida de la electroforesis	44
4.4. Transferencia.....	44
4.5 Bloqueo de la membrana	45
4.6 Incubación con anticuerpos	45
4.7 Revelado	45
5. Microscopía electrónica de transmisión.....	46
5.1 Preparación de la muestra	46

RESULTADOS	46
1. Análisis del número de las VEs del plasma separadas mediante UF/SEC con corte molecular de 30 y 100 kDa.....	46
2. Análisis del tamaño de las VEs del plasma separadas mediante UF/SEC con corte molecular de 30 y 100 kDa.....	48
3. Cuantificación de proteínas totales en las VEs de plasma.....	50
4. Análisis molecular de lipoproteínas APO-A1 y APO-E en las VEs en aisladas por UF-SEC	51
5. La albúmina no se enriquece al utilizar UF y SEC	52
6. Marcadores de vesículas extracelulares presentes en líneas celulares.....	52
7. Identificación de proteínas exosomales en las fracciones de vesículas extracelulares de plasma	
.....	
.....55	
8. Análisis morfológico de VEs por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	55
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	64
APÉNDICES.....	71
APÉNDICE 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	71
APÉNDICE 2. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	71
APÉNDICE 3. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	74

ABREVIATURAS

1X Concentración de uso

Anti-Anti-Solución antibiótica (Penicilina-Estreptomicina) y Antimicótica (Anfotericina)

APC Células presentadoras de antígenos

ELEs Endosomas tardíos

ESCRT Complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte

ESEs Endosomas tempranos

HRS Sustrato del factor de crecimiento de hepatocitos regulado por tirosina quinasa

ILV Vesículas intraluminales

ISEV Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares, por sus siglas en inglés

kDa Kilodaltons

LEL Bucle largo extracelular

MHC-I Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I

MHC-II Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II

microARNs Micro ácidos ribonucleicos

MVB Cuerpos multivesiculares

NCF Nanocitometría de Flujo

NTA Rastreo por nanopartículas

PBS Solución salina amortiguadora de fosfatos

PS Fosfatidilserina

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEC Cromatografía de exclusión molecular

SEL Bucle pequeño extracelular

SNARE Receptor soluble de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida

TEM Microscopía electrónica de transmisión

TSG101 Gen de susceptibilidad tumoral 101

UF Ultrafiltración

UF-100 Ultrafiltración con corte de 100 kDa

UF-30 Ultrafiltración con corte de 30 kDa

VEs Vesículas extracelulares

VPS4 Proteína 4 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares

WB Western blot

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Tipos de vesículas extracelulares.	15
2	Estructura general y contenido molecular de los exosomas.	17
3	Biogénesis de los exosomas por invaginación de la membrana celular.	23
4	Composición del plasma sanguíneo humano.	32
5	Clasificación y estructura de las lipoproteínas.	33
6	Calibración del equipo de NTA para determinar tamaño y concentración de partículas.	47
7	Diferencias en concentración y tamaño de partículas de plasma aisladas en fracciones provenientes de SEC.	49
8	Diferencias en la cantidad de proteína presente en las fracciones aisladas con UF-30 y UF-100.	51
9	Principales contaminantes en las fracciones de vesículas extracelulares de plasma aisladas por UF-SEC.	52
10	Identificación molecular de proteínas expresadas en las líneas celulares HeLa, Jurkat, HEK293 y MCF-7 para la caracterización de vesículas extracelulares.	53
11	Análisis del contenido molecular de biomarcadores exosomales en las fracciones obtenidas por SEC con UF 30 kDa y UF 100 kDa para la validación de presencia de exosomas.	54
12	Vesículas extracelulares visualizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).	56

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Datos demográficos de los individuos analizados.	40
2	Criterios de inclusión y exclusión de los individuos.	71
3	Anticuerpos utilizados para el análisis por western blot.	74

RESUMEN

El estudio de las vesículas extracelulares (VEs) es un campo de gran interés por sus características moleculares. Estas características les confieren la capacidad de actuar como mediadores de la comunicación intercelular; participando en procesos celulares y en el desarrollo de diversas patologías como el cáncer. El caracterizar VEs permitirá su implementación como biomarcadores, por ejemplo, para el seguimiento e identificación de metástasis en el cáncer. Las aplicaciones subsecuentes a la separación de las VEs a partir de biofluidos, requieren de una muestra lo más pura posible, lo cual no es trivial a causa de la heterogeneidad de los fluidos biológicos donde se encuentran inmersas las VEs. En particular en el plasma humano, estas vesículas se encuentran acompañadas por proteínas y partículas con las que comparten tamaño y densidad, lo que dificulta su aislamiento y purificación. Debido a esto, es necesario el desarrollo de una metodología basada en el conocimiento molecular, la cual permita la identificación óptima de las VEs y la caracterización de moléculas de superficie para la verificación del enriquecimiento de estas. En este trabajo se propone el uso de la combinación de la ultrafiltración (UF) y la cromatografía de exclusión molecular (SEC) como alternativa óptima para el aislamiento de VEs de plasma humano. Para demostrar esto se obtuvieron VEs de plasma de siete individuos aparentemente sanos y se analizó por western blot la presencia de biomarcadores vesiculares como; las tetraspaninas CD63 y CD9, la proteína intracelular TSG101, así como calnexina, proteína marcadora del paso de las proteínas por el retículo endoplásmico y presente en microvesículas. Adicionalmente, para estudiar a las proteínas acarreadas con las VEs y que pueden interferir con análisis posteriores, se analizaron proteínas como la albúmina y otras asociadas a lipoproteínas como APO-A1 y APO-E1, las cuales son abundantes en plasma humano con potencial contaminante para el análisis de VEs. La concentración y el tamaño de las VEs en cada fracción de SEC fue evaluado por rastreo de nanopartículas (NTA) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se identificaron las fracciones específicas con mayor presencia de marcadores exosomales y menor presencia de marcadores de posibles contaminantes y en las muestras analizadas fue posible identificar las fracciones con mayor enriquecimiento de VEs y menor contaminación de albúmina y las lipoproteínas analizadas. Los resultados obtenidos en este trabajo determinaron que la combinación de UF y SEC, así como las adecuaciones realizadas en este trabajo experimental, permiten un aislamiento óptimo de VEs, identificando la mayor concentración de vesículas en las fracciones intermedias de la

cromatografía. La relevancia de este trabajo experimental reside en que se identificó gran variabilidad en concentración de VEs y en la cantidad de las proteínas co-aisladas en una separación en una muestra pequeña de individuos humanos, lo cual contribuye al conocimiento de la heterogeneidad de componentes en el plasma y su impacto en la separación de VEs para análisis moleculares potencialmente útiles.

INTRODUCCIÓN

1. Comunicación celular y mensajeros extracelulares

La comunicación celular es el conjunto de señales que permiten la interacción de las células con el ambiente y con otras células, lo cual contribuye a su funcionamiento fisiológico normal (Karp 8th p.583). Las células de los organismos pluricelulares poseen la capacidad de comunicarse entre ellas mediante procesos de señalización celular. Esta capacidad les permite responder apropiadamente a los estímulos que se encuentren en el medio e inducir procesos biológicos necesarios para el organismo. Uno de los mecanismos de comunicación celular más recientemente descritos, es la liberación de vesículas extracelulares (VEs). Estas se han identificado como importantes mediadores de la comunicación celular por su capacidad de transferir información genética de una célula a otras (Jin et al., 2022). La señalización celular inducida por las VEs es de tipo paracrina o endocrina dependiendo de la lejanía o cercanía de la célula diana. Cuando es necesario comunicar el mensaje a una célula adyacente se habla de una señal paracrina, donde la célula de recepción debe ser cercana, debido a la poca estabilidad que presenta la molécula mensajera y al riesgo de ser degradada por enzimas cercanas. Por otro lado, si se requiere enviar el mensaje de la célula de origen a un sitio distante, se denomina señalización endocrina, este tipo de señalización requiere de mensajeros extracelulares estables capaces de viajar por el torrente sanguíneo, llegando hasta la célula blanco, en donde comunican el mensaje de la célula original. Otras moléculas que comparten este tipo de señalización con las VEs son las hormonas, mediadores solubles como, factores de crecimiento, citocinas y neurotransmisores (Karp 8th p.583). La función principal de estas moléculas es fungir como mensajeros extracelulares. Estos procesos permiten el intercambio de información e inducen, en las células blanco, la activación de cascadas de señalización que desencadenan funciones celulares como la expresión de proteínas, la inducción de división celular o la migración de esas células, entre otras (Gutiérrez-Vázquez et al., 2013).

2. Vesículas extracelulares

2.1. Generalidades

Como se mencionó, las vesículas extracelulares son mensajeros celulares recientemente descritos, que tienen gran relevancia en el estudio de procesos celulares homeostáticos y patológicos debido a su alto contenido molecular. Este contenido es seleccionado diferencialmente dependiendo de las condiciones de la célula de origen y también en base a su célula destino. Poseen la característica de migrar grandes distancias en el organismo y tienen gran impacto en la inducción de procesos en las células diana (Meldolesi, 2018). La gran mayoría de células eucariotas, poseen la capacidad de producir y liberar estas partículas pequeñas al medio extracelular. El contenido molecular de las VEs está rodeado por una bicapa lipídica en la cual además se encuentran insertadas algunas moléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos. Las propiedades de las VEs, implicadas en la comunicación celular, son conferidas a través de su contenido molecular también llamado carga (Fonseka y Mathivanan, 2023). Estas moléculas son principalmente proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN), metabolitos, lípidos (como colesterol, ceramidas, esfingomiélinea, ácido lisobisfosfatídico); todas estas moléculas en conjunto contribuyen a la regulación de procesos celulares en las células blanco (Meldolesi, 2018).

El estudio de las VEs es complejo, debido a la heterogeneidad del contenido molecular de éstas y a sus propiedades fisicoquímicas, particularmente su naturaleza submicrónica. Es por esto ha surgido internacionalmente la necesidad de homogeneizar las definiciones y establecer los requerimientos técnicos mínimos para la validación y el reporte de la información obtenida de estas VEs. Dichos requerimientos se encuentran contenidos en la guía: “*Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV 2023): From basic to advanced approaches*”. De acuerdo con la guía MISEV 2024, se define a las VEs como partículas liberadas por las células, las cuales presentan una bicapa lipídica y no poseen la capacidad de replicarse por ausencia de un núcleo funcional (Welsh et al., 2024).

2.2. Tipos de Vesículas extracelulares: microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas

Existen diferentes tipos de vesículas extracelulares las cuales se pueden clasificar de acuerdo con el tamaño, composición bioquímica, origen celular y biogénesis (Théry et al., 2018). De acuerdo con el tamaño, se denominan exomeros a aquellas vesículas que

miden menos de 50 nm y son no membranosos (Irmer et al., 2023), posteriormente se encuentran los exosomas los cuales son VEs que provienen de compartimientos internos de la célula y son liberados vía cuerpos multivesiculares (MVB), presentan un tamaño menor a 200 nm. Por su parte los exosomas se subclasifican en exosomas pequeños (exo-small) que van de 30 nm a 100 nm y grandes (exo-large) que son mayores a 100 nm y menores a 200 nm de diámetro. Posteriormente encontramos vesículas de mayor tamaño, como las microvesículas, cuerpos apoptóticos y los oncosomas, las cuales van desde los 200 nm hasta los 1000 nm de diámetro (Fig.1) (Théry et al., 2018; Welsh et al. 2024).

De acuerdo con su composición bioquímica, existen diferentes clasificaciones en la literatura, derivadas de diferentes combinaciones de marcadores que son específicos para la mayoría de las vesículas extracelulares (Irmer et al., 2023).

Dependiendo de la célula de origen será la expresión de marcadores, el contenido molecular de las VEs y por consiguiente el efecto que podrán tener en las células blanco a las cuales lleguen (Kalluri y LeBleu, 2020). Las VEs presentan gran variedad de proteínas de superficie como leptinas, inmunoglobulinas, integrinas y tetraspaninas, así como moléculas en su interior como microARN o ARNm, los cuales participan en el desarrollo de enfermedades, como la progresión del cáncer. Ya algunos estudios ya han evaluado la importancia de estas biomoléculas en cáncer, como el descrito por Reclusa y colaboradores en el 2016, en el cual se indica que las vesículas provenientes de carcinomas renales son capaces de transformar el endotelio y promover un fenotipo angiogénico que permite el desarrollo de la metástasis en pulmón (Reclusa et al., 2016). Por último, la clasificación a partir de su biogénesis consiste en los mecanismos que derivan en la producción de estas VEs en las células de origen. Existen vesículas extracelulares que se forman por desprendimiento de la membrana plasmática como es el caso de los ectosomas. Estos ectosomas dan origen a microvesículas, micropartículas y vesículas grandes de ~50 nm a 1 μ m (Théry et al., 2018). Por otro lado, los exosomas son de origen endosómico, producto de una invaginación de la membrana plasmática en estadios tempranos, que da lugar a la fusión de las endosomas con los cuerpos multivesiculares, permitiendo la formación de endosomas multivesiculares que posteriormente se fusionarán con las membranas plasmáticas de las células y liberarán su contenido en forma de exosomas (Tian et al., 2019).

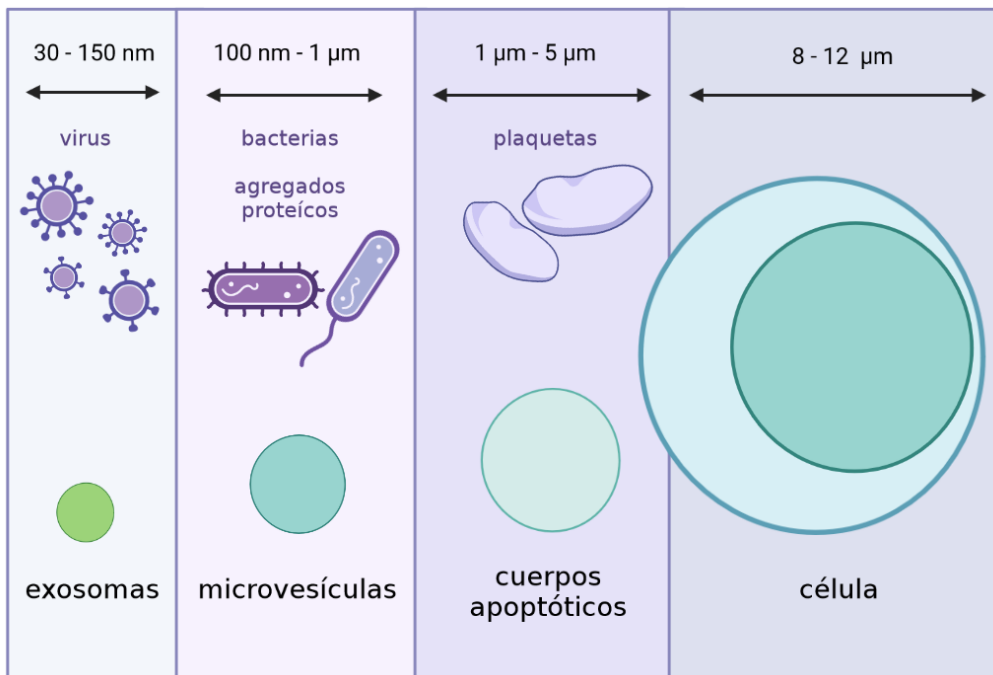


Figura 1. Tipos de vesículas extracelulares. Modificada de György *et al*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011. Las principales vesículas extracelulares son los exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, estos presentan un menor tamaño en comparación con las células (8 a 12 µm). Los exosomas presentan un tamaño de entre 35 y 120 nm, las microvesículas presentan un tamaño de entre 100 nm y 5 µm, mientras que los cuerpos apoptóticos pueden presentar tamaños de 1 µm a 5 µm de diámetro.

3. Exosomas: definición

Debido a su papel biológico, determinante en la comunicación celular, se ha conferido gran relevancia biomédica y tecnológica a las VEs de menor tamaño, conocidos como exosomas, los cuales a continuación se definirán ampliamente (Zhang *et al.*, 2019).

Los exosomas son uno de los subtipos más pequeños de VEs. Tienen un diámetro entre 30 y 150 nm y una densidad entre 1.13 y 1.19 g/ml. Su origen es de tipo endosómico. Una de las principales características que los diferencian de otras VEs es su biogénesis, ya que son resultado de la fusión de los cuerpos multivesiculares, las cuales son estructuras endosómicas intraluminales que liberan a los exosomas por exocitosis hacia el exterior de la célula (Zhang *et al.*, 2020).

3.1. Primeros estudios de los exosomas

El estudio de las vesículas extracelulares se ha desarrollado desde 1946, cuando Chargaff y West comenzaron a estudiar el contenido del plasma humano e identificaron una región libre de plaquetas pero que conservaba la función coagulante (Chargaff &

West, 1946). Posteriormente en 1967, Wolf, P. demostró, mediante la microscopía electrónica que la presencia de material coagulante, en circulación, se presentaba en forma de partículas muy pequeñas, las cuales recibieron el nombre de polvo de plaquetas (Wolf, 1967). Debido a su apariencia y elevada abundancia en sangre periférica se les denominó vesículas extracelulares (VEs). Posteriormente se determinó que todos los tipos celulares, incluyendo células tumorales, poseen la capacidad de secretarlas (Dvorak, 1981).

En 1987, Johnstone estudió la maduración de los reticulocitos, los cuales son los estadios inmaduros de los glóbulos rojos, y describió un mecanismo mediante el cual estas células pierden la expresión del receptor de transferrina, en la transición a su estadio maduro en circulación. De manera interesante encontró que las VEs participaban en este mecanismo y para distinguirlas por su tamaño las denominó exosomas (Jin et al., 2022). Hasta ese momento la única función descrita de los exosomas era la de ser desecho celular (Zhang et al., 2020) (Ratajczak and Ratajczak, 2020). Fue hasta 1998 que Amigorena S. estableció a los exosomas como mediadores de la comunicación celular entre células del sistema inmune (Laurence Zitvogel, 1998). Posteriormente, en los 2000, se describió que los exosomas poseen la capacidad de transferir antígenos (moléculas que son reconocidas por un TCR o BCR) de célula a célula. Un ejemplo de este tipo de mecanismos es la transferencia de la molécula CD41, a través de los exosomas hacia las membranas de células madre hematopoyéticas CD34+ (Janowska-Wieczorek et al., 2001) (Maia et al. 2018). Actualmente se conoce que los exosomas son inductores de diversos procesos celulares como quimiotaxis, proliferación, diferenciación y apoptosis (Dashevsky et al., 2009).

Los exosomas se han estudiado en los últimos años debido a su relevancia biológica, estos se pueden encontrar en medios condicionados a partir de líneas celulares, tejidos y en los treinta fluidos biológicos presentes en mamíferos, tales como: plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sincial, saliva, entre otros (Théry et al., 2018). Esta ubicuidad les permite participar como mediadores de comunicación intercelular en la mayoría de los procesos biológicos homeostáticos, así como favorecer el desarrollo de diversos procesos patológicos tales como: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o incluso la generación de nichos pre metastásicos, los cuales son procesos que contribuyen a la propagación de tumores en el organismo (Zhang et al. 2019).

3.2. Características biológicas de los exosomas

Es importante mencionar que la gran mayoría de las células eucariotas son capaces de producir exosomas, incluyendo a las células mesenquimales madre (MSC), células B, células T, macrófagos, células dendríticas (CD), células asesinas naturales (NK), entre otras (Zhang et al., 2020).

De manera importante, un componente característico de los exosomas es la bicapa lipídica que conforma su membrana. Estas estructuras son plataformas celulares dinámicas, debido a su contenido molecular. Las membranas exosomales están compuestas por lípidos enriquecidos en colesterol, esfingomiélinea, ceramidas y ácido lisobisfosfatídico, el cual permite la acumulación de colesterol. Por otro lado, el contenido intravesicular de los exosomas es diferencial dependiendo la célula de origen, sin embargo, en general contienen gran variedad de proteínas y ácidos nucleicos al interior de ellos (Fig.2) (Meldolesi, 2018).

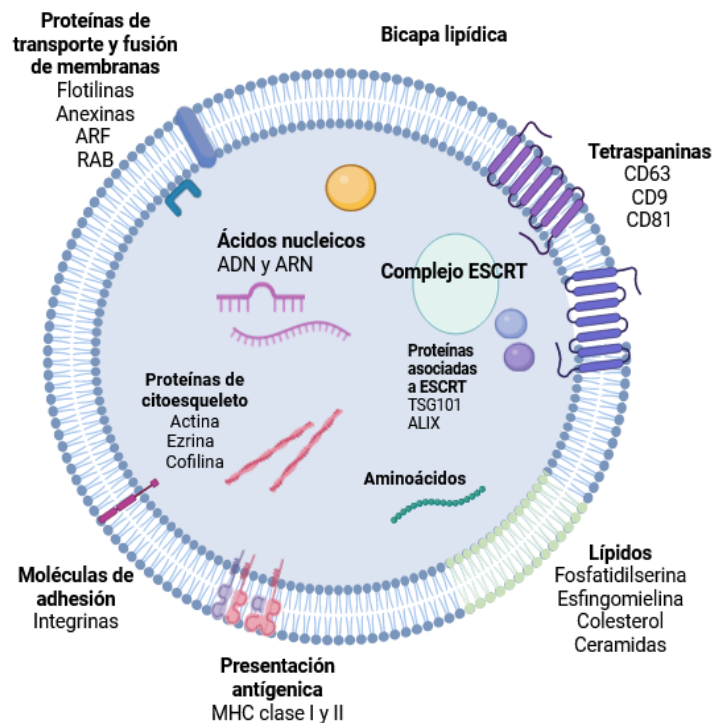


Figura 2. Estructura general y contenido molecular de los exosomas. Imagen modificada de Maravillas-Montero et al. 2018. *Rev. alerg. Méx. vol.64 no.4.2017*. Los exosomas poseen una bicapa lipídica la cual se encuentra conformada por lípidos como fosfatidilserina, esfingomiélinea, colesterol y ceramidas. En su membrana también se encuentran proteínas de transporte y encargadas de la fusión de membranas (flotilinas, anexinas,

ARF y RAB), tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81), moléculas de adhesión (integrinas) y moléculas de presentación antigénicas (MHC clase I y II).

3.3. Principales biomarcadores asociados a exosomas

Los exosomas contienen en sus membranas altos niveles de proteínas que participan en el transporte, como la maquinaria del complejo de clasificación endosómica requerido para el transporte (ESCRT), así como en la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática, como proteínas de citoesqueleto (tubulina, miosina y actina), anexina, proteínas RAB y flotilina (Ruzycka-Ayoush et al., 2023). Además, algunas de estas proteínas enriquecidas participan en la liberación de los exosomas (exocitosis), tal es el caso de las GTPasas, las proteínas G como Rab1, Rab27a y Rab27b, así como algunas integrinas relacionadas con sus células originarias como $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta7$, $\alpha\beta8$, $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta4$, y otros complejos como el MHC-II de células presentadoras de antígenos. En relación con la formación de vesículas intraluminales los exosomas contienen tetraspaninas (Ruzycka-Ayoush et al., 2023). Las tetraspaninas son proteínas transmembranales que se encuentran enriquecidas en microdominios de las membranas celulares y vesiculares. Estos microdominios son responsables de la adhesión celular, movilidad y de los procesos de interacción de las células con su entorno (Ahmed et al., 2021). Estas tetraspaninas participan en el proceso de selección molecular que tienen las VEs en el lumen. También participan en la captura de proteínas de señalización celular y otras moléculas tales como E-cadherina, b-catenina y Wnt (Mizenko et al., 2021). Las tetraspaninas más reportadas en la membrana de las VEs son CD63, CD9 y CD81, por lo que se consideran marcadores de VEs que permiten identificarlas y distinguirlas después de su aislamiento (Mizenko et al., 2021) (Okada-Tsuchioka et al., 2022). Otras proteínas contenidas en las VEs son la flotilina, PGRL (regulatoria) y la estomatina, las proteínas de adhesión celular asociadas a lisosoma L1CAM, LAMP2, enzimas como la alanil aminopeptidasa N y fibronectina (glicoproteína de superficie), entre otras (Ruzycka-Ayoush et al., 2023).

Las proteínas que se encuentran menos representadas a comparación de las anteriores son las proteínas asociadas al citoesqueleto como actina, vimentina, talina y anexina, proteínas chaperonas HSP70 y HSP90, las cuales protegen la estructura y función de otras proteínas, y enzimas como fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1) y gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), entre otras (Ruzycka-Ayoush et al., 2023).

Se ha descrito el contenido de moléculas como CD55 y CD59, las cuales podrían participar como una alternativa para evitar que en la superficie puedan fijarse opsoninas y factores de coagulación. Esta característica, les confiere mayor integridad y estabilidad por más tiempo en los biofluidos como el suero sanguíneo, linfa, plasma, líquido cefalorraquídeo, entre otros (Meldolesi, 2018).

Como se mencionó previamente, los marcadores que permiten la identificación de las VEs y su clasificación que han sido más estudiados son las tetraspaninas, tales como; CD81, CD63 y CD9, marcadores intracelulares como ALIX (*apoptosis-linked gene 2-interacting protein X*), TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*), y proteínas de choque térmico como HSP70 y HSP90, principalmente (Jung et al., 2021; Yang et al., 2021).

3.4. Tetraspaninas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas transmembranales que se encuentran en la membrana plasmática de las células y en la de las vesículas extracelulares. Estas moléculas participan en diversos procesos biológicos como adhesión, movilidad, señalización celular, modulación y diferenciación (Toribio y Yáñez-Mó, 2022). De manera interesante, la tetraspanina CD63 (LAMP3) participa en la regulación de la producción de exosomas y CD9 se ha demostrado que participa en la curvatura de la membrana debido a su forma cónica, regula la internalización del MHC-II en los endosomas tempranos y se ha observado que su bloqueo reduce el número de endosomas tempranos presentes, por citar algunos ejemplos de los procesos biológicos regulados por estas moléculas (Umeda et al., 2020; Toribio y Yáñez-Mó, 2022).

3.5. Características moleculares de las tetraspaninas

Las tetraspaninas son moléculas que se encuentran ampliamente expresadas en los seres vivos. En el caso de los humanos se han descrito treinta y tres miembros de esta familia de proteínas, al ser descritas como marcadores de vesículas extracelulares, se han vuelto de interés biomédico, por lo cual actualmente se conocen ampliamente sus características moleculares (Ahmed et al., 2021).

Estas proteínas integrales presentan cuatro segmentos transmembranales (TM1-4), dos bucles extracelulares que reciben el nombre de SEL y LEL (del inglés *Small Extracellular Loop* y *Long Extracellular Loop*), un bucle giratorio de menor tamaño, puentes disulfuro y extremos terminales N- y C-. Las tetraspaninas se caracterizan por tener entre 200 y 300 aminoácidos, y en ellos se encuentran distribuidos distintos sitios de glicosilación,

modificación de lípidos y otras modificaciones postraduccionales que permiten la participación de estas proteínas en la transducción de señales, así como en diversos procesos proteolíticos, replicación viral e interacciones virus y huésped (Ahmed et al., 2021). El papel de las tetraspaninas en los exosomas es muy relevante ya que les confieren algunas de las funciones biológicas implicadas en la comunicación celular como su papel en la migración celular, internalización de receptores, adhesión celular y la inhibición de su degradación por el proteasoma (Ruzycka-Ayoush et al., 2023).

4. Biogénesis de los exosomas

Los exosomas presentan una biogénesis a partir de la vía endosomal, esto ocurre mediante la gemación intraluminal de los compartimentos endosomales, los cuales son los encargados de internalizar las sustancias bioactivas que vienen del medio extracelular y de proteínas asociadas a la membrana. Este proceso ocurre en la membrana plasmática de las células. Estas estructuras forman los endosomas tempranos, EIV; por las siglas en inglés de “*Early intraluminal vesicles*”. Los endosomas tempranos son los encargados de regular la composición de la superficie celular, así como también participan en la separación de proteínas que serán utilizadas en otro lugar celular de aquellas que serán degradadas por lisosomas (Diaz et al., 2018). Una vez internalizado el contenido proveniente del medio extracelular y de la membrana celular, comienza la transición a endosomas tardíos. En los endosomas tardíos ocurre una selección, mediante los túbulos vesiculares, de proteínas y lípidos para ser recicladas y regresadas a la red trans-golgi (TNF) o para su incorporación dentro las vesículas intraluminales, ILV; por sus siglas en inglés de “*Intraluminal vesicles*”. Para la formación de ILVs ocurre una invaginación de la membrana limitante que permite la formación de estas vesículas (ILV) (Rädler et al., 2023). Dentro de las ILV, ya se encuentra determinado el cargo específico de cada vesícula. Estas ILV son contenidas en cuerpos multivesiculares, MVB; “*multivesicular bodies*”, por sus siglas en inglés, mediante una modificación post-traducciona por ubiquitina (Diaz et al., 2018). Los cuerpos multivesiculares son mecanismos de transporte endosómico, poseen Rab y LAMPs que les permite diferenciarse de otros organelos membranosos, y con ayuda de las proteínas del citoesqueleto se movilizan a la periferia, para fusionarse a la membrana celular y liberar su contenido en forma de exosomas (Fig. 3) (Zhang et al., 2020).

4.1. Determinación del contenido vesicular

El contenido vesicular se determina durante la formación de las vesículas intraluminales (ILV) y de los cuerpos multivesiculares (MVB). Su formación se ha descrito por dos vías: la vía clásica y la vía alterna. Ambas vías requieren de proteínas específicas para el reclutamiento de otras, distribución del cargo vesicular e invaginación.

La primera vía, conocida como la vía clásica, requiere del Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte o Maquinaria ESCRT; del inglés “*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*”. La principal función de este complejo es la de ser una maquinaria de transporte que permita tanto la invaginación de las ILV como la secreción exosomal (Todorova et al., 2017). Este complejo se compone de las subunidades ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y proteínas accesorias. La proteína HRS; del inglés “*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*” subunidad de ESCRT-0, reconoce a las proteínas ubiquitinadas y se une a el fosfolípido fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P), lo cual permite la unión de ESCRT-I mediante TSG101. Esta proteína interactúa con HRS, desplegando la señal para la unión de complejo ESCRT-II, causando la invaginación de la membrana endosomal. Posteriormente ESCRT-III se une al complejo, realizando la escisión de la membrana y formando la ILV. ESCRT-III participa tanto en la vía clásica como la vía alterna, para poder ser utilizado en ambas requiere de la proteína VPS4, la cual permite el reciclaje de ESCRT-III. Estudios recientes demostraron que la ausencia del complejo ESCRT no impide la producción de exosomas lo cual dio paso al estudio de una vía alterna (Rädler et al., 2023).

La vía alterna de formación de MVB, es regulada por las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81, las cuales se encargan del reclutamiento de proteínas asociadas para la formación de dominios ricos en tetraspaninas. También participan proteínas como ALIX, ESCRT-III y sintenina. La proteína sindecano (presente en la membrana de los exosoma), recluta a la proteína sintenina-1 la cual es una proteína que regula la proliferación, migración, metástasis y angiogénesis de células tumorales. Esta proteína se encuentra presente en vesículas para su interacción con ALIX (*ALG-2-Interacting Protein X*) en la biogénesis exosomal (Kim et al., 2022). La proteína ALIX es una proteína citoplasmática expresada en las células y presente en los exosomas en altas concentraciones. Esta proteína participa en la muerte celular por su capacidad de unión a la proteína dependiente de calcio ALG-2 (*apoptosis-linked gene 2*) (Chatellard-Causse et al., 2002). Ambas proteínas

son reguladas por GTPasas y los factores ARF6 (*ADP ribosylation factor 6*) y PLD2 (*phospholipase D2*) (Kim et al., 2022). De esta manera, se promueve la invaginación y formación de los ILV. Una vez formadas estas estructuras se recluta al complejo ESCRT-III reciclado de la vía clásica con ayuda de la proteína VPS4 para finalizar su biogénesis (Rädler et al., 2023).

La selección del contenido de los exosomas ocurre por medio de los miembros de la maquinaria ESCRT (TSG101 y Alix) y la proteína ARRDC1 (dominio de arresto contenedor), estas proteínas participan en permitir la acumulación de otras moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en los dominios del lumen de las vesículas. Los microdominios se curvan internamente y liberan los endosomas (ILVs) en la parte interna de los cuerpos multivesiculares (MVB), estas proteínas se encuentran ubiquitinadas. La regulación funcional de los exosomas ocurre mediante la ubiquitinación de sus proteínas. Para esto, la maquinaria ESCRT interactúa con la proteína tirosina fosfatasa HD-PTP y desubiquitina a las proteínas, lo cual permite su activación funcional. La selección del contenido de la vesícula comienza con el ensamble de los ILV y termina hasta su fusión con la membrana. En la decisión del contenido intravesicular específico participan principalmente las tetraspaninas mediante su interacción con proteínas citosólicas, también se asocian a la captura de proteínas de señalización intracelulares y de superficie, como son la E-cadherina, beta catenina y Wnt (Meldolesi, 2018).

Los cuerpos multivesiculares poseen la capacidad de fusionarse con la membrana celular para poder liberar las sustancias intracelulares en forma de exosomas, esto lo hacen mediante sitios de fusión alrededor de la membrana o sólo en una parte de ella. Para la fusión de los MVB es necesario el acercamiento de estos a la membrana citoplasmática con ayuda de proteínas de citoesqueleto, motores moleculares y GTPasas RAB (como Ral1, Rab27) y mediante un proceso de exocitosis y transporte activo, ocurre la liberación de los exosomas al medio extracelular (Zhang et al., 2020; Rädler et al., 2023).

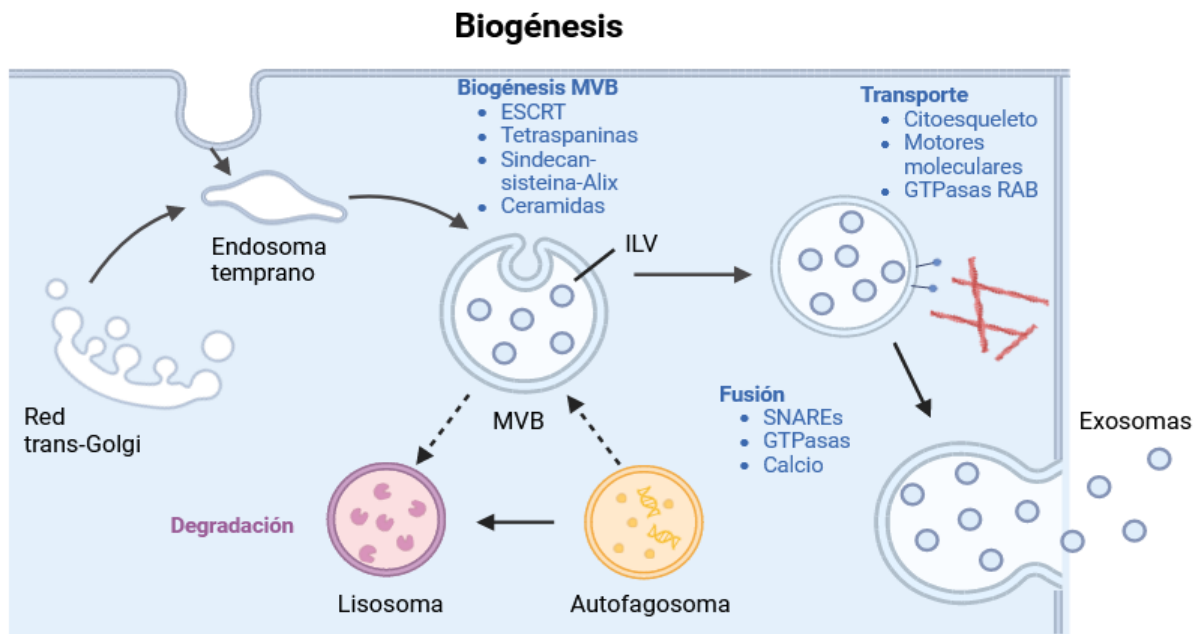


Figura 3. Biogénesis de los exosomas por invaginación de la membrana celular. Imagen tomada de Radler et al. 2023. **ILV**: vesículas intra lumenales (por sus siglas en inglés, *intraluminal vesicles*), **MVB**: cuerpos multivesiculares (por sus siglas en inglés, *multivesicular bodies*), **TSG101**: gen de susceptibilidad tumoral 101 (por sus siglas en inglés, *tumor susceptibility gene 101*), **SNARE**: receptores de proteínas de fijación soluble de NSF soluble (por sus siglas en inglés, *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), **ESCRT**: complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte (por sus siglas en inglés, *endosomal sorting complexes required for transport*) y **VPS4**: proteína asociada a la clasificación de proteínas vacuolares (por sus siglas en inglés, *vacuolar protein sorting-associated protein 4*).

5. Mecanismos de acción de las VEs

Las VEs son liberadas al medio extracelular, se trasladan e interaccionan con la membrana plasmática de las células diana. Las VEs poseen moléculas como las tetraspaninas, integrinas, proteoglicanos y lectinas, las cuales interaccionan con los receptores, moléculas de adhesión y proteínas de matriz extracelular como la laminina y fibronectina presentes en las membranas de las células receptoras. Algunas vesículas disgregan su membrana para exponer las sustancias bioactivas que se unirán a los receptores de las células diana. (Meldolesi, 2018).

La fusión de las VEs con la membrana plasmática de la célula es mediada por CD9, esta tetraspanina participa junto con las sincitinas que se unen a proteínas transmembranales (MFSD2a o ASCT2) mediante su región hidrofóbica. Posteriormente ocurre una reestructuración proteica, la cual permite la apertura de la membrana plasmática y la

internalización del contenido vesicular. Otros mecanismos de fusión descritos son la fagocitosis, endocitosis y macropinocitosis (Meldolesi, 2018).

Las VEs que no son internalizadas pueden permanecer estables en el medio extracelular, o migrar a través de uniones intercelulares, estas VEs se desplazan a zonas adyacentes en los tejidos, encontrándose en los biofluidos como el suero sanguíneo, linfa, plasma y líquido cefalorraquídeo (Théry et al., 2018).

6. Importancia y relevancia del estudio de los exosomas en la homeostasis y la enfermedad

6.1. VEs en la homeostasis

Las VEs, en particular las de menor tamaño, conocidas como exosomas, son de gran relevancia en el mantenimiento de la homeostasis, participando como inmunoreguladores y mediadores en procesos de inflamación en el sistema inmune (Buzas et al., 2014).

Las células del sistema inmune; como los neutrófilos, macrófagos, monocitos y macrófagos derivados de monocitos secretan VEs en respuesta a mediadores inflamatorios, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Izquierdo-Serrano et al., 2022) (Timár et al., 2013). Actualmente, se conoce que la cantidad de VEs secretadas se ha visto incrementada en procesos infecciosos y de inflamación (Li et al., 2023).

Las VEs secretadas por células del sistema inmune pueden potenciar la respuesta inmune al incrementar la expresión de moléculas proinflamatorias (IL-6) y de adhesión que faciliten la trans migración de las células a los tejidos (Kolonics et al., 2020), también contribuyen en la respuesta antimicrobiana, ya que permiten la agregación de bacterias en procesos infecciosos (Timár et al., 2013; Tian et al., 2019). Otra función a la cual se les ha asociado es a la presentación antigénica; las VEs derivadas de células presentadoras de antígenos (APC) en su membrana poseen el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) requerido para presentar un péptido a los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Kalluri y LeBleu, 2020). Las VEs de APC maduras presentan un fenotipo con mayor capacidad activadora, mientras que las provenientes de APC inmaduras favorecen un estado inmunosupresor, induciendo apoptosis de células efectoras y activando células reguladoras (Tregs) (Maravillas-Montero et al. 2017).

Otro mecanismo donde se ha descrito su participación es en la activación del sistema inmune innato: se ha visto que los exosomas provenientes de células dendríticas (DC) contienen proteínas de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que favorece la activación de células citotóxicas como las Natural Killer (NK) (Lugini et al., 2012).

6.2. VEs en la enfermedad

Los exosomas también están implicados en diversas patologías como infecciones virales, desregulación de células del sistema inmune, aparición de la metástasis en cáncer, problemas cardiovasculares y neurológicos, entre otros. Se han descrito múltiples mecanismos a través de los cuales los exosomas participan en el establecimiento y progresión de estas enfermedades. Por ejemplo, en infecciones virales los exosomas participan como vehículos virales, ya que los virus poseen mecanismos de patogenicidad que les permite secuestrar y modificar la vía endosómica de las células blanco, para propagar la infección (Joseph et al., 2023). Se ha encontrado material genético de virus de la familia Flaviviridae, del virus de la hepatitis C y del virus de Epstein-Barr dentro de exosomas (Yates et al., 2022). Estos acarreadores, internalizan el ARN infeccioso a las células blanco con ayuda de la interacción de las tetraspaninas con la membrana de la célula. Lo anterior se ha observado en los exosomas provenientes de células con Hepatitis C. En esta infección, las tetraspaninas CD81 y CD63 participan como receptores de la glicoproteína viral E2, permitiendo la entrada del virus a las células (Karimi et al., 2022).

Por otro lado, los exosomas se han asociado con enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (Yates et al., 2022). Estas vesículas actúan como vehículos que transfieren microARNs y distintas proteínas. Se ha descrito otro mecanismo de internalización a través de la penetración de la barrera hematoencefálica propagando antígenos cerebrales a los tejidos periféricos (Yates et al., 2022). Los exosomas en los tejidos cerebrales, promueven la agrupación de proteínas con defectos en su plegamiento, ocasionando la inactividad de las proteínas y favoreciendo la progresión de las enfermedades. Por el contrario, también se ha observado que los exosomas pueden proteger los tejidos mediante la eliminación de las proteínas mal plegadas, ejerciendo así funciones desintoxicantes y neuroprotectoras en el sistema nervioso (Kalluri y LeBleu, 2020).

Por otro lado, también se ha identificado que los exosomas participan en el desarrollo de enfermedades metabólicas y problemas cardiovasculares. Estas vesículas favorecen la comunicación y el intercambio de metabolitos en células beta pancreáticas, tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. En enfermedades cardiovasculares, los exosomas pueden afectar el desarrollo de la placa aterosclerótica en los vasos sanguíneos. Esto es desfavorable para el organismo ya que promueve un estado inflamatorio, aumenta la proliferación celular generando trombosis y respuestas vasoactivas. Algunas otras patologías con las que se han relacionado a los exosomas y su contenido molecular son: el síndrome metabólico, aterosclerosis, diabetes asociada a problemas cardiovasculares y fallas cardíacas (Kalluri y LeBleu, 2020).

6.3. VEs como biomarcadores

Las vesículas extracelulares, en particular los exosomas, han tenido gran relevancia en los últimos años debido a su alto contenido molecular y su capacidad de mediar la comunicación intra- y extracelular mediante la actividad de las moléculas acarreadas por las VEs al interior de las células blanco. Debido al transporte de diversas sustancias bioactivas, los exosomas participan en procesos como la regulación celular, reparación de tejidos, progresión tumoral, regulación del sistema inmune, participación en la expresión de nuevos genes y diseminación de patógenos, entre otros. Estas vesículas son capaces de modificar la fisiología celular e inducir procesos de señalización a través de interacciones ligando-receptor (Ruzycka-Ayoush et al., 2023) así como brindar información acerca del estado fisiológico de la célula que las secretó (Yates et al., 2022). Debido a lo anterior, los ARNs y proteínas asociadas a las VEs, en particular los exosomas, han sido estudiados con el objetivo de utilizarlos como biomarcadores (Wang et al., 2020). El empleo de las VEs como posibles biomarcadores ha abierto una posibilidad para el diagnóstico, pronóstico, monitoreo y tratamiento de enfermedades de gran incidencia como el cáncer, enfermedades virales, neurodegenerativas y cardiovasculares (Kalluri y LeBleu, 2020; Karimi et al., 2022) Por ejemplo, en un estudio reciente, se han administrado directamente los exosomas provenientes de células dendríticas como tratamiento contra la artritis reumatoide, ya que se han encontrado moléculas antiinflamatorias como IL-10 e IL-4, que brindan un mejor pronóstico para el paciente (Maravillas-Montero, 2017).

Los exosomas poseen la capacidad de penetrar barreras biológicas lo cual los hace atractivos como transportadores de fármacos (Kalluri y LeBleu, 2020). Actualmente se han

implementado dos alternativas para modificar el cargo de las VEs con el fármaco en cuestión y poder introducirlo al paciente. Estas vías consisten en modificar a las VEs a través de la edición de genes y la co-incubación con células progenitoras para obtener una vesícula modificada desde su biogénesis o posterior a la liberación extracelular, donde es necesario aislar las vesículas y modificarlas mediante la co-incubación con otros exosomas, electroporación, sonificación, extrusión, ciclos de congelación y tratamiento con saponinas. Estos métodos se basan en la perforación o alteración de la membrana lipídica de los exosomas para la introducción de moléculas específicas (Zhang et al., 2020). Una consideración importante de mencionar es que, a pesar de su extenso potencial, su estudio es muy complejo debido a su tamaño y la poca estabilidad de su membrana, y a las dificultades metodológicas que implica separarlas, lo cual puede favorecer la pérdida de su integridad, su agregación y el co-aislamiento de moléculas y partículas contaminantes, lo cual dificulta el tratamiento individualizado de las VEs o incluso puede disminuir su función biológica (Zhang et al., 2020).

6.4. Importancia de las vesículas extracelulares en el estudio del cáncer

Así mismo, se conoce que los exosomas juegan un papel fundamental en la biogénesis del cáncer, ya que las células tumorales utilizan la liberación de exosomas como un mecanismo para promover el crecimiento tumoral. Estos mecanismos implican: la liberación de compuestos oncogénicos y microRNAs. Las integrinas contenidas en las membranas de los exosomas son reguladores de la comunicación intercelular (Shimaoka et al., 2019) y favorecen la colonización de nuevos nichos metastásicos para realizar metástasis. Estas moléculas son capaces de mediar la interacción de las células residentes de los tejidos con los exosomas. Se ha observado que estas integrinas activan promotores oncogénicos como la proteína tirosina-quinasa Src y prenden genes pertenecientes a la familia S100 (los cuales promueven la migración e inflamación) para regular la función de las células residentes (Tian et al., 2019). Por otro lado, las vesículas contribuyen con el microambiente tumoral mediando la infiltración de células inflamatorias y la angiogénesis y también favorecen la resistencia de las células tumorales a fármacos (Tian et al., 2019). Se ha reportado un incremento en la concentración de exosomas en circulación en pacientes con distintos tipos de cáncer. Melo y colaboradores demostraron que las vesículas secretadas por células provenientes de cáncer de mama median eficientemente el silenciamiento del ARNm, con el objetivo de reprogramar el transcriptoma de la célula diana. Estas VEs inducían a las células epiteliales no

tumorigénicas a formar tumores en un sistema dependiente de Dicer (Melo et al., 2014; Milane et al., 2015), lo cual se encuentra relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad. Uno de los mecanismos propuestos para este incremento en la liberación exosomas por las células tumorales, está asociado a la biogénesis exosomal modificada, la cual tiene modificaciones significativas en el complejo ESCRT (Ruzycka-Ayoush et al., 2023; Meldolesi, 2018).

Las VEs provenientes de las células presentadoras de antígenos (APC) tumorales, se han propuesto como candidatas para el tratamiento de cáncer ya que pueden inducir la activación de linfocitos T citotóxicos, que favorezca la disminución del crecimiento tumoral. Las VEs participan como mediadores en el proceso de angiogénesis. En cáncer colorrectal las células colorrectales (CRC) secretan exosomas que permiten la sobreexpresión CAPS1 promoviendo el crecimiento epitelial de células FHC (Wu et al., 2021). Es por todo lo anterior, que es sumamente relevante el estudio de los mecanismos moleculares que median la comunicación de los exosomas y las VEs, con el microambiente tumoral para la progresión del cáncer, por lo cual, es de gran interés la optimización de las metodologías que permitan el estudio de VEs en circulación, con el objetivo buscar biomarcadores o con fines terapéuticos (Ruzycka-Ayoush et al., 2023).

7. Métodos de estudio de las vesículas extracelulares

7.1. Métodos de aislamiento y purificación de VEs

Específicamente, debido al interés en la búsqueda de biomarcadores, el plasma y el suero son biofluidos de gran relevancia en el estudio de los exosomas. La composición de estos dos biofluidos es extremadamente compleja. En el plasma encontramos estructuras de composición lipídica, como es el caso de las lipoproteínas (Apo-A1, Apo-E1 y Apo-B) las cuales comparten tamaño, densidad y forma con las vesículas, lo que dificulta el aislamiento con la mayor pureza y el posterior análisis de las VEs (Mladenović et al., 2023). La elección de un método adecuado para el enriquecimiento de los exosomas es crucial para la interpretación de los datos. No existe un método por sí solo que asegure una purificación absoluta, ni el mejor rendimiento; sin embargo, se han analizado las ventajas y desventajas de las metodologías utilizadas actualmente (Sidhom et al., 2020). Debido a que la naturaleza de los biofluidos es muy distinta, es muy importante elegir el método adecuado de aislamiento de las VEs, que considere el mejor rendimiento y pureza posibles.

Actualmente se han implementado diversas técnicas para el enriquecimiento de las VEs a partir de biofluidos, tales como; la ultracentrifugación (UC), la separación por gradientes de densidad, precipitación, filtración, inmunoprecipitación (IP), exclusión por cromatografía de exclusión molecular (SEC) y diferentes combinaciones de ellas que permitan optimizar y maximizar la purificación. Como se mencionó previamente, no hay una técnica universal para el aislamiento y enriquecimiento de las VEs, la selección de la metodología más adecuada dependerá del objetivo de la investigación a desarrollar y de la naturaleza de la muestra. Cada técnica tiene ventajas y desventajas; por ejemplo, la UC permite obtener VEs con un mayor rendimiento, sin embargo, compromete la integridad de las VEs; la IP favorece la especificidad de las moléculas de interés, pero es un procedimiento de costo elevado, y la SEC facilita el enriquecimiento y la conservación de la integridad de las membranas de las VEs, además de que favorece la reducción de contaminación con lipoproteínas, aunque compromete el rendimiento. Por todo esto, es necesario considerar varios factores al seleccionar el método más adecuado dependiendo del objetivo de la investigación. A continuación, se describen con detalle las metodologías más utilizadas para el aislamiento de las VEs (Tiwari et al., 2021)

7.1.1. Ultracentrifugación

La ultracentrifugación (UC) es de las primeras metodologías empleadas para el aislamiento de las VEs desde que se empezaron a estudiar. Su fundamento es la separación de los componentes de una muestra por tamaño y densidad, mediante series de centrifugaciones a altas velocidades. Estas series se realizan en dos fases; la primera es una centrifugación de mediana velocidad (p.e. 10 000 rpm) que se encarga de remover células muertas, debris y vesículas de gran tamaño. La segunda fase requiere de una ultracentrifugación a altas velocidades (100 000 x g), para separar a las VEs pequeñas. Esta técnica es inespecífica ya que no requiere de anticuerpos específicos para marcadores vesiculares que permitan su separación. Las desventajas de la UC son que es un procedimiento que ocurre en lapsos prolongados de tiempo, es una técnica de alto costo, el daño estructural que provocan las altas velocidades y la pérdida de integridad de las vesículas, así como la agregación no deseada de las vesículas y co-separación de lipoproteínas en la muestra de VEs (Zhang et al., 2020).

7.1.2. Cromatografía de inmunoafinidad

La cromatografía de inmunoafinidad es una técnica basada en el uso de anticuerpos que interactúan con los ligandos presentes en las vesículas, permitiendo la recuperación de

vesículas específicas de muestras heterogéneas. En esta técnica necesario utilizar las proteínas más abundantes, tanto en la membrana como transmembranales de las VEs, para su identificación; algunas de las más utilizadas son las proteínas ESCRT. Esta metodología se emplea cuando se buscan VEs positivas para una proteína en específico, ya que segmenta las poblaciones de VEs e impide una caracterización general de la muestra. El uso de anticuerpos no es recomendable para aislamientos en gran escala debido a la interferencia no específica por parte del anticuerpo (Yates et al., 2022).

7.1.3. Precipitación por polímeros

La precipitación de polímeros es otro método utilizado para el aislamiento de VEs, esta metodología consiste en la adición de un polímero hidrofílico al biofluido, como el polietilén-glicol, el cual interactúa con el agua presente, permitiendo la precipitación de los componentes menos solubles de la muestra. Es considerado un análisis rápido y fácil, donde la pureza y la tasa de recuperación son limitadas. Adicionalmente el polímero es difícil de remover por completo de la muestra, por lo cual actualmente no es aceptado en estudios funcionales de VEs (Irmer et al., 2023).

7.1.4. Cromatografía de exclusión molecular

Existen otras metodologías que no alteran la integridad de las membranas y limita la agregación de las vesículas, pero el rendimiento disminuye. Esto no excluye el co-aislamiento de proteínas, ribonucleótidos o lipoproteínas presentes en la muestra. Un ejemplo es la cromatografía de exclusión molecular, SEC; por sus siglas en inglés “*Size-exclusion chromatography*”. Esta metodología (SEC) se basa en la retención, por tamaños, de las partículas inmersas en una matriz. Para su realización es necesaria la recolección de un número estipulado de fracciones de la muestra, donde se recuperan las moléculas de mayor tamaño en las primeras fracciones del biofluido y el tamaño de las moléculas recuperadas disminuye progresivamente en las fracciones posteriores. Esto se debe a que las macromoléculas no son capaces de entrar a los poros de la matriz y se eluyen entre los espacios de estas, mientras que las micromoléculas si son capaces de entrar en los poros de la matriz y son retenidos por mayor tiempo. El tamaño del poro de la matriz es determinante para el tipo de vesícula que se desea aislar (Wang et al., 2020). Algunas ventajas que presenta esta metodología son el tiempo, el costo y la facilidad. Los exosomas aislados conservan sus características estructurales, biológicas y son uniformes en tamaño. Una de las principales desventajas es que la pureza se ve reducida, ya que también se eluyen partículas de tamaños similares presentes en la muestra, pero

estas pueden ser en menores cantidades que las VEs presentes (Yang et al., 2021). En el caso de muestras de plasma humano se han observado el co-aislamiento de proteínas similares en tamaño, como lipoproteínas (Stranska et al., 2018; Tóth et al., 2021).

8. VEs en el plasma humano

El plasma proveniente de una muestra sanguínea contiene gran cantidad de VEs, en específico exosomas provenientes de plaquetas, células del sistema inmune y antígenos presentes en el fluido, además de ser una muestra fácil y rápida de colectar, estas dos características lo han posicionado como una biopsia líquida para la purificación y enriquecimientos de VEs que funjan como biomarcadores diagnósticos de enfermedades (Karimi et al., 2018) Para el estudio de las VEs en plasma es indispensable conocer medidas cuantitativas del volumen inicial del biofluido, la caracterización de las VEs para determinar abundancia (número total de partículas, proteína o lípidos presentes), identificar subtipos de VEs (caracterización molecular) y verificar la presencia en la muestra de componentes no vesiculares que se co-aislen con las VEs (Théry et al., 2018).

8.1. Composición bioquímica del plasma humano

El plasma humano es un biofluido proveniente de la centrifugación de las muestras sanguíneas. Al someter la sangre 2500 rpm es posible obtener tres fases visibles: los eritrocitos, responsables del transporte de oxígeno, en la parte inferior, posteriormente las plaquetas, factores de coagulación y los leucocitos, en la parte superior encontramos el plasma (Fig.4). El plasma abarca el 55% del volumen total sanguíneo, y se compone en un 90% por agua. Se caracteriza por ser un líquido transparente y amarillento, de alta viscosidad, el cual permite el correcto flujo sanguíneo, posee una función reguladora de la temperatura corporal, la presión osmótica y el equilibrio iónico, y mantiene la presión arterial estable. También participa como transporte de diversas moléculas como, albúmina, lipoproteínas, hormonas, citocinas, carbohidratos, sales, vitaminas, minerales, y proteínas que son vitales en procesos de coagulación y de defensa. Este se diferencia del suero sanguíneo por la presencia de fibrinógeno, principal componente que permite la coagulación (Matthew et al., 2023).

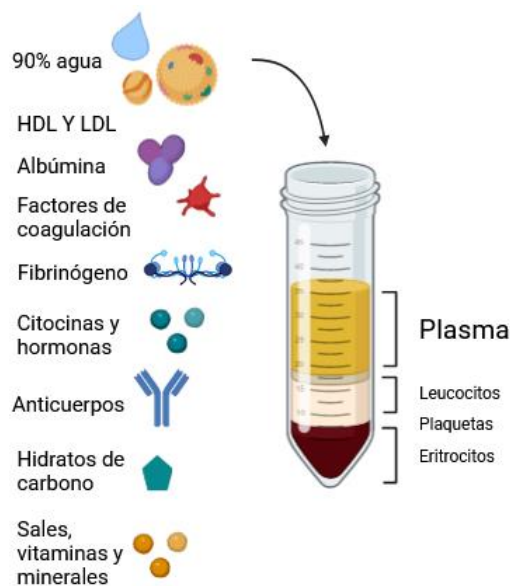


Figura 4. Composición del plasma sanguíneo humano. La sangre se separa en tres principales fases donde encontramos eritrocitos, plaquetas, leucocitos y plasma. La composición del plasma es de 90% agua y encontramos altas concentraciones de lipoproteínas (HDL y LDL), albúmina, factores de coagulación, fibrinógeno, citocinas y hormonas, anticuerpos, hidratos de carbono, sales, vitaminas y minerales.

8.2. Contaminantes en el plasma

Como se mencionó anteriormente el plasma es muy rico en VEs, pero también contiene diversas moléculas que pueden comprometer el aislamiento de ellas (Baranyai et al., 2015). Al analizar vesículas extracelulares obtenidas de plasma, la albúmina y las lipoproteínas serán los mayores contaminantes a los que nos enfrentamos (Karimi et al., 2022; Tsamchoe et al., 2023). Esta clase de lípidos son muy abundantes en plasma, incluso más que las vesículas, se estima que pueden ser de 20 a 100 veces más abundantes y se caracterizan por tener características fisicoquímicas similares: como su densidad, tamaño y composición superficial. Debido a esto pueden co-aislarse con las vesículas y marcarse con anticuerpos específicos para vesículas extracelulares dificultando su análisis (Botha et al., 2022).

8.3. Lipoproteínas como principales agregados particulados

Las lipoproteínas son partículas esenciales para el transporte sistémico de lípidos. Estas partículas están compuestas por un núcleo hidrofóbico de ésteres de colesterol y triglicéridos, rodeado por una capa hidrofílica compuesta por fosfolípidos en monocapa con moléculas de colesterol libre y apolipoproteínas. En altas cantidades se han relacionado con riesgo proaterogénico, con excepción de las HDL que favorecen un

estado antiaterogénico (Afonso y Spickett, 2019; Ding et al., 2022). En el cuerpo humano se encuentran cuatro tipos de lipoproteínas, los cuales son los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de densidad intermedia y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas moléculas se clasifican conforme a su tamaño (Fig.5). Los quilomicrones son los de mayor tamaño midiendo entre 75 y 1200 nm. Estas partículas se generan posterior a la ingesta de alimentos altos en ácidos grasos, su tamaño va a depender de la cantidad de ácidos grasos presentes. Estas moléculas facilitan el transporte de los lípidos y el colesterol por el torrente sanguíneo, para su procesamiento en hígado y conversión a lipoproteínas HDL, LDL, IDL y VLDL. Una vez que la conversión finaliza estas moléculas viajan por torrente sanguíneo para transportar los triglicéridos y el colesterol a los tejidos periféricos para su almacenamiento. Debido a su enriquecimiento en la membrana de las lipoproteínas, las apolipoproteínas como Apo A, E y B se han convertido en los marcadores utilizados para su identificación (Sun et al., 2019).

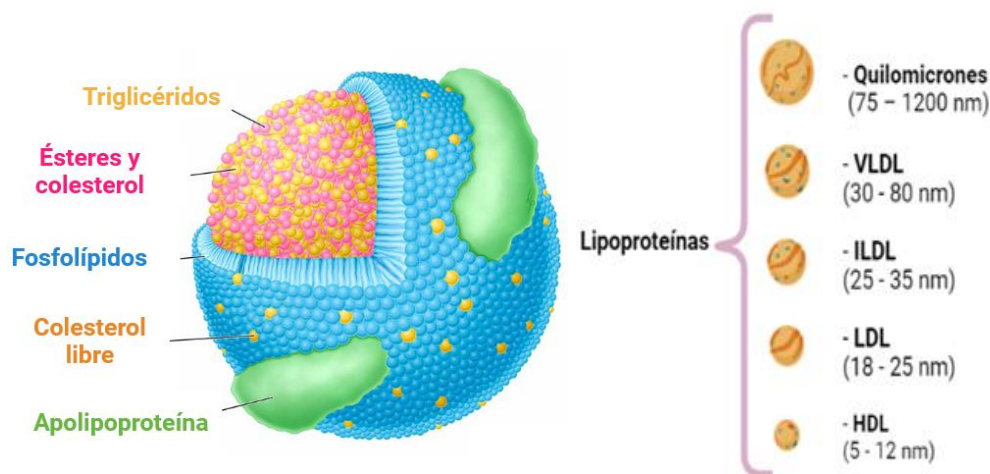


Figura 5. Clasificación y estructura de las lipoproteínas. Imagen modificada de Cleveland clinic, 2022. Las lipoproteínas poseen una membrana compuesta por fosfolípidos con apolipoproteínas, colesterol y en su interior poseen triglicéridos. Las lipoproteínas se clasifican en quilomicrones de 75 a 1200 nm, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) de 30 a 80 nm, lipoproteínas de densidad intermedia (ILDL) de 25 a 35 nm, lipoproteínas de baja densidad (LDL) de 18 a 25 nm y lipoproteínas de alta densidad (HDL) de 5 a 12 nm.

9. Análisis fenotípico y morfológico de vesículas extracelulares (NTA, WB, TEM, citometría de flujo)

Debido a que el estudio de las VEs es muy complejo por las dificultades en su aislamiento y caracterización, en la actualidad la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

(ISEV, por sus siglas en inglés) se ha encargado de establecer una serie de lineamientos que contribuyen a una mejor interpretación de los estudios de las VEs y a la reproducibilidad de estos. En la versión más reciente de estas guías, la ISEV recomendó algunas metodologías específicas para el análisis de las vesículas extracelulares (Théry et al., 2018). Las metodologías más aceptadas por ésta comunidad son: análisis por rastreo de partículas (NTA) para determinar el tamaño y concentración, western blot (WB) para evaluar la presencia de marcadores superficiales y contenido molecular de las VEs, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA); el cual permite la detección de la presencia de proteínas exosomales específicas, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) empleada para observar estructuras internas y el tamaño de las VEs y la nanocitometría de flujo, entre los métodos más recientemente sugeridos para análisis más individualizados de las VEs (Théry et al., 2018). La nanocitometría de flujo ha adquirido una enorme relevancia, debido a que permite la detección de biomarcadores exosomales mediante un análisis multiparamétrico. Una de sus ventajas es que el análisis requiere de poco tiempo y permite obtener resultados con una concentración baja de muestra. Sin embargo, tiene como desventaja que los citómetros convencionales son incapaces de analizar partículas menores a 400 nm, por lo que hasta hace unos años no era factible el análisis de VEs pequeñas. Debido a esta limitante, se han desarrollado tecnologías mucho más sensibles que la hacen capaz de analizar partículas de hasta 100 nm como son los exosomas. Si bien la citometría aplicada al estudio de partículas submicrométricas es una herramienta vanguardista que nos permite realizar conteo de partículas o eventos, identificar diferentes poblaciones con el uso de anticuerpos acoplados, también requiere cierta sensibilidad para su detección y muchos controles que discriminen eventos falsos positivos (Zhang et al., 2020). Algunas de las dificultades en esta área son la necesidad de equipos altamente especializados, que posean la resolución necesaria, para poder eliminar los artefactos y visualizar sólo a las vesículas. Otro inconveniente es la complejidad de la muestra, lo cual hace elemental el uso de una metodología lo suficientemente rigurosa para el aislamiento de estos. Debido a la conservación de la integridad de las VEs que ofrece la cromatografía de exclusión molecular, se ha utilizado en conjunto con la nanocitometría de flujo (Bettin et al., 2023).

Por lo cual, se deja sustentado que el subsecuente análisis de VEs de plasma humano requiere de un mejor conocimiento de las potenciales moléculas que acompañan a las preparaciones de VEs, así como al desarrollo de metodologías que cada vez aseguren un mejor aislamiento.

ANTECEDENTES

1. La cromatografía de exclusión molecular permite el enriquecimiento de las VEs, pero no excluye a proteínas del mismo peso molecular

En el apartado anterior se han descrito diversas técnicas para el aislamiento y purificación de vesículas extracelulares que permiten el empleo de éstas como posibles biomarcadores en el área clínica. Las VEs de plasma son de gran interés en la búsqueda de biomarcadores moleculares, debido a que las técnicas de obtención de las muestras de sangre son menos invasivas que otros tipos de muestras clínicas como la obtención de tejido tumoral, además de que contiene información sistémica de todas las VEs secretadas, por lo que son potencialmente útiles para el desarrollo de biomarcadores útiles en enfermedades de gran incidencia en la población, como el cáncer. Se ha demostrado que los pacientes con cáncer tienen mayor concentración de VEs circulantes y estas pueden transportar moléculas específicas que indican un perfil molecular asociado a la enfermedad (Tang et al., 2022).

La elección del método de aislamiento y purificación dependerá del objetivo del análisis. Por ejemplo, en el caso de requerir realizar análisis individualizados como la nanocitometría de flujo, es necesario que las proteínas abundantes en sangre no se co-aislen junto con las vesículas, ya que esto dificultará el análisis de marcadores no tan enriquecidos en las VEs y favorecerá a la generación de artefactos que dificultan el estudio y la interpretación de los análisis (Diaz et al., 2018). Debido a esto, la cromatografía de exclusión molecular (SEC) se ha considerado una alternativa favorable, ya que se basa en el principio de gravedad. A diferencia de otras técnicas, la cromatografía no compromete la integridad de las vesículas, no favorece la agregación de las partículas, no contamina la muestra con compuestos externos como polímeros, se logra la separación incluso de compuestos de menor tamaño y agregados por los diferentes tiempos de colecta implementados y es de las metodologías menos sofisticadas y que no requiere una infraestructura costosa para llevarse a cabo (Jung et al., 2021).

El aislamiento de las vesículas extracelulares y el posible co-aislamiento con otras moléculas ha sido de gran interés en los últimos años. Grupos como el de Karimi y colaboradores en el 2018, se dieron a la tarea de implementar la cromatografía de exclusión molecular (SEC) como metodología para el aislamiento de las VEs y analizar en cada fracción colectada el contenido molecular de la muestra, mediante western blot. De

esta manera se ha determinado una diferencia en el contenido de moléculas co-aisladas con las VEs, de acuerdo con las fracciones analizadas. La cromatografía (SEC) por sí sola no resulta en un aislamiento óptimo, pero al combinar con otra metodología se puede mejorar mucho el aislamiento. Debido a que las proteínas en la muestra avanzan en la columna con una velocidad proporcional a su tamaño, las VEs pueden eluir junto con proteínas, muy abundantes en el plasma y que, por su similitud en tamaño con las VEs, pueden ser eludidas en las mismas fracciones. Por lo cual, dependiendo de la fracción elegida, va a ocurrir el co-aislamiento con posibles contaminantes, como las lipoproteínas, las cuales son uno de los principales constituyentes del plasma (Karimi et al., 2018; Baranyai et al., 2015). Estudios han visto cómo la implementación de la SEC, como método de aislamiento de VEs, en combinación con técnicas de análisis como western blot, permiten conocer el proteoma de las VEs de plasma. Esto resulta de gran utilidad debido a su potencial como biomarcadores en diferentes enfermedades (Karimi et al., 2018; Sun et al., 2019).

Stranska y colaboradores en el 2018, determinaron que las fracciones donde las VEs se encontraban más enriquecidas y con mayor cantidad de marcadores moleculares de exosomas, son las que presentan mayor cantidad de partículas (fracciones 7-9). Por otro lado, otro parámetro que es importante de considerar, además del rendimiento, es la cuantificación de moléculas co-aisladas como la albúmina y las lipoproteínas, las cuales se observó que incrementan en concentración, conforme aumentan las fracciones (10-14) y que a partir de la fracción 10 comienzan a verse enriquecidas (Stranska et al., 2018).

2. La combinación de ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular favorece el enriquecimiento de VEs aisladas a partir de medio condicionado

La cromatografía de exclusión molecular es altamente recomendable para una adecuada separación de las VEs, pero no posee por sí sola la capacidad de eliminar una gran parte de los contaminantes de mayor tamaño del plasma, por lo cual se ha utilizado en conjunto con otras técnicas como la ultrafiltración por centrifugación para potenciar sus resultados y asegurar previamente la eliminación de los complejos de mayor tamaño (Guerreiro et al., 2018). Se ha descrito que la combinación de ambas técnicas permite también un alto enriquecimiento de marcadores exosomales como CD63 y una baja concentración de Apo-A1, proteína de mayor concentración en lipoproteínas de alta densidad y Apo-B1, proteína de mayor concentración en lípidos de baja densidad (Diaz et al., 2018).

De igual manera, se ha demostrado que la ultrafiltración de 30 kDa seguida de la SEC, permite la recuperación de VEs de tamaño pequeño (30-150 nm) las cuales se pueden identificar mediante la presencia de ALIX (cuyo nombre y símbolo oficial en humanos es *programed cell death 6 interacting protein PCDCD6IP*), la cual es una proteína involucrada en el tráfico endosomal y cuyo enriquecimiento en los exosomas ha permitido que se utilice como un marcador exosomal. Ortega-Chavez y colaboradores en el 2019, analizaron las VEs provenientes de medio condicionado de líneas celulares metastásicas y no metastásicas como la MDA-MB-468 y las MCF7, mediante el rastreo de nanopartículas y la microscopía electrónica de transmisión. En este trabajo se propuso que la combinación de SEC y ultrafiltración de 30 kDa es una buena alternativa para la separación de VEs con un buen rendimiento y conservando su morfología (Ortega-Chávez et al. 2019).

El tamaño del corte del poro es una variante de la ultrafiltración que indiscutiblemente afecta la calidad de las VEs y el contenido de las preparaciones resultantes. Guerreiro y colaboradores en el 2018, realizaron estudios utilizando diferentes tamaños de poro que van desde 30, 50 y 100 kDa, donde se encontró que existe mayor enriquecimiento de la tetraspanina CD9 con tamaño de poro de 100 kDa en vesículas de medio condicionado, lo cual sugiere un mejor enriquecimiento de moléculas con el fenotipo de VEs empleando un mayor tamaño de poro en la SEC (Guerreiro et al., 2018). Los estudios previos se basan en la obtención de VEs a partir de medios condicionados, los cuales plantean un acercamiento a la conformación de las muestras vesiculares, pero son muestras menos heterogéneas a comparación de una muestra de plasma sanguíneo. Al realizar estudios en muestras de plasma se ha descubierto un enorme reto por la complejidad del fluido, por lo cual es necesario identificar el mejor tamaño de corte molecular en la ultrafiltración (Karimi et al., 2018), para facilitar el análisis y contribuir a una mejor calidad de muestra resultante de vesículas de plasma sanguíneo.

3. Las vesículas extracelulares requieren de técnicas específicas de aislamiento para realizar análisis individualizados

Cumba García y colaboradores, observaron que al analizar una muestra sanguínea de individuos sanos y de pacientes con Glioma, se enriquecen vesículas de mayor tamaño (100>1000 nm) de diámetro si la muestra no es tratada previamente con algún método de aislamiento, y se reportan agregaciones de otras partículas contenidas en la muestra, lo

cual no es óptimo para el análisis de nanopartículas por citometría de flujo (Cumba Garcia et al., 2019). Lozano-Andrés y colaboradores en el 2023, demostraron que, en muestras de VEs de plasma, las lipoproteínas características de las HDL, LDL y quilomicrones juegan un papel determinante en el análisis, ya que enmascaran la señal vesicular y afectan la detección de marcadores vesiculares como la tetraspanina CD9. Esta detección de marcadores vesiculares depende del tipo y cantidad de lipoproteínas co-aisladas con ellas (Lozano-Andrés et al., 2023). Este estudio establece la importancia de considerar los requerimientos de pureza de una muestra de VEs separadas a partir del plasma, que no interfieran con el subsecuente análisis de las vesículas por citometría de flujo.

JUSTIFICACIÓN

Las VEs de plasma son elementos biológicos potenciales en el desarrollo de biomarcadores accionables para el diagnóstico y seguimiento de múltiples enfermedades. Sin embargo, el aislamiento y análisis de las vesículas de plasma no es trivial, debido a la complejidad molecular y fisicoquímica de este biofluido. En particular, en el plasma humano, estas vesículas se encuentran acompañadas por proteínas y partículas con las que comparten tamaño y densidad, lo que dificulta la purificación y la posibilidad de realizar análisis individualizados de las mismas. Debido a esto es necesario el desarrollo de una metodología estandarizada que permita la identificación óptima de las VEs, la reducción de contaminantes co-aislados con la muestra y un buen rendimiento para posteriores análisis que conduzcan a profundizar el conocimiento de las VEs y los exosomas.

Actualmente es de gran interés, analizar a las lipoproteínas Apo-A1 y Apo-E1, y albúmina, proteínas de gran abundancia en el plasma, que se co-aislen mediante la combinación de UF con SEC que pudieran interferir con el análisis de las VEs en el plasma, por lo que es necesario un estudio detallado de estas proteínas y su co-aislamiento en muestras de VEs en plasma de individuos sanos, lo que permitirá optimizar estudios posteriores en pacientes de múltiples enfermedades.

HIPÓTESIS

El co-aislamiento de albúmina y las lipoproteínas Apo-A1, Apo-E1 en las VEs aisladas de plasma se modificará de acuerdo a las condiciones de separación por UF-SEC, lo cual se verá reflejado en las características fenotípicas y moleculares de las VEs del plasma de individuos humanos sanos.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar el contenido molecular de albúmina y las lipoproteínas Apo-A1 y Apo-E1 co-aisladas con las vesículas extracelulares a partir de plasma humano, así como caracterizar las vesículas extracelulares resultantes mediante la identificación de los marcadores exosomales CD63, CD9 y TSG101.

Objetivos particulares

1. Obtener y purificar vesículas extracelulares provenientes de plasma de individuos humanos sanos mediante la combinación de ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular.
2. Comparar la ultrafiltración con un corte molecular de 30 kDa y 100 kDa como complemento a la SEC en la separación de vesículas extracelulares provenientes de plasma de individuos humanos sanos.
3. Cuantificar el rendimiento de las vesículas provenientes de plasma de individuos humanos sanos.
4. Analizar la morfología de las vesículas de plasma de individuos humanos sanos obtenidas.
5. Determinar el contenido molecular de lipoproteínas y albúmina en las distintas fracciones de vesículas extracelulares obtenidas de plasma de individuos humanos sanos y compararlo en las diferentes fracciones.
6. Analizar el contenido molecular de marcadores intra- (TSG101 y calnexina) y extravesiculares (CD63 y CD9) de las vesículas extracelulares obtenidas de plasma de individuos de humanos sanos y compararlo en las diferentes fracciones obtenidas.

METODOLOGÍA

1. Obtención de la muestra

Los procedimientos empleados para el manejo de muestras humanas fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los individuos incluidos en este estudio se encuentran dentro de los 18 y 40 años, de ambos sexos (masculino y femenino), en ayuno de ocho horas, en ausencia de procesos infecciosos y sin enfermedades crónicas aparentes (criterios de inclusión y exclusión ver apéndice 1). Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de ocho individuos humanos aparentemente sanos mediante venopunción. La muestra fue extraída en tubos Vacutainer de 4 mL con EDTA como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron en tubos cónicos de 15 mL (Labofuge 400R) a 2000 rpm, sin freno, durante 10 minutos para separar el plasma del paquete celular y eritrocitos, y el plasma resultante se filtró mediante un filtro de 200 nm para reducir la contaminación por plaquetas y desechos celulares.

Tabla 1. Datos demográficos de los individuos analizados.

Parámetros demográficos		
Género	Mujer (n=3)	Hombre (n=4)
Edad (años)	29.3 ± 4.16	28 ± 7.7
Volumen de plasma por ml de sangre	27.2 ± 15.2	23.09 ± 3.24

2. Aislamiento y purificación de exosomas de plasma humano

2.1 Preparación de soluciones

Para lavar la sefarosa, se utilizó PBS 10X (80 g de NaCl, 2 g de KCl, 6.1 g de Na₂HPO₄ anhidro, 2 g de KH₂PO₄). A partir de esta solución se realizó la disolución de PBS-Citrato de sodio 0.32% y PBS 1X a un pH fisiológico (7.2 - 7.4), con Antibiótico-antimicótico 1X (Gibco cat. 15240096). Ambas fueron filtradas con un filtro de 0.1 µm en una unidad de filtración de 500 mL conectada a una trampa de vacío.

2.2 Pre-tratamiento de la sefarosa CL-2b

Se colocaron de 20-40 mL de sefarosa CL-2b (Sigma Aldrich cat. CL2B300-500) en un recipiente de plástico estéril y se permitió su sedimentación durante 15 minutos. Una vez sedimentada se desechó el diluyente y se agregó 15 mL de amortiguador (PBS-Citrato de sodio 0.32% filtrado con 0.1 μm) se mezcló suavemente para lavar la sefarosa. Posteriormente se dejó sedimentar durante 15 minutos y se repitió el procedimiento 2 veces más. Por último, se volvió a descartar el sobrenadante y se agregaron 10 mL de amortiguador nuevo. La sefarosa se almacenó a 4°C.

2.3 Preparación de la columna de sefarosa

Se cortó 1 cm^2 de media de nylon (dernier 19) esterilizada por radiación UV y se introdujo con guantes estériles dentro de la columna (Jeringa 10 mL Syringe Marca. BD cat. DW612780L) por la parte de abajo formando un tapón. Se colocó una llave de 3 vías en la boquilla de la jeringa. Se sujetó en un soporte universal metálico, se colocaron 10 mL de sefarosa CL-2b en la columna y se dejó sedimentar. Para continuar se realizaron 2 lavados (4 mL cada uno) con el amortiguador para empacar (PBS/Citrato 0.32% con Anti-Anti 1X filtrado con 0.1 μm) y al finalizar se realizaron 2 lavados más de la columna (4 mL) con el disolvente de la muestra (PBS 1X con Anti-Anti 1X filtrado 0.1 μm). En todo momento se aseguró de no dejar secar la columna utilizando el disolvente de la muestra.

2.4 Separación de las VEs por UF-SEC

Se filtró la muestra de plasma con un filtro de polietersulfona (PES) (Cat.431219), con un poro de 0.20 μm . El filtrado se colocó en tubos de ultrafiltración (Amicon 30 kDa y 100 kDa Millipore cat. 903024) de 15 mL. A continuación, se centrifugaron a 3100 g y 4°C durante 30 minutos y se recuperó el volumen del filtrado de aproximadamente 200 μL . Se colectó el volumen retenido y se resuspendió con PBS 1X en un volumen final de 1.5 mL en un tubo eppendorf. Una vez empacada la columna de sefarosa, con la llave cerrada y manteniendo así, se colocó el volumen del diluyente con el menisco en 10 mL y se colocó entonces 1.5 mL de la muestra. Se colectaron fracciones de 500 μL , y cada fracción se obtuvo en tubos eppendorf de 1.5 mL. Una vez obtenido el volumen de 1.5 mL en el tubo cónico, se cerró la llave y se reemplazó en la parte superior de la columna con más diluyente circularmente, para evitar que la columna se deformara. Se abrió nuevamente la llave y se continuaron colectando las fracciones. Se continuó con el procedimiento hasta haber recolectado 13 fracciones. Para finalizar se realizaron 3 lavados con 4 mL de

amortiguador de citrato y posteriormente se desempacó la columna y almacenó la sefarosa a 4°C.

2.5 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Para el análisis por rastreo de nanopartículas, el cual analiza la dispersión de la luz proyectada después de hacer incidir un láser en la muestra y analizar el movimiento browniano de las partículas para estimar tamaño y la concentración, por lo cual esta metodología aunque es inespecífica, proporciona información de las partículas totales contenidas en la muestra, se realizaron diluciones en PBS 1X estéril y filtrado con un filtro de polietilsulfona 0.2 µm dependiendo de la cantidad de partículas presentes en la muestra, limitándose a un rango entre 10^6 y 10^9 partículas/mL, viscosidad de 0.8 centipoise. Las partículas se observaron en el equipo Nanosight (NS300) con el software NTA 3.2.16 (Malvern, Worcestershire, UK). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: ganancia 1, nivel de cámara 11 y el límite de ruido 6.

3. Cuantificación de proteínas en las VEs por ensayo colorimétrico del ácido bicinconónico

Para la cuantificación de proteína total de las muestras se utilizó el método de cuantificación de proteínas mediante el ensayo colorimétrico del ácido bicinchonónico (microBCA), empleando una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA). Las proteínas se cuantificaron en preparaciones de VEs lisadas y sin lisar con amortiguador de lisis (ver apéndice 2).

3.1 Lisis de vesículas extracelulares

Para comenzar se prepararon 500 µl de amortiguador RIPA 5X (*radioimmunoprecipitation assay*) para la lisis de vesículas de la siguiente manera. En un microtubo se colocaron 250 µl de RCF 10X (ver apéndice 2), 25 µl de Triton X-100, 25 µl de SDS 10%, 85 µl de deoxicolato de sodio al 15%, 25 µl de inhibidores de proteasas (Cóctel inhibidor de proteasas Halt™ (100X) Thermo Fisher Scientific) y 90 µl de agua miliQ. Se lisaron 160 µl de muestra de VEs previamente separadas por la combinación de UF-SEC con 40 µl de RIPA 5X, durante 30 min en frío, con agitación cada 10 min. Transcurrido ese tiempo, se mantuvieron en frío hasta su posterior análisis.

3.2 Curva estándar de BSA

Para realizar la curva estándar se realizaron cinco diluciones seriadas a partir de una solución de 80 µg/mL de BSA (cat. A2153-50G). Las diluciones seriadas se realizaron colocando 12 µl de BSA en 1488 µl de H₂O miliQ para partir de un volumen final de 1500 µl. A partir de esta se realizó la de 64 µg/mL, colocando 880 µl de la dilución previa en 220 µl de H₂O, para la de 32 µg/mL se tomaron 500 µl de la dilución previa en 500 µl de H₂O, para la de 16 µg/mL se tomaron 425 µl de la dilución previa en 425 µl de H₂O y para la de 8 µg/mL se tomaron 250 µl de la dilución previa en 250 µl de H₂O.

3.3 Preparación de las muestras de proteína total previo a la cuantificación

Las muestras sin lisar se prepararon 1:20 de la siguiente manera: 24 µl de muestra de VEs (previamente aisladas y purificadas por SEC) en 3 µl de H₂O y posteriormente se realizó una dilución 1 en 50 en un volumen final de 500 µl. Las muestras previamente lisadas (3.1) también se llevaron 1 en 50 para obtener un volumen final de 500 µl.

3.4 Cuantificación de las proteínas en preparaciones de VEs

En una microplaca de 96 pozos se colocó el blanco (H₂O miliQ) con y sin RIPA, la curva y las muestras lisadas y sin lisar, el análisis se realizó por triplicado, colocando 160 µl por pozo. Posteriormente se agregaron 150 µl del colorante para determinar la concentración de la proteína (Micro BCA Protein Assay Kit cat. #23235 lot. PK207908) y la placa se incubó durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 565 nm mediante el equipo Cytation 3, imaging reader. BioTek. Los valores obtenidos se registraron en una tabla de cálculo y se analizaron los datos respecto a la curva estándar.

4. Western Blot

4. 1 Preparación del gel SDS-PAGE Tris Glicina

Para realizar la separación de los extractos proteicos se preparó un gel al 10% de acrilamida compuesto por el concentrador y el separador (H₂O, Acrilamida al 30%, Tris 1.5M, (separador pH 8.8) (concentrador pH 6.8), SDS 10%, persulfato de amonio (10%)) Una vez mezclada la solución se agregó el TEMED para permitir la polimerización del gel, el cual se realizó con un grosor de 1.5 mm y pozos de 50 µl de capacidad (las concentraciones utilizadas se describen en el apéndice 2.) Los geles se prepararon en un soporte universal (BIORAD), para ambos se colocó primero el gel separador hasta la

mitad del vidrio y se linealizó utilizando etanol al 96%, se dejó polimerizar por 30 minutos y se eliminó el etanol por decantación. Una vez hecho esto, se colocó el gel concentrador hasta un milímetro antes del borde del vidrio, se colocó el peine y se dejó polimerizar por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se armó la cámara de electroforesis (BIORAD) y se retiraron los peines. Se cubrió en su totalidad la cámara interna con amortiguador de corrida (apéndice 1) y se colocaron las muestras.

4.2 Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras es necesario cuantificar la proteína total de las fracciones como se describió en el apartado anterior (cuantificación de proteína), se colocó 50 µg de proteína por carril. Las muestras se desnaturalizaron a baño maría en un Thermo Block (Techne DB-3) a 96 °C durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se agregó el amortiguador de carga para todas las muestras y el b.mercapto etanol para los marcadores que requerían condiciones reductoras (TSG101, calnexina, albúmina, Apo-A1 y Apo-E1), en el caso de las tetraspaninas se omitió este reactivo.

4.3 Corrida de la electroforesis

Una vez cargadas las muestras se colocó el amortiguador de corrida Tris-Glicina 5X (preparación descrita en elapéndice 2) hasta la mitad de la cámara y se corrió la electroforesis a 70 Volts por 30 minutos, una vez que la muestra llegó al separador se aumentó la corriente a 110 Volts por 1 hora. Para cada marcador se corrieron dos geles, una vez terminada la separación de los extractos proteicos por electroforesis se tiñó un gel con Azul de Coomassie (apéndice 2) por una hora y se destiñó con solución desteñidora (apéndice 2) para integridad y el otro se utilizó para transferencia.

4.4. Transferencia

Una vez realizada la separación de los extractos proteicos por la electroforesis, se colocó el gel separador en el amortiguador de transferencia y se equilibró durante 5 minutos. Se hidrató una membrana de nitrocelulosa en amortiguador de transferencia y se agitó durante 5 minutos. Para realizar la transferencia, se colocaron los materiales dentro de los casetes de transferencia, se colocaron dentro de la cámara de transferencia húmeda y se llenó de amortiguador de transferencia Tris-Glicina 5X (preparación descrita en elapéndice 2) hasta cubrir los casetes. Se tapó la cámara y se colocó en una charola con

hielo. Se corrió la transferencia por 2.50 horas, a 200 miliAmps. Una vez terminada la transferencia, se desmontó la cámara y se realizó un lavado con TBS 1x durante 5 minutos en agitación, cuidando de siempre mantener la membrana en el electrodo positivo. Una vez terminada la transferencia la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau (apéndice 2) durante 15 min y se lavó con TBS 1X, para confirmar la transferencia de los extractos proteicos.

4.5 Bloqueo de la membrana

Se bloqueó la membrana con 15 mL de solución de bloqueo 5X (Blotting-Grade Blocker cat. #1706404) durante 1 h. Se realizó un lavado con TBS 1X, durante 10 min, para eliminar los residuos del bloqueo.

4.6 Incubación con anticuerpos

Se preparó la solución del anticuerpo primario dependiendo la proteína a evaluar (concentraciones descritas en el apéndice 3) en TBS 1X. Se colocó en una bolsa de propileno y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados de 10 min en agitación con TBS 1X. Se preparó el anticuerpo secundario en TBS 1X. Las diluciones de los anticuerpos se utilizaron en un rango de 1:30000 a 1:40000 dependiendo del marcador de interés (ver apéndice 3) en 15 mL y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Al terminar se realizaron 3 lavados con TBS 1X por 10 min cada lavado en agitación.

4.7 Revelado

El revelado se realizó en total oscuridad. Las membranas se colocaron en una carpeta plástica y se colocaron 500 µl de reactivo químico luminiscente (Pico West Thermo cat. 34095). Se realizó el revelado utilizando una placa autoradiográfica y posteriormente se colocó la placa en la solución reveladora 5 seg, luego en la solución fijadora otros 5 seg y finalmente se enjuagó en agua miliQ. Se repitió este procedimiento para todas las membranas a revelar. Se dejaron secar al aire por 10 minutos.

Las placas se digitalizaron y el análisis densimétrico se realizó mediante la determinación del análisis del área bajo la curva en el software ImageJ (versión 1.53t). Se analizaron 3 muestras para cada proteína.

5. Microscopía electrónica de transmisión

La muestra se colectó un día previo a la cita y se aislaron las VEs cómo se describe previamente. Para este análisis, la ultrafiltración se realizó únicamente con el filtro de 100 kDa Para ello se juntaron las fracciones 9, 10 y 11 y la muestra resultante se concentró en un tubo Amicon de 100 kDa de 4 mL y se centrifugó a 3100 g, por 20 minutos, a 4° C. Una vez centrifugado se recuperó el concentrado y se almacenó a 4° C por 24 h.

5.1 Preparación de la muestra

Para visualizar la muestra se colocaron 9 µl de muestra (1:100 en PBS 1X filtrado) en una rejilla de carbón y se dejó secar por 3 min. Para el contraste se retiró el exceso con un papel filtro y se colocó una gota de acetato de uranilo al 2% por 5 min. Posteriormente se dejó secar en una fuente de luz a 35 cm, por 15 min. La muestra se colocó dentro del microscopio y se visualizó a 80 KW en los objetivos de 1X y 100X.

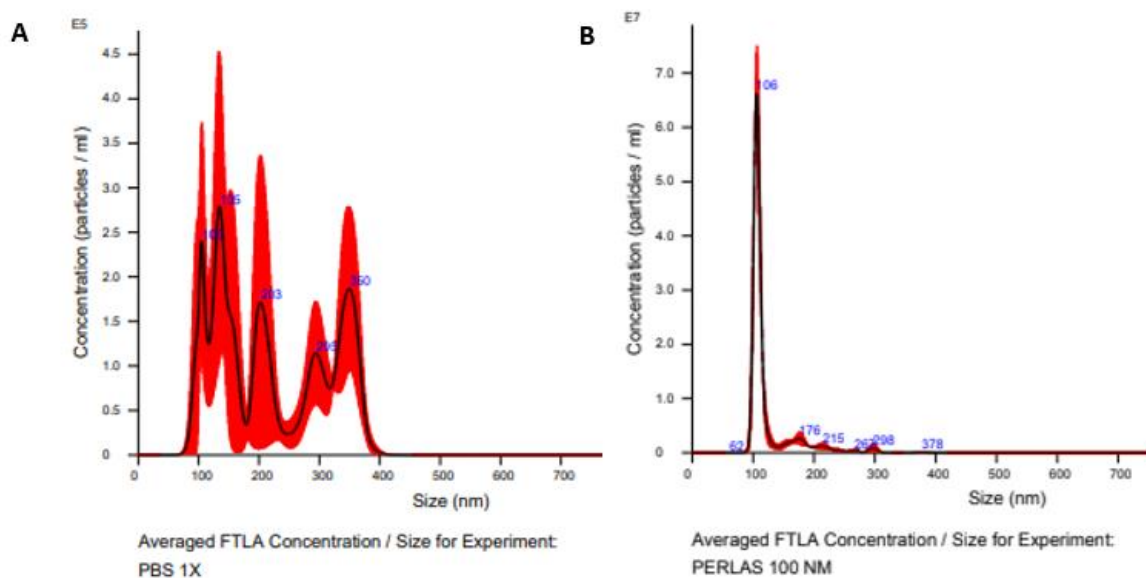
La determinación del diámetro de las VEs se realizó en el software ImageJ, analizando el total de las VEs (aumento de 5 kx en un total de 5 campos y 15 kx en un total de 10 campos).

RESULTADOS

1. Análisis del número de las VEs del plasma separadas mediante UF/SEC con corte molecular de 30 y 100 kDa

Las vesículas extracelulares fueron recuperadas del plasma de individuos aparentemente sanos, mediante la técnica de ultrafiltración (UF) en combinación con cromatografía de exclusión molecular (SEC), para incrementar la pureza y no comprometer la integridad de las VEs. Existen muchas variantes experimentales que afectan la pureza en la UF de VEs. Específicamente, debido a la complejidad del plasma, la pureza de las VEs se ve altamente comprometida, dependiendo del método de elección para separarlas. Diversos estudios han demostrado la efectividad de realizar la ultrafiltración con un poro de 100 kDa (UF-100) (Guerreiro et al., 2018). Debido a que los antecedentes del grupo de investigación se basaban en la separación de VEs a partir de 30 kDa, se implementó un corte 100 kDa (UF-100) adicional, para comparar los resultados de la UF en el plasma. Se analizaron las muestras de VEs ultrafiltradas con 30 y 100 kDa y se separaron en 13 fracciones posterior a la colecta por SEC de cada individuo (n=7) para poder estimar la concentración y el tamaño de las vesículas totales por individuo. Este análisis se realizó por rastreo de nanopartículas (NTA por las siglas en inglés de nanoparticle tracking analysis) mediante el equipo NanoSight NS3000 (Malvern,UK), el cual analiza la

dispersión de la luz proyectada después de hacer incidir un láser en la muestra y analizar el movimiento browniano de las partículas para estimar tamaño y la concentración, por lo cual esta metodología aunque es inespecífica, proporciona información de las partículas totales contenidas en la muestra. En primer lugar, se analizó el medio de suspensión (PBS 1X) en el que se encontraban las partículas, como control negativo, como se observa en la figura 6A. En esta figura se observa la distribución de partículas detectadas en PBS 1X. La gráfica muestra que no hay eventos repetidos de algún tamaño específico que sugieran la presencia de VEs. Para la calibración del equipo se utilizaron perlas de 100 nm (Malvern; Polystyrene Latex Microspheres NTA 4088). Como era de esperarse, es posible ver una población enriquecida en el diámetro correspondiente a 100 nm (Fig. 6B y C). Posteriormente, se analizaron las fracciones previamente aisladas por cromatografía de exclusión molecular (SEC) comenzando el análisis a partir de la fracción 4 y terminando en la fracción 13.



C

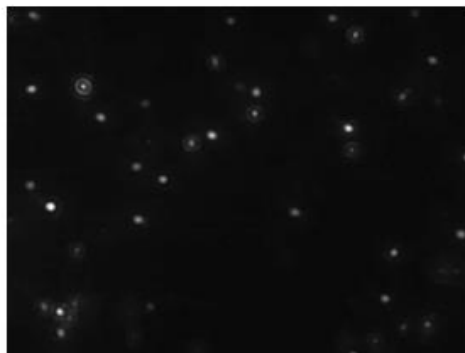


Figura 6. Calibración del equipo de NTA para determinar tamaño y concentración de partículas. A. Gráfico representativo de las partículas contenidas en el PBS 1X como control negativo. **B.** Gráfico representativo de perlas de calibración de 100 nm como control positivo de partículas (Malvern; Polystyrene Latex Microspheres NTA 4088). **C.** Imagen representativa de las perlas de calibración detectadas por el equipo.

El análisis por NTA de las fracciones obtenidas durante la cromatografía (SEC) indica que el número de partículas se incrementa considerablemente a partir de la fracción 7 con una concentración promedio de 5.03×10^9 partículas/mL que es mayor en relación con la concentración del vehículo 1.05×10^8 partículas/mL. Estas concentraciones continúan incrementando hasta la fracción 11 con 2.72×10^{10} partículas /mL (Fig. 7A y B), por lo cual fue necesario realizar diluciones específicas dependiendo de cada sujeto de estudio en un rango de 1:20 a 1:100 para obtener campos contables. A partir de la fracción 12 se observó que la concentración de vesículas comienza a decrecer (2.45×10^{10} partículas/mL), además cualitativamente se pudo identificar mayor turbidez en las muestras, lo cual podría indicar contaminación de otras moléculas. Estos datos permitieron proponer a las fracciones 7, 8, 9, 10 y 11 como las de mayor contenido de partículas y menor cantidad de contaminantes.

2. Análisis del tamaño de las VEs del plasma separadas mediante UF/SEC con corte molecular de 30 y 100 kDa

En relación con el tamaño de las partículas, se observa que la relación del avance de la cromatografía (número de fracción), es inversamente proporcional al tamaño de las partículas analizadas (Fig. 7 C y D), ya que en fracciones iniciales 4, 5, 6, 7 se reportan tamaños de partículas mayores tanto para UF-30 (111.23 nm, 114.48 nm, 113.55 nm) como para UF-100 (134.07 nm, 166.98 nm, 131.57 nm), en las fracciones 8, 9, 10 y 11, consideradas las fracciones intermedias se reportan tamaños dentro del rango de tamaño de las VEs (30-150 nm) (Zhang et al. 2020) UF-30 (114.52 nm, 110.22 nm, 105.82 nm, 100.68 nm), UF-100 (109.33 nm, 100.72 nm, 104.67 nm, 99.10 nm) y en fracciones avanzadas 12 y 13 se encuentran partículas de menor tamaño, UF-100 (89.50 nm, 83.44 nm), UF-100 (92.22 nm, 65.48 nm), (Fig. 7C). Cabe señalar que, debido a la interferencia por la turbidez de la muestra en estas fracciones, la cuantificación de las partículas y el tamaño por el equipo pueden ser poco precisas. Lo anterior sugiere que la UF-SEC permite agrupar y recolectar partículas de diferentes tamaños a partir de una muestra heterogénea, tal como se ha reportado previamente. Se determinó como fracciones de

interés la 7, 8, 9, 10 y 11, con el criterio de la homogeneidad de las partículas enriquecidas en un tamaño menos de 150 nm. Estas fracciones presentaron un tamaño intermedio tanto para UF-30 de como para UF-100 de 114.43, 114.52, 110.22, 105.82, 100.68 y 118.13, 109.33, 100.72, 104.67, 99.10 en la UF-100 y valores reportados en la literatura coincidentes con VEs pequeñas (30-150 nm) (Théry et al., 2018).

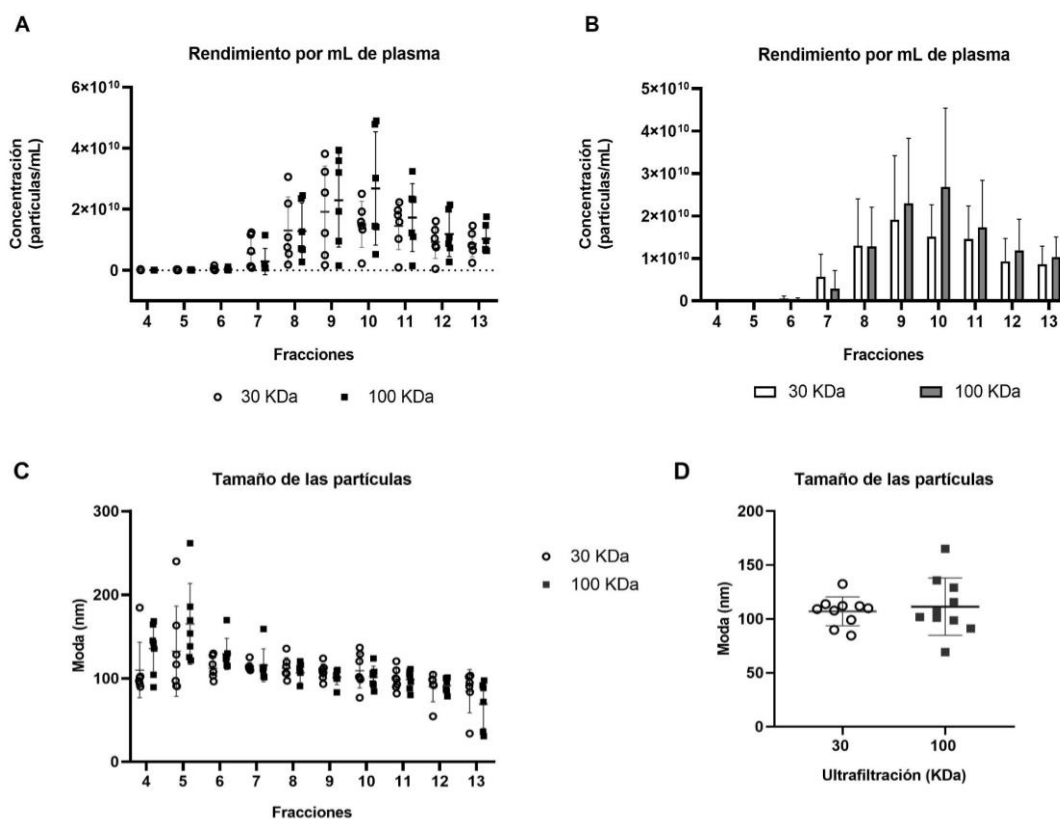


Figura 7. Diferencias en concentración y tamaño de partículas de plasma aisladas en fracciones provenientes de SEC. A y B. Rendimiento de las VEs aisladas por mL de plasma en las fracciones 4-13. (n = 7). **C y D.** Tamaño de las partículas aisladas contenidas en las fracciones 4-13. (n = 7), los resultados se muestran como el promedio \pm DS. Analizado en GraphPad Prism 8 usando una T student pareada.

Al analizar si el corte de 30 o 100 kDa permite una mayor purificación y recuperación de partículas, excluyendo a otro tipo de agregados que puedan ser contabilizados como partículas, no se observa una diferencia significativa entre los dos filtros, al menos en los individuos analizados, que nos indique mayor recuperación con un corte que con el otro, Lo que sí es posible observar es una tendencia de incremento en la concentración con el filtro de 100 kDa, como se muestra en la Figura 7. Igualmente, se observa una tendencia

en la cantidad de partículas de mayor tamaño en el filtro con corte de 100 kDa. Todo lo anterior sugiere que el uso de filtro con corte molecular de 30 kDa comparado con el de 100 kDa en la UF, no altera de manera importante el rendimiento de partículas recuperadas y el análisis del tamaño indica que el enriquecimiento en partículas homogéneas de tamaño de 30 a 120 nm, tamaño correspondiente a los exosomas, ocurre en las fracciones 7, 8, 9, 10 y 11.

3. Cuantificación de proteínas totales en las VEs de plasma

Las proteínas contenidas en las VEs se encuentran en su membrana y en su interior. Debido a que en el plasma existen proteínas muy concentradas como la albúmina o las lipoproteínas como Apo-A1, Apo-E1 y Apo-B, las cuales pueden ser co-separadas con las VEs, nos referiremos a proteína extravascular a todo el contenido proteico que no sea proveniente de la vesícula y sea propiamente del plasma. Por lo cual, fue de nuestro interés determinar la concentración de proteína total asociada a la vesícula y la proteína total extravascular mediante una cuantificación de proteínas en VEs lisadas y VEs sin lisar. Se analizaron las fracciones provenientes de SEC y UF con 30 y 100 kDa para poder detectar si existe diferencia en la cantidad de proteína contenida dentro de las VEs entre un filtro y el otro, para ello fue necesario utilizar un amortiguador de lisis que permitiera la disgregación de la membrana vesicular y expusiera estas moléculas. Al analizar las muestras de VEs lisadas fue posible detectar toda la proteína total de la muestra (tanto las proteínas no pertenecientes a la VE como aquellas que estén en la VE y puedan ser detectadas aun en la membrana de las VEs sin lisar). Como control positivo proteico, determinamos la cantidad de proteínas totales en el plasma sin ser ultrafiltrado y asilado por SEC de los individuos analizados. Como era de esperarse, la cantidad de proteínas detectadas en el plasma es significativamente mayor comparada con la proteína de las fracciones de UF-SEC (Fig. 8 A). La variabilidad entre los individuos analizados, a pesar de los criterios de inclusión empleados, no permitió que se observaran diferencias significativas en la cantidad de proteína encontrada entre UF-30 y 100 (Fig. 8 B). Por lo tanto, ambos cortes permiten identificar el enriquecimiento proteico esperando al haber mayor cantidad de VEs en estas fracciones presentes en el plasma sanguíneo. Cabe señalar que la contaminación proteica extravascular que aumenta conforme el avance de la SEC, no podría ser distinguida de aquella proteína proveniente de las VEs mediante este método de cuantificación.

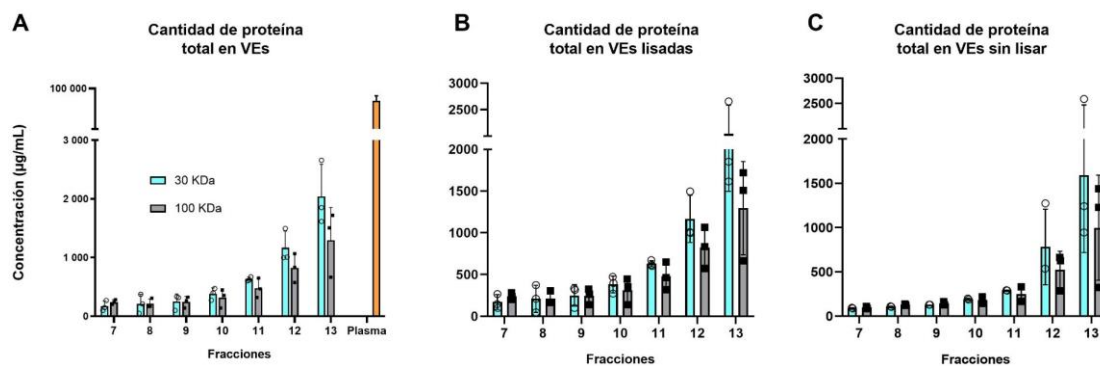


Figura 8. Diferencias en la cantidad de proteína presente en las fracciones aisladas con UF-30 y UF-100. **A.** Concentración de proteína total lisada presente en las fracciones (7-13) así como de plasma intacto. **B.** Concentración de proteína total (muestra lisada) presente en las fracciones (7-13) de plasma de UF-30 y 100. **C.** Concentración de proteína soluble (muestra sin lisar) presente en las fracciones (7-13) de plasma con UF-30 y 100. N = 3, los resultados se muestran como el promedio \pm DS. Analizado en GraphPad Prism 8 mediante una T student pareada.

4. Análisis molecular de lipoproteínas APO-A1 y APO-E en las VEs en aisladas por UF-SEC

Debido a que uno de los objetivos de este trabajo es determinar el co-aislamiento de proteínas extravesiculares que pudieran representar una interferencia en análisis posteriores de las VEs, fue necesario determinar la presencia de las lipoproteínas más abundantes en el plasma Apo-A1 y Apo-E, en las fracciones con mayor cantidad de partículas determinadas por NTA: (9, 10, 11 y 12). Estas lipoproteínas, junto con Apo-B1, se han descrito como los principales contaminantes de vesículas en muestras de plasma humano (Sun et al. 2019). Al realizar un análisis por western blot en cada fracción, se observó que la presencia de APO-E1 es constante en las fracciones 9, 10, 11 y 12 y de acuerdo con lo reportado, también se espera en grandes cantidades en la muestra de plasma (Fig. 9), lo cual sugiere un co-aislamiento de esta proteína en las VEs. Por otro lado, se observa que en las muestras analizadas no existe diferencia significativa independientemente de si el aislamiento se realizó con la UF30 o la UF100 kDa. APO-A1, fue detectable en la fracción 11-12 y en el plasma lo que sugiere que está lipoproteína se encuentra co-aislada con las VEs en fracciones avanzadas (Fig. 9), indicando el co-aislamiento HDL y quilomicrones a pesar de las condiciones de ayuno aplicadas.

5. La albúmina no se enriquece al utilizar UF y SEC

Se realizó el análisis molecular del contenido de albúmina en ambas muestras debido a que esta proteína es muy abundante en el plasma y tiene una función de transporte de ligandos endógenos y exógenos en el torrente sanguíneo. Se observó un enriquecimiento de esta proteína en el plasma mediante western blot, pero no fue detectable en las fracciones separadas por cromatografía. Esto sugiere que ambos filtros de ultrafiltración, combinados con la cromatografía, permiten la reducción de la albúmina hasta niveles no detectables por western blot y otras proteínas o en todas las fracciones analizadas (Fig. 9).

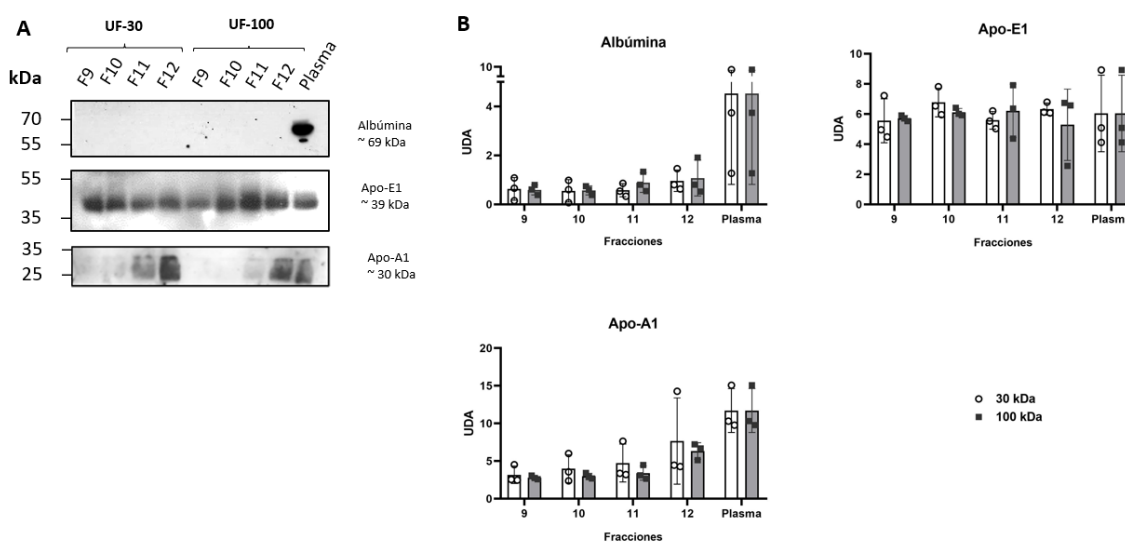


Figura 9. Principales contaminantes en las fracciones de vesículas extracelulares de plasma aisladas por UF-SEC. **A.** Apo-E1 (39 kDa) Apo-A1 (30 kDa) y albúmina (69 kDa) determinados por Western Blot en las fracciones 9-12 (50 μ L por fracción) ultrafiltradas con un poro de 30 kDa y 100 kDa, aisladas por SEC en muestras de vesículas extracelulares de plasma (10 μ g totales de proteína). Imágenes representativas en A de tres experimentos independientes (n=3). **B** Densitometría representada en unidades arbitrarias densitométrías (UDA). Imagen en B del promedio de tres experimentos independientes (n=3) \pm SD.

6. Marcadores de vesículas extracelulares presentes en líneas celulares

Para validar que las muestras contenían fracciones enriquecidas de vesículas extracelulares de acuerdo con los consensos internacionales establecidos por la MISEV, se realizó un western blot (WB) para analizar un enriquecimiento de estos biomarcadores en las VEs aisladas, para lo cual, analizamos a las tetraspaninas CD63 y CD9, y a TSG101 como representación de los elementos intraluminales. Así mismo, se analizó calnexina como un marcador de vesículas con biogénesis en el retículo endoplásmico, que indicaría la presencia de otras vesículas distintas a los exosomas. Se evaluó la

presencia de estas moléculas en lisados de proteínas totales de cuatro líneas celulares en donde ya se había reportado previamente una expresión importante de estos biomarcadores y que sirvieran de control positivo (Tognoli et al., 2023; Sun et al., 2019). Se cultivaron células HeLa, MCF-7, Jurkat y HEK293 y se obtuvieron lisados totales a partir de estos cultivos. Se cuantificó la cantidad de proteína total para realizar el análisis molecular.

Al evaluar la presencia de las tetraspaninas, mediante el análisis por WB, se encontró CD63 altamente expresado en las células HeLa (Fig. 10A) y CD9 se encontró expresado en estas mismas células y en también en las células MCF-7 (Fig. 10B). El marcador intracelular característico de los exosomas TSG101, se encontró expresado en la línea celular HEK293 (Fig. 10A) y el marcador de microvesículas provenientes del retículo endoplásmico, calnexina, se encontró en las células HeLa y MCF-7 (Fig. 10B). En la línea celular Jurkat solo se encontró el marcador de calnexina expresado en estas condiciones, pero bajo en relación con las líneas HeLa y MCF-7.

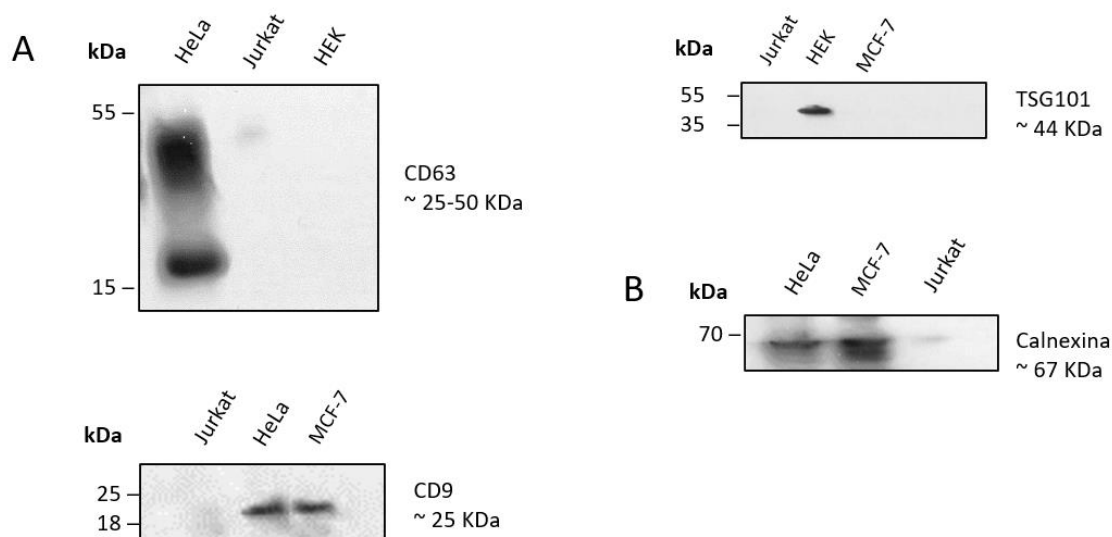


Figura 10. Identificación molecular de proteínas expresadas en las líneas celulares HeLa, Jurkat, HEK293 y MCF-7 para la caracterización de vesículas extracelulares **A** Presencia de CD63, CD9 y TSG-101 determinados por western blot en las líneas celulares HeLa, Jurkat, MCF-7 y HEK293 (50 μ L por pozo) (10 μ g totales de proteína). **B** Presencia de calnexina determinada por Western Blot en las líneas celulares HeLa, Jurkat y MCF-7 (50 μ L por pozo) (10 μ g totales de proteína). (n=3), Imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

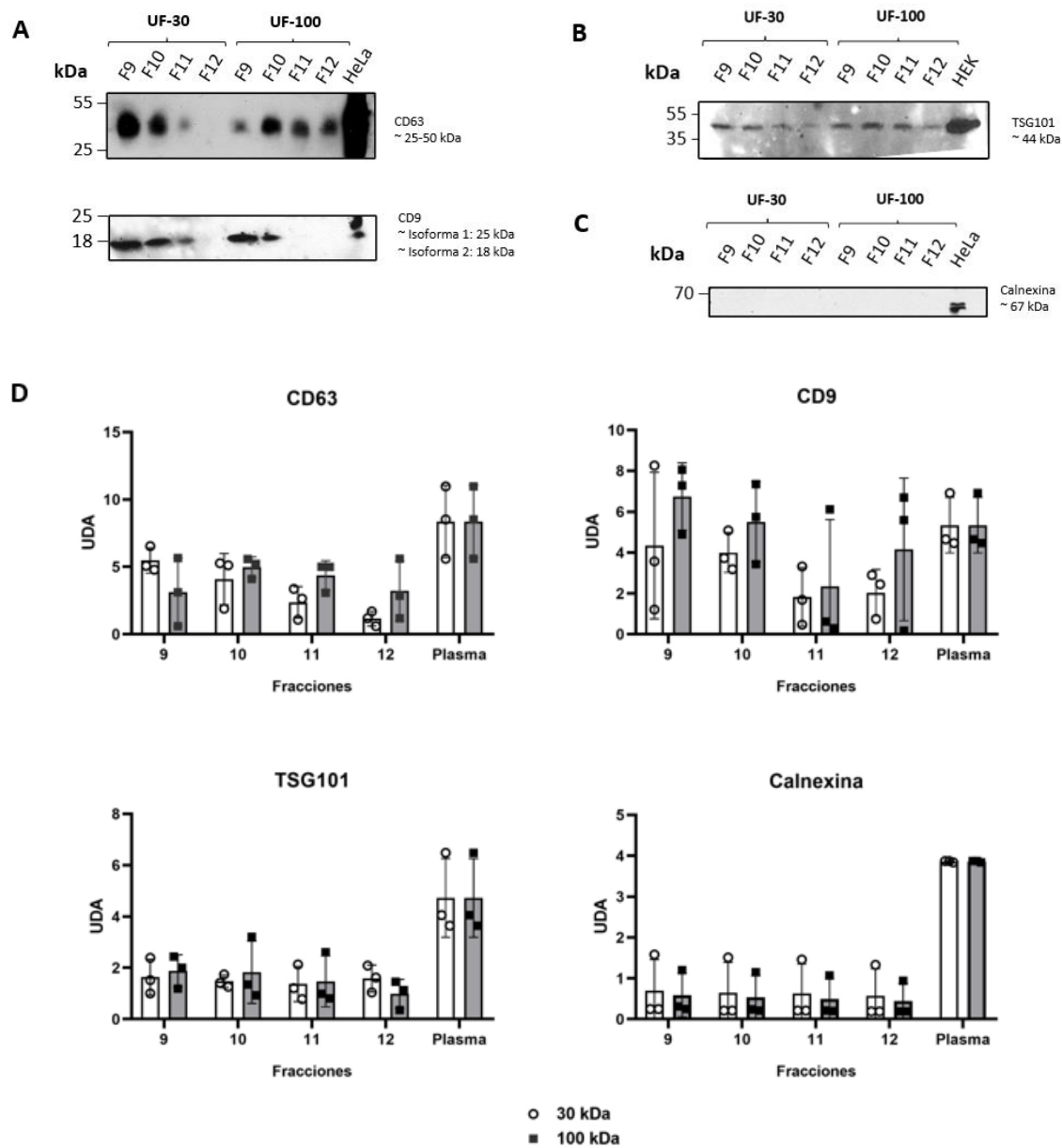


Figura 11. Análisis del contenido molecular de biomarcadores exomales en las fracciones obtenidas por SEC con UF 30 kDa y UF 100 kDa para la validación de presencia de exomas. A Tetraspaninas CD63 (21 kDa - 25 kDa) y CD9 (17 kDa-25 kDa) contenidas en vesículas extracelulares. B TSG101 (44 kDa - 37 kDa). C Calnexina (67 kDa). Se emplearon 50 μ L por pozo (10 μ g totales de proteína) para cada Western Blot (n=3). Imágenes en A, B y C representativas de tres experimentos independientes. D Densitometría representada en unidades arbitrarias densitométrías (UDA). Imagen en D del promedio de tres experimentos independientes (n=3) \pm SD.

7. Identificación de proteínas exosomales en las fracciones de vesículas extracelulares de plasma

Posteriormente a la identificación de las proteínas CD63, CD9, TSG101 y calnexina en los extractos celulares, se realizó el análisis molecular por WB para evaluar la presencia de estos marcadores de VEs pequeñas, en particular exosomas. A partir de la fracción 9 fue posible visualizar CD63 en ambas condiciones de UF (30 y 100) pero en mayor proporción en UF-100. Las fracciones en las que se observó mayor enriquecimiento de CD63 son la 9, la 10 y la 11. Al identificar CD9, se observó el enriquecimiento en la UF-100 pero tanto 30 como 100 comparten su enriquecimiento en la fracción 9 y 10 (Fig. 11A). TSG101 se observó en los dos cortes y se vio enriquecida en las fracciones 9 y 10 (Fig. 11B). La heterogeneidad en el contenido de las moléculas analizadas en las distintas fracciones de VEs sugiere que hay diferentes fenotipos de exosomas presentes en la muestra, es decir, no todas las VEs presentan las mismas combinaciones de proteínas trans e intra membranales. Posteriormente, para poder analizar la contribución de los exosomas o VEs de otra índole a las fracciones separadas por SEC, se analizó calnexina en las muestras de VEs, debido que se enriquece en VEs cuya biogénesis está relacionada con un procesamiento en el retículo endoplásmico. No se observó la presencia de esta proteína de acuerdo con el peso molecular calculado para esta (67 kDa) en ninguna de las cuatro fracciones analizadas (9-12) con ambos cortes de por UF-30 y 100, lo que indica que las VEs enriquecidas en plasma son en su mayoría VEs pequeñas como los exosomas (Fig.11C).

8. Análisis morfológico de VEs por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Debido a que la caracterización fenotípica de las VEs aisladas requiere una evaluación de su integridad, morfología y una visualización del tamaño, se observó la muestra aislada previamente con UF-100 y SEC en el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Una vez obtenida la muestra se realizó la tinción con acetato de uranilo al 10X, con las VEs en una dilución de 1:100 en PBS 1X filtrado a través de membranas de 0.1 μm . Se analizaron distintos campos de la muestra donde se observan diferentes tamaños de vesículas, los cuales coinciden con el tamaño de los exosomas, con una moda de 94 nm (Fig. 12). Estas estructuras son visibles debido a que el contraste negativo del acetato de uranilo presenta afinidad por las membranas lipídicas y se almacena a su alrededor sin penetrar en ella, la morfología no es completamente esférica debido a la deshidratación del procedimiento (Dong et al. 2020), pero sí se observa intacta la bicapa lipídica de las vesículas. Estas

imágenes sugieren que, de acuerdo con la morfología y el rango de tamaños de las VEs aisladas, algunas de estas podrían ser exosomas, sin embargo, aún queda por analizar en el futuro, la contribución de los exosomas a una muestra total de VEs aisladas.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que se aislaron vesículas extracelulares a partir de muestras de individuos humanos sanos, las cuales, de acuerdo con el análisis fenotípico, corresponde en tamaño a VEs que se encuentran en un rango de 40.18 - 302.34 (nm) para el aumento de 5kx (5 000 aumentos) y de 15.51 - 159.25 (nm) para el aumento de 15kx (15 000 aumentos).

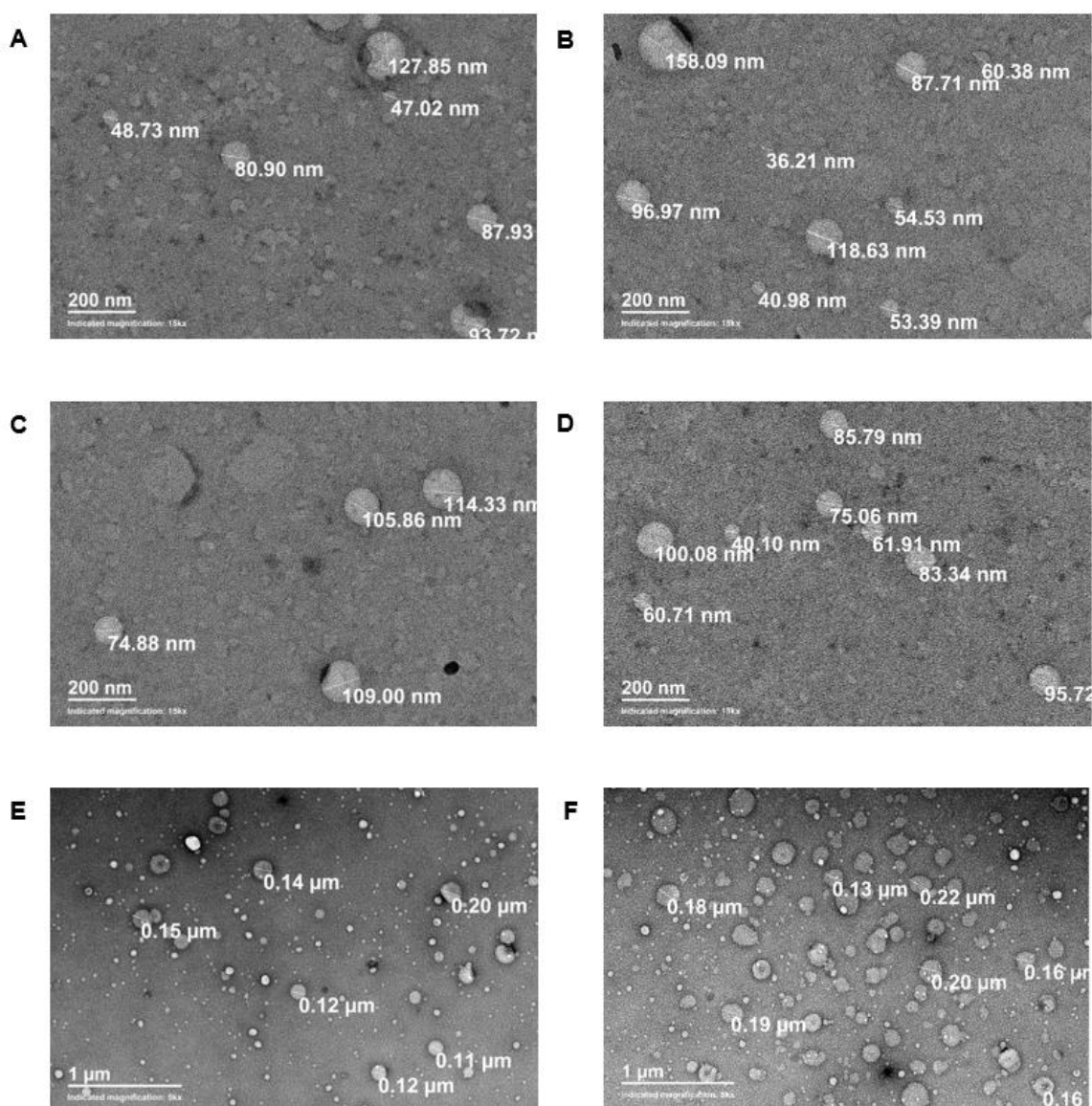


Figura 12. Vesículas extracelulares visualizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las VEs fueron aisladas por SEC y UF 100, se concentraron las fracciones 9, 10 y 11, las cuales fueron teñidas

negativamente con acetato de uranilo. **A, B, C y D.** Los rangos de VEs identificadas de: 40.18 a 302.34 (nm) en el aumento de 5kx (5 000 aumentos) imágenes representativas de cinco campos. **E y F.** Rangos de VEs identificadas de 15.51 a 159.25 (nm) en el aumento de 15kx (15 000 aumentos) imágenes representativas de diez campos. El diámetro de las vesículas extracelulares fue obtenido mediante el software ImageJ.

DISCUSIÓN

El estudio de las vesículas extracelulares se ha extendido durante los últimos años debido a su enorme potencial como fuente de biomarcadores con implicación diagnóstica pronóstica o terapéutica, además de sus funciones biológicas (Wang et al., 2020). Es por esto que los métodos de separación de VEs se han diversificado y existen muchas variantes metodológicas reportadas en la literatura. No existe un método de separación de VEs único, sino que el criterio para elegir la estrategia más adecuada dependerá de la aplicación subsecuente de esa muestra de VEs y del tipo de muestra biológica. Una de las implicaciones futuras de las VEs y su empleo como biomarcadores que acarrearán las VEs es la citometría de flujo aplicada a la detección de moléculas presentes en las VEs y actualmente se ha determinado que la presencia de algunos contaminantes afecta la interpretación de los datos de citometría de VEs del plasma (Lozano-Andrés et al., 2023; Botha et al., 2022). Es por esto, que el interés de este trabajo fue analizar el aislamiento con las VEs de las proteínas más abundantes en el plasma, a partir de una muestra de sangre. Las VEs se separaron mediante UF-SEC, con el objetivo de conocer cómo afecta dos parámetros de la UF-30 y 100 kDa el arrastre de proteínas no deseadas, junto con las vesículas extracelulares.

La cromatografía de exclusión molecular permite la recuperación de VEs y de contaminantes de plasma

Debido a que el plasma representa una muestra de gran complejidad, el aislamiento de las vesículas extracelulares a partir de una muestra de plasma no es trivial. Existen algunos factores que afectan la pureza de una muestra de VEs, tales como su alta densidad, la viscosidad de la muestra y la presencia de vesículas de distintos tipos. Particularmente en el caso del plasma existen gran cantidad de proteínas y lipoproteínas que hacen una composición altamente compleja y que complican su estudio (Stranska et al., 2018). En este trabajo se implementó una estrategia que combina la ultrafiltración (UF) con cromatografía de exclusión molecular (SEC) como método para la recuperación de VEs de plasma de individuos sanos, debido a que en el futuro quisiéramos aplicarlo a la

búsqueda de biomarcadores en el plasma de pacientes con distintos tipos de cáncer. En el estudio de las VEs provenientes de plasma sanguíneo es muy importante elegir un método de aislamiento que sea reproducible y que permita eliminar la mayor cantidad de moléculas o artefactos contaminantes de la muestra sin comprometer su integridad (Tsamchoe et al., 2023), considerando que más del 70% de las partículas contenidas en el plasma no son de naturaleza vesicular (Jung et al., 2021).

La ultrafiltración en combinación con la cromatografía de exclusión molecular empleadas en este trabajo es una alternativa adecuada para el aislamiento de vesículas, debido a que esta metodología permite eliminar partículas mayores a 200 nm de diámetro (Fig. 7C y D) y contaminantes proteicos co-aislados (Fig. 9 A y B) (Baranyai et al., 2015). La concentración de albúmina presente en plasma es de 32 a 52 g/l (Executive Committee of the German Medical Association on the Recommendation of the Scientific Advisory Board, 2016), por lo que se considera la proteína más abundante. Debido a esta alta concentración de albúmina, esta proteína se ha determinado como el principal contaminante de vesículas en plasma (Baranyai et al., 2015). En las VEs aisladas por UF-SEC, no se detectó la presencia de albúmina, lo cual sugiere una purificación óptima de proteínas mayores a 70 kDa, debido a que esta proteína tiene un peso molecular de 69 kDa. De manera interesante, esta metodología permite una eliminación importante de este contaminante el cual ya se había reportado previamente en muestras de exosomas (Baranyai et al., 2015) Por otro lado, existen otras proteínas de menor tamaño, como las lipoproteínas, en específico Apo-A y Apo-E (Fig. 9 A y B), cuya presencia indica un co-aislamiento con las VEs y la contaminación de estas fracciones con lípidos de alta y baja densidad (Karimi et al., 2018). Cabe resaltar que la Apo-A es una lipoproteína que compone a las partículas HDL y la Apo-E es una lipoproteína presente en VLDL, IDL, HDL (Sun et al., 2019; Moreno et al. 2006). La presencia de estas dos lipoproteínas sugiere un co-aislamiento de estas partículas en las muestras de VEs, lo que coincide con lo previamente reportado (Karimi et al., 2018). Es importante destacar que, aunque la presencia de estas proteínas no afecta la integridad de la muestra, sí dificulta la implementación de estudios individualizados, como la citometría de flujo (Andrés-Lozano et al., 2023). La citometría de flujo, la cual es una aplicación que se requiere implementar para el análisis de biomarcadores en VEs de plasma, requiere de la mayor pureza posible de la muestra, con la menor presencia de contaminantes, ya que estos pueden ocasionar

un marcaje inespecífico y comprometer la interpretación de los resultados (Botha et al., 2022).

La combinación de la ultrafiltración con corte de 100 kDa en combinación con la cromatografía de exclusión molecular permite la mayor eliminación de contaminantes en muestras de vesículas extracelulares

La separación de VEs depende de estrategias que permitan por un lado obtener la mayor concentración posible de las partículas, y por otro lado la mayor eliminación posible de otras moléculas. El combinar la SEC con la UF, con un corte molecular de ≤ 100 kDa, es una buena estrategia que permite concentrar la muestra de VEs, pero puede enmascarar la presencia de proteínas plasmáticas contaminantes (Stranska et al., 2018). Debido a ello, se comparó el aislamiento de las VEs con un corte de ≤ 100 kDa y otro de ≤ 30 kDa. Al realizar el análisis por NTA no se encontró diferencia significativa entre un corte u otro, pero se identificó una tendencia mayor en el tamaño de partículas recuperadas en el corte de 100 kDa (Fig. 7C y D), lo cual podría estar relacionado con una mejor limpieza de otras partículas de menor peso molecular, sin embargo aún es necesario analizar mayor cantidad de muestras, para poder determinar si, a pesar de la enorme variabilidad entre los individuos, esta mayor recuperación de partículas, es consistente en este corte molecular de 100 kDa ($2.06E+10$ partículas/mL). Por consiguiente, la concentración promedio de vesículas en el corte de 100 kDa fue mayor en comparación con el de 30 kDa ($1.54E+10$ partículas/mL). Es importante mencionar que el NTA es una metodología inespecífica para el análisis de partículas genéricas, entre las cuales pueden estar ubicadas las VEs, por lo cual, para concluir si hay un mayor o menor enriquecimiento de VEs y exosomas en las muestras analizadas, es necesaria una evaluación más específica de las VEs, como se puede lograr con la citometría de flujo.

Por otro lado, la caracterización molecular realizada en las VEs por western blot, demostró la presencia de la lipoproteína Apo-E, la cual se encontró de manera constante en las cuatro fracciones analizadas (Fig. 9A y B), lo cual indica un co-aislamiento de estas lipoproteínas con las VEs. Guillaume van Niel y colaboradores, demostraron que los exosomas pueden contener dicha lipoproteína, ya que está lipoproteína está asociada con vesículas intraluminales (ILV) de células de pigmento (van Niel et al., 2015). Mientras que la lipoproteína Apo-A1 fue identificada en mayor cantidad en fracciones avanzadas (11 y 12), otros estudios han observado está lipoproteína presente en todas las fracciones (7-

12), por lo cual, encontrarla solamente en fracciones avanzadas de la muestra es un acierto en la separación de las VEs mediante esta metodología. Esto sugiere una purificación adecuada al implementar UF-SEC, logrando la eliminación de HDL y quilomicrones. Estos complejos lipídicos proteicos son sintetizados en el hígado y son los encargados del transporte de moléculas insolubles como colesterol y triglicéridos del hígado a los tejidos periféricos, por ello su abundancia en plasma (Sun et al., 2019). Las fracciones 11 y 12 presentaron la mayor cantidad de contaminantes asociados en todos los individuos analizados. Por ello se propone a las fracciones 9 y 10 como las fracciones óptimas para separar y estudiar biomarcadores en las futuras muestras de VEs en pacientes.

En los biofluidos las subpoblaciones de vesículas son muy heterogéneas (Dong et al., 2020). Debido a esto es necesario la caracterización molecular de las vesículas para determinar la composición. En el caso de los exosomas se espera ver marcadores enriquecidos de tetraspaninas y proteínas asociadas a las subunidades ESCRT. Al evaluar estas moléculas encontramos a las tetraspaninas CD9 y CD63 y la proteína TSG101 intensificadas en las fracciones 9 y 10 en la UF-100, sugiriendo la mayor concentración de VEs en estas fracciones (Figura 11a, b y c). Por otro lado, la presencia de estas proteínas se asocia principalmente con VEs de tamaño pequeño entre 60-80 nm de diámetro, conocidos como exosomas pequeños ("small exosomes") (Saludas et al., 2022; Jung et al., 2021). La presencia de la tetraspanina CD9 es muy abundante en las muestras de VEs ya que se ha relacionado con la función del exosoma, por su participación en la producción exosomal, biogénesis, y selección del cargo vesicular. Se ha descrito que facilita la curvatura de la membrana durante su desprendimiento (budding) y en la dirección de proteínas asociadas al contenido de las vesículas (Umeda et al., 2020). De manera adyacente, la tetraspanina CD63 participa en procesos intracelulares como el tráfico endosomal y también en el cargo vesicular, se encuentra en mayor cantidad en el plasma de pacientes con leucemia, melanoma o cáncer colorrectal (Jung et al., 2021), además de ser considerada como un biomarcador importante sugerente de presencia de exosomas en el total de las VEs, por lo cual fue de gran importancia su evaluación en este trabajo. Otras moléculas de interés que sugirieran un enriquecimiento de exosomas en el total de las VEs, son la proteína del gen de susceptibilidad 101 (TSG101) y la ausencia de calnexina. TSG101 es una molécula muy importante para la supervivencia celular, su carencia en células ocasiona defectos en el ciclo celular,

anormalidades en estructuras endolisosomales y acumulación de vacuolas aerofágicas (Shin et al., 2022). Además, esta proteína se asocia con los cuerpos apoptóticos (Tenchov et al., 2022). La presencia de calnexina en fracciones de VEs sugiere contaminación con vesículas de organelos intracelulares (Moon et al., 2019). Moon y colaboradores, demostraron que las muestras provenientes del plasma humano con mayor acidificación, proveniente de la adición de proteasa K (PK), presentan una disminución en la presencia de moléculas como calnexina y la apolipoproteína Apo-A1. También se ha asociado la presencia de calnexina a muestras con un enriquecimiento de VEs de mayor tamaño (Saludas et al., 2022), por lo cual su ausencia en nuestros experimentos y la presencia constante de CD63 sugieren un enriquecimiento de VEs pequeñas, como los exosomas, aunque faltaría confirmarlo a través de la presencia de otros marcadores positivos (CD81, ALIX y sintenina1) y la no presencia de otros marcadores negativos (calreticulina y GM130) (Moon et al., 2019).

Es importante mencionar que en este estudio se utilizó Sefarosa CL-2b para la separación por cromatografía de exclusión molecular, la cual tiene un tamaño de poro aproximado de 75 nm, debido a esto partículas más pequeñas al corte se retienen en la matriz y se retardan para ser eluidas en fracciones avanzadas de la muestra (Hagel et al., 1996). De esta manera se separan a las partículas más pequeñas de las más grandes las cuales se eluyen primero conforme a su tamaño. Las fracciones obtenidas, se analizaron mediante el rastreo por nanopartículas (NTA), de esta manera fue posible estimar el tamaño de las partículas presentes en las diferentes fracciones. Una de las desventajas de esta técnica es que puede sobreestimar el tamaño (Kashkanova et al., 2023) y al no ser específica, no distingue entre vesículas y partículas no vesiculares, por lo cual, es necesario complementar el estudio por otras metodologías como la microscopía electrónica de transmisión y western blot (Karimi et al., 2018; Stranska et al., 2018). Al analizar la fracción 7 en comparación con la muestra del amortiguador de elución (Fig. 6 A), se observa la aparición de partículas que coinciden en tamaño con VEs pequeñas y cómo éstas se ven incrementadas conforme al progreso de la cromatografía, por lo que podemos sugerir que en las fracciones 9, 10 y 11 hay un enriquecimiento de exosomas y otras VEs (Fig. 7 A y B). Lo cual correlaciona con el análisis por TEM de las mismas fracciones. Las variaciones de tamaño determinadas por cada una de las dos metodologías se pueden asociar a las condiciones de hidratación y desecación en el que la muestra es analizada, por lo cual no siempre correlaciona el tamaño determinado por

cada una de estas metodologías (Stranska et al., 2018). Considerando esto, ambas técnicas nos permitieron confirmar la purificación de VEs pequeñas en un rango de 40 a 302 nm de diámetro con un tamaño promedio de 109 nm y una moda de 94 nm.

Estudios previos mediante espectrofotometría de masas, han permitido identificar partículas del tamaño de las VEs, así como también la mayor presencia de marcadores vesiculares en fracciones (8-12) aisladas por SEC (Karimi et al., 2018), lo cual correlaciona con nuestra identificación respecto al enriquecimiento de biomarcadores exosomales en las fracciones 9-11. La mayor concentración de VEs purificadas en plasma por SEC se ha reportado en la fracción 9 (Böing et al., 2014), lo cual coincide con nuestro análisis por NTA y con el enriquecimiento de los biomarcadores exosomales en las fracciones 9 a 11. De manera interesante, con las muestras analizadas, no podemos concluir aun si existen diferencias o no entre un tipo de ultrafiltración o no; sin embargo, de acuerdo con este estudio, hemos podido identificar que existe un enriquecimiento distinto entre las moléculas analizadas con el filtro de 30 kDa y las analizadas con el filtro de 100 kDa, lo que permitiría una mejor limpieza de proteínas menores a 100 kDa no provenientes en las VEs, por lo cual este trabajo sugiere que la UF-100 kDa, seguida de la cromatografía.

Es por lo anterior que el análisis de las VEs de plasma de individuos sanos nos puede dar una perspectiva general de su función en el organismo. En contraste, se ha demostrado que difieren en tamaño, frecuencias cargo en pacientes con alguna patología, por ejemplo, como el caso del GBM glioblastoma (Cumba Garcia et al., 2019). Finalmente, es importante mencionar que este trabajo hace una aportación muy relevante al estudio de las VEs de plasma y sus métodos de purificación, lo cual tiene una gran implicación en la creciente necesidad de obtener muestras cada vez más puras de VEs que permita identificar posibles biomarcadores relacionados con algunas enfermedades como el cáncer. Por otro lado, debido a que la citometría de flujo y otras estrategias de alto rendimiento representan metodologías potenciales para el estudio individualizado, se ha determinado que se requiere de un conocimiento molecular del contenido de proteínas contaminantes que se acarren en preparaciones de VEs, debido a su interferencia en el análisis (Andres-Lozano et al., 2023).

CONCLUSIONES

La mayor parte de partículas del plasma humano, no son de naturaleza vesicular, por lo que, para el estudio de las VEs es necesaria la optimización en la separación de estas partículas y agregados, para poder realizar ensayos funcionales y de caracterización molecular con una mejor interpretación biológica de la información. Esto enfatiza la necesidad de implementar un aislamiento riguroso que favorezca la integridad de las vesículas.

Este estudio demostró que la combinación de UF-100 y SEC permite la optimización de la pureza obtenida de las vesículas recuperando la mayor cantidad de vesículas extracelulares y reduciendo las principales proteínas y lipoproteínas presentes en plasma que contaminan las muestras, lo cual es de mucha utilidad para poder implementar posteriores análisis individualizados por otras aplicaciones enfocadas a la búsqueda de biomarcadores.

PERSPECTIVAS

Por lo cual algunas perspectivas que se proponen para estudios consecutivos de este trabajo son:

1. Aumentar el número de muestras de plasma de individuos sanos, para tener un mejor análisis estadístico y una mejor determinación de la variabilidad biológica en las VEs aisladas del plasma humano.
2. Analizar el contenido de otras moléculas que identifiquen a los exosomas tales como CD81, Alix, sintenina1, anexina y marcadores negativos como calreticulina o GM130.
3. Cuantificar el contenido de otras lipoproteínas que también se consideran contaminantes, como Apo-B, por su presencia en las partículas lipídicas.
4. Determinar el rendimiento y la pureza de preparaciones de VEs purificadas con UF 100-KDa y otras variantes de la SEC, como la sefarosa CL-4B.
5. Analizar el contenido de tetraspaninas en subpoblaciones de VEs aisladas a partir del procedimiento reportado en este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- Afonso, C. B., & Spickett, C. M. (2019). Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation. In *Redox Biology* (Vol. 23). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101066>
- Ahmed, W., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2021). Tetraspanins as Potential Therapeutic Candidates for Targeting Flaviviruses. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630571>
- Baranyai, T., Herczeg, K., Onódi, Z., Voszka, I., Módos, K., Marton, N., Nagy, G., Mäger, I., Wood, M. J., El Andaloussi, S., Pálincás, Z., Kumar, V., Nagy, P., Kittel, Á., Buzás, E. I., Ferdinandy, P., & Giricz, Z. (2015). Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS ONE*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145686>
- Bettin, B. A., Varga, Z., Nieuwland, R., & van der Pol, E. (2023). Standardization of extracellular vesicle concentration measurements by flow cytometry: the past, present, and future. In *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jth.2023.04.042>
- Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
- Botha, J., Handberg, A., & Simonsen, J. B. (2022). Lipid-based strategies used to identify extracellular vesicles in flow cytometry can be confounded by lipoproteins: Evaluations of annexin V, lactadherin, and detergent lysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, *11*(4). <https://doi.org/10.1002/jev2.12200>
- Buzas, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A., & Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 356–364). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.19>
- Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of biological chemistry*, *166*(1), 189–197.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., & Sadoul, R. (2002). Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 29108–29115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204019200>
- Cumba Garcia, L. M., Peterson, T. E., Cepeda, M. A., Johnson, A. J., & Parney, I. F. (2019). Isolation and Analysis of Plasma-Derived Exosomes in Patients With Glioma. *Frontiers in Oncology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00651>
- Dashevsky, O., Varon, D., & Brill, A. (2009). Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *International Journal of Cancer*, *124*(8), 1773–1777. <https://doi.org/10.1002/ijc.24016>
- Diaz, G., Bridges, C., Lucas, M., Cheng, Y., Schorey, J. S., Dobos, K. M., & Kruh-Garcia, N. A. (2018). Protein digestion, ultrafiltration, and size exclusion chromatography to optimize the isolation of exosomes from human blood plasma and serum. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(134). <https://doi.org/10.3791/57467>

- Ding, W. Y., Prottly, M. B., Davies, I. G., & Lip, G. Y. H. (2022). Relationship between lipoproteins, thrombosis, and atrial fibrillation. In *Cardiovascular Research* (Vol. 118, Issue 3, pp. 716–731). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab017>
- Dong, L., Zieren, R. C., Horie, K., Kim, C. J., Mallick, E., Jing, Y., Feng, M., Kuczler, M. D., Green, J., Amend, S. R., Witwer, K. W., de Reijke, T. M., Cho, Y. K., Pienta, K. J., & Xue, W. (2020). Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/jev2.12044>
- Dvorak, H. F., Quay, S. C., Orenstein, N. S., Dvorak, A. M., Hahn, P., Bitzer, A. M., & Carvalho, A. C. (1981). Tumor shedding and coagulation. *Science (New York, N.Y.)*, 212(4497), 923–924. <https://doi.org/10.1126/science.7195067>
- Fonseka, P., & Mathivanan, S. (2023). Extracellular Vesicles Biogenesis, Cargo Sorting and Implications in Disease Conditions. In *Cells* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12020280>
- Guerreiro, E. M., Vestad, B., Steffensen, L. A., Aass, H. C. D., Saeed, M., Øvstebø, R., Costea, D. E., Galtung, H. K., & Søland, T. M. (2018). Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PLoS ONE*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204276>
- Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunological Reviews*, 251(1), 125–142. <https://doi.org/10.1111/imr.12013>
- Hagel, L., Ostberg, M., & Andersson, T. (1996). JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A Apparent pore size distributions of chromatography media. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 743).
- Irmer, B., Chandrabalan, S., Maas, L., Bleckmann, A., & Menck, K. (2023). Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies as Biomarkers for Solid Tumors. In *Cancers* (Vol. 15, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers15041307>
- Izquierdo-Serrano, R., Fernández-Delgado, I., Moreno-Gonzalo, O., Martín-Gayo, E., Calzada-Fraile, D., Ramírez-Huesca, M., Jorge, I., Camafeita, E., Abián, J., Vicente-Manzanares, M., Veiga, E., Vázquez, J., & Sánchez-Madrid, F. (2022). Extracellular vesicles from *Listeria monocytogenes*-infected dendritic cells alert the innate immune response. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.946358>
- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reza, R., Turner, A. R., Ratajczak, J., Emerson, S. G., Kowalska, M. A., & Ratajczak, M. Z. (2001). *Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment.*
- Jin, Y., Xing, J., Xu, K., Liu, D., & Zhuo, Y. (2022). Exosomes in the tumor microenvironment: Promoting cancer progression. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1025218>
- Joseph, J., Premeaux, T. A., Pinto, D. O., Rao, A., Guha, S., Panfil, A. R., Carey, A. J., Ndhlovu, L. C., Bergmann-Leitner, E. S., & Jain, P. (2023). Retroviral b-Zip protein (HBZ) contributes to the release of soluble and exosomal immune checkpoint molecules in the context of neuroinflammation. *Journal of Extracellular Biology*, 2(7). <https://doi.org/10.1002/jex2.102>
- Jung, J. H., Back, W., Yoon, J., Han, H., Kang, K. W., Choi, B., Jeong, H., Park, J., Shin, H., Hur, W., Choi, Y., Hong, S., Kim, H. K., Park, Y., & Park, J. H. (2021). Dual size-exclusion

- chromatography for efficient isolation of extracellular vesicles from bone marrow derived human plasma. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80514-8>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. In *Science* (Vol. 367, Issue 6478). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Karimi, N., Cvjetkovic, A., Jang, S. C., Crescitelli, R., Hosseinpour Feizi, M. A., Nieuwland, R., Lötvall, J., & Lässer, C. (2018). Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(15), 2873–2886. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2773-4>
- Karimi, N., Dalirfardouei, R., Dias, T., Lötvall, J., & Lässer, C. (2022). Tetraspanins distinguish separate extracellular vesicle subpopulations in human serum and plasma – Contributions of platelet extracellular vesicles in plasma samples. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(5). <https://doi.org/10.1002/jev2.12213>
- Kashkanova, A. D., Blessing, M., Reischke, M., Baur, J. O., Baur, A. S., Sandoghdar, V., & Van Deun, J. (2023). Label-free discrimination of extracellular vesicles from large lipoproteins. *Journal of Extracellular Vesicles*, 12(8). <https://doi.org/10.1002/jev2.12348>
- Kim, O., Hwangbo, C., Tran, P. T., & Lee, J. H. (2022). Syntenin-1-mediated small extracellular vesicles promotes cell growth, migration, and angiogenesis by increasing onco-miRNAs secretion in lung cancer cells. *Cell Death and Disease*, 13(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04594-2>
- Kolonics, F., Szeifert, V., Timár, C. I., Ligeti, E., & Lőrincz, Á. M. (2020). The Functional Heterogeneity of Neutrophil-Derived Extracellular Vesicles Reflects the Status of the Parent Cell. In *Cells* (Vol. 9, Issue 12). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9122718>
- Laurence Zitvogel, C. Flamen. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature*.
- Li, G., Chen, T., Dahlman, J., Eniola-Adefeso, L., Ghiran, I. C., Kurre, P., Lam, W. A., Lang, J. K., Marbán, E., Martín, P., Momma, S., Moos, M., Nelson, D. J., Raffai, R. L., Ren, X., Sluijter, J. P. G., Stott, S. L., Vunjak-Novakovic, G., Walker, N. D., ... Sundd, P. (2023). Current challenges and future directions for engineering extracellular vesicles for heart, lung, blood and sleep diseases. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 12, Issue 2). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jev2.12305>
- Lozano-Andrés, E., Enciso-Martinez, A., Gijsbers, A., Ridolfi, A., Van Niel, G., Libregts, S. F. W. M., Pinheiro, C., van Herwijnen, M. J. C., Hendrix, A., Brucale, M., Valle, F., Peters, P. J., Otto, C., Arkesteijn, G. J. A., & Wauben, M. H. M. (2023). Physical association of low density lipoprotein particles and extracellular vesicles unveiled by single particle analysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, 12(11), Article 12376. <https://doi.org/10.1002/jev2.12376>
- Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., Paris, L., Abalsamo, L., Colone, M., Molinari, A., Podo, F., Rivoltini, L., Ramoni, C., & Fais, S. (2012). Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2833–2842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101988>
- Maravillas-Montero, José & Martinez Cortes, Ismael. (2017). Regulation of immune responses by exosomes derived from antigen presenting cells. *Revista alergía México* (Tecamachalco, Puebla, México: 1993). 64. 463-476.

- Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R435–R444). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>
- Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L. T., Melo, C. A., Lucci, A., Ivan, C., Calin, G. A., & Kalluri, R. (2014). Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26(5), 707–721. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.005>
- Milane, L., Singh, A., Mattheolabakis, G., Suresh, M., & Amiji, M. M. (2015). Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 219, pp. 278–294). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.029>
- Mizenko, R. R., Brostoff, T., Rojalin, T., Koster, H. J., Swindell, H. S., Leiserowitz, G. S., Wang, A., & Carney, R. P. (2021). Tetraspanins are unevenly distributed across single extracellular vesicles and bias sensitivity to multiplexed cancer biomarkers. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00987-1>
- Mladenović, D., Khamari, D., Kittel, Á., Koort, K., Buzás, E. I., & Zarovni, N. (2023). Acidification of blood plasma facilitates the separation and analysis of extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 21(4), 1032–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.01.007>
- Moon, S., Shin, D. W., Kim, S., Lee, Y. S., Mankhong, S., Yang, S. W., Lee, P. H., Park, D. H., Kwak, H. B., Lee, J. S., & Kang, J. H. (2019). Enrichment of exosome-like extracellular vesicles from plasma suitable for clinical vesicular miRNA biomarker research. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/jcm8111995>
- Okada-Tsuchioka, M., Kajitani, N., Omori, W., Kurashige, T., Boku, S., & Takebayashi, M. (2022). Tetraspanin heterogeneity of small extracellular vesicles in human biofluids and brain tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 627, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.025>
- Rädler, J., Gupta, D., Zickler, A., & Andaloussi, S. EL. (2023). Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading. In *Molecular Therapy*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.013>
- Ratajczak, M. Z., & Ratajczak, J. (2020). Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? In *Leukemia* (Vol. 34, Issue 12, pp. 3126–3135). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>
- Reclusa, P., Sirera, R., Araujo, A., Giallombardo, M., Valentino, A., Sorber, L., Bazo, I. G., Pauwels, P., & Rolfo, C. (2016). Exosomes genetic cargo in lung cancer: A truly Pandora's box. In *Translational Lung Cancer Research* (Vol. 5, Issue 5, pp. 483–491). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.10.06>
- Ruzycka-Ayoush, M., Nowicka, A. M., Kowalczyk, A., Gluchowska, A., Targonska, A., Mosieniak, G., Sobczak, K., Donten, M., & Grudzinski, I. P. (2023). Exosomes derived from lung cancer cells: Isolation, characterization, and stability studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106369>
- Saludas, L., Garbayo, E., Ruiz-Villalba, A., Hernández, S., Vader, P., Prósper, F., & Blanco-Prieto, M. J. (2022). Isolation methods of large and small extracellular vesicles derived from cardiovascular progenitors: A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 170, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.12.012>

- Shimaoka, M., Kawamoto, E., Gaowa, A., Okamoto, T., & Park, E. J. (2019). Connexins and integrins in exosomes. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11010106>
- Shin, H., Park, D., Kim, J., Nam, M. Y., Kwon, S., Um, D. E., Oh, J. E., Youn, E., Shim, Y. H., Wagner, K. U., Jun, J. H., Kim, H. R., Song, H., & Lim, H. J. (2022). Peripubertal requirement of Tsg101 in maintaining the integrity of membranous structures in mouse oocytes. *Cell Proliferation*, 55(10). <https://doi.org/10.1111/cpr.13288>
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Stranska, R., Gysbrechts, L., Wouters, J., Vermeersch, P., Bloch, K., Dierickx, D., Andrei, G., & Snoeck, R. (2018). Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1374-6>
- Sun, Y., Saito, K., & Saito, Y. (2019). Lipid profile characterization and lipoprotein comparison of extracellular vesicles from human plasma and serum. *Metabolites*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/metabo9110259>
- Tang, Q., Xiao, X., Li, R., He, H., Li, S., & Ma, C. (2022). Recent Advances in Detection for Breast-Cancer-Derived Exosomes. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27196673>
- Tenchov, R., Sasso, J. M., Wang, X., Liaw, W. S., Chen, C. A., & Zhou, Q. A. (2022). Exosomes Nature's Lipid Nanoparticles, a Rising Star in Drug Delivery and Diagnostics. In *ACS Nano* (Vol. 16, Issue 11, pp. 17802–17846). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c08774>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Jose Alcaraz, M., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Bach, M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., ... Jung, S. (2018). *Journal of Extracellular Vesicles 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*. <https://www.tandfonline.com/loi/zjev20>
- Tian, W., Liu, S., & Li, B. (2019). Potential Role of Exosomes in Cancer Metastasis. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4649705>
- Timár, C. I., Lorincz, Á. M., Csépanyi-Kömi, R., Vályi-Nagy, A., Nagy, G., Buzás, E. I., Iványi, Z., Kittel, Á., Powell, D. W., McLeish, K. R., & Ligeti, E. (2013). Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121(3), 510–518. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431114>
- Tiwari, S., Kumar, V., Randhawa, S., & Verma, S. K. (2021). Preparation and characterization of extracellular vesicles. *American Journal of Reproductive Immunology*, 85(2). <https://doi.org/10.1111/aji.13367>
- Todorova, D., Simoncini, S., Lacroix, R., Sabatier, F., & Dignat-George, F. (2017). Extracellular vesicles in angiogenesis. In *Circulation Research* (Vol. 120, Issue 10, pp. 1658–1673). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309681>

- Tognoli, M. L., Dancourt, J., Bonsergent, E., Palmulli, R., de Jong, O. G., Van Niel, G., Rubinstein, E., Vader, P., & Lavieu, G. (2023). Lack of involvement of CD63 and CD9 tetraspanins in the extracellular vesicle content delivery process. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04911-1>
- Toribio, V., & Yáñez-Mó, M. (2022). Tetraspanins interweave EV secretion, endosomal network dynamics and cellular metabolism. *European Journal of Cell Biology*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151229>
- Tóth, E., Turiák, L., Visnovitz, T., Cserép, C., Mázló, A., Sódar, B. W., Försönits, A. I., Petővári, G., Sebestyén, A., Komlósi, Z., Drahos, L., Kittel, Á., Nagy, G., Bácsi, A., Dénes, Á., Gho, Y. S., Szabó-Taylor, K., & Buzás, E. I. (2021). Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(11). <https://doi.org/10.1002/jev2.12140>
- Tsamchoe, M., Petrillo, S., Lazaris, A., & Metrakos, P. (2023). Isolation of extracellular vesicles from human plasma samples: The importance of controls. *Biotechnology Journal*, 18(6). <https://doi.org/10.1002/biot.202200575>
- Umeda, R., Satouh, Y., Takemoto, M., Nakada-Nakura, Y., Liu, K., Yokoyama, T., Shirouzu, M., Iwata, S., Nomura, N., Sato, K., Ikawa, M., Nishizawa, T., & Nureki, O. (2020). Structural insights into tetraspanin CD9 function. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15459-7>
- Van Niel, G., Bergam, P., Di Cicco, A., Hurbain, I., Lo Cicero, A., Dingli, F., Palmulli, R., Fort, C., Potier, M. C., Schurgers, L. J., Loew, D., Levy, D., & Raposo, G. (2015). Apolipoprotein E Regulates Amyloid Formation within Endosomes of Pigment Cells. *Cell Reports*, 13(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.057>
- Wang, Y. T., Shi, T., Srivastava, S., Kagan, J., Liu, T., & Rodland, K. D. (2020). Proteomic analysis of exosomes for discovery of protein biomarkers for prostate and bladder cancer. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 9, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12092335>
- Welsh, J.A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R.,...Witwer, K.W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, 13, e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- Wolf, P. (1967). *The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma*. *Br J Haematol*. 1967 May;13(3):269-88. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x. PMID: 6025241.
- Wu, J. Y., Li, Y. J., Hu, X. Bin, Huang, S., & Xiang, D. X. (2021). Preservation of small extracellular vesicles for functional analysis and therapeutic applications: a comparative evaluation of storage conditions. *Drug Delivery*, 28(1), 162–170. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1869866>
- Yang, Y., Wang, Y., Wei, S., Zhou, C., Yu, J., Wang, G., Wang, W., & Zhao, L. (2021). Extracellular vesicles isolated by size-exclusion chromatography present suitability for RNomics analysis in plasma. *Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02775-9>
- Yates, A. G., Pink, R. C., Erdbrügger, U., Siljander, P. R. M., Dellar, E. R., Pantazi, P., Akbar, N., Cooke, W. R., Vatish, M., Dias-Neto, E., Anthony, D. C., & Couch, Y. (2022). In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part

II: Pathology. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 11, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jev2.12190>

Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 15, pp. 6917–6934). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. In *Cell and Bioscience* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282>

APÉNDICES

APÉNDICE 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de los individuos

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Edad 18 a 40 años.	Menores de edad y adultos mayores de 40 años.
Adultos aparentemente sanos sin enfermedades crónicas declaradas.	Adultos con procesos infecciosos, inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas.
Sin ingesta de medicamentos recurrentes.	Con ingesta de medicamentos recurrentes.
Mujeres y hombres.	Mujeres embarazadas o con otro tipo de alteraciones hormonales declaradas.
Ayuno de 8 horas mínimo.	Ingesta de alimentos recientes.

APÉNDICE 2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. Sefarosa 2CL-B

Sigma-Aldrich (cat. CL2B300-500)

2. Antibiótico-antimicótico 1X

Esta solución contiene 10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B Gibco (cat. 15240096).

3. Solución RCF 10x

EDTA 0.5 M, TRIS 1M, NaCl 5M, NaF 0.5 M y Na₃VO₄ 0.2M.

4. Triton X-100

Bio Rad (cat. #161-0407) Non-ionic detergent octylphenoxypoly ethoxyethanol.

5. Deoxicolato de sodio 15%

Sigma (cat. 30970).

6. Cóctel de Inhibidores de proteasas

Thermo Scientific (cat. 78430) Contiene AEBSF 1mM, Aprotinin 800 nM, Bestatin 50µM, E64 15µM, Leupeptin 20 µm, Pepstatin A 10µM y EDTA mM).

7. Solución 30% Acrilamida/Bis

Bio Rad (cat. #161-0156) 3.3% Crosslinker electrophoresis purity reagent.

8. Tris base

Tris 1.5 M (Bio Rad cat. #1610716) disuelto en agua miliQ a pH 8.8 para el gel separador y a pH 6.8 para el gel concentrador.

9. Persulfato de amonio

Persulfato de amonio disuelto en agua miliQ al 10% (Bio Rad cat.161-0700).

10. Lauril sulfato sódico dodecil (SDS)

SDS (Calbiochem cat.428015) disuelto en agua miliQ al 10 %.

11. TEMED

El tetrametiletenodiamina (TEMED) (Research Organics cat.9658T Lote: X62969) fue empleado como catalizador para la polimerización del gel de bis-acrilamida.

12. Preparación de gel de poliacrilamida al 10%

H₂O, Acrilamida 30%, Tris (1.5M, pH 8.8), SDS 10%, persulfato de amonio (10%), y TEMED.

12. Amortiguador de Corrida

Se preparó el amortiguador de corrida 5x para realizar la electroforesis. Se utilizó Tris 25 mM (Bio Rad cat. #1610716), Glicina (Bio Rad cat. #1610718) 192 mM y SDS al 0.2%, disuelto en agua miliQ. a un pH de 8.3. Posteriormente se preparó el amortiguador de corrida a 1X, se diluyó el amortiguador de Tris/Glicina 5X en agua miliQ y se agregó SDS al 10%.

13. Amortiguador de Carga

Para preparar el amortiguador de carga 5x se utilizó Tris/HCL al 1 molar con pH 6.8, SDS al 4%, Azul de bromofenol 0.2%, Glicerol al 80%, Ditiotreitól 1M y agua miliQ y se almacenó a temperatura ambiente. Al utilizarlo se agregó beta mercaptoetanol a 200 mM, cuando se trabajó condiciones reductoras.

14. Amortiguador de Transferencia

Para preparar el amortiguador de transferencia se utilizó Tris 25 mM (Bio Rad Cat. #1610716), Glicina (Bio Rad cat. #1610718) 192 mM al 1X y se agregó metanol

20% (Wöhler cat. W7561) y se aforó en agua miliQ. Se almaceno a -4° C para mejorar la transferencia.

15. TBS

Se preparó una solución de TBS al 10x, disolviendo el cloruro de sodio (NaCl Wöhler cat. W7145), Tris Base en agua miliQ y se ajustó el pH a 7.6 con HCL. Posteriormente se llevó a una concentración de 1x, partiendo de TBS 10x en agua miliQ. Se almacenó a temperatura ambiente.

16. Azul Coomassie

Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.05%, metanol (Wöhler cat. W7561) al 50%, ácido glacial (J.T. Baker cat. 9608-02) al 10 %. Una vez incorporado se filtró la solución y se almacenó a temperatura ambiente.

17. Rojo de Ponceau

Ácido acético glacial (J.T. Baker cat. 9608-02) (0.1%), Rojo de Ponceau S (Sigma P-3504) 10.87mM (0.1%) en agua miliQ. Una vez disuelto se almacenó a temperatura ambiente.

18. Solución desteñidora

Para desteñir los geles previamente teñidos con Coomassie se usó una solución desteñidora elaborada con metanol (Wöhler cat. W7561) al 30% y ácido acético glacial (J.T. Baker cat. 9608-02) (CH₃COOH gl.) al 10% en agua mili Q.

19. Solución de bloqueo

Blotting-Grade Blocker. Bio Rad (cat. #1706404) Nonfat dry milk.

20. Solución de revelado

Carestream Dental GBX Revelador y Reforzador (cat. 5158597).

21. Solución fijadora

Carestream Dental GBX Fijador y Reforzador (cat. 5158605).

22. Reactivo quimio luminiscente.

Thermo Fisher. Super Signal West Femto Maxium Sensitivity Substrate (cat.34095).

23. Membranas de nitrocelulosa

Bio-Rad Trans-Blot Transfer Medium (0.45 micron) (cat. 162-0115) Lot. 8102.

24. Solución RIPA

Para preparar RIPA 5x se preparó una solución de RCF 10x, Triton 100, SDS al 10%, desoxicolato, cóctel de inhibidores de proteasas 1x y agua desionizada milli Q.

APÉNDICE 3. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el análisis por western blot

Proteína	Marcador	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
APO-A1	Lipoproteína	Anti-Apolipoprotein A1 antibody [EPSISR 27] ab151710	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG H & L (HRP) ab97051	1:30 000
APO-E1	Lipoproteína	Anti-Apolipoprotein E antibody [EPR 19392] ab183597	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG H & L (HRP) ab97051	1:30 000
Albúmina	Albúmina	Anti-Human Serum Albumin antibody [15C7] (ab10241)	1:500	Goat anti Mouse Cat. ab205719	1:40 000
CD63	Tetraspanina	Anti-CD63 antibody [KILL150A] (ab271286) Lot. GR33896341	1:500	Goat anti Mouse Cat. ab205719	1:40 000
CD9	Tetraspanina	Anti-CD9 antibody [EPR23105-125] (ab263019) Lot. GR3293118	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG H & L (HRP) ab97051	1:30 000
TSG101	Exosoma (intravesicular)	Anti-TSG101 antibody [EPR7130(B)] (ab125011) Lot.GR2993322	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG H & L (HRP) ab97051	1:40 000
Calnexina	Retículo endoplásmico	Anti-Calnexin antibody - ER Marker (ab22595) Lot.GR3298210	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG H & L (HRP) ab97051	1:30 000