



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis comparativo de técnicas de aislamiento y
purificación de vesículas extracelulares**

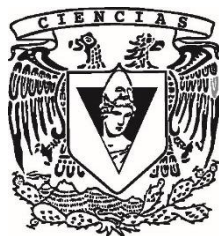
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

JUAN ALFONSO MARTÍNEZ GREENE



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

Cd. Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

**Juan Alfonso
Martínez Greene
552-307-2862
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
41510362-4**

Integrantes del Jurado

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz

Dr. Eduardo Martínez Martínez

Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez

Dr. Ricardo David Quiroz Báez

Índice

Resumen	04
Introducción	05
Antecedentes	07
Justificación, Hipótesis y Objetivos	17
Materiales y Métodos	18
Resultados	24
Discusión	43
Conclusiones	48
Bibliografía	49

Resumen

La comunicación celular es fundamental para el funcionamiento adecuado de todos los tejidos de un organismo. Una forma de comunicación intercelular se da a través de la producción y secreción de vesículas extracelulares. Recientemente, se ha observado que estas vesículas intervienen en una variedad de procesos fisiológicos como la angiogénesis, la curación de heridas y la respuesta inmunológica. Sin embargo, las técnicas de aislamiento que actualmente se utilizan no garantizan un rendimiento y grado de pureza adecuado, dificultando el estudio de la composición y función de las vesículas extracelulares. El presente estudio tiene el objetivo comparar tres diferentes técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares: la ultracentrifugación, la precipitación y la cromatografía de exclusión por tamaño. Con base en esta comparación, se diseñó un nuevo protocolo para obtener vesículas extracelulares que puedan ser utilizadas en ensayos funcionales y en estudios proteómicos. Este nuevo protocolo permitió aislar dos subgrupos de vesículas que potencialmente desempeñan diferentes funciones.

Palabras clave: vesículas extracelulares, exosomas, ultracentrifugación, precipitación, cromatografía de exclusión por tamaño, proteómica.

Introducción

En los últimos años, el estudio de las vesículas extracelulares (EVs, por sus siglas en inglés), compuestas por exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, ha cobrado interés por su enorme potencial para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, uno de los principales retos ha sido lograr su aislamiento con un alto grado de pureza para el desarrollo de aplicaciones biomédicas. La técnica más utilizada para su aislamiento es la ultracentrifugación [1], la cual se basa en los diferentes coeficientes de sedimentación de las partículas en solución para separarlas por medio de distintas velocidades y tiempos de centrifugación. No obstante, la ultracentrifugación no elimina por completo las proteínas solubles o complejos proteicos [2]. Por ello, es conveniente buscar nuevas alternativas que permitan determinar con precisión la composición proteica de las EVs para la identificación de biomarcadores, así como el estudio de sus posibles blancos funcionales.

Recientemente, han surgido otros métodos para aislar EVs con el objetivo de facilitar y reducir tiempos y costos de su separación [3, 4]. Ejemplo de esto son: el polietilenglicol, que se utiliza para precipitar vesículas y la cromatografía, que ayuda a eliminar agregados proteicos o proteínas individuales. Debido a que cada técnica se basa en un principio diferente, no se ha documentado a detalle la efectividad de cada técnica para eliminar componentes del medio de cultivo o fluidos corporales. Tampoco se ha evaluado el impacto de cada técnica sobre las propiedades biológicas de las EVs [5]. En el caso de la ultracentrifugación se ha sugerido que puede provocar la fusión o ruptura de EVs. Por su parte, la precipitación acarrea proteínas solubles ajenas a las EVs que obstaculizan el estudio de sus efectos funcionales, mientras que la cromatografía diluye la preparación de EVs, aumentando el riesgo de pérdida de funcionalidad. Asimismo, la búsqueda de biomarcadores es entorpecida por la falta de técnicas estandarizadas para la purificación de EVs lo suficientemente confiables.

El propósito de este trabajo fue realizar un análisis del rendimiento proteico obtenido tanto por ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño y por precipitación. Al aprovechar las ventajas de cada una de estas técnicas, se diseñó una estrategia metodológica que permite enriquecer el contenido de EVs reduciendo al mínimo la alteración de su función biológica. La meta fue contar con una técnica de aislamiento que permitiera aumentar la pureza de las vesículas obtenidas, para posteriores estudios por espectrometría de masas. En el presente trabajo se cuantificó la expresión de marcadores

moleculares asociados a EVs mediante ensayos de Western blot y por análisis de rastreo de nanopartículas. Adicionalmente, se confirmó la morfología de las EVs mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión, y se realizó un análisis proteómico de los componentes vesiculares obtenidos. Finalmente, por estudios de microscopia confocal se determinó si las EVs podían ser incorporadas por una célula blanco.

Antecedentes

La comunicación celular garantiza la coordinación apropiada entre los diferentes tipos celulares [6]. Existen diversos mecanismos de comunicación celular que dependen de la secreción y recepción de una enorme variedad de moléculas señalizadoras. Estas moléculas son producidas y liberadas como respuesta a diversos estímulos provenientes del ambiente. Las señales producidas pueden ser: señales eléctricas, las cuales son producidas principalmente en el tejido nervioso y cardíaco por efecto del disparo de varios potenciales de acción en las membranas celulares, permitiendo la transmisión de impulsos eléctricos a través de nodos específicos [7]; y las señales mecánicas, generadas a partir de la deformación o estimulación física de ciertos tejidos, tales como el tejido epitelial, nervioso y muscular [7]. Estas señales, viajan de forma individual o en conjunto con otras moléculas para producir una respuesta específica. Entre las principales formas de comunicación celular se encuentra: i) la secreción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas señalizadoras; ii) la adhesión célula-célula mediada por varios complejos moleculares especializados; y iii) el intercambio de información a través de nanotúbulos especializados de transporte por donde viajan diversas moléculas [8-10].

En años recientes, se ha descubierto otro sistema de comunicación celular que se lleva a cabo mediante la producción, secreción y recepción de vesículas, las cuales son expulsadas al espacio extracelular. Las EVs fueron descritas por primera vez hace más de 30 años en estudios de transporte intracelular de la proteína transferrina en reticulocitos de rata. Se observó que la transferrina era expulsada al espacio extracelular en organelos vesiculares tras la fusión de los denominados cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática[11, 12]. Años más tarde, se documentó que estas vesículas estimulan activamente la respuesta inmunológica adaptativa en células receptoras[13]. A partir de entonces, se ha documentado la presencia de este tipo de vesículas en una enorme variedad de células y fluidos biológicos, tanto en condiciones normales como patológicas[14, 15]. Dado a su mecanismo de liberación y acción, estos organelos celulares se conocen actualmente como vesículas extracelulares.

Clasificación de las vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares se dividen con base en sus diferentes propiedades y origen de síntesis. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares ha recomendado que los tipos vesiculares sean caracterizados bajo ciertos criterios específicos, tales como la

composición membranal, su contenido y función [16]. Bajo estos criterios, se han designado 3 tipos principales de vesículas extracelulares: los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos. Los exosomas presentan un origen endosomal, mientras que las microvesículas y los cuerpos apoptóticos son producidos por la protrusión de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular [17]. Esto genera que cada tipo vesicular presente características y funciones particulares. Aunque originalmente las vesículas se clasificaron con base en su tamaño, experimentalmente es complicado separar cada tipo de EVs por su tamaño.

Biogénesis de las vesículas extracelulares

Se han descrito más de una vía para la formación de vesículas extracelulares que involucran complejos proteicos/lipídicos específicos [18]. Algunos de los marcadores asociados a exosomas, tales como las proteínas ALIX, TSG101, y las tetraspaninas CD9 y CD63 son indicadores de una vía de síntesis intracelular; mientras que la presencia de moléculas, como la fosfatidilserina, VAMP3 y los receptores de integrina B1, han sido asociados como marcadores de microvesículas. La trombospondina junto con la proteína de complemento C3b están enriquecidos en la pared externa de la membrana de cuerpos apoptóticos [19]. En la Figura 1 se muestran las vías de síntesis de cada tipo vesicular.

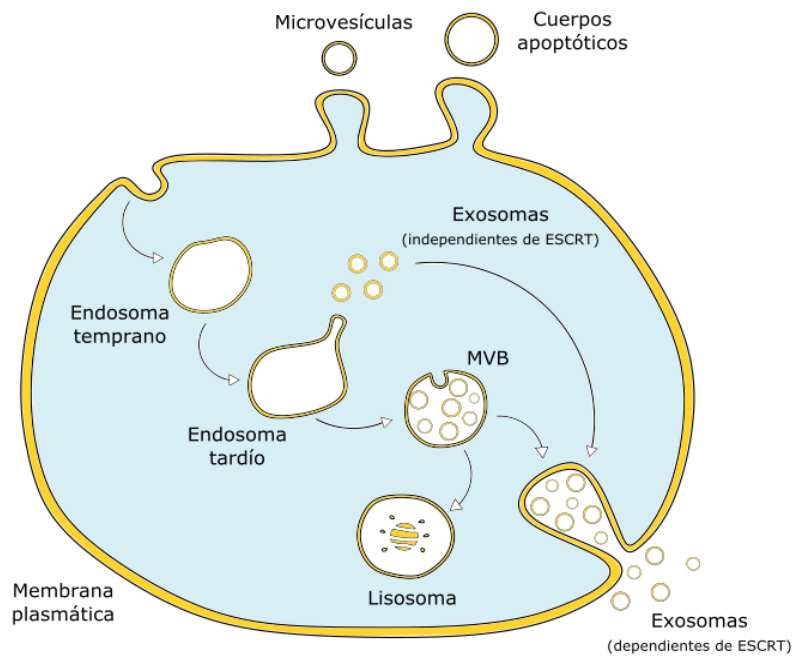


Figura 1. Esquema de la biogénesis de distintos tipos de vesículas extracelulares. Mientras que los exosomas presentan un origen endosomal, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos se forman a partir de la protrusión de la membrana plasmática. Los exosomas pueden formarse por dos vías principales: la clásica, dependiente de las proteínas del complejo ESCRT, y la independiente de la participación del complejo ESCRT.

-Exosomas

Como se mencionó previamente, los exosomas tienen un origen endocítico. Su síntesis comienza cuando la membrana plasmática se invagina generando la formación de un pequeño saco o cuerpo vesicular que se fusionará con un endosoma temprano, el cual podría madurar hasta convertirse en un endosoma tardío. Una vez establecido el endosoma tardío, su membrana puede invaginarse para formar pequeñas vesículas denominadas vesículas intraluminales (ILVs). A los endosomas tardíos que contienen ILVs se les denomina cuerpos multivesiculares (MVB). Los MVBs tienen dos destinos distintos: fusionarse con un lisosoma y degradarse completamente; o acoplarse a la membrana plasmática celular y liberar su contenido hacia el espacio extracelular. Las vesículas intraluminales liberadas hacia el espacio extracelular se les denomina exosomas [17]. Aunque esta es la vía general para su biogénesis, estudios recientes han sugerido que existe más de una vía de síntesis y secreción de exosomas [18, 20, 21]. La principal maquinaria responsable de coordinar la formación, empaquetamiento y el desprendimiento de los exosomas son los complejos proteicos ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*, en inglés). Éstos constan de 4 grupos proteicos denominados 0, I, II y III, los cuales se encargan de distribuir proteínas específicas hacia el interior de los exosomas, invaginar la membrana del endosoma tardío y posteriormente liberarlos [22]. Las células también pueden sintetizar y secretar exosomas por vías alternas que son independientes de la actividad del grupo ESCRT [18, 23] (ver Figura 1). Estas vías alternas también se caracterizan por el enriquecimiento de lípidos específicos, como las ceramidas y el bis-monoacilglicerol fosfato [18], o por la actividad de ciertas tetraspaninas, como CD63 y CD81[23]. Estas distintas vías de síntesis provocan un cambio en la composición de los exosomas resultantes [18].

-Microvesículas

En contraste con el origen de los exosomas, las microvesículas (MVs) se producen por la protrusión de la membrana plasmática hacia el medio extracelular. La formación de estas vesículas se debe al rearreglo de fosfolípidos membranales, especialmente la translocación de la fosfatidilserina hacia la pared exterior de la membrana, así como la contracción de los filamentos de actina y miosina [19]. La principal vía de formación descrita para las microvesículas comienza por la activación de la fosfolipasa-D por acción del factor de ribosilación de ADP 6. Al mismo tiempo, ERK se desplaza hacia la membrana plasmática, en donde activa a la cinasa de miosina de cadena ligera (MLCK)

como consecuencia de su fosforilación. La activación de MLCK provoca la liberación de microvesículas al espacio extracelular [24]. En otro estudio se mostró que el complejo ESCRT-1 interactúa con la enzima VSP4a-ATPasa y la proteína contenedora del dominio de arrestina-1 (ARRDC1) en la formación de microvesículas. En dicho estudio, las microvesículas contienen TSG101 como marcador distintivo y al mismo tiempo, carecen de marcadores de MVBs o endosomas tardíos, tales como Alix, CD63 y LAMP1 [25]. Por último, se ha reportado que estímulos externos pueden inducir el aumento de la producción de vesículas. Ejemplo de esto es la entrada de grandes cantidades de calcio en eritrocitos humanos, la cual provoca una redistribución importante de los fosfolípidos membranales y aumenta la formación y expulsión de microvesículas hacia el medio [26].

-Cuerpos apoptóticos

Al igual que las microvesículas, los cuerpos apoptóticos se forman a partir de la protrusión de la membrana plasmática hacia el exterior. También pueden originarse a partir de la fragmentación de la membrana del retículo endoplásmico [27]. Estas vesículas son secretadas durante el proceso de muerte celular programada denominada tipo apoptótica [19]. La principal vía de formación es a través de las modificaciones producidas por el sistema actina-miosina del citoesqueleto, mediante la actividad de las proteínas ROCK y caspasas [28]. La proteína ROCK I es procesada por caspasas, la cual genera una cinasa trunca con actividad enzimática aumentada [28]. Esto provoca cambios característicos en la membrana de los cuerpos apoptóticos. Uno de ellos es la translocación de la molécula fosfatidilserina hacia la monocapa externa de la membrana plasmática, la cual se une con su receptor y permite su reconocimiento por células fagocíticas [19, 29]. Otro cambio importante es la oxidación de diversas moléculas receptoras de la superficie membranal que permiten el reclutamiento de la trombospondina y la proteína de complemento C3b. La trombospondina y la C3b permiten el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas [19]. Por lo tanto, la presencia de trombospondina y proteína complementaria C3b refieren a una vía particular de síntesis de vesículas particular y son marcadores aceptados para identificarlas como cuerpos apoptóticos.

Composición de las vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares se componen principalmente de una bicapa fosfolipídica derivada de la invaginación o protrusión de la membrana plasmática celular [23]. Dentro

de este fragmento de membrana se encuentran embebidas proteínas y lípidos, como integrinas, fosfatidilserina, esfingomiélinea, y varias tetraspaninas como CD9, CD63, CD81 [24]. El contenido de las vesículas difiere dependiendo de las células que las originan, y el mecanismo de direccionamiento de moléculas hacia su interior aún se desconoce en su mayor parte [30]. Sin embargo, se sabe que la composición específica de cada tipo de vesículas cambia dependiendo de la vía por la que fueron sintetizadas.

-Exosomas

Los exosomas han sido descritos en varios fluidos corporales de diferentes organismos [31-35]. La gran variedad de técnicas para aislarlos ha dificultado realizar un consenso claro acerca de su contenido específico [24]. Existen ciertas moléculas que, debido a su presencia generalizada al aislar exosomas por diferentes técnicas, son clasificadas como marcadores de los mismos. Las principales moléculas asociadas a exosomas son proteínas integrales de la membrana plasmática con función de adherencia, como son las tetraspaninas CD9, CD63, CD81, LAMP-1, receptor de Transferrina (TfR) [36, 37]; proteínas asociadas a balsas lipídicas como flotilina-1 [35]; proteínas Rab/Ras, involucradas en las vías de síntesis [23]; moléculas señalizadoras del sistema inmune, como el complejo principal de histocompatibilidad I y II [38]; proteínas chaperonas, tales como HSP70 y HSp90 [33]; interleucinas-6, -8, -18 [15]; factores de crecimiento EGF y EGFRvIII [15]; proteínas adaptadoras de la familia 14-3-3YWHAZ, YWHAB, YWHAQ [35]; y proteínas de recubrimiento vesicular, como clatrina-I y II [39].

La composición de lípidos presentes en exosomas se ha estudiado a detalle en reticulocitos, timocitos murinos, oncosomas, linfocitos B y células dendríticas humanas [37, 40]. Los exosomas presentan fosfolípidos asociados a balsas lipídicas de la membrana plasmática, tales como ceramidas, bis-monoacilglicerol fosfato [18, 24], esfingomiélinea, fosfatidilserina, gangliósido GM3 [24], fosfatidiletanolamina y colesterol [37]. Se ha observado que los niveles de ciertos lípidos como la fosfatidilserina y la esfingomiélinea varían dependiendo de la etapa de maduración celular en el que se encuentra la célula productora, como durante el proceso de maduración de los reticulocitos en eritrocitos [37]. Es de destacar, que estudios lipídómicos han demostrado que el contenido de lípidos en los exosomas no es aleatorio, sino que existe un mecanismo que distribuye de manera precisa el contenido de lípidos en la membrana de los exosomas tales como por la acción de ceramidas y esfingomiélinasas [41, 42]. Esta composición lipídica les confiere ciertas propiedades necesarias para desplazarse en el

medio extracelular. Por ejemplo, la abundancia de colesterol y otros esfingolípidos en exosomas les proporciona una mayor resistencia estructural a los cambios fisicoquímicos del medio, como variación de pH y la presencia de detergentes [15]. Se considera que esta resistencia se debe a que los lípidos de los exosomas reflejan una conformación similar a las balsas lipídicas de la membrana plasmática de las células [33].

En el caso de los ácidos nucleicos, se ha encontrado la presencia de RNAs de varios tipos, así como pequeñas secuencias de DNA de cadena sencilla (ssDNA) en el interior de los exosomas [23, 24, 43-45]. Los RNAs descritos pertenecen a los subgrupos de RNAs mensajeros (mRNAs), microRNAs (miRNAs), , short hairpin RNA (shRNAs) y RNAs ribosomales (rRNAs), principalmente; mientras que el DNA asociado a exosomas corresponde a DNA genómico (gDNA) [46]. El DNA descrito en los exosomas ha sido detectado en muestras de cáncer de próstata, y las secuencias corresponden a los genes *PTEN* y *MLH 1*, asociados a la supresión tumoral y reparación de DNA fragmentado, respectivamente [46]. Sin embargo, faltan estudios para entender los mecanismos que llevan al cargado de DNA en las vesículas para poder conocer su efecto en las células receptoras [15]. En el caso de los RNAs, se han encontrado secuencias asociadas a la regulación transcripcional de genes del sistema inmune, supresión tumoral, citocinesis, splicing alternativo y apoptosis [43-45].

-Microvesículas y Cuerpos Apoptóticos

La composición membranal de las microvesículas y los cuerpos apoptóticos es similar debido a que ambos se producen desde la membrana plasmática celular. Sin embargo, existen diferencias importantes entre ellas. Por ejemplo, en las microvesículas su composición lipídica se asemeja a la que se encuentra en la célula productora, aunque hay moléculas como glicerofosfoserina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina que se encuentran enriquecidas en su membrana [24, 32]. En cuanto al contenido proteico de su membrana, se ha reportado la presencia de miosina, ARF-6, fosfolipasa D, cofilina, integrinas, metaloproteinasas, calpaína y la tetraspanina CD40 como marcadores de microvesículas [30, 39, 47]. Además, se ha encontrado la presencia de VAMP-1, caspasas, FGF e interleucinas enriquecidas en su interior [19]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que este tipo de proteínas se encuentran también presentes en cuerpos apoptóticos, lo que dificulta la correcta identificación y separación de tipos vesiculares [48, 49]. Incluso, se ha demostrado que las microvesículas pueden transportar organelos completos o parte de ellos, como es el caso del traslado de mitocondrias de un

tipo celular a otro [50], aunque esta característica no es exclusiva de las microvesículas, pues los cuerpos apoptóticos también contienen fragmentos de organelos en su interior.

Papel de las vesículas extracelulares en diversas enfermedades

La presencia de vesículas extracelulares y su función se ha estudiado en diversos organismos como en el humano, el ratón, el cerdo, el caballo, la rata y la oveja [15]. Se propone que la producción de vesículas es un atributo conservado entre todos los seres vivos, aunque la función que desempeñan es distinta dependiendo del organismo y su estado fisiológico. Incluso, la función que desempeñan las EVs varía entre el tipo de células que las reciben. En un estudio realizado por Di Trapani *et. al.* [51], observaron que las EVs producidas por células mesenquimales son ingresadas de forma diferencial entre las células T, B y NK del sistema inmune. Ellos demostraron que la función de inmunoregulación parácrina de las células mesenquimales sobre el sistema inmune está directamente relacionada con la secreción de EVs, y que además, la respuesta de proliferación, migración y activación/supresión de cada tipo celular del sistema inmune es sensible a la cantidad de EVs que ingresan. En otro estudio, Stranford *et. al.* evaluaron la capacidad de tres líneas celulares de cáncer de mama (HEK293FT, MCF7 y MDA-MB-231) para recibir EVs de distinto origen celular. Encontraron que el ingreso de EVs es dependiente del tipo celular que las recibe, sin importar el origen celular de las EVs, y que la línea celular MDA-MB-231 mostró el mayor porcentaje de ingreso de EVs. Con ello, demostraron que el tipo de células receptoras es un factor determinante en la cantidad de EVs que son ingresadas. Las principales funciones atribuibles a las vesículas extracelulares en mamíferos son: la activación de respuestas del sistema inmunológico [52], la inducción de la diferenciación celular, la activación de apoptosis [53], la transferencia de material genético, el transporte molecular [23], la inducción de angiogénesis [34, 54], la regulación metabólica de células receptoras [38], la regulación de expresión génica y la transformación de células sanas a células patógenas [55].

Varios estudios han determinado que las vesículas extracelulares presentan alteraciones en personas que padecen alguna enfermedad crónico-degenerativa, tales como cáncer, diabetes, trastornos cardiovasculares y otras enfermedades metabólicas [56-58]. Estas alteraciones van desde la modificación de algún receptor membranal hasta un cambio en la función que desempeñan en células receptoras. Particularmente, la diabetes tipo 2 altera significativamente el contenido de las EVs y su efecto en células receptoras. Ejemplo de esto son las vesículas obtenidas a partir de islotes pancreáticos diabéticos, las

cuales pueden alterar los procesos de apoptosis y proliferación celular de las células β pancreáticas. Lakhter *et. al.* [56] demostraron que las vesículas producidas por células de cáncer pancreático podían inducir un estado diabético en células β receptoras. En otro estudio, se encontró que el suero diabético puede alterar la producción de exosomas por la vía endosomal de células mesenquimales humanas, mediante la sobreexpresión de genes tales como Alix, CD63, Rab27a/b, y Rab8b [59].

En el caso del cáncer, las vesículas producidas por células de melanoma, que presentan el ligando de Fas CD95L en su superficie, pueden inducir muerte apoptótica en linfocitos Fas CD95L⁺ [58]. También, las vesículas producidas por células cancerígenas pueden regular las respuestas del sistema inmune. Además de esto, se ha visto que las EVs de células tumorales pueden regular los procesos de angiogénesis, formación de matriz extracelular y estroma en el microambiente tumoral [58]. En un estudio reciente se mostró que las vesículas producidas por un mesotelioma pleural maligno inhibieron la proliferación de células T CD8⁺ en respuesta a la interleucina-2. Este efecto se asoció a la presencia de TGF β 1 a la superficie de la membrana vesicular como molécula responsable de dicho efecto [60]. En otro estudio, encontraron que los exosomas producidos por células de cáncer pancreático, los cuales presentan a la tetraspanina 8 en su contenido, pueden reclutar mRNAs que activan la expresión génica asociada a la angiogénesis en células endoteliales periféricas a la región tumoral [61].

La producción y función de las vesículas extracelulares también son alteradas en padecimientos como la obesidad y otras enfermedades metabólicas [56]. Se ha observado que las vesículas obtenidas a partir de sangre de ratas obesas aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno en las células receptoras [62]. Así mismo, el contenido de miRNAs en las EVs cambia en estado de obesidad. Por ejemplo, en un análisis comparativo del contenido de miRNAs de exosomas entre individuos sanos y obesos humanos se encontró que al menos 55 miRNAs están diferencialmente expresados en los exosomas obesos con respecto a los de personas sanas. Estos miRNAs se asociaron con las vías de señalización del factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β) y Wnt/ β -catenina [63]. Estos estudios indican que las vesículas extracelulares son un componente crítico para la progresión y propagación de las enfermedades crónico-degenerativas.

Técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares

Debido a que las vesículas extracelulares se encuentran en diversos fluidos corporales, se ha impulsado el desarrollo de técnicas de aislamiento que permitan obtener vesículas de manera rápida y eficiente, sin perturbar su composición molecular y quitando la mayor cantidad de contaminantes posibles. Actualmente, no se ha llegado a un consenso sobre cuál es la técnica más apropiada para aislarlas, sobre todo para aplicaciones clínicas. Los resultados obtenidos por cada técnica generan variaciones en el contenido final de la muestra [5, 64]. Las técnicas actuales de aislamiento no permiten separar completamente a las vesículas de otras proteínas solubles del medio, lo que impide determinar con claridad qué proteínas corresponden a las vesículas y cuáles se encuentran disueltas en el medio.

La técnica más utilizada para el aislamiento de vesículas extracelulares es la ultracentrifugación. Sin embargo, esta técnica requiere la utilización de equipo especializado y de tiempos largos de procesamiento. Además, las velocidades comúnmente utilizadas (>100,000 RCF) causa la agregación de vesículas con diferentes fenotipos y orígenes, lo que podría alterar la funcionalidad de las vesículas [65]. Varios autores sugieren que el tipo de rotor (ángulo fijo o libre), la velocidad de centrifugación, el ángulo de sedimentación del rotor, la viscosidad de la solución y el radio de la fuerza de centrifugación (radio del rotor) son algunos de los parámetros críticos que pueden afectar la muestra final obtenida de vesículas [5, 64].

Buscando alternativas a la ultracentrifugación, se han desarrollado técnicas de aislamiento considerando el tamaño de las vesículas como la cromatografía de exclusión por tamaño [3] y la ultrafiltración [66]. Aprovechando la presencia de proteínas transmembranales específicas se han desarrollado técnicas basados en el uso de anticuerpos acoplados a perlas magnéticas [67], así como la precipitación utilizando polímeros sintéticos [4]. Incluso se han acoplado gradientes de sacarosa a la ultracentrifugación para evitar el maltrato de las vesículas y aumentar su purificación [5, 67]. Varios grupos de investigación han combinado el uso de distintas técnicas para aumentar el rendimiento total y la pureza de sus muestras. Esto porque se ha comprobado que el uso de una sola técnica no es suficiente para aislar una buena cantidad y calidad de preparación de vesículas. Algunos de los problemas identificados pueden ser la fragmentación de las vesículas, así como la agregación de vesículas con material contaminante, alterando las propiedades biológicas de las mismas [68, 69].

Recientemente, se han desarrollado kits comerciales que son utilizados para aislar EVs de forma rápida y reproducible. Estos kits aprovechan métodos alternativos a la ultracentrifugación, tales como la precipitación, cromatografía, ultrafiltración, o el uso de perlas magnéticas, solos o en conjunto, para separar las EVs del resto del medio líquido, dando como resultado una muestra con vesículas sin alteraciones morfológicas [70, 71]. Además, el rendimiento de EVs obtenido mediante el uso de estos kits es de 80 a 300 veces más alto que la ultracentrifugación [70]. Algunos de estos kits comerciales son miRCURY™ (Exiqon), ExoQuick™ (System Biosciences), y Total Exosome Isolation Reagent (TEIR) (Life Technologies).

En resumen, aunque todas las técnicas aíslan cierta cantidad de EVs, la muestra final de vesículas varía tanto en cantidad como en contenido. Por ello, es necesario realizar una caracterización de las EVs obtenidas de cada técnica disponible, para poder conocer lo que se está obteniendo después del proceso de aislamiento.

Justificación

La presencia de EVs en distintos fluidos corporales y en cantidades limitadas ha requerido del diseño de técnicas novedosas de aislamiento que permitan obtener el mayor rendimiento posible sin comprometer la integridad de las EVs. Para una adecuada caracterización de las EVs se requiere de un elevado grado de pureza, sin el cual se pueden producir interferencias en la identificación de marcadores específicos, la alteración de ensayos funcionales, así como errores de asociación con procesos biológicos. Sin embargo, pocos son los trabajos que han comparado exhaustivamente las técnicas actuales de aislamiento. Esto permitirá determinar las ventajas de cada técnica y así explorar nuevas maneras de aumentar su pureza.

Hipótesis

La combinación de técnicas de aislamiento facilitará la purificación de vesículas extracelulares y aumentará el rendimiento del procedimiento.

Objetivos

-Objetivo General

- Analizar el rendimiento de purificación de vesículas extracelulares obtenidas por diferentes técnicas de aislamiento.

-Objetivos particulares

- Cuantificar el contenido neto de proteína obtenido por ultracentrifugación, precipitación y cromatografía de exclusión por tamaño a partir de una cantidad constante de medio de cultivo.
- Caracterizar la presencia y abundancia de marcadores moleculares de vesículas extracelulares obtenidos en cada técnica.
- Diseñar un nuevo protocolo que permita aumentar la pureza de las preparaciones de vesículas.

Materiales y Métodos

Cultivo celular

Se utilizaron 3 líneas celulares: MDA-MB-468, derivada de un tumor epitelial de glándulas mamarias humanas; HEK293T, generada a partir de tejido embrionario de riñón humano; y fibroblastos humanos obtenidos a partir de una muestra de tejido bucal. Las células fueron cultivadas en cajas de cultivo de 150cm², y sembradas a una densidad de 10,000 células/cm², manteniéndolas hasta alcanzar una confluencia aproximada de 95%. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Medio de cultivo Condicionado (MCC)

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo libre de exosomas. Para ello, el suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) fue previamente ultracentrifugado por 18h a 120,000xg (rotor 45Ti, Beckman Coulter). Al término de la centrifugación el suero se esterilizó mediante el uso de filtros de 0.22 µm. Se utilizó medio DMEM suplementado con FBS libre de vesículas al 10% v/v, y penicilina/streptomina al 1%. El medio de cultivo condicionado se recolectó cada 48h y se centrifugó a 400 RCF por 10 mins. (SorvallLegend RT, Thermo Electron Corporation) para eliminar células en suspensión. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 2,000 RCF por 20 mins. (SorvallLegend RT, ThermoElectronCorportation). El sobrenadante fue recuperado y almacenado -80°C, hasta su posterior uso.

Electroforesis de proteínas

Mediante el uso de técnicas electroforéticas, se analizaron los patrones de proteínas de las muestras de EVs obtenidas de cada uno de las técnicas. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras y no reductoras, utilizando un sistema de Tris-Tricina. Se cargaron 20µg de proteína por cada muestra. Posteriormente, los geles fueron fijados con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 30 minutos. Después de la fijación, el gel se incubó con una solución de azul de Coomassie (Bio-Safe Coomassie Brilliant Blue G-250 Stain, Bio Rad) durante toda la noche. Para eliminar el exceso de tinción, el gel se lavó con agua destilada hasta que las bandas de las muestras fueron visibles.

Ensayos de Western Blot (WB)

Para este ensayo se utilizaron geles de acrilamida al 10% y 8%. En análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía, se realizó a volumen constante (27µl) y mientras que para el análisis de los marcadores de EVs se utilizaron 20µg de proteína. La proteína se transfirió una membrana de PVDF y posteriormente fue incubada con los anticuerpos para los marcadores de vesículas extracelulares: CD9 (1:5,000), CD63 (1:2,000), CD81 (1:500), AnnA2 (1:6,000), AnnA5 (1:5,000), Alix (1:500), TSG101 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology), de origen de ratón, y AnnA2 (1:6,000) (Abcam), de origen de conejo. También se utilizaron los anticuerpos para detectar albúmina (1:100,000), de origen de conejo, y calnexina (1:2000), de origen de cabra, como indicadores de pureza de las muestras. Los anticuerpos anti-Rabbit (1:20,000/1:200,000), anti-Goat (1:40,000) y la proteína de unión IgG Kappa (1:2,500/1:5,000), fueron utilizados para la detección de los anticuerpos primarios. Se utilizó un fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad), así como el programa ImageLab (versión5.0) para la captura de la señal quimioluminiscente y para la densitometría de las señales de los marcadores analizados.

Comparación de técnicas de aislamiento

-Ultracentrifugación (UC)

Sesenta mL de medio condicionado recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células fue centrifugado a una velocidad de 120,000 RCF durante 90 minutos (rotor 70Ti, Beckman Coulter). El sobrenadante fue descartado y el botón se resuspendió en 2.8 mL de PBS. La muestra se volvió a centrifugar a 120,000 RCF por 35 minutos (rotor TLA 100.3, modelo Optima MAX, Beckman Coulter). El sobrenadante se descartó nuevamente y el botón se resuspendió en 110µl de solución RIPA con inhibidores de proteasas 1x y EDTA 1x (solución de lisis). La muestra fue almacenada a -80°C para posteriores análisis.

-Precipitación (Pre)

A 60 mL de medio condicionado, recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células, le fue adicionado, en condiciones de esterilidad, polietilenglicol 8000 (PEG 8000) a una concentración de 20% v/v, y incubó a 4°C toda la noche. Posteriormente, el medio se centrifugó a 1500xg por 30 minutos (SorvallLegend RT, ThermoElectronCorporation). El sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 110 µl de solución de lisis. La muestra fue almacenada a -80°C para posteriores análisis.

-Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)

Sesenta mL de medio condicionado recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células fue centrifugado a 5,000xg en tubos de ultrafiltración (Amicon Ultra-15 3k M.W., Millipore) hasta reducir su volumen a 1ml. La muestra se pasó por una columna de sefarosa tipo CL-2B y se recolectaron 30 fracciones de 500 µl. Las fracciones fueron almacenadas a -80°C hasta su uso posterior.

-Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Pre-SEC)

Con la finalidad de aumentar el rendimiento en la obtención de EVs obtenidas a partir de medio de cultivo, decidimos acoplar las técnicas de precipitación y la cromatografía de exclusión por tamaño. A partir de 60 ml de medio de cultivo se siguió el protocolo descrito en la sección *Precipitación*. El botón obtenido se resuspendió en 1ml de buffer PBS/citrato 0.32% a pH 7.4. Posteriormente, se siguió el protocolo descrito en la sección *Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)*. Las fracciones obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

Caracterización de subpoblaciones de vesículas extracelulares

Para esta serie experimental se utilizaron 80 mL de medio y se siguió el protocolo descrito en la sección *Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño*. Para la concentración de las subpoblaciones de EVs obtenidas se evaluaron 3 procedimientos: 1) ultracentrifugación de 120,000xg por 90 minutos, como está descrito en la sección *Ultracentrifugación*; 2) precipitación con el polímero PEG 8000 al 20% durante una noche, tal como está descrito en la sección *Precipitación*; 3) Ultrafiltración con filtros Amicon 100KDa (Brevemente, se concentraron las fracciones del subgrupo A (fracciones 5-10) y del subgrupo B (fracciones 11-16) en tubos Amicon, y se centrifugaron a 4000 RCF hasta alcanzar un volumen aproximado de 100µL). Las pruebas con ensayos tipo Western se realizaron en las muestras a concentración constante (20µg), utilizando los marcadores CD81 (1:500), TSG101 (1:500), MFG-E8 (1:5000) y Actinina 4 (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology), de origen de ratón, y Anexina A2 (1:6,000) (Abcam), de origen de conejo, utilizando a la calnexina (1:2000) y albúmina (1:100,000) como controles de contaminación. Los anticuerpos anti-Rabbit (1:20,000/1:200,000), anti-Goat (1:40,000) y la proteína de unión IgG Kappa (1:2,500/1:5,000), fueron utilizados para la detección de los anticuerpos primarios.

Análisis proteómico de subgrupos de vesículas

Para la realización de estos experimentos se utilizaron 600 mL de medio condicionado, recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células, para así aislar suficiente cantidad de vesículas. Los ensayos se realizaron por duplicado. Brevemente, el medio de cultivo se centrifugó a 400 RCF por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó 2,000 RCF por 20 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se aislaron las vesículas utilizando el protocolo descrito en la sección *Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño*. Una vez aisladas las vesículas por Pre-SEC, se juntaron las fracciones en dos subgrupos: subgrupo A (fracciones 5 a 10) y subgrupo B (fracciones 11 a 15). Se concentraron por ultracentrifugación a 120,000 RCF por 90 minutos. La muestra fue liofilizada y almacenada a -80°C hasta su uso posterior. El análisis proteómico se realizó mediante un análisis de proteínas por espectrometría de masas en tándem (TMT MS/MS). La identificación de los péptidos en el análisis proteómico se realizó utilizando el software Proteome Discoverer (versión 1.4, Thermo Fisher Scientific). El comparativo de proteínas entre subgrupos se realizó utilizando el software Funrich (versión 3.1.3) [72].

Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA)

El aislamiento de vesículas se realizó por triplicado a partir de 80 mL de medio. Las muestras se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en la sección *Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño*. Las fracciones se concentraron mediante un paso de ultracentrifugación a 120,000xg por 90 minutos. El pellet se resuspendió en 400µl de buffer PBS filtrado 1x. Se utilizaron 200 µl para el análisis de rastreo de nanopartículas.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El aislamiento de vesículas se realizó por triplicado a partir de 80 mL de medio. Las muestras se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en la sección *Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño*. Las fracciones se concentraron mediante un paso de ultracentrifugación a 120,000xg por 90 minutos. El pellet se resuspendió en 400µl de buffer PBS filtrado 1x. Se redujeron 200µL de muestra por ultrafiltración utilizando tubos Amicon 0.5mL 3kDa y centrifugando a 14,000xg hasta alcanzar un volumen de 100µL. Se les adicionó 400µL de una solución de paraformaldehído/glutaraldehído al 2.5% y se fijaron durante 45 minutos. Posteriormente,

se redujo nuevamente el volumen de la muestra hasta alcanzar 100 μ L para finalmente ser transferidos a un recipiente nuevo. Una vez fijada la muestra, se tomaron 7 μ L de muestra y se colocaron sobre una rejilla de Formvar carbón ultradelgada y se incubó durante 20 minutos. Finalmente, se dieron 8 lavados con agua de 2 minutos cada uno y se dejó secar una temperatura ambiente toda la noche. Por último, se realizó una contratinción con acetato de uranilo. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

Microscopía confocal

Se sembraron células en una laminilla de 8 pozos de 0.7cm²/pozo (Merck Millipore) a una densidad de 20,000 células/cm². Las vesículas se aislaron de acuerdo con el protocolo *Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño*. Las vesículas aisladas fueron teñidas con el colorante lipofílico BODIPY TR *ceramide* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Brevemente, se aislaron vesículas de la línea celular MDA-MB-468 a partir 80mL colectados en 48h de exposición. Una vez aisladas, se les agregó 1 μ L de la solución stock del colorante por cada 100 μ L de muestra para obtener una concentración del colorante de 10 μ M. Se incubaron durante 20 minutos a 37°C, en total oscuridad. Posteriormente, se removió el exceso de colorante mediante la limpieza por columnas EXOSOME Spin Columns (MW 3,000) (Life Technologies, ThermoFisher). Una vez teñidas, se adicionaron 30 μ g de vesículas a cada pozo de la laminilla por 3 horas. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.4, por 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con PBS/tritón 0.2% y se hizo una contratinción con DAPI. Como control negativo se utilizó PBS mezclado con el marcador fluorescente sin vesículas.

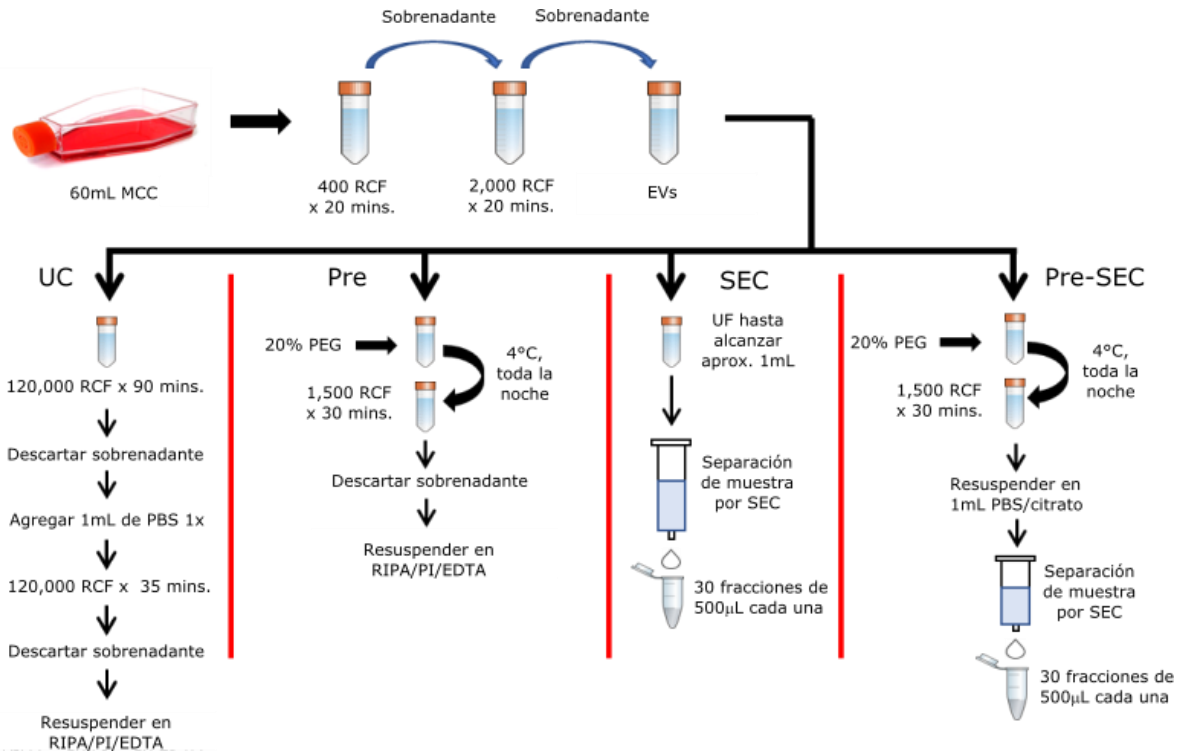


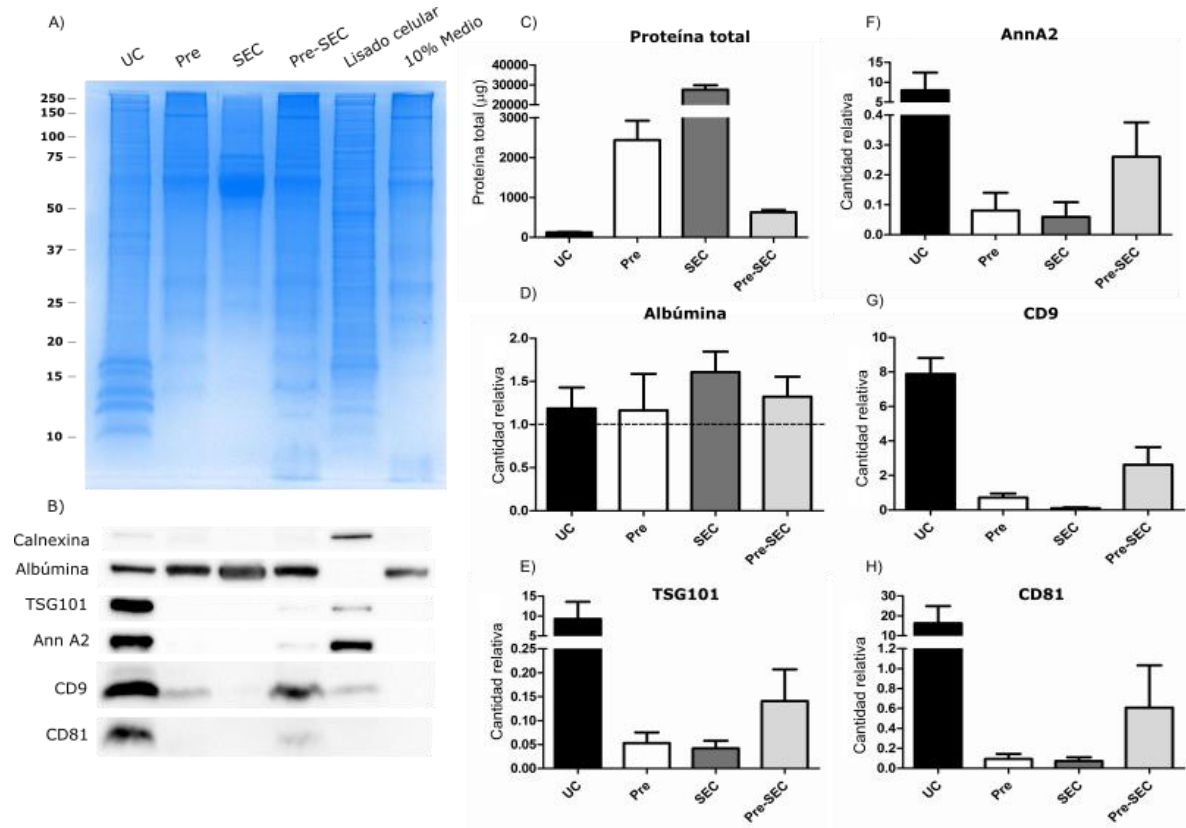
Figura 2. Diagrama de las técnicas utilizadas en el aislamiento de vesículas extracelulares. En todos los casos, se utilizó la misma cantidad de medio de cultivo condicionado (60ml). La abundancia de los marcadores de vesículas extracelulares, obtenidos por las distintas técnicas, fue comparada por ensayos de Western blot. Abreviaturas: MCC= medio de cultivo condicionado; UC=Ultracentrifugación; Pre=Precipitación; SEC= Cromatografía de exclusión por tamaño; Pre-SEC= Precipitación acoplada a cromatografía de exclusión por tamaño; PEG=Polietilenglicol; UF= Ultrafiltración.

Resultados

Comparación de muestras obtenidas por diferentes técnicas

Las muestras de cada técnica se obtuvieron como se muestra en la figura 2. Al realizar el análisis del patrón de proteínas para cada técnica con la tinción de azul de Coomassie se puede distinguir diferencias en el contenido total de proteína entre las distintas técnicas estudiadas. El cambio más evidente corresponde al enriquecimiento de proteínas de bajo peso molecular tanto en la ultracentrifugación como en Pre-SEC (figura 3A). Los marcadores asociados a vesículas extracelulares se enriquecieron diferencialmente dependiendo de la técnica utilizada. La mayor intensidad de todos los marcadores de EVs se obtuvo a través de la ultracentrifugación, seguida del protocolo que desarrollamos en el presente trabajo, Pre-SEC. En cambio, en la precipitación y SEC prácticamente no mostraron señal de los marcadores, excepto por CD9, que presenta una débil señal. El medio de cultivo sin condicionar (10% medio) no mostró señal de ninguno de los marcadores de vesículas. La única señal de las proteínas analizadas en el medio correspondió a la albúmina, considerada en este estudio como contaminante de la muestra por su abundancia en el suero fetal bovino agregado al medio de cultivo (figura 3B). La cuantificación de proteína total mostró que la ultracentrifugación es la técnica con menor rendimiento, seguida de Pre-SEC. La técnica SEC recuperó la mayor cantidad de proteína seguida de la precipitación, con casi 200 veces y 30 veces, respectivamente, más que por ultracentrifugación (figura 3C). Para determinar la abundancia de los marcadores de vesículas, se realizó un análisis densitométrico respecto a la albúmina. La abundancia relativa de la albúmina no fue estadísticamente significativa entre las técnicas (figura 3D). La mayor abundancia relativa de todos los marcadores se obtuvo por ultracentrifugación, mostrando un enriquecimiento casi 20 veces mayor de CD81 y casi 10 veces mayor de CD9, TSG101 y Anexina A2 comparado con el resto de las técnicas. La técnica acoplada de Pre-SEC fue la segunda más intensa en cuanto a abundancia relativa de marcadores, mostrando una abundancia relativa mayor de CD81 (7 veces), CD9 (15 veces), TSG101 (3 veces), y Anexina A2 (4 veces) comparado con las técnicas de precipitación y SEC por separado. Para las muestras de precipitación y SEC, los marcadores mostraron las abundancias relativas más bajas de todas las técnicas. La muestra obtenida por precipitación registró ligeramente una mayor abundancia relativa de marcadores de vesículas que la muestra de SEC, siendo ésta última la que registró la menor señal en todos los marcadores (figura 3E-H). Adicionalmente, se evaluó la pureza

de la muestra mediante la presencia de la proteína calnexina, un marcador de retículo endoplásmico. Solamente se encontró su presencia en la muestra proveniente del lisado celular y por ultracentrifugación. En el resto de las muestras no se detectó señal.



Comparación de fracciones obtenidas por SEC y Pre-SEC

Siendo uno de los principales objetivos de este estudio el encontrar una forma alternativa a la ultracentrifugación para aislar vesículas extracelulares, y con base en los resultados obtenidos de la comparación entre las técnicas, decidimos caracterizar con mayor detalle las vesículas obtenidas de la línea celular MDA-MB-468, mediante la Precipitación acoplada a Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Pre-SEC). El patrón de proteínas obtenido por azul de Coomassie de las fracciones de SEC mostró gran abundancia de proteínas en el rango de entre 50kDa y 75kDa, mientras que las fracciones de Pre-SEC presentaron una menor cantidad de proteínas dentro del mismo rango (figura 4A y D). La lectura de absorbancia 280 nm, la cual es una técnica utilizada para conocer la concentración aproximada de proteína presente en cada fracción, fue distinta entre las fracciones de SEC y Pre-SEC, siendo 41 veces más alta la concentración de proteínas de SEC que en Pre-SEC. En el caso de SEC, la mayor lectura de absorbancia se registró en las últimas fracciones colectadas. En cambio, en Pre-SEC, la mayor lectura de absorbancia se registró en las primeras fracciones colectadas, siendo la fracción 8 la que presentó la mayor absorbancia (figura 4B y E). En los ensayos tipo western, la señal de la proteína CD9 se encontró desde la fracción 6 hasta la fracción 17 en ambas técnicas, mientras que en el resto de las fracciones no se observó señal alguna. Para la proteína Anexina A5, se registró la presencia del marcador en las fracciones 7 a 9, y 6 a 9 de SEC y Pre-SEC, respectivamente (figura 4C y F). Con estos resultados, se determinó que las fracciones 6 a 17 contenían la mayor proporción de las vesículas aisladas en ambas técnicas.

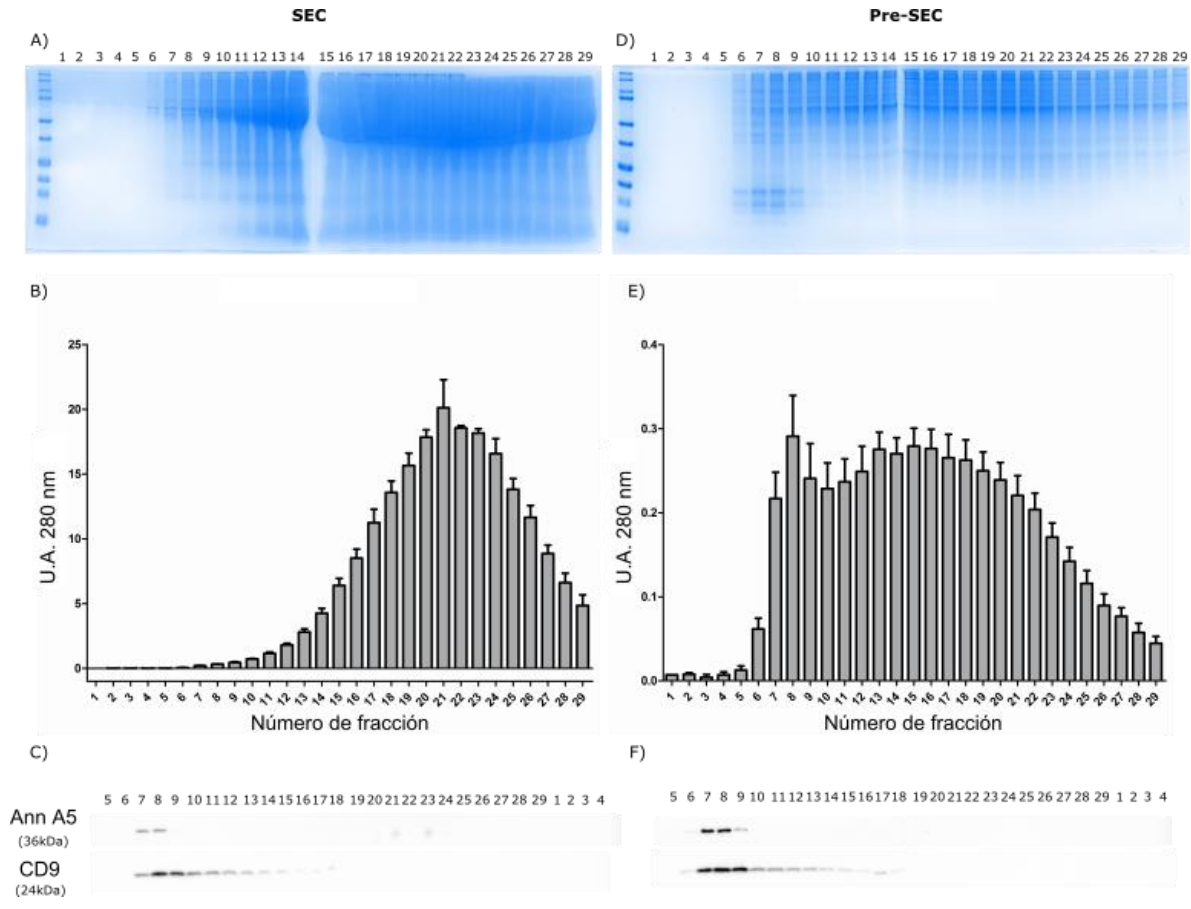


Figura 4. Comparación de las fracciones obtenidas por SEC y Pre-SEC. A, D) Patrón de proteína obtenido con azul de Coomassie a partir del procesamiento del medio de cultivo por SEC (A) y Pre-SEC (D). Se observa una mayor definición en las fracciones colectadas por Pre-SEC en comparación con las procesadas por SEC. Adicionalmente se distingue un grupo de proteínas de bajo peso molecular en la parte baja de las primeras fracciones del Pre-SEC, el cual no es detectable en SEC. B, E) Absorbancia a 280 nm detectada en las fracciones colectadas por SEC (B) y Pre-SEC (E). C, F) Ensayos de Western blot que muestra la distribución de los marcadores de vesículas extracelulares Anexina A5 y CD9 en las fracciones colectadas por SEC (E) y Pre-SEC (F).

Caracterización de las fracciones de MDA-MB-468 obtenidas por Pre-SEC

Para caracterizar el estado de las EVs obtenidas mediante la técnica Pre-SEC, se concentraron las fracciones 6 a 17, las cuales presentaron señal de marcadores de vesículas. La observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM) permitió detectar vesículas con la clásica forma descrita de copa (Figura 5A). El análisis de la muestra por rastreo de nanopartículas (NTA) presentó una distribución agrupada entre los 100nm hasta los 450nm de tamaño, siendo las partículas de 204nm (+/- 12nm) aproximadamente las más abundantes en la muestra (Figura 5B). Las fracciones colectadas, evaluadas mediante ensayos tipo western a volumen constante, mostraron una distribución diferencial de los marcadores de vesículas. Mientras que algunos marcadores se restringieron a las primeras fracciones colectadas, como Alix, TSG101 y Anexina A2, otros marcadores lograron detectarse en el doble de fracciones, como Anexina A5 y las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 (figura 5C). Para descartar que la distribución se debiera a diferencias en la cantidad de proteína recuperada de cada fracción, se cargó una cantidad de 20µg por fracción y se analizaron por ensayos de Western Blot. La distribución diferencial de marcadores en las fracciones no solo conservó el mismo patrón que el observado a volumen constante, sino que también aumentó la intensidad de las señales (figura 5D).

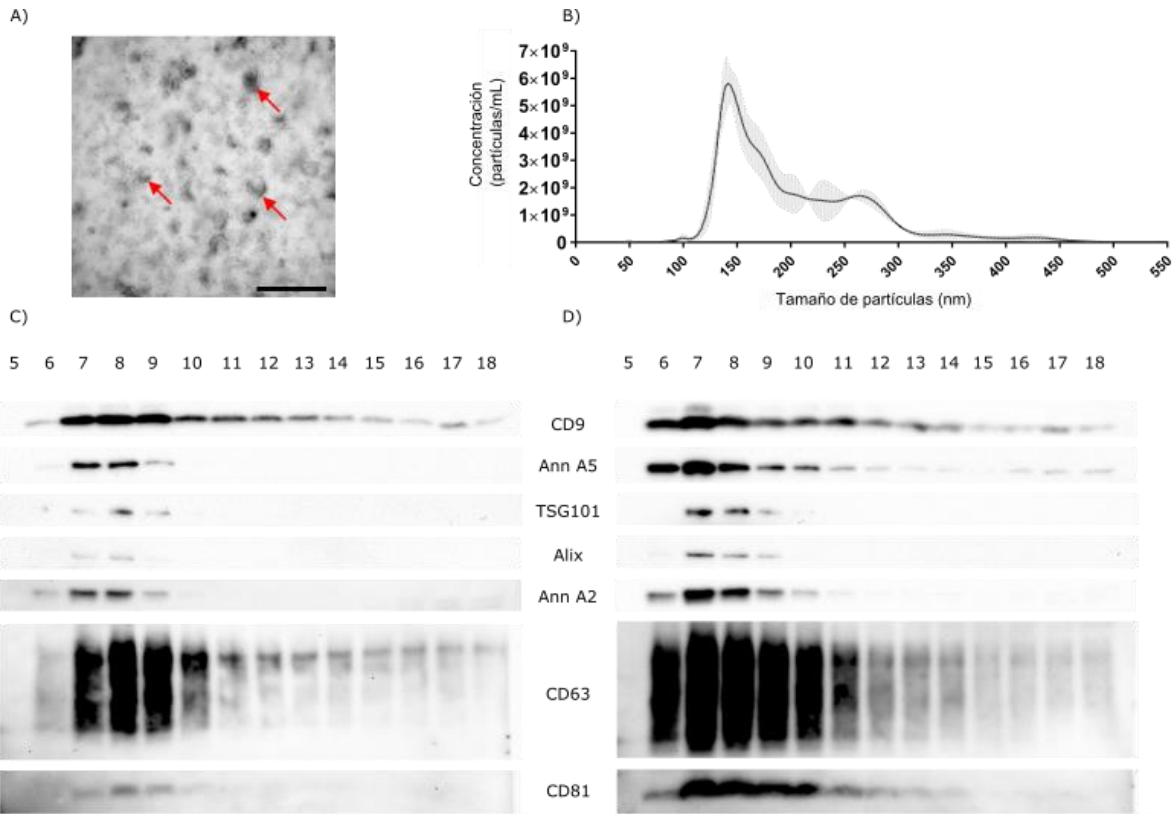


Figura 5. Caracterización de las fracciones de MDA-MB-468 obtenidas por Pre-SEC. (A) Microscopía Electrónica de Transmisión de las vesículas extracelulares obtenidas por Pre-SEC (concentrado de las fracciones 6 a la 17). La flecha señala a las vesículas extracelulares, las cuales muestran la clásica forma de copa, previamente reportada. Escala= 500 nm. **(B)** Análisis de rastreo de nanopartículas correspondiente al concentrado de las fracciones 6 a la 17. El tamaño de partículas varía entre los 100 y 300 nm, obteniéndose un promedio de 150 nm, mismo que ha sido reportado previamente en preparaciones de vesículas. **(C, D)** Ensayos de Western blot que muestra la distribución de los marcadores de vesículas extracelulares presentes en las fracciones 5 a 18, tanto a volumen constante (C) como a proteína constante (D). Se puede ver que existe una distribución diferencial entre los marcadores.

El aislamiento mediante Pre-SEC permite separar subgrupos de vesículas

La distribución diferencial de los marcadores de vesículas extracelulares en las fracciones colectadas nos permitió inferir que posiblemente se trataran de dos subgrupos distintos de vesículas. Para comprobar esto, se separaron las fracciones en dos grupos, uno que incluyera las fracciones 6 a 10, denominado subgrupo A (SG-A), y otro que reuniera las fracciones 11 a 15, denominado subgrupo B (SG-B). Debido a que la separación cromatográfica diluye la muestra de vesículas, se evaluaron 3 métodos para concentrar el contenido de cada subgrupo: la ultracentrifugación; la precipitación con polietilenglicol; y la ultrafiltración con filtros Amicon. El patrón de proteínas observado por azul de Coomassie permitió determinar que el enriquecimiento de proteínas es visiblemente distinto en cada caso. En el subgrupo A, se puede ver que las tres técnicas aislaron proteínas con un patrón similar, todas enriquecidas en proteínas de bajo peso molecular. En cambio, en el subgrupo B, se puede ver que solamente la ultracentrifugación logró enriquecer la muestra en proteínas de bajo peso molecular. La precipitación y la ultrafiltración mostraron un patrón de proteínas similar entre sí, aunque pobremente enriquecidas en proteínas menores a 50kDa (Figura 6A).

Cada subgrupo fue analizado mediante ensayos tipo western para determinar la presencia de marcadores de vesículas presentes en cada técnica de concentración. Para el subgrupo A, todos los marcadores fueron detectados en las tres técnicas, aunque la señal más intensa se encontró en la muestra aislada por ultracentrifugación. En el caso del subgrupo B, solo los marcadores TSG101 y CD9 mostraron una fuerte intensidad. La precipitación y la ultrafiltración también lograron aislar vesículas del subgrupo A, aunque la intensidad de las señales de los marcadores es menor que lo que se obtuvo en la ultracentrifugación. Para el subgrupo B, prácticamente no se pudieron detectar los marcadores de vesículas utilizando la precipitación y la ultrafiltración, excepto por el marcador CD9. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de calnexina (figura 6B). La proteína total obtenida por cada técnica muestra una relación inversa entre la cantidad de proteína total obtenida y la intensidad de los marcadores. (Figura 6C). Para todos los casos, se normalizó la señal de los marcadores con respecto a la señal dada por la albúmina en el medio de cultivo. La ultracentrifugación presentó la mayor intensidad de señal de marcadores, tanto para la muestra del subgrupo A como el subgrupo B. Con esta técnica, la abundancia relativa de los marcadores fue cuatro veces más alta que en el resto de las técnicas. Además, las señales de TSG101 y CD9 no difieren

significativamente entre los subgrupos. El resto de los marcadores pudieron detectarse, aunque con una intensidad casi 10 veces menor que la que se observa en el subgrupo A.

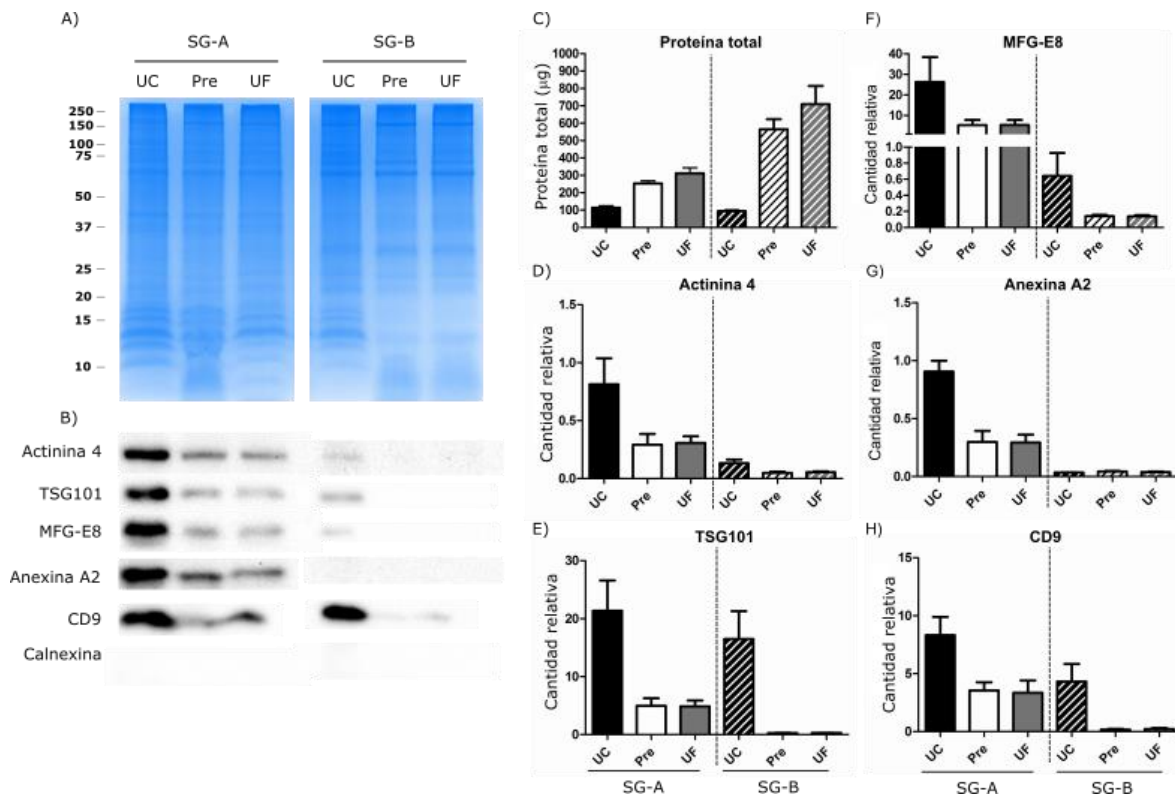


Figura 6. Aislamiento de subgrupos de vesículas extracelulares por Pre-SEC. En las vesículas extracelulares obtenidas por Pre-SEC se analizó la eficiencia de aislamiento al añadir un paso más al protocolo de purificación: ultracentrifugación (UC), precipitación (Pre) o ultrafiltración (UF). **A)** Patrón de proteína obtenido con azul de Coomassie, a partir del procesamiento por Pre-SEC. Existen diferencias entre el subgrupo A (**SG-A**) y el subgrupo B (**SG-B**), especialmente en las proteínas de bajo peso molecular. **B)** Panel de marcadores de vesículas extracelulares detectados por ensayos de western blot. Se observan diferencias en el contenido de marcadores entre los dos subgrupos seleccionados. **C)** Proteína total (microgramos) obtenida del aislamiento de vesículas por Pre-SEC. No existe una relación entre la cantidad de proteína total aislada y la intensidad de marcadores de vesículas extracelulares. **D-H)** Cantidad relativa de los marcadores de vesículas extracelulares: Actinina 4 (D), TSG101 (E), MFG-E8 (F), Anexina A2 (G) y CD9 (H). La normalización se realizó tomando como referencia el contenido de albúmina en el medio de cultivo sin vesículas.

Pre-SEC permite separar vesículas y subgrupos de vesículas en diferentes líneas celulares

Para descartar la posibilidad de que la separación de vesículas por Pre-SEC y su posterior concentración en subgrupos fuera exclusiva de la línea celular MDA-MB-468, se evaluó el aislamiento de vesículas extracelulares en otras 2 líneas celulares.

En el caso de la línea celular HEK293T (figura 7), las fracciones colectadas mostraron una distribución de proteínas similar a la de MDA-MB-468. El patrón de azul de Coomassie permitió ver que el contenido de proteína aumenta a partir de la fracción 5, alcanza el máximo en la fracción 9, y posteriormente disminuye gradualmente (figura 7A). Los ensayos tipo Western de las fracciones 5 a 18 a concentración proteica constante revelaron una distribución de marcadores muy similar a la que se obtuvo en la muestra de MDA-MB-468, en donde los mismos marcadores de vesículas Alix, TSG101, Anexina A2 y Anexina A5 se encontraron restringidos a las primeras fracciones y las tetraspaninas se extendieron hacia fracciones posteriores (figura 7B). La lectura de absorbancia 280nm confirmó la distribución de proteína observada en los geles con Coomassie (figura 7C).

En el caso de las vesículas obtenidas a partir de cultivos primarios de fibroblastos (figura 8), el patrón de proteínas observado presenta una distribución semejante a la encontrada en las líneas celulares MDA-MB-468 y HEK293T. En este caso se observa una menor presencia de proteínas en la región debajo de los 50kDa (figura 8A). Algunos marcadores de vesículas mostraron un patrón distinto al que se encontró en las otras líneas celulares. Los marcadores Anexina A5 y Anexina A2 mantuvieron una distribución restringida a las primeras fracciones evaluadas, mientras que otros marcadores como Alix y TSG101 no mostraron señal. Las tetraspaninas sí conservaron una distribución amplia (figura 8B). Los valores de absorbancia 280 nm registraron un aumento progresivo de la concentración proteica a partir de la fracción 4, alcanzando el máximo valor en las fracciones 13, 14 y 15, y disminuyendo gradualmente hasta la fracción 20 (figura 8C).

La microscopía electrónica reveló la presencia de vesículas con morfología similar a la que ha sido descrita para el caso de las EVs en ambos subgrupos (figuras 7D/8D). Finalmente, el análisis de rastreo de nanopartículas mostró que, en el caso de HEK293T, las partículas del subgrupo A registraron un tamaño promedio de 174 nm (+/- 5.4nm), mientras que el subgrupo B registró un tamaño de 159 nm (+/-7.3nm). Para las vesículas

de fibroblastos, el subgrupo A presentó un tamaño promedio de partículas de 191nm (+/- 8.5nm), y el subgrupo B de 167nm (+/-11.2 nm). Sin embargo, en los tres tipos celulares el subgrupo A presento una abundancia 8 veces mayor que el subgrupo B (figuras 7E/8E).

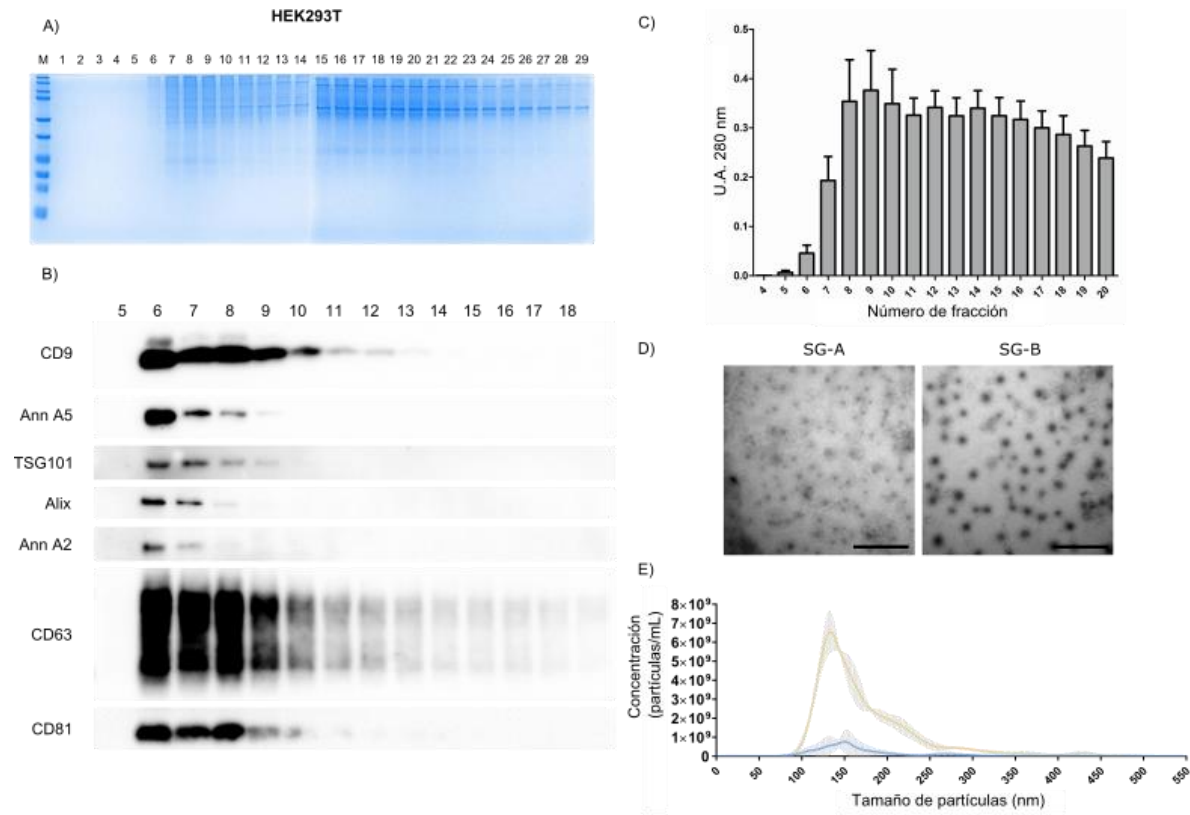


Figura 7. Caracterización de las vesículas extracelulares obtenidas de células HEK293T mediante Pre-SEC. A) Patrón de proteína obtenido con azul de Coomassie. **B)** Panel de marcadores de vesículas extracelulares detectados por ensayos de western blot, obtenido a partir de las fracciones 5 a 18. **C)** Absorbancia a 280 nm detectada en las fracciones colectadas. **D)** Microscopía electrónica de los subgrupos A (SG-A) y B (SG-B). Aumento=60,000x; escala= 500 nm. **E)** Análisis de rastreo de nanopartículas de SG-A (amarillo) y SG-B (azul). El SG-A contiene casi 14 veces más partículas que el SG-B.

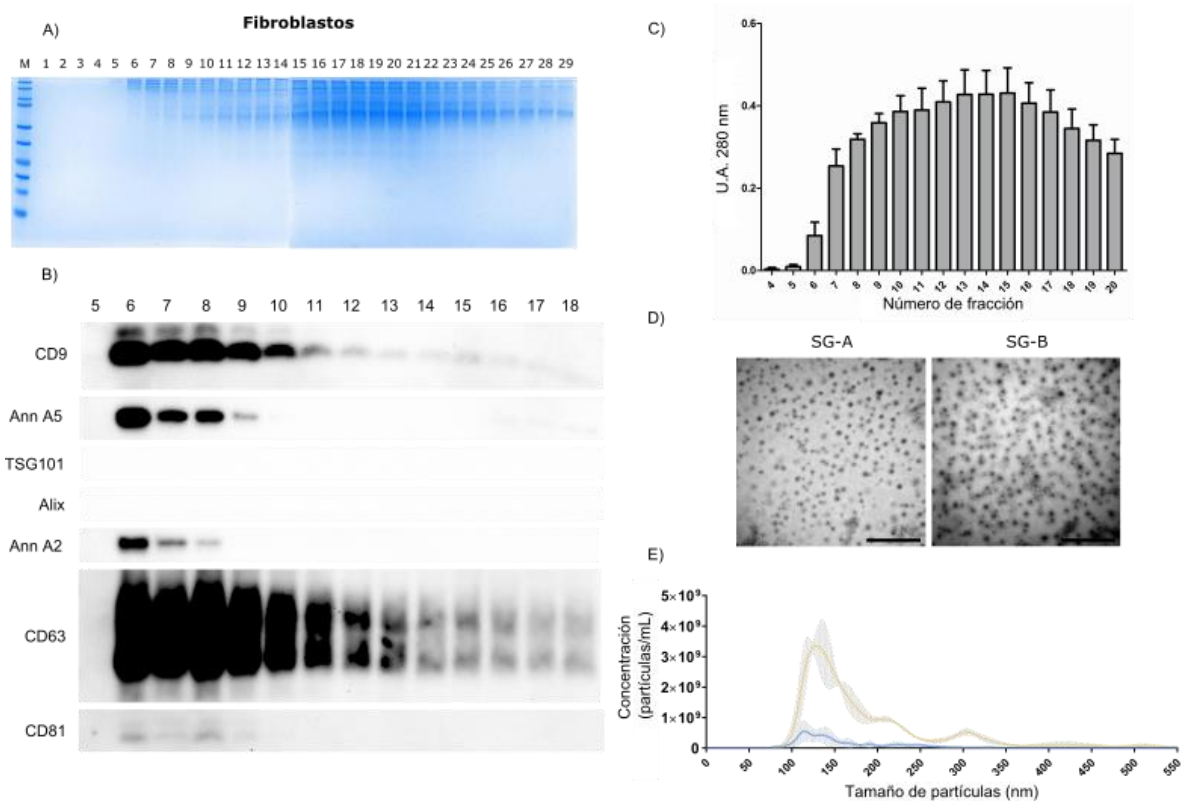


Figura 8. Caracterización de las vesículas extracelulares obtenidas de fibroblastos mediante Pre-SEC. A) Patrón de proteína obtenido con azul de Coomassie. **B)** Panel de marcadores de vesículas extracelulares detectados por ensayos de western blot, obtenido a partir de las fracciones 5 a 18. A diferencia de MDA-MB-468 y HEK293T, Alix y TSG101 no pudieron ser detectados en las vesículas extracelulares obtenidas de los fibroblastos. **C)** Absorbancia a 280 nm detectada en las fracciones colectadas. **D)** Microscopía electrónica de los subgrupos A (SG-A) y B (SG-B). Aumento=60,000x; escala=500 nm. **E)** Análisis de rastreo de nanopartículas de SG-A (amarillo) y SG-B (azul). SG- A contiene casi 6 veces más partículas que SG-B.

Efecto de la concentración de suero fetal bovino sobre el patrón de proteínas obtenido por Pre-SEC

Debido a que el suero fetal bovino adicionado al medio de cultivo contribuye a que aumente la cantidad de proteínas solubles presentes (figura 9A), se buscó determinar la cantidad de suero suplementada al medio, a fin de no alterar la tasa de crecimiento celular y reducir al máximo la contaminación proveniente del medio de cultivo. Partiendo de 80 mL de medio DMEM se evaluaron 3 condiciones: medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino libre de vesículas. (figura 9B), medio con 1% de suero fetal bovino libre de vesículas (figura 9C), y medio sin suero fetal bovino adicionado (figura 9D). El patrón de proteínas observado muestra que, conforme se reduce la cantidad de suero añadida al medio, la presencia de proteínas en las fracciones disminuye (figura 9A-D). Esto fue confirmado por los valores de absorbancia 280 nm de las fracciones colectadas por Pre-SEC en cada condición (figura 9E). La máxima absorbancia registrada en el medio condicionado con 1% de suero (fracción 8) fue casi 5 veces menor que las fracciones provenientes del medio condicionado con 10% de suero fetal bovino.

La figura muestra la caracterización de los marcadores moleculares de EVs en células MDA-MB-468 incubadas en medio con suero al 1%, condición que se utilizó para los estudios proteómicos que realizamos. El patrón de proteínas muestra una concentración de proteínas de bajo peso molecular desde la fracción 5 hasta la fracción 17 (figura 10A). El análisis de marcadores de vesículas confirmó su distribución en el mismo número de fracciones (fracción 5 a 17). Se encontró una distribución diferencial entre los marcadores. Las proteínas CD9 y Anexina 2 se distribuyeron desde la fracción 5 hasta la fracción 17. En cambio, los marcadores Actinina 4, TSG101 y Anexina 5 se restringieron a las fracciones 6-10 (figura 10B). Por último, la absorbancia 280 nm registró el máximo valor en la fracción 7 (figura 10C), misma que presenta la mayor intensidad de marcadores de vesículas. Estos datos confirmaron que las vesículas se encontraron concentradas entre las fracciones 5 a 16, y nos permitió separar las fracciones en los subgrupos A (fracción 5-10) y B (fracción 11-16).

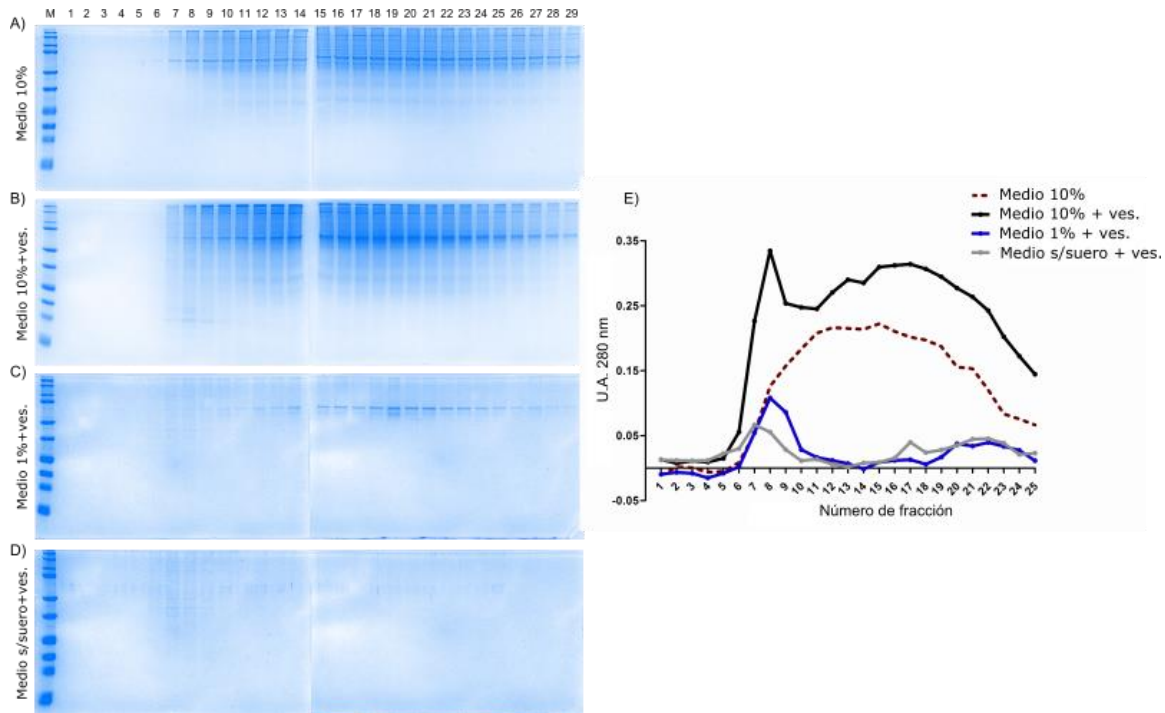


Figura 9. Efecto de la concentración de suero fetal bovino sobre el patrón de proteínas obtenido por Pre-SEC. Células de MDA-MB-468 fueron incubadas en medio de cultivo condicionado con distintos porcentajes de suero fetal bovino, El suero fue previamente ultracentrifugado, a fin de depletar el contenido de vesículas extracelulares provenientes del mismo. **A-D)** Patrón de proteína obtenido con azul de Coomassie de en las distintas fracciones del Pre-SEC. (A) Medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino sin vesículas. (B) Medio de cultivo condicionado al 10% recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células. (C) Medio de cultivo condicionado al 1% recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células. (D) Medio de cultivo sin suero recolectado después de 48 horas de incubación en presencia de células. **E)** Absorbancia a 280 nm detectada en las fracciones colectadas a partir de los distintos porcentajes de condicionamiento del medio de cultivo. Se observa una diferencia significativa en el contenido de proteína detectada en el medio tanto en las condiciones de suero al 10% como al 1%, siendo más baja en el segundo caso.

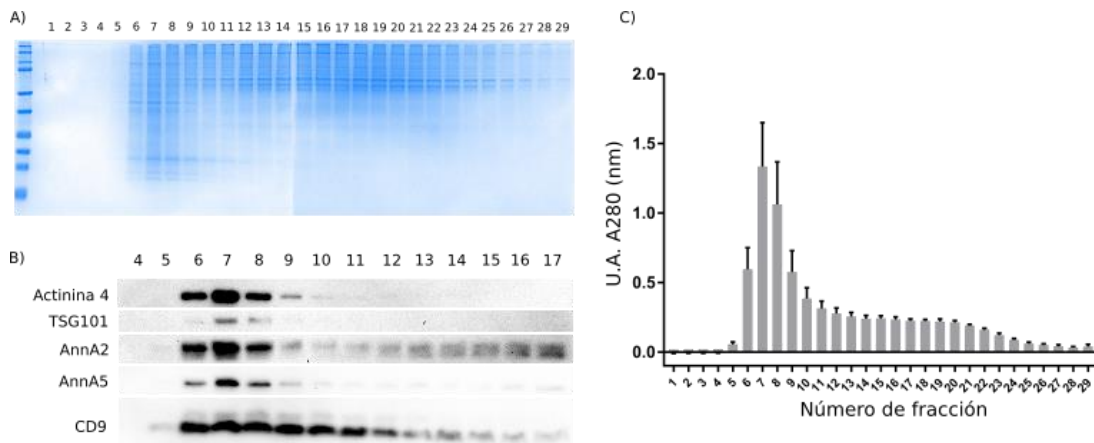


Figura 10. Caracterización de los marcadores moleculares de vesículas extracelulares en células MDA-MB-468 incubadas en medio con suero al 1%. Se seleccionó esta condición a fin de optimizar la obtención de vesículas extracelulares para su posterior análisis por estudios de proteómica. **A)** Patrón de proteína obtenido con azul de Coomassie. Se puede observar la presencia de un grupo claramente visible de proteínas de bajo peso molecular correspondiente a las fracciones donde se localizan las vesículas extracelulares. **B)** Panel de marcadores de vesículas extracelulares detectados por ensayos de western blot. **C)** Absorbancia a 280 nm detectada en las fracciones colectadas. El uso de medio de cultivo con suero al 1% produce una baja absorbancia en las fracciones libres de vesículas extracelulares, mientras que las fracciones que contienen vesículas extracelulares muestran un aumento significativo.

Análisis proteómico de los subgrupos de EVs aislados por Pre-SEC

Para la caracterización molecular de los subgrupos generados, hicimos un análisis proteómico de tipo cuantitativo con el fin de conocer diferencias en la composición de proteínas de EVs de células MDA-MB-468. Los resultados obtenidos muestran que el protocolo propuesto en este trabajo (Pre-SEC más ultracentrifugación) es la mejor técnica para obtener vesículas purificadas y así obtener la mayor resolución posible del análisis proteómico por espectrometría de masas MS/MS. El conjunto de proteínas detectadas en cada subgrupo fue comparado con la base de datos de vesículas extracelulares Vesiclepedia (figura 11A). Esta base de datos en línea condensa una gran cantidad de estudios proteómicos de vesículas. La información de Vesiclepedia fue filtrada para que solamente mostrara las proteínas identificadas por ultracentrifugación, precipitación y cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando a la espectrometría de masas como método de análisis proteómico de las muestras. Esto dio un total de 2707 proteínas para comparar. Se realizó un comparativo cuantitativo del enriquecimiento proteico entre los subgrupos (figura 11B). Adicionalmente, se comparó con los resultados obtenidos en el proyecto del National Cancer Institute, NCI-60, generado por Hurwitz *et al* [73]. Para nuestro análisis sólo se consideraron las proteínas detectadas para la línea celular MDA-MB-468 (figura 11C). Se encontró que el 94% de las proteínas detectadas se encuentran reportadas en Vesiclepedia, y el 98% en la base de datos de NCI-60. Al comparar los subgrupos entre sí, se encontró que todas las proteínas del subgrupo B se encuentran registradas para el subgrupo A. En cambio, el subgrupo A registró 25 proteínas exclusivas que no se encontraron en el subgrupo B (figura 11B). La comparación con la base de datos Vesiclepedia mostró que hay 166 proteínas nuevas detectadas en los subgrupos A y B que no estaban reportadas en la base de datos. En la comparación con la base de datos de NCI-60, se lograron detectar 53 proteínas nuevas en los subgrupos A y B. Una vez discriminadas las proteínas encontradas tanto en la base de datos Vesiclepedia como de NCI-60, se encontraron 163 proteínas compartidas entre los subgrupos que no estaban reportadas en ninguna de las dos bases de datos. Estas proteínas se encuentran asociadas a procesos de regulación transcripcional, la cascada de señalización TRAIL (procesos de apoptosis) y respuesta inmune.

Utilizando el software Funrich, identificamos el perfil de las proteínas que fueron detectadas en ambos subgrupos, asociando las proteínas ya sea con un componente celular o con un proceso biológico celular específicos (figura 11D y E). El comparativo de

las proteínas presentes en los subgrupos, haciendo referencia al componente celular al que pertenecen, mostró diferencias importantes en el porcentaje de expresión de cada subgrupo. La expresión de las proteínas del subgrupo A se encuentra mayormente enriquecida en componentes del citoesqueleto (1.82 veces), vía de síntesis de lisosomas y endosomas (1.56 y 1.67 veces, respectivamente), y componentes de la membrana plasmática (1.39 veces), comparado con el subgrupo B; mientras que las proteínas del subgrupo B se encuentran mayoritariamente asociadas a la expresión nuclear, específicamente a las regiones nucleolar (1.29 veces), nucleosomal (3.5 veces), nucleoplásmica (4.31 veces) y cromosomal (4.96 veces), en comparación con el subgrupo A. De forma interesante, más del 90% de las proteínas de los dos subgrupos se encuentran asociadas a exosomas. En el caso de la asociación con procesos biológicos, se encontró que ambos subgrupos presentan un porcentaje similar de asociación con vías de transducción de señales y comunicación celular, aunque también se encontraron diferencias importantes. Las proteínas del subgrupo A se encuentran asociadas a procesos de síntesis de energía (2.05 veces>SG-B), transporte intercelular (2.42 veces>SG-B), metabolismo y crecimiento y mantenimiento celular (1.46 veces>SG-B); mientras que las proteínas del subgrupo B se encuentran principalmente asociadas a procesos de regulación del metabolismo de ácidos nucleicos (3.19 veces>SG-A) y respuesta inmune (1.59 veces<SG-A). Las tablas 1 y 2 representan las 20 proteínas con el mayor enriquecimiento identificado en cada subgrupo. La tabla 1 corresponde a las proteínas mayoritariamente enriquecidas en el subgrupo A, en comparación con el subgrupo B, y la tabla 2 muestra las proteínas mayormente enriquecidas en el subgrupo B, con respecto al subgrupo A.

Por último, se observaron ambos subgrupos por microscopía electrónica de transmisión y se realizó un análisis de rastreo de nanopartículas de cada subgrupo (figura 11 F y G, respectivamente). La microscopía electrónica confirmó la presencia de vesículas con forma de copa y esférica en ambos subgrupos (figura 11F). El análisis de rastreo por nanopartículas mostró que la cantidad de partículas es 15 veces más abundante de partículas en el subgrupo A que en el subgrupo B. El tamaño de las partículas se encuentra dentro de un rango similar (figura 10G).

Para los tres tipos celulares, se calculó el índice de pureza de las muestras de ambos subgrupos. Este índice se calcula a partir de la concentración de partículas por mL de la

muestra y es dividido por la cantidad de proteína total de la misma. Esto permite hacer un cálculo aproximado de la fracción de la proteína total de la muestra que corresponde a las vesículas, separándolas del resto de proteínas solubles. Los resultados se encuentran representados en la tabla 3. En los tres casos, la muestra del subgrupo A obtuvo un valor de pureza mayor que el subgrupo B.

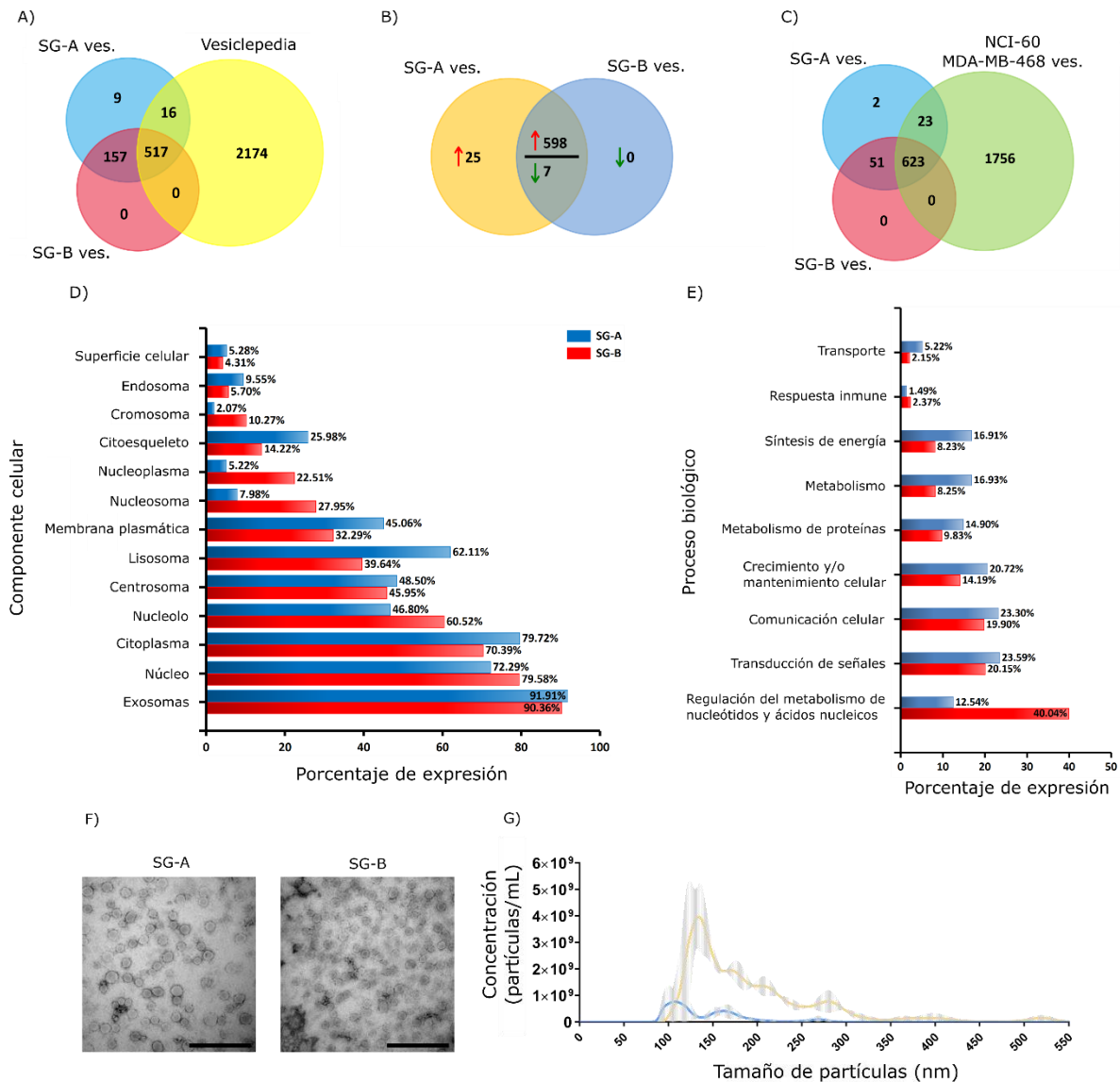


Figura 11. Análisis comparativo entre las vesículas extracelulares aisladas en el subgrupo A (SG-A) y el Subgrupo B (SG-B). **A)** Análisis proteómico de las vesículas presentes en el SG-A y SG-B, comparado con la base de datos Vesiclepedia. **B)** Comparación cuantitativa del enriquecimiento proteico SG-A vs SG-B. **C)** Comparación entre las proteínas presentes en ambos subgrupos con la base de datos NCI-60. **D, E)** Análisis cuantitativo del porcentaje de expresión de las proteínas identificadas en cada subgrupo asociadas a un componente celular (D) y proceso biológico específico (E). Ambos subgrupos presentan un porcentaje de expresión similar para proteínas asociadas a exosomas (91.91% y 90.36%, respectivamente), confirmando el perfil vesicular presente en los dos subgrupos. **F)** Microscopía electrónica de las vesículas extracelulares presentes en SG-A y SG-B. Aumento=60,000x; escala= 500 nm. **G)** Análisis de rastreo de nanopartículas de SG-A (amarillo) y SG-B (azul). SG-A presenta casi 8 veces más partículas que SGB.

Tabla 1: Lista representativa de proteínas enriquecidas en SG-A.

ID proteína	Símbolo del gen	Nombre
P26038	MSN	Moesin
P23528	CFL1 CFL	Cofilin-1
P06733	ENO1	Alpha-enolase
P68104	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1
P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta
P61204	ARF3	ADP-ribosylation factor 3
P51149	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a
Q08431	MFGE8	Lactadherin
P08758	ANXA5	Annexin A5
P62820	RAB1A	Ras-related protein Rab-1A
P62805	HIST1H4A	Histone H4
P07355	ANXA2	Annexin A2
P62937	PPIA	Peptidyl-prolylcis-trans isomerase A
O43707	ACTN4	Alpha-actinin-4
P0DP24	CALM2	Calmodulin-2
P16401	HIST1H1B	Histone H1.5
P35579	MYH9	Myosin-9
Q6FI13	HIST2H2AA3	Histone H2A type 2-A
P21333	FLNA	Filamin-A
P01892	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain

Tabla 2: Lista representativa de proteínas enriquecidas en SG-B.

ID proteína	Símbolo del gen	Nombre
P40933	IL15	Interleukin-15 (IL-15)
P11532	DMD	Dystrophin
P00734	F2	Prothrombin
P15056	BRAF	Serine/threonine-protein kinaseB-raf
Q9NZM3	ITSN2	Intersectin-2
Q6FGE5	S100A10	S100A10 protein
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2
E7END7	RAB1A	Ras-related protein Rab-1A
E9PLD0	RAB1B	Ras-related protein Rab-1B
Q92928	RAB1C	Ras-related protein Rab-1C
M0QZN2	RPS5	40S ribosomal protein S5
P16403	HIST1H1C	Histone H1.2
P62805	HIST1H4A	Histone H4
P16401	HIST1H1B	Histone H1.5
P35579	MYH9	Myosin-9
P10412	HIST1H1E	Histone H1.4
P16070	CD44	CD44 antigen
P21333	FLNA	Filamin-A
Q08380	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein
O00468	AGRN	Agrin

Tabla 3. Valores obtenidos del índice de pureza (partículas/ μ g de proteína) de las preparaciones de vesículas obtenidas por Pre-SEC. Se realizaron 3 réplicas por cada línea celular.

Subgrupos	MDA-MB-468		HEK293T		Fibroblastos	
	Promedio	Desv. Estándar	Promedio	Desv. Estándar	Promedio	Desv. Estándar
SG-A	1.04E+09	1.06E+08	9.55E+08	1.61E+08	7.96E+08	9.19E+07
SG-B	2.67E+08	2.98E+07	1.44E+08	3.26E+07	9.98E+07	2.05E+07

Las vesículas extracelulares obtenidas de MDA-MB-468 mediante Pre-SEC son ingresadas por células receptoras

Una vez comprobado que ambos subgrupos contienen vesículas extracelulares con diferentes propiedades, se realizó un ensayo para determinar si las vesículas extracelulares de los subgrupos podían ser internalizadas por las células. El marcaje de ambos subgrupos con el marcador fluorescente lipofílico BODIPY TR *ceramide* permitió determinar cualitativamente el ingreso de las vesículas a las células MDA-MB-468 receptoras. Tanto las vesículas del SG-A como de SG-B fueron integradas por las células receptoras (figura 12). En el caso de las vesículas marcadas, se puede ver que la señal fluorescente se encuentra distribuida por todo el citoplasma. La mayor intensidad fluorescente se localiza alrededor del núcleo, región que corresponde con el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

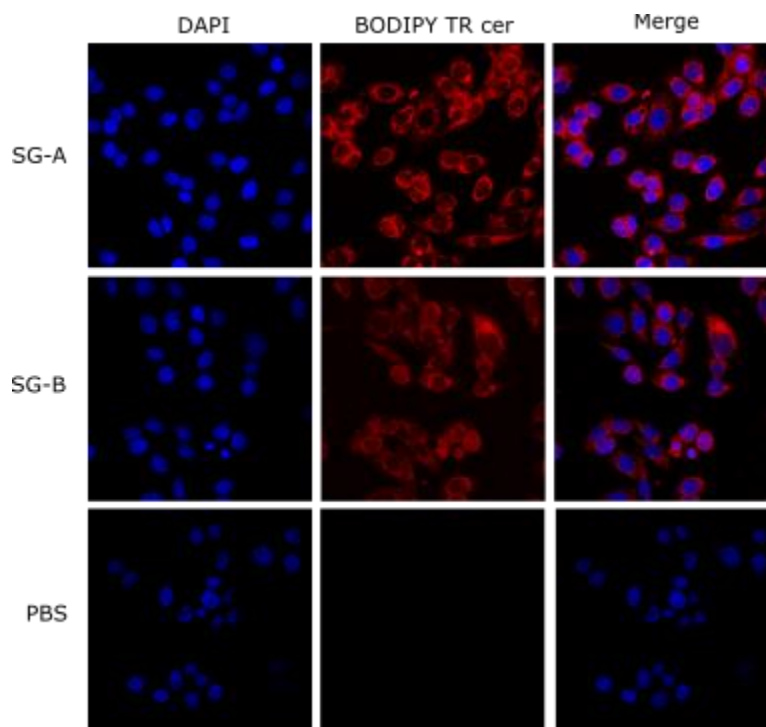


Figura 12. Ensayo funcional de captura de vesículas extracelulares en células MDA-MB-468. Se utilizó el marcador vesicular fluorescente, BODIPY TR *ceramide*, para determinar si las vesículas extracelulares SG-A y SG-B fueron capaces de ingresar en las células blanco después de un tiempo de incubación de 3 horas. Como control negativo fue utilizado PBS con BODIPY TR disuelto. Azul= DAPI; rojo= BODIPY TR *ceramide*.

Discusión

En años recientes se han desarrollado una gran variedad de técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares [74]. Debido a que no existe un consenso claro acerca de cuál técnica es la más apropiada para su aislamiento, todas ellas parecen ser utilizadas indiscriminadamente y funcionan en cierta medida para aislar EVs [1, 5, 64, 67, 75]. En este sentido, diversos estudios han demostrado que el producto final obtenido por cada técnica presenta cantidades y calidades diferentes, ya sea por la naturaleza de cada técnica, así como del tipo y la cantidad de fluido del que son aisladas [5, 64, 75]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo también confirman esta heterogeneidad en las muestras. Aunque partimos del mismo tipo y la misma cantidad de muestra, el resultado final de cada técnica fue drásticamente diferente. Además, la diferencia en el contenido de albúmina presente en las muestras no fue estadísticamente significativa entre ellas, lo que sugiere que en todos los casos existe una cierta cantidad de albúmina que no puede eliminarse completamente por ninguna de las técnicas comparadas aquí. Esto ha sido confirmado en varios estudios, donde comparan la pureza de las muestras obtenidas por distintas técnicas, concluyendo que ninguna técnica logra desaparecer por completo la presencia de albúmina en las muestras [75-78]. La ultracentrifugación mostró ser la técnica que permite aislar vesículas y remueve la mayor cantidad de proteínas solubles del medio, aunque ya se ha demostrado que esta técnica puede causar la fusión de las vesículas aisladas, así como la agregación de las mismas [65]. Contrario a lo que se ha reportado en otros estudios [3, 4], las técnicas de precipitación y cromatografía de exclusión por tamaño permitieron obtener muy pocas vesículas o con un mayor grado de contaminación, comparado con la ultracentrifugación. Interesantemente, al combinar estas dos técnicas, el rendimiento de vesículas aisladas aumentó significativamente, lo que sugiere que el acoplamiento de técnicas permite aislar una mayor cantidad de vesículas y separarlas del resto de las proteínas solubles que las acompañan.

La técnica Pre-SEC demostró ser una alternativa viable a la ultracentrifugación para aislar una mayor cantidad de vesículas del medio condicionado sin comprometer su integridad. Otros estudios han combinado diferentes técnicas de aislamiento y han obtenido un aumento en el aislamiento de EVs similar, en comparación con el uso de las técnicas por separado [68, 79]. Los trabajos como el de Helwa *et al.*, en donde han comparado el rendimiento obtenido de EVs utilizando kits comerciales, han concluido que éstos permiten obtener una mayor cantidad de vesículas (de 80 a 300 veces más) que con la

ultracentrifugación, sin comprometer su integridad física y la pureza de la muestra [70]. Sin embargo, una desventaja que presentan estos kits junto con la ultracentrifugación es que es imposible aislar de manera independiente subgrupos de EVs, debido a que estos protocolos están diseñados para aislar vesículas de manera general. Cabe destacar que una ventaja que presenta la técnica Pre-SEC sobre el resto es que permite separar fácilmente subgrupos de vesículas, sin utilizar equipos especializados, además de que puede realizarse todo el procedimiento bajo condiciones de esterilidad, dándole un potencial uso en estudios *in vivo*.

Al calcular el índice de pureza de la muestra de EVs como han propuesto Webber y colaboradores [80], basado en obtener la proporción entre la concentración de partículas/mL registradas por NTA y la concentración proteica ($\mu\text{g/mL}$), obtuvimos valores que se encuentran en el límite de ser consideradas como “ligeramente purificadas” (véase tabla 3) con base en la escala de pureza propuesta en [80]. Esto indica que las muestras obtenidas por Pre-SEC se encuentran enriquecidas en vesículas, aunque aún presentan una ligera presencia de impurezas. Cabe destacar que el uso de medio condicionado al 10% con FBS para el análisis de rastreo de nanopartículas y la cuantificación de proteínas por ensayo BCA pudo haber afectado el índice de pureza y explicar el valor obtenido, cercano a la categoría “ligeramente puras”. Otros estudios como los que han realizado Martins *et. al.*, Goulet *et. al.*, y Corso *et. al.*, han utilizado el mismo método para calcular la pureza de sus muestras aisladas por distintas técnicas y han obtenido valores de alta pureza para sus preparaciones de vesículas, utilizando medio de cultivo reducido en suero (<10%), medio sin suero adicionado, o acoplado una separación por densidad con gradientes de sacarosa [69, 81, 82]. Rider y colaboradores [4], demostraron que el protocolo establecido para precipitar proteínas utilizando polietilenglicol como agente precipitante permite obtener un valor de pureza similar al máximo obtenido al utilizar un protocolo de purificación por ultracentrifugación con gradiente de sacarosa [80]. La clave está en cultivar las células con medio de cultivo libre de suero para eliminar la mayoría de las proteínas solubles que aporta el suero. En nuestro estudio, utilizando la técnica Pre-SEC, pudimos alcanzar un nivel de pureza muy similar al que se obtiene por ultracentrifugación. Esto, combinado con el uso de medio de cultivo con 1% de suero fetal bovino, nos permitió obtener una muestra final con un alto grado de pureza para realizar los análisis proteómicos.

Los subgrupos de vesículas separados por Pre-SEC mostraron diferencias en la presencia y enriquecimiento de proteínas marcadoras. Esto concuerda con lo que se ha reportado en otros estudios, donde el aislamiento de subpoblaciones de vesículas por distintas técnicas muestra un enriquecimiento diferencial en el contenido de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos entre ellas [44, 83-85]. Utilizando la técnica Pre-SEC para aislar vesículas de distintas líneas celulares encontramos que cada tipo celular produce vesículas con diferentes propiedades. En el caso de las líneas celulares inmortalizadas MDA-MB-468 y HEK293T, los marcadores de vesículas mostraron la misma presencia y distribución, aunque con distintas intensidades. En cambio, en los fibroblastos se encontró la ausencia de algunos marcadores, tales como Alix y TSG101. Ya que estas proteínas son consideradas comúnmente como marcadores enriquecidos en preparaciones exosomales [83-85], su ausencia sugeriría que las vesículas aisladas de fibroblastos o no serían exosomas o provendrían de una ruta de síntesis alterna en donde no se encuentra involucrada la actividad de Alix o TSG101. Este cambio en la composición de las EVs podría ser explicado a partir del tipo de tejido del que fueron obtenidas, así como por tratarse de un cultivo primario, a diferencia de las otras dos líneas celulares que han sido inmortalizadas con el uso de virus. Se sabe que los virus utilizados para inmortalizar líneas celulares, tales como los retrovirus y otros virus encapsulados, secuestran la vía endosomal de síntesis de vesículas para propagarse hacia el espacio extracelular [86, 87]. Esto puede significar un aumento en la presencia de proteínas exosomales, tales como Alix y TSG101, en las preparaciones de vesículas [88, 89]. Sin embargo, las vesículas de los tres tipos celulares presentaron a las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 con una distribución similar, lo que sugiere que comparten moléculas membranales y, por lo tanto, sistemas de reconocimiento y señalización [90, 91]. El volumen de medio de cultivo utilizado para aislar EVs de cada línea celular se estableció con base en los resultados obtenidos a partir de la línea celular MDA-MB-468, ya que nosotros encontramos que esta línea celular produce una alta cantidad de vesículas hacia el medio extracelular. Algunos autores sugieren que esta característica les brinda una alta capacidad de generar metástasis en otros tejidos sanos del organismo [92]. Esto pudo haber afectado el número de EVs detectado para los otros dos tipos celulares HEK293T y los fibroblastos, especialmente en el segundo caso. Aunque se partió de la misma cantidad de medio de cultivo condicionado y se mantuvo una densidad celular similar en los tres casos, los fibroblastos produjeron casi la mitad de EVs, comparado con MDA-MB-468 y HEK293T. Otra explicación probable podría ser que las células MDA-MB-468, al

presentar una condición tumoral, la producción y secreción de EVs sea más elevada que en condiciones normales; mientras que las células HEK293T, al tener un origen embrionario y estar infectadas con adenovirus 5, pueden tener una alta actividad de producción de EVs, comparado con células de tejido adulto. Esto podría explicar la menor cantidad de proteína visible en las fracciones teñidas con azul de Coomassie en los geles.

Kowal y colaboradores, en un estudio donde caracterizaron las vesículas producidas por células dendríticas humanas, determinaron que los marcadores de vesículas TSG101 y Actinina 4 son excluyentes de distintas subpoblaciones de vesículas [84]. Sin embargo, en nuestro caso no sucedió así, ya que ambos marcadores fueron detectados tanto en el subgrupo A como en el subgrupo B, aunque la Actinina 4 mostró una señal muy débil en el segundo subgrupo. Además, la proteína Anexina 2, considerada en el trabajo previamente citado como marcador general de vesículas extracelulares, mostró un fuerte enriquecimiento en el subgrupo A, siendo prácticamente indetectable en el subgrupo B. Esto es interesante, ya que sugiere que podríamos tener una mezcla de subtipos vesiculares aún dentro de los subgrupos que nosotros hemos delimitado, abriendo la posibilidad de poder separar aún más las vesículas acoplado más pasos de separación. Sin embargo, los trabajos de Bobrie [85], Durcin [83] y colaboradores mostraron una distribución de los marcadores TSG101, MFG-E8, Actinina 4, Anexina 2 y las tetraspaninas CD9 y CD81 similar a nuestros resultados. Por ello, es posible que esta discrepancia entre estudios sea consecuencia de un artefacto producido por la variedad de técnicas que son utilizadas para el aislamiento de EVs y no una distinción real entre subtipos.

Dado que los estudios proteómicos requieren de un alto grado de pureza de la muestra para ser analizada [93], la adición de un tercer paso de aislamiento (ultracentrifugación) a la técnica Pre-SEC, desarrollada por nosotros, permitió obtener EVs lo suficientemente purificadas para ser analizadas por espectrometría de masas. Además, el medio de cultivo con 1% de suero fetal bovino resultó ser la condición óptima para maximizar la sensibilidad del análisis proteómico de los subgrupos de vesículas, ya que el resto de las condiciones del medio evaluadas aquí alteran la cantidad y la pureza de las vesículas aisladas. Es interesante ver que el SG-B no presentó ninguna proteína exclusiva, sino que todas se encontraron también en el SG-A, no siendo igual el caso contrario, pues el SG-A reportó 25 proteínas exclusivas. Esto podría significar que las vesículas aisladas del SG-B

no pertenecen a una subpoblación real, al ser estas muy similares a las del subgrupo A. Aunque presentaron una alta similitud proteica, el análisis del enriquecimiento general de las proteínas asoció a cada subgrupo con vías y procesos biológicos distintos. Por ejemplo, el SG-A se encuentra enriquecido en proteínas tales como TSPAN15, ANXA7, KIF2Ay HLA-G, involucradas en la transducción de señales de membrana [94], la promoción de la fusión de membrana durante la exocitosis, la interacción con integrinas [95], la regulación de la síntesis de microtúbulos [96] y la presentación de antígenos hacia células del sistema inmune como respuesta de defensa celular [97]. En cambio, las proteínas LAMC1, BANF1, SSBP1, enriquecidas en el subgrupo B, se encuentran asociadas a la migración celular, como constituyentes de la membrana basal [98], y al mantenimiento estructural de DNA [99]. Estas diferencias podrían significar que la localización y función de las EVs de cada subgrupo dentro de las células es distinta. El contenido del SG-A podría depositarse principalmente en el citoplasma celular, mientras que las moléculas del SG-B podrían asociarse hacia regiones cercanas al núcleo celular. Esto sugiere que cada subgrupo de vesículas podría producir un efecto distinto en las células receptoras.

Finalmente, en los estudios de incorporación de vesículas, las células blanco lograron capturar tanto las vesículas marcadas con BODIPY TR *ceramide* del SG-A como las del SG-B. La señal fluorescente en el citoplasma celular sugiere que el marcador fluorescente requiere estar adherido a una partícula que pueda ser reconocida por las células para posteriormente ser ingresadas hacia su citoplasma. Por ello, el reconocimiento celular de proteínas señalizadoras tales como CD9, CD63 y CD81 presentes en las vesículas son fundamentales para el reconocimiento e ingreso exitoso del marcador BODIPY TR *ceramide*, adherido a la membrana vesicular, hacia el interior celular [91, 100, 101]. Estos resultados, muestran que ambos subgrupos poseen vesículas con moléculas señalizadoras en su superficie, lo cual les permite ser reconocidas e internalizadas por células.

Conclusiones

La cantidad y calidad de vesículas extracelulares obtenidas a partir de medio de cultivo es altamente dependiente de la técnica utilizada para su aislamiento y purificación. Se debe tener previamente definido el uso que se le dará a las vesículas aisladas, pues de ello dependerá la elección de la técnica más adecuada para esos fines. El acoplamiento de técnicas aumenta significativamente la calidad de la muestra final obtenida, comparado con su uso por separado. Trabajos como el presente estudio muestran la necesidad de que futuros proyectos dedicados al análisis funcional de vesículas extracelulares, homogenicen las condiciones en las que deben ser aisladas las vesículas para poder aumentar el valor de reproducibilidad y comparación entre resultados, así como la determinación de los límites que presenta cada técnica y las condiciones específicas en las que es aceptable su uso.

Bibliografía

1. Thery, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3 22.
2. Witwer, K.W., et al., *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. Journal of Extracellular Vesicles, 2013. **2**(1): p. 20360.
3. Böing, A.N., et al., *Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography*. Journal of Extracellular Vesicles, 2014. **3**(1): p. 23430.
4. Rider, M.A., S.N. Hurwitz, and D.G. Meckes Jr, *ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 23978.
5. Taylor, D.D. and S. Shah, *Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes*. Methods, 2015. **87**: p. 3-10.
6. Camussi, G., et al., *Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication*. Kidney International, 2010. **78**(9): p. 838-848.
7. Hancock, J.T., *Cell signalling*. 2017: Oxford University Press.
8. Majka, M., et al., *Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3075.
9. Rustom, A., et al., *Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport*. Science, 2004. **303**(5660): p. 1007.
10. Vidulescu, C., S. Clejan, and K.C. O'Connor, *Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2004. **8**(3): p. 388-396.
11. Pan, B.-T. and R.M. Johnstone, *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor*. Cell, 1983. **33**(3): p. 967-978.
12. Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl, *Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding*. European journal of cell biology, 1984. **35**(2): p. 256-263.
13. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**(3): p. 1161.
14. El Andaloussi, S., et al., *Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(5): p. 347-357.
15. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
16. Lötvall, J., et al., *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. Journal of Extracellular Vesicles, 2014. **3**(1): p. 26913.
17. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-579.
18. Babst, M., *MVB Vesicle Formation: ESCRT-Dependent, ESCRT-Independent and Everything in Between*. Current opinion in cell biology, 2011. **23**(4): p. 452-457.
19. Akers, J.C., et al., *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. Journal of neuro-oncology, 2013. **113**(1): p. 1-11.

20. Obata, Y., et al., *Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release*. JCI Insight, 2018. **3**(8).
21. Urbanelli, L., et al., *Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate*. Genes, 2013. **4**(2).
22. Wollert, T. and J.H. Hurley, *Molecular Mechanism of Multivesicular Body Biogenesis by ESCRT Complexes*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 864-869.
23. Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry, *Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2014. **30**(1): p. 255-289.
24. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2016. **36**(3): p. 301-312.
25. Nabhan, J.F., et al., *Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(11): p. 4146.
26. Bucki, R., et al., *Calcium Induces Phospholipid Redistribution and Microvesicle Release in Human Erythrocyte Membranes by Independent Pathways*. Biochemistry, 1998. **37**(44): p. 15383-15391.
27. Bilyy, R.O., et al., *Macrophages Discriminate Glycosylation Patterns of Apoptotic Cell-derived Microparticles*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(1): p. 496-503.
28. Coleman, M.L., et al., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I*. Nature Cell Biology, 2001. **3**: p. 339.
29. Martínez, M.C. and J.-M. Freyssinet, *Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: Phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry*. BMC Cell Biology, 2001. **2**(1): p. 20.
30. Minciaccchi, V.R., M.R. Freeman, and D. Di Vizio, *Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2015. **40**: p. 41-51.
31. Poliakov, A., et al., *Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen*. The Prostate, 2008. **69**(2): p. 159-167.
32. Choi, D.S., et al., *Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes*. Mass Spectrometry Reviews, 2014. **34**(4): p. 474-490.
33. Kreimer, S., et al., *Mass-Spectrometry-Based Molecular Characterization of Extracellular Vesicles: Lipidomics and Proteomics*. Journal of Proteome Research, 2015. **14**(6): p. 2367-2384.
34. György, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011. **68**(16): p. 2667-2688.
35. Février, B. and G. Raposo, *Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages*. Current Opinion in Cell Biology, 2004. **16**(4): p. 415-421.
36. Mears, R., et al., *Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry*. PROTEOMICS, 2004. **4**(12): p. 4019-4031.
37. Carayon, K., et al., *Proteolipidic Composition of Exosomes Changes during Reticulocyte Maturation*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(39): p. 34426-34439.
38. Théry, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**: p. 581.
39. Cocucci, E. and J. Meldolesi, *Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles*. Trends in Cell Biology, 2015. **25**(6): p. 364-372.

40. van Blitterswijk, W.J., et al., *Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1982. **688**(2): p. 495-504.
41. Trajkovic, K., et al., *Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes*. *Science*, 2008. **319**(5867): p. 1244.
42. Tan, S.S., et al., *Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013. **2**(1): p. 22614.
43. Eirin, A., et al., *MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. *Gene*, 2014. **551**(1): p. 55-64.
44. Crescitelli, R., et al., *Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013. **2**(1): p. 20677.
45. Chevillet, J.R., et al., *Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(41): p. 14888.
46. Lázaro-Ibáñez, E., et al., *Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes*. *The Prostate*, 2014. **74**(14): p. 1379-1390.
47. Lo Cicero, A., P.D. Stahl, and G. Raposo, *Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015. **35**: p. 69-77.
48. Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi, *Shedding microvesicles: artefacts no more*. *Trends in Cell Biology*, 2009. **19**(2): p. 43-51.
49. Turiák, L., et al., *Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice*. *Journal of Proteomics*, 2011. **74**(10): p. 2025-2033.
50. Spees, J.L., et al., *Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(5): p. 1283.
51. Di Trapani, M., et al., *Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 24120.
52. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. *Nature Reviews Immunology*, 2014. **14**: p. 195.
53. Yoon, Y.J., O.Y. Kim, and Y.S. Gho, *Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes*. *BMB Reports*, 2014. **47**(10): p. 531-539.
54. Leoni, G., et al., *Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2015. **125**(3): p. 1215-1227.
55. Kreger, B.T., et al., *Microvesicle Cargo and Function Changes upon Induction of Cellular Transformation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2016. **291**(38): p. 19774-19785.
56. Lakhter, A.J. and E.K. Sims, *Minireview: Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Diabetes and Related Metabolic Disorders*. *Molecular Endocrinology*, 2015. **29**(11): p. 1535-1548.
57. Ailawadi, S., et al., *Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2015. **1852**(1): p. 1-11.
58. Webber, J., V. Yeung, and A. Clayton, *Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015. **40**: p. 27-34.
59. Rezaie, J., et al., *Diabetic sera disrupted the normal exosome signaling pathway in human mesenchymal stem cells in vitro*. *Cell and Tissue Research*, 2018.

60. Clayton, A., et al., *Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2*. *Cancer Research*, 2007. **67**(15): p. 7458.
61. Nazarenko, I., et al., *Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation*. *Cancer Research*, 2010.
62. Heinrich, L.F., et al., *Long-term high fat feeding of rats results in increased numbers of circulating microvesicles with pro-inflammatory effects on endothelial cells*. *British Journal of Nutrition*, 2015. **113**(11): p. 1704-1711.
63. Ferrante, S.C., et al., *Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease*. *Pediatric Research*, 2014. **77**: p. 447.
64. Tauro, B.J., et al., *Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes*. *Methods*, 2012. **56**(2): p. 293-304.
65. Linares, R., et al., *High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015. **4**(1): p. 29509.
66. Lobb, R.J., et al., *Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015. **4**(1): p. 27031.
67. Zeringer, E., et al., *Strategies for Isolation of Exosomes*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015. **2015**(4): p. pdb.top074476.
68. Nordin, J.Z., et al., *Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015. **11**(4): p. 879-883.
69. Corso, G., et al., *Reproducible and scalable purification of extracellular vesicles using combined bind-elute and size exclusion chromatography*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 11561.
70. Helwa, I., et al., *A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents*. *PLOS ONE*, 2017. **12**(1): p. e0170628.
71. Li, P., et al., *Progress in Exosome Isolation Techniques*. *Theranostics*, 2017. **7**(3): p. 789-804.
72. Pathan, M., et al., *FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool*. *PROTEOMICS*, 2015. **15**(15): p. 2597-2601.
73. Hurwitz, S.N., et al., *Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers*. *Oncotarget*, 2016. **7**(52): p. 86999-87015.
74. Momen-Heravi, F., et al., *Current methods for the isolation of extracellular vesicles, in Biological Chemistry*. 2013. p. 1253.
75. Baranyai, T., et al., *Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(12): p. e0145686.
76. Caradec, J., et al., *Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods*. *Clinical Biochemistry*, 2014. **47**(13): p. 1286-1292.
77. Rood, I.M., et al., *Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome*. *Kidney International*, 2010. **78**(8): p. 810-816.
78. Kalra, H., et al., *Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma*. *PROTEOMICS*, 2013. **13**(22): p. 3354-3364.
79. Benedikter, B.J., et al., *Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 15297.

80. Webber, J. and A. Clayton, *How pure are your vesicles?* Journal of Extracellular Vesicles, 2013. **2**(1): p. 19861.
81. Soares Martins, T., et al., *Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches.* PLOS ONE, 2018. **13**(6): p. e0198820.
82. R Goulet, C., et al., *Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-associated Fibroblasts through TGF β Signaling.* Molecular Cancer Research, 2018.
83. Durcin, M., et al., *Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles.* Journal of Extracellular Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1305677.
84. Kowal, J., et al., *Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016.
85. Bobrie, A., et al., *Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation.* Journal of Extracellular Vesicles, 2012. **1**(1): p. 18397.
86. Schmidt, O. and D. Teis, *The ESCRT machinery.* Current Biology, 2012. **22**(4): p. R116-R120.
87. Stuchell, M.D., et al., *The human endosomal complex required for transport I (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding.* Journal of Biological Chemistry, 2004.
88. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Role of ESCRT-I in Retroviral Budding.* Journal of Virology, 2003. **77**(8): p. 4794.
89. Votteler, J. and Wesley I. Sundquist, *Virus Budding and the ESCRT Pathway.* Cell Host & Microbe, 2013. **14**(3): p. 232-241.
90. Boucheix, C. and E. Rubinstein, *Tetraspanins.* Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2001. **58**(9): p. 1189-1205.
91. Rana, S., et al., *Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012. **44**(9): p. 1574-1584.
92. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis.* Nature, 2015. **527**: p. 329.
93. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics.* Nature, 2003. **422**: p. 198.
94. Dornier, E., et al., *TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals.* The Journal of Cell Biology, 2012. **199**(3): p. 481.
95. Li, H., et al., *Relationship between annexin A7 and integrin β 4 in autophagy.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2013. **45**(11): p. 2605-2611.
96. Watanabe, T., et al., *TTBK2 with EB1/3 regulates microtubule dynamics in migrating cells through KIF2A phosphorylation.* J Cell Biol, 2015. **210**(5): p. 737-751.
97. Paul, P., et al., *HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance.* Proceedings of the national academy of sciences, 1998. **95**(8): p. 4510-4515.
98. Breitkreutz, D., et al., *Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin γ 1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures.* Journal of Cell Science, 2004. **117**(12): p. 2611-2622.
99. Segura-Totten, M., et al., *Barrier-to-ointegration factor.* The Journal of Cell Biology, 2002. **158**(3): p. 475.
100. Rana, S. and M. Zöller, *Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis.* Biochemical Society Transactions, 2011. **39**(2): p. 559.

101. Zöller, M., *Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis*. Nature Reviews Cancer, 2008. **9**: p. 40.