



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

A PARTIR DE DISTINTOS TEJIDOS DE RATÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MARTÍNEZ GREENE JUAN ALFONSO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. DAVID RICARDO OROZCO SOLIS

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/251/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de febrero de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **MARTÍNEZ GREENE JUAN ALFONSO** con número de cuenta **415103624** con la tesis titulada **“Obtención y caracterización bioquímica de vesículas extracelulares a partir de distintos tejidos de ratón”**, realizada bajo la dirección del **DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
Vocal: DR. JUAN GABRIEL JUÁREZ ROJAS
Vocal: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
Vocal: DRA. CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA
Secretario: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de marzo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haberme brindado todas las facilidades escolares y administrativas necesarias para cumplir con el programa de maestría en ciencias biológicas satisfactoriamente.

También quiero agradecer al apoyo recibido por parte del proyecto de CONACYT del fondo sectorial de Ciencia Básica (#258589), así como de la Beca Nacional de Posgrado de CONACYT (#958860), por brindarme todos los recursos necesarios para realizar mi proyecto de maestría.

Agradezco a mi tutor principal, el Dr. Eduardo Martínez Martínez, y a los miembros de mi Comité Tutoral, la Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor y el Dr. David Ricardo Orozco Solis, por haber guiado y supervisado mi trabajo durante el desarrollo del proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Primero, quiero agradecer a mi madre, a mi padre y a mis hermanos, por estar siempre apoyándome durante mi desarrollo personal y académico. Gracias a ellos es que siempre he buscado ser un mejor ser humano. Por ser mi fuente de inspiración y el mejor ejemplo de eterna lucha para salir adelante, gracias. Juntos somos unos guerreros vikingos: implacables en fuerza, inquebrantables de espíritu. Nos espera el Valhalla. Los amo.

Segundo, a mi tutor, el Dr. Eduardo Martínez, porque es a él quien le debo toda mi formación científica profesional. Gracias por darme todas las herramientas y consejos que necesitaba para llegar a ser un investigador independiente. Estaré eternamente agradecido contigo por eso y te honraré trabajando siempre con pasión y disciplina.

Tercero, a Mariana, por siempre estar cerca de mi cuando más necesitaba ayuda. Por ser una fuente de inspiración de perseverancia, fortaleza y valentía. Por enseñarme que se puede salir adelante con una sonrisa. Por permitirme compartir risas, lágrimas y esfuerzos contigo. Porque sin ti, nunca hubiera logrado llegar hasta aquí, y estaré eternamente agradecido contigo. Somos un gran equipo. Gracias infinitas.

Cuarto, al Dr. Marco, mi querido amigo, porque gracias a él retomé mis estudios en un momento de mucha incertidumbre en mi vida. Sin tu ayuda, jamás hubiera imaginado lograr todo lo que he logrado hasta ahora. Y todo comenzó porque creíste en mí. Estaré eternamente agradecido contigo por ello, y te honraré con ser siempre una persona íntegra, dedicada en cuerpo y alma a mi profesión. Mil gracias.

Quinto, a los integrantes de mi jurado, por revisar y corregir mi tesis, ya que enriquecieron mi trabajo con sus observaciones, muchas gracias. A mis amigas y amigos, que me hicieron los días de trabajo menos pesados. A la Dra. Margarita Gómez Chavarín, que fue fundamental para el manejo de animales y la obtención de los diversos tejidos analizados en este estudio. Siempre apoyando de manera incondicional para completar los experimentos. A la Mtra. María del Pilar Ramos-Godínez, por sus enseñanzas en la preparación de muestras para su análisis en el microscopio electrónico. Al Dr. Hugo Villamil Ramírez, por su apoyo técnico en la implementación de diversas técnicas de laboratorio. Y por supuesto, a mis profesores, a la UNAM y al INMEGEN, por ser parte fundamental en mi formación académica y profesional. Muchas gracias.

“Only those who attempt the absurd can achieve the impossible.”
-Albert Einstein.

INDICE	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
METODOLOGÍA	17
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMEN

En años recientes, los estudios de las vesículas extracelulares (EVs, por sus siglas en inglés) en el contexto de diversas enfermedades han aumentado considerablemente por su potencial diagnóstico y terapéutico. Generalmente, las EVs son aisladas *in vitro*, a partir de cultivos celulares o explantes de tejidos, o a partir de fluidos corporales. Sin embargo, con estos métodos de cultivo no se logra capturar la complejidad de un ambiente *in vivo*. Por ello es importante desarrollar nuevos métodos de aislamiento de vesículas directamente a partir de tejido para evaluar la heterogeneidad vesicular en distintas condiciones experimentales y patologías. En el presente trabajo desarrollamos un protocolo de aislamiento de vesículas extracelulares a partir de tejidos congelados de ratón. Las vesículas extracelulares se aislaron a partir de hígado, tejido adiposo, cerebro y riñón de ratones. Para su aislamiento utilizamos una combinación de centrifugación diferencial y gradientes de densidad. Verificamos la presencia de vesículas por el enriquecimiento de marcadores de vesículas mediante ensayos de western blot y por microscopía electrónica de transmisión, identificando que existe una heterogeneidad en la composición de las EVs de cada tejido. En el caso del hígado, implementamos adicionalmente una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para aumentar el grado de pureza de las vesículas. El aislamiento exitoso de EVs a partir de tejido congelado permitirá conocer con mayor precisión su composición molecular y sus funciones, así como su papel en la comunicación intercelular en un microambiente *in vivo*.

ABSTRACT

In recent years, the study of extracellular vesicles (EVs) in the context of various diseases has dramatically increased due to their diagnostic and therapeutic potential. Typically, EVs are isolated *in vitro* from cell culture of primary cells or cell lines, or from body fluids. However, these cell culture methods do not represent the whole complexity of an *in vivo* microenvironment, and body fluids contain a high heterogeneous population of vesicles, since they originate from different tissues. This highlights the need to develop new methods to isolate EVs directly from tissue samples to evaluate vesicle heterogeneity in different experimental and pathological conditions. In the present study, we established a protocol for isolating high purity EVs directly from frozen mouse tissue. EVs were isolated from liver, adipose, brain, and kidney tissues of CD1 male mice and C57BL6 female mice, using a combination of ultracentrifugation and sucrose density gradient separation. We verified EV isolation with EV protein marker enrichment in Western Blot assays, total protein quantification, and transmission electron microscopy, further identifying a heterogeneous EV composition from each tissue. Regarding the liver tissue, we additionally implemented a size exclusion chromatography (SEC) to further increase the purity grade of EVs. The successful isolation of EVs from tissue samples will allow us to uncover a more precise molecular composition and functions, as well as their role on intercellular communication in an *in vivo* microenvironment.

INTRODUCCIÓN

En años recientes, se ha visto que la secreción de vesículas extracelulares (EVs), las cuales son partículas secretadas hacia el espacio extracelular que se encuentran delimitadas por una bicapa lipídica y que incluyen a los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos, juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica [1, 2]. Generalmente, las EVs son aisladas a partir de fluidos corporales o cultivos celulares. Sin embargo, recientemente se ha argumentado que el aislamiento de vesículas a partir de cultivos celulares y explantes de tejidos no refleja la complejidad que existe dentro de los tejidos de un organismo [3]. Lo anterior se debe a que los cultivos celulares generalmente se realizan con un solo tipo celular y los explantes de tejidos cambian la expresión de varios genes durante el periodo de incubación. Por otro lado, los fluidos corporales están compuestos de una gran variedad complejos macromoleculares, incluyendo vesículas extracelulares originadas de diversos tipos celulares, lo cual dificulta el aislamiento y estudio de un subgrupo particular de vesículas al estar embebidas en estos fluidos. Por ello, se ha buscado desarrollar nuevos métodos que permitan aislar EVs a partir de muestras de tejido y, de esta manera, poder caracterizar la composición proteica de las EVs en una condición lo más aproximada al microambiente *in vivo*.

Para resolver este problema, se han desarrollado varios protocolos de aislamiento a partir de muestras de tejido [4-7]. Estos protocolos se basan principalmente en realizar una digestión enzimática de la biopsia de tejido para disgregar el tejido conectivo sin causar ruptura celular. Posteriormente, se utiliza una combinación de centrifugación diferencial, ultracentrifugación y separación por gradientes de densidad para obtener las vesículas que se encuentran embebidas en la matriz extracelular del tejido. De esta manera, se busca obtener vesículas que reflejen con mayor precisión los procesos fisiológicos que ocurren en un microambiente *in vivo*.

Desafortunadamente, la gran mayoría de estos protocolos han sido estandarizados para aislar vesículas a partir de cerebro. Además, la heterogeneidad de protocolos ha dificultado la comparación de resultados entre estudios. Es necesario desarrollar protocolos de aislamiento de EVs a partir de biopsias de otros tejidos, además del cerebro, para tener una mayor comprensión sobre la composición y función de las EVs en distintos microambientes *in vivo* y, de esta manera, detectar y aprovechar posibles nuevos biomarcadores de enfermedades.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (JUSTIFICACIÓN)

Dado que extraer las vesículas directamente de tejido implica eliminar grandes cantidades de material contaminante, se ha buscado utilizar una combinación de métodos de aislamiento para aumentar el grado de pureza de las vesículas obtenidas, tanto para su caracterización como para ser utilizadas en ensayos funcionales. Debido a que la mayoría de las EVs son aisladas *in vitro*, a partir de cultivos celulares, explantes de tejidos o fluidos corporales, se necesitan desarrollar nuevos métodos de aislamiento de vesículas a partir de tejido para evaluar su composición en diversos contextos de salud y enfermedad. El desarrollo de nuevos protocolos de aislamiento de vesículas a partir de otros tejidos permitirá caracterizar, analizar y comprender su composición y posible función en un microambiente *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Obtener y caracterizar las vesículas extracelulares obtenidas a partir de tejido hepático, adiposo, cerebral y renal de ratones.

Objetivos particulares

- Estandarizar las condiciones de aislamiento de vesículas extracelulares provenientes de tejido congelado de hígado, tejido adiposo, cerebro y riñón de ratones.
- Evaluar la presencia de los marcadores de vesículas extracelulares y tejido específico CD63, CD81, Anexina A2, Anexina A5, MFG-E8, TSG101 y Alix en las preparaciones obtenidas de tejido hepático, adiposo, cerebral y renal.
- Aumentar el grado de pureza de las EVs del hígado, utilizando SEC.
- Determinar si en cada uno de los tejidos existe heterogeneidad en la composición de las EVs.

ANTECEDENTES

Vesículas Extracelulares

En las últimas décadas, se ha descrito un nuevo modelo de comunicación intercelular mediado por la producción, secreción y recepción de vesículas, las cuales son expulsadas hacia el espacio extracelular. Estas vesículas fueron descritas por primera vez, hace más de 30 años, en reticulocitos de rata y oveja como “sacos de desperdicio”, en donde se observó que la transferrina de los reticulocitos se desecha activamente hacia el espacio extracelular [8, 9]. La transferrina es empaquetada en vesículas presentes en el interior de los cuerpos multivesiculares que, finalmente, se fusionan con la membrana plasmática para su expulsión. En la década de los noventa, se encontró que estas vesículas estimulaban a las células del sistema inmune, dándoles un papel activo en la comunicación intercelular [10]. A partir de entonces, se ha descrito la presencia y actividad de estas vesículas en diversos tejidos, tanto en condiciones normales como patológicas [11, 12]. Aunque tienen orígenes celulares y funciones distintas, colectivamente se les conoce como vesículas extracelulares.

-Clasificación

Las vesículas extracelulares se clasifican de acuerdo con su composición y las vías de síntesis [13]. En 2018, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares publicó una guía para estudiar las EVs, en donde sugiere que se utilice el término “vesículas extracelulares” para englobar a todas las vesículas y/o partículas que son secretadas hacia el espacio extracelular que se encuentran delimitadas por una bicapa lipídica y que no pueden autorreplicarse [14]. De manera general, las EVs pueden subdividirse en exosomas, con un tamaño de entre 30-150nm, microvesículas, de 100-1000nm, y cuerpos apoptóticos, con un tamaño mayor a 1000nm. Aunque esta división resulta conveniente para distinguir diferentes orígenes subcelulares, existen varias propiedades, como tamaño, densidad, marcadores moleculares y/o funciones que comparten entre subgrupos que genera dificultades en separarlos adecuadamente por los métodos comúnmente utilizados para su aislamiento [2, 15].

-Biogénesis

La figura 1a resume a grandes rasgos las principales vías de biogénesis de los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos, y la tabla 1 muestra las principales características de cada subtipo de EVs. La principal diferencia entre los tres principales subgrupos de EVs es que los exosomas se originan a partir de una primera invaginación de la membrana plasmática hacia

el interior de la célula, formando un endosoma temprano. Posteriormente, este endosoma madura hasta formar un endosoma tardío, el cual sufre una segunda invaginación hacia el interior y forma unas partículas denominadas vesículas intraluminales. Se ha visto que esta invaginación depende, en parte, de la presencia de balsas lipídicas, en donde hay una alta presencia de lípidos saturados, colesterol y proteínas palmitoiladas [16]. Este endosoma tardío, denominado ahora cuerpo multivesicular (MVB), finalmente se dirige hacia la membrana plasmática de la célula, en donde se fusiona con la membrana y libera las vesículas hacia el espacio extracelular. Las vesículas intraluminales liberadas hacia el espacio extracelular son denominadas exosomas. La principal maquinaria molecular encargada de la formación, cargado y desprendimiento de los exosomas es el complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Existen 4 complejos ESCRT denominados 0, I, II y III, los cuales se encargan de distribuir proteínas hacia el interior de los exosomas, invaginar la membrana de los endosomas y finalmente liberarlas [17]. Aunque ésta es la vía clásica de síntesis, existen vías alternas por las que pueden producirse exosomas independientes del complejo ESCRT [13, 18]. Esta formación puede ser dirigida por lípidos, como ceramidas, por la actividad de proteínas Rab, como Rab11, Rab27 y Rab35, o por la actividad de ciertas tetraspaninas como CD63 y CD81. Esto resulta en un cambio estructural de los exosomas producidos.

En el caso de las microvesículas, su formación depende de la concentración de fosfolípidos en la membrana plasmática, como por ejemplo, la translocación de la fosfatidilserina hacia la pared exterior de la célula, así como la contracción de filamentos de actina y miosina [19]. La principal vía de síntesis descrita comienza por la translocación de la enzima fosfolipasa-D por el factor de ribosilación de ADP 6. Al mismo tiempo, la cinasa regulada por señal extracelular, o ERK, se desplaza hacia la membrana plasmática, en donde activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), como consecuencia de su fosforilación. Esta activación de MLCK provoca la liberación de microvesículas hacia el espacio extracelular [20]. También se ha documentado que el complejo ESCRT-1 interactúa con la enzima vacuolar de sorteo de proteínas VSP4a-ATPasa y la proteína contenedora del dominio de arrestina-1 (ARRDC1) en la formación de microvesículas.

En contraste, los cuerpos apoptóticos son secretados durante el proceso de muerte celular programada denominado apoptosis. Además de originarse a partir de la membrana plasmática, también pueden originarse a partir de la fragmentación del retículo endoplásmico [21]. La principal vía de formación es a través de modificaciones producidas por el sistema de actina-miosina del citoesqueleto, mediante la actividad de proteínas cinasas asociadas a Rho (ROCK)

y caspasas. La vía de las caspasas corta a la enzima ROCK1 y esto ocasiona que su actividad enzimática aumente y se formen los cuerpos apoptóticos. Una característica que comparten con las microvesículas es que también exponen fosfatidilserina en su superficie, esto para que los macrófagos puedan identificar estas vesículas para luego ser fagocitadas [19]. Una característica particular de estas vesículas es la oxidación de varios receptores membranales que permiten el reclutamiento de la trombospondina y la proteína de complemento C3b. La trombospondina y C3b permiten el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas.

-Composición

En general, todas las vesículas extracelulares se componen de una bicapa lipídica y contienen derivados del citosol de la célula productora (figura 1b). Sin embargo, por sus distintas vías de síntesis, cada subtipo vesicular presenta enriquecimiento de diferentes proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que les confieren actividades particulares, como la regulación metabólica de células receptoras (exosomas), la activación de la respuesta inmune (microvesículas) y el desecho de material apoptótico (cuerpos apoptóticos), por mencionar algunas de ellas. En el caso de los exosomas, se ha visto que se encuentran enriquecidos en proteínas integrales de membrana, como son las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) y otras integrinas. También contienen proteínas que participan en su síntesis como la proteína de interacción con la muerte celular programada 6 (ALIX), el gen susceptible de tumor 101 (TSG101), sintenina-1 y proteínas Rab/Ras; proteínas asociadas a balsas lipídicas, como flotilina-1 y caveolina-1; proteínas asociadas a la membrana, tales como lactadherina (MFG-E8) y las anexinas-2 y -5; moléculas señalizadoras del sistema inmune, como el complejo mayor de histocompatibilidad I y II, interleucinas-6, -8 y -18; proteínas chaperonas como Heat Shock Protein (HSP) -70 y -90; el factor de crecimiento epidermal (EGF) y su receptor EGFRvIII; proteínas de la familia 14-3-3; y proteínas de recubrimiento vesicular, como clatrina I y II [12, 22-24]. En cambio, las microvesículas están enriquecidas en proteínas como el factor de ADP-ribosilación 6 (ARF6), fosfolipasa-D, cofilina, receptores de integrinas β 1, metaloproteinasas, glicoproteína Ib, P-selectina, ARRDC1, Perilipina 2 (PLP2) y, en algunos casos, TSG101 [25-27]. Por último, los cuerpos apoptóticos se componen de proteínas como la proteína de membrana asociada a vesícula 1 (VAMP-1), caspasas, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) e interleucinas[19], aunque estas moléculas también han sido identificadas en microvesículas y, por lo tanto, ha sido difícil separar ambas subpoblaciones de vesículas.

En relación con ácidos nucleicos, se ha descrito la presencia de varios tipos de RNA y DNA empacados en vesículas extracelulares[12, 20]. Algunos de los subtipos de RNA descritos en EVs son RNA mensajero (mRNA), RNAs no codificantes como micro RNA (miRNA), RNAs asociados a Piwi (piRNA), RNAs nucleares pequeños (snRNA), RNA ribosomal (rRNA), RNA mitocondrial (mtRNA), RNA de transferencia (tRNA), entre otros [12, 20]. En el caso de DNA, se ha detectado DNA de cadena sencilla y de doble cadena, DNA mitocondrial, así como DNA viral empaquetado en vesículas [12]. No todos los subtipos vesiculares presentan todos los tipos de ácidos nucleicos previamente mencionados, pues dependiendo del subtipo vesicular, la actividad celular y el mensaje que requiere transmitirse el cargamento puede variar. Estudios recientes han encontrado una maquinaria molecular que regula la incorporación de RNAs hacia el interior vesicular [28]. La proteína de unión a RNA, Syncrip, reconoce un motivo en la secuencia de los miRNAs, denominada NURR (*N-terminal unit for RNA recognition*, en inglés) que los dirige hacia el interior de las vesículas [29]. En el caso del DNA, se desconoce cuál es el mecanismo por el que se cierto tipo de DNA viaja hacia las vesículas, aunque se sabe que algunas células cancerosas son capaces de transferir secuencias de DNA a través de la secreción de vesículas [30, 31]. Algunas de las secuencias de DNA transferidas, como los genes de la proteína tumoral 53 (TP53), fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) y la proteína de reparación de *mismatch* de DNA MLH1, están asociadas a supresión tumoral y reparación de DNA fragmentado [30]. Se desconoce el motivo de esta transferencia de DNA genómico. Recientemente, se ha cuestionado la transferencia de DNA mediada por vesículas, ya que no se encontró una asociación directa de la presencia de histonas dentro de vesículas[32], por lo que hace falta más evidencia que confirme una transferencia activa de algún tipo de DNA mediada por vesículas.

La composición de lípidos de las EVs ha cobrado enorme interés en los últimos años, ya que recientemente se ha descrito un papel activo de los lípidos tanto en la integridad estructural de las EVs como posibles moléculas señalizadoras. En el caso de los exosomas, su membrana se encuentra enriquecida en colesterol, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, principalmente [26, 33]. En cambio, las microvesículas se encuentran enriquecidas en acyl carnitina, lisofosfatidilcolina, colesterol ésteres, ceramidas y esfingomielinas. Finalmente, la composición lipídica de los cuerpos apoptóticos no ha sido estudiada a detalle. Sin embargo, uno de los lípidos más importantes en su membrana es la fosfatidilserina presente en la capa externa de la membrana, ya que este lípido señala a las células del sistema inmune para que las vesículas sean fagocitadas. Es importante destacar que la composición lipídica de las EVs varía dependiendo de la célula que las produce y el estado

metabólico en el que se encuentre la misma, es decir si se encuentra produciendo, almacenando o gastando energía en mayor o menor proporción. Por ejemplo, se ha visto que los niveles de colesterol, ésteres de colesterol y fosfatidilcolina se encontraron diferencialmente enriquecidos en las EVs de la línea celular de cáncer de mama D3H1, que es de baja actividad metastásica, comparada con la línea D3H2LN, también de cáncer de mama, que es de alta actividad metastásica [34]. De la misma manera, la composición de lípidos de las microvesículas varía entre dos líneas celulares de cáncer, U87 y Huh7, y células mesenquimales [26]. Esto refleja la constante remodelación de la composición lipídica de las EVs en función de la actividad metabólica de la célula productora.

En el caso particular de las EVs derivadas de hepatocitos, se ha encontrado que están enriquecidas en proteínas tales como el receptor de asialoglicoproteína 1, el ligando de quimiocina con motivo C-X-C 10 (CXCL10), la tetraspanina 4 (TSPAN-4), Flotilina-1, Clusterin, Apolipoproteína E, ICAM-1, integrina β 1, entre otras [35-37]. En cuanto a su composición lipídica, se han visto enriquecidas en ceramidas, esfingomielinas, ésteres de colesterol, glicolípidos, ácidos grasos libres, cardiolipinas, lisofosfatidilserinas y lisofosfatidilglicerol [26, 38]. Por otro lado, las EVs derivadas de adipocitos presentan un enriquecimiento en perilipina-1 y -2, la proteína de unión a ácido graso 3 y 4 (FABP-3 y -4), adiponectina, ácido graso sintasa, Caveolina-1 y -2, el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), por mencionar algunas de ellas [39-43]; y también están enriquecidas en fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, y fosfatidilserina, así como de esfingolípidos, como ceramidas y esfingomielina [39].

Por otro lado, las vesículas de tejido cerebral se encuentran enriquecidas en proteínas como neuromodulina, amfifisina, Acetyl-CoA acetiltransferasa, proteína b-amiloide A4, alfa y beta sinucleína, superóxido dismutasa 2, Anexina A6, CD90, CD47, por mencionar algunas de ellas [5, 7]. Desafortunadamente, no existen estudios que hayan caracterizado la composición lipídica de estas vesículas, y se asume que comparten cierta similitud con las vesículas secretadas por otros tipos celulares o tejidos, aunque esto falta por comprobarse. Se ha visto que las vesículas secretadas por células nerviosas son capaces de regular procesos como señalización celular, transporte intercelular de moléculas, regular los niveles de receptores de neurotransmisores en las sinapsis, y controlar la producción y recambio de proteínas membranales de la mielina [4].

La cantidad, composición y el contenido de las EVs puede variar dependiendo del estado metabólico de la célula que las produce, así como los estímulos externos e internos que las

células reciben. Por ejemplo, se ha visto que, en condiciones de hipoxia, la secreción de EVs aumenta en células hepáticas, adipocíticas y renales [44-46]. Por otro lado, se ha visto que las altas concentraciones de ácidos grasos, tanto en el exterior como en el interior celular, causan un enriquecimiento en moléculas proinflamatorias en las EVs secretadas, lo que a su vez induce una respuesta inflamatoria en las células receptoras, remodelación de tejidos y, eventualmente, fibrosis en los tejidos receptores [47-50].

Tabla 1. Características generales de los principales subtipos de vesículas extracelulares. Modificado de [15] y [51].

	Diametro (nm)	Densidad (g/mL)	Morfología (TEM)	Origen subcelular	Composición
Exosomas	50-100	1.13-1.19	Copa-esférica	Endosomal	CD9, CD63, CD81, Alix, TSG101, Syntenin, Syndecan, Flotilina-1, proteínas Rab
Microvesículas	20-1000	Altamente variable	Copa-esférica	Membrana plasmática	ARF6, VCAMP3, ARRDC1, β -Integrinas, VSP4, Anexinas
Cuerpos apoptóticos	>1000	1.16-1.28	Irregular/Heterogénea	Membrana plasmática	TSP, C3b, PS, caspasas, VAMP1, histonas

Abreviaturas: TEM= Microscopía Electrónica de Transmisión; TSG101= Gen susceptible de tumor 101; ARF6= Factor de ribosilación de ADP-6; ARRDC1= proteína contenedora del dominio de arrestina-1; VSP4= Proteína vacuolar asociada al sorteo de proteínas 4; TSP=Trombospondina; C3b= Complemento 3b; PS= Fosfatidilserina; VAMP1= Proteína de membrana asociada a vesículas 1.

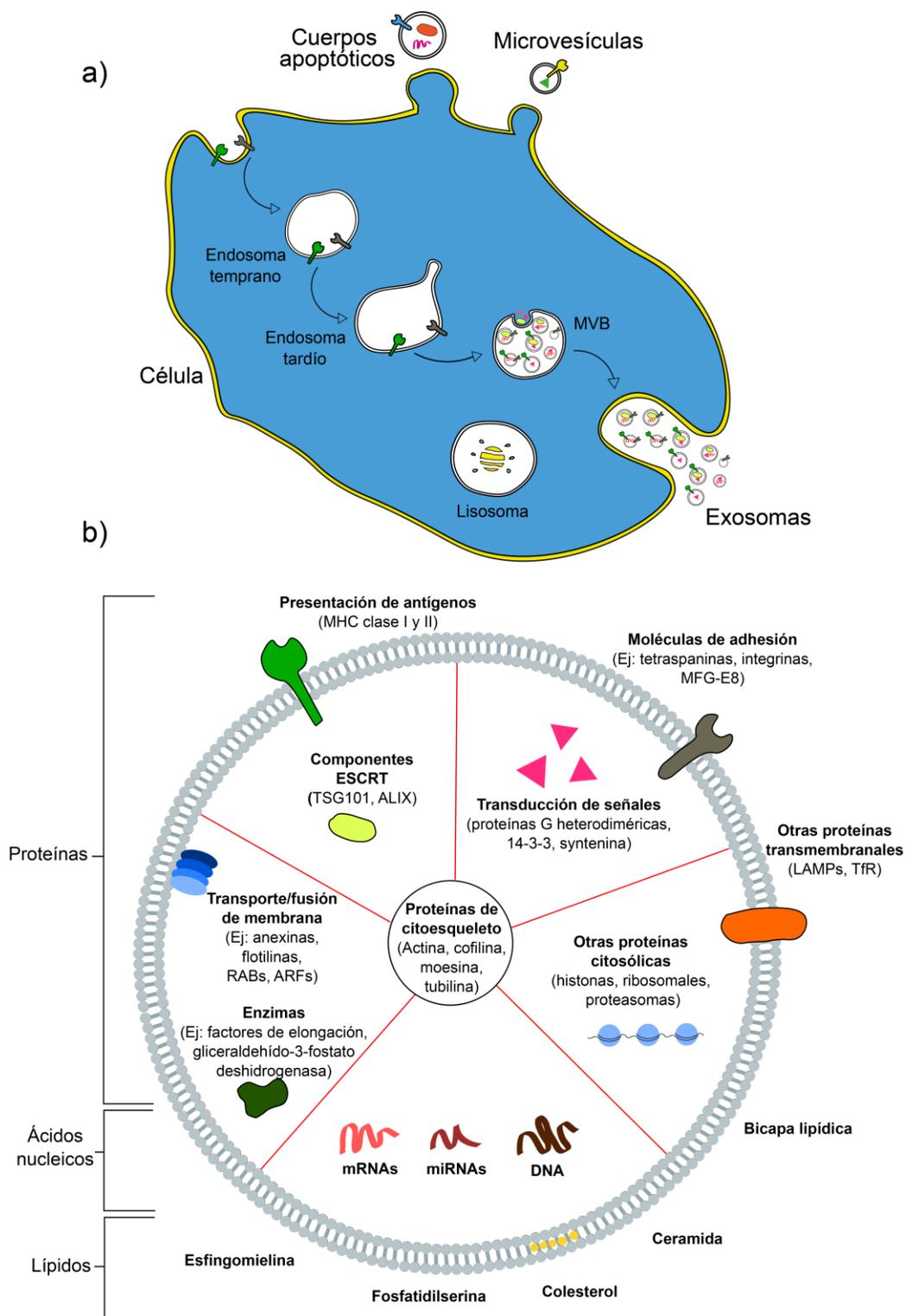


Figura 1. Diagrama general de biogénesis (a) y composición (b) de las vesículas extracelulares. MHC= Complejo mayor de histocompatibilidad, LAMP= Proteína de membrana asociada a lisosoma 1, TfR= Receptor de transferrina. Modificado de [13].

Papel de EVs en la comunicación intercelular

Hasta ahora, todos los tipos celulares que se conocen son capaces de secretar vesículas hacia el espacio extracelular [52, 53]. Particularmente en animales, como el ratón y el humano, la actividad de las vesículas extracelulares durante diversos procesos bioquímicos ha sido documentada ampliamente [50, 54-57]. Algunos de los procesos en los que se ha observado una participación activa de las EVs son: la regulación de agregación plaquetaria [58], la transferencia de mitocondrias activas [59], la recuperación de niveles de proteínas a niveles basales en células deficientes de éstas [54], regulación de la síntesis y degradación de la matriz extracelular [60] y facilitar el cierre de heridas [61].

Las vesículas extracelulares son secretadas principalmente al sistema circulatorio y su secreción es regulada por factores tanto externos como internos, como por ejemplo la actividad metabólica celular, la presencia y concentración de ácidos grasos, o el estado celular [21, 49, 62]. De esta manera, pueden viajar a través del organismo y llegar a la célula receptora adecuada. Se estima que existe una tasa de secreción/incorporación específica de vesículas provenientes de todos los tejidos que contribuye a mantener el estado homeostático de todo el organismo [63]. Por otra parte, la secreción de vesículas extracelulares hacia el torrente sanguíneo debe ser altamente regulada, pues de ello depende que se produzca el estímulo en el lugar y momento adecuados [58].

Los siguientes son algunos ejemplos en los que se ha detallado la función de las EVs como parte de la comunicación celular:

- Se ha visto que células mesenquimales neurales pueden transferir mitocondrias activas empaquetadas en vesículas hacia células fibroblásticas y fagocíticas receptoras para regular su actividad metabólica [59]
- Las células endoteliales presentes en el tejido adiposo son capaces de transferir proteínas como caveolina-1 a adipocitos *cav-1^{-/-}*. Esto permite que los adipocitos puedan recuperar parcialmente la presencia de caveolina-1 en su membrana plasmática, a pesar de no producir mRNA. Además, esta transferencia de caveolina-1 es dependiente del estado de ayuno/alimentación [54].
- Las vesículas del tejido adiposo son capaces de regular indirectamente la señalización de insulina en células hepáticas y musculares. Esto lo logran mediante la transferencia de algunas citocinas, tales como interleucina-6, MIF, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), adiponectina, resistina y la proteína de unión a retinol 4 (RBP-4),

lo que se traduce en la regulación de la fosforilación de la proteína serina/treonina cinasa RAC-alfa (Akt) inducida por la insulina en las células receptoras [64].

- Se ha descrito la presencia de vesículas extracelulares en el espacio intersticial de las capas dérmicas de la piel. En un ensayo de cierre de herida, encontraron que la estimulación de los queratinocitos con vesículas de fibroblastos senescentes aumenta su migración celular y, por lo tanto, el cierre de la herida en menor tiempo. Encontraron que esta estimulación de cierre de herida se debe a que las vesículas contienen el microRNA miR-23a-3p, el cual es el responsable de estimular la migración celular [61].
- El hígado es capaz de remodelar al tejido adiposo en respuesta a una sobrecarga de lípidos mediante la secreción de vesículas extracelulares. Esto lo hace como respuesta a una sobreacumulación de lípidos en células hepáticas. El incremento en la presencia de lípidos aumenta la expresión de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa, la cual cataliza la geranil-geranilación de Rab27A, lo que ocasiona que los hepatocitos incrementen la liberación de EVs. Estas vesículas inducen la acumulación de lípidos en los adipocitos receptores [50].
- Las neuronas y otras células nerviosas presentes en el tejido cerebral secretan vesículas enriquecidas en la proteína precursora β -amiloide y sus productos procesados, los fragmentos C-terminales y la proteína β -amiloide. En condiciones normales, se ha visto que existe un enriquecimiento de estas proteínas en las vesículas, comparado con los niveles de éstas en el citoplasma celular. Además, estas proteínas pueden ser procesadas dentro de las vesículas durante su transporte. Esto contribuye al mantenimiento homeostático de los niveles de β -amiloide dentro de las células nerviosas, y que su desregulación puede contribuir a la acumulación de placas de β -amiloide en células nerviosas y causar la enfermedad de Alzheimer [4].

Estos son solo algunos ejemplos que demuestran que las vesículas extracelulares son un canal de comunicación fundamental para mantener la cohesión y coordinación de los distintos tejidos de un organismo. La regulación de su secreción, cargamento y recepción es crítica para promover la homeostasis metabólica. La alteración en cualquiera de estos pasos puede generar o contribuir en el desarrollo de una enfermedad metabólica.

Métodos de aislamiento de vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares se encuentran presentes en una gran variedad de fluidos corporales, tales como saliva[65], orina[66], sangre[67], líquido intersticial[68], semen[69], entre otros. Para aislarlas se utilizan técnicas de separación que involucran pasos de centrifugación, afinidad molecular y exclusión molecular [70]. El método más utilizado para aislar EVs es la ultracentrifugación [71]. En este método se aprovecha el tamaño y el coeficiente de sedimentación de las vesículas para ser aisladas mediante varios pasos de centrifugación diferencial, para separar cuerpos apoptóticos y microvesículas, y que finalizan con un paso de ultracentrifugación para enriquecer la muestra en exosomas. Otros métodos utilizados para la separación de EVs incluyen la precipitación con polímeros adherentes, como el polietilenglicol, la separación por cromatografía de exclusión por tamaño o por afinidad molecular, la adición de perlas magnéticas acopladas a anticuerpos que reconocen moléculas de la superficie de las EVs y el uso de microchips que aprovechan propiedades fisicoquímicas como la microfluídica, la acústica y la afinidad molecular para separar las EVs suspendidas en un fluido [70, 72, 73]. Aunque existen todos estos métodos de aislamiento de vesículas extracelulares, todos ellos presentan ciertas desventajas, lo que fomenta el desarrollo de nuevos métodos de aislamiento que solucionen los obstáculos presentes en cada método [67, 74, 75]. Por ejemplo, se ha demostrado que en la ultracentrifugación se coprecipitan partículas y/o agregados proteicos junto con las vesículas, además de que se pueden romper o fusionar las vesículas aisladas. Otro ejemplo es la cromatografía de exclusión por tamaño y el uso de polímeros, donde el mayor problema que presentan es la poca especificidad que tienen para aislar vesículas de algún subtipo en particular, ya que el primero se basa en propiedades físicas compartidas entre diferentes subtipos, y el segundo se basa en la unión del polímero con las partículas de la muestra de forma inespecífica. Finalmente, el mayor problema del uso de microchips para el aislamiento de vesículas es que, si bien aumentan considerablemente la especificidad del aislamiento, utilizan un volumen muy pequeño de muestra para aislarlas, lo que dificulta su uso para escalas de mayor nivel, como su uso industrial.

Recientemente se ha argumentado que el análisis de EVs obtenidas a partir de cultivos celulares *in vitro*, ya sea con líneas celulares o explantes de tejidos, no refleja con precisión las propiedades de éstas en un microambiente *in vivo* [3]. Esto porque se ha visto que el cultivo de células en superficies rígidas altera su fenotipo, ya que deben adaptarse a una superficie de material artificial. Además, los componentes utilizados para el cultivo, tales como el medio de cultivo y el suero fetal bovino, alteran el metabolismo de las células, causando que la composición

y cargamento de las vesículas se altere por consecuencia. Por ello, se han buscado alternativas para obtener vesículas extracelulares directamente de fluidos y tejidos corporales. El tejido más utilizado para obtener EVs es la sangre [76]. Sin embargo, un problema de obtener EVs de sangre es que hay una mezcla altamente heterogénea de vesículas provenientes de todos los tejidos del cuerpo. Aunque son consideradas una fuente importante para detectar biomarcadores de enfermedades sin necesidad de hacer biopsias de tejidos blandos, es difícil asociar un subgrupo particular de vesículas con un origen específico, debido a que aún no se han caracterizado a profundidad todas las vesículas producidas por cada tipo celular, mucho menos por tejido específico.

Para tratar de resolver este problema, se ha buscado desarrollar métodos para aislar vesículas extracelulares directamente de tejidos blandos [4-7, 68]. Estos métodos se basan principalmente en la disección de un fragmento de tejido, seguido de una digestión enzimática suave que permite disgregar la matriz extracelular del tejido sin causar ruptura celular, con el acoplamiento de varios métodos de aislamiento para finalmente poder purificar a las vesículas. Pérez-González et al diseñaron el primer método para aislar vesículas a partir de tejido de cerebro de ratón, ya sea congelado o fresco [4]. Para ello, utilizaron una combinación de ultracentrifugación y separación por gradiente de densidad para purificar y obtener las vesículas. Posteriormente, otros trabajos siguieron este protocolo como base, haciendo ligeras modificaciones para incrementar la pureza de la muestra final [5-7, 68]. Por ejemplo, Hurwitz et al optimizaron el paso de separación por gradiente de densidad, colocando la muestra en el fondo del gradiente (*bottom-loaded*), lo que permitió una separación más restringida de las vesículas entre las fracciones del gradiente. Vella et al optimizaron la digestión enzimática al utilizar colagenasa tipo III para evitar la ruptura celular durante la disgregación del tejido. Finalmente, Muraoka et al expandieron el uso del método de aislamiento, logrando aislar vesículas tanto de tejido cerebral como de fluido cerebroespinal. Aunque el número de publicaciones de aislamiento de vesículas extracelulares a partir de tejido ha ido en aumento, la gran mayoría de ellas están enfocadas en aislar vesículas de cerebro, lo cual crea un sesgo sobre el estudio de vesículas en otros tejidos.

Heterogeneidad en el aislamiento de vesículas extracelulares y la necesidad de estandarización

Debido a que las vesículas extracelulares comparten propiedades como el tamaño, la densidad, la composición molecular y algunas funciones, esto dificulta la separación de las EVs en subpoblaciones de vesículas, sin considerar el resto de las partículas solubles con las que

coexisten en los fluidos corporales. La existencia de diversos métodos de aislamiento de EVs refleja la complejidad de obtener muestras de vesículas altamente purificadas. Ningún método de aislamiento logra aislar vesículas completamente purificadas y ahora está claro que el método de aislamiento utilizado es dependiente del fin para el que serán utilizadas las EVs. Dada la heterogeneidad de muestras que se obtienen por los diferentes métodos utilizados, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares ha definido las propiedades básicas que deben identificarse y reportarse en cualquier estudio que involucre el aislamiento de EVs [14]. Estas propiedades abarcan aspectos como la caracterización de tamaño de partículas, la visualización de las vesículas por microscopía, la identificación de marcadores moleculares asociados a vesículas y otras moléculas contaminantes. Además, se debe reportar claramente el proceso de obtención de muestra, el método de aislamiento utilizado con cada paso explícitamente descrito y el almacenamiento de la muestra. Desafortunadamente, pocos trabajos reportan toda esta información completa y muchas veces resulta difícil la comparación de resultados entre trabajos por la falta de claridad en sus métodos. Para contrarrestar esto, la comunidad científica ha desarrollado una plataforma llamada EV-TRACK, una base de datos de colaboración abierta y acceso libre que registra y concentra todos los detalles de los métodos reportados de miles de estudios relacionados con EVs [77]. De esta manera, se busca homogeneizar la forma de reportar los métodos utilizados para aislar EVs y que esto permita una mejor comunicación y comparación de resultados.

METODOLOGÍA

Animales y extracción de órganos/tejidos

Se utilizaron ratones CD1 machos y ratones C57BL6 hembras para la estandarización del aislamiento. Se extrajeron los órganos y tejidos el mismo día del sacrificio. Para el sacrificio, se administró 0.1mL de pentobarbital sódico (concentración=210mg/Kg, Pisabental, PiSA), mediante inyección intraperitoneal, a los ratones para anestesiarlos. Posteriormente, se sacrificaron por decapitación. Se extrajo el hígado, el tejido adiposo mesentérico, el cerebro y los riñones de cada individuo. Se colocaron las muestras en tubos de 2mL y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta su uso posterior. Para la perfusión de los animales, se utilizó 1x PBS y se perfundieron a través del corazón para eliminar la sangre de todos los órganos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité de Bioética y de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (CEI 22/2016/I).

Cultivo celular

Para la identificación de marcadores de vesículas hepáticas, se utilizó la línea celular de ratón AML12 como control positivo. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo (DMEM con 10% suero fetal bovino y 5% penicilina/estreptomicina). Este medio de cultivo convencional se reemplazó por uno compuesto de DMEM, 10% suero fetal bovino libre de exosomas y 5%penicilina/estreptomicina (Exo-NM). 48 horas después, se recolectó el medio condicionado y se centrifugó a 400g por 10 minutos. El sobrenadante recuperado se centrifugó a 2,000g por 20 minutos, previo a su almacenamiento. El sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso posterior y se descartó el precipitado.

Aislamiento de vesículas extracelulares

En el caso del medio de cultivo, se ultracentrifugó a 100,000g x 90 minutos (Rotor 70Ti, Beckman Coulter) para concentrar las EVs. Se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado. El precipitado fue resuspendido en 1mL de 1x PBS y se ultracentrifugó a 100,000g x 30 minutos para volver a concentrar la muestra. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 100µL de buffer 1x RIPA con inhibidores de proteasas y EDTA, ambos al 1x.

Para el aislamiento a partir de tejido, se utilizaron 0.5g de cada tejido. La figura 2 muestra un diagrama general de los principales pasos del protocolo de aislamiento. El tejido se disgregó con navaja en trozos pequeños y se colocó en un tubo con 3.5mL de papaína disuelta en PBS 1x (20

unidades/mL) o Colagenasa tipo II disuelta en PBS 1x (0.15%), según el tipo de tejido. Se incubaron durante 20 minutos con papaína o 30 minutos con Colagenasa tipo II a 37°C con agitación constante. La digestión enzimática se inactivó con 3.5mL de PBS frío con inhibidores de proteasas y EDTA, ambos al 1x. Posteriormente, se realizó una serie de centrifugaciones: primero a 400g x 10 minutos, para eliminar células.; 2,000g x 20 minutos para eliminar cuerpos apoptóticos y fragmentos celulares; 10,000g x 40 minutos, para eliminar microvesículas. En las tres centrifugaciones, se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Finalmente, la muestra se filtró con una unidad de filtración con poro de 0.8micras (Millipore) y se ultracentrifugó a 100,000g x 90 minutos (Rotor 70Ti, Beckman Coulter) para concentrar las vesículas. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 2mL de PBS 1x y se ultracentrifugó a 100,000g x 35 minutos (Rotor TLA100.3, Beckman Coulter). Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 2.5mL de una solución de gradiente al 30% de iodixanol-sacarosa (valor de densidad $\delta= 1.175\text{g/mL}$, Optiprep, Alere Technologies AS). Se dejó en resuspensión durante toda la noche.

Para la separación por gradiente, se preparó un gradiente discontinuo de Optiprep (iodixanol)-sacarosa de 2.5mL con Optiprep al 30% ($\delta=1.175\text{g/mL}$), 1.3mL con Optiprep al 20% ($\delta=1.127\text{g/mL}$) y 1.2mL con Optiprep al 10% ($\delta=1.079\text{g/mL}$), ya que usualmente las vesículas se aíslan entre los valores de densidad de $\delta=1.08\text{g/mL}$ a $\delta=1.16\text{g/mL}$, con la muestra colocada en el fondo del gradiente (*bottom-loaded*). Se centrifugó a 250,000g x 60 minutos, sin freno (Rotor SWTi55, Beckman Coulter). Se recuperaron 10 fracciones de 490 μL cada una, de arriba hacia abajo. Cada fracción se lavó con 1mL de PBS 1x y se ultracentrifugó a 100,000g x 35 minutos (Rotor TLA 100.3, Beckman Coulter). Cada fracción se resuspendió en 60 μL de buffer RIPA, con inhibidores de proteasas y EDTA al 1x, o en 500 μL de PBS 1x, según el uso posterior.

En algunos casos, las fracciones recuperadas por gradiente fueron resuspendidas en 500 μL de PBS 1x por fracción, y se juntaron en parejas (1/2, 3/4, 5/6, 7/8 y 9/10) para dar un total de 1mL por pareja (ver diagrama de la figura 3). Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna de sefarosa CL-2B, y se colectaron 30 fracciones de cada pareja de 500 μL cada una, utilizando una solución de PBS/citrato al 0.32% como eluyente. Con base en los datos obtenidos de absorbancia a 280nm, se concentraron las fracciones 5 a 10 de la serie de cada pareja.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El aislamiento de las vesículas se realizó conforme el procedimiento descrito en la sección *Aislamiento de vesículas extracelulares*. Una vez aislados, las vesículas fueron resuspendidas en 400 μ L de buffer de PBS 1x. Se concentraron en tubos Amicon 0.5mL 3KDa centrifugando a 14,000g, hasta alcanzar un volumen de 100 μ L. Se les adicionaron 400 μ L de una solución de paraformaldehído/glutaraldehído al 2.5%, y se fijaron durante 45 minutos. Posteriormente, se redujo nuevamente el volumen hasta alcanzar 100 μ L. 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 7 lavados con agua destilada de 2 minutos cada uno y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche. Se realizó una contratinción con acetato de uranilo alcohólico durante 15 minutos, y se lavó dos veces con agua.

Western Blot

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales CD9 (Dilución (Dil.) 1:500, #cat. SC-13118, Santa Cruz), CD63(Dil. 1:500, #cat. SC-5275, Santa Cruz), CD81 (Dil.1:500, #cat. SC-166029, Santa Cruz), Anexina A5 (Dil. 1:2500, #cat. SC-74438, Santa Cruz), Alix (Dil. 1:500, #cat. SC-53540, Santa Cruz), TSG101 (Dil. 1:500, #cat. SC-7964, Santa Cruz), Flotilina-1(Dil. 1:500, #cat. SC-74566, Santa Cruz), Actinina A4 (Dil. 1:1000, #cat. SC-393495, Santa Cruz), Rab5c (Dil.1:500, #cat. SC-365667, Santa Cruz), MFG-E8 (Dil. 1:2500, #cat. SC-271574, Santa Cruz), Apo-A1 (Dil. 1:1000, #cat. ab211472, Abcam), de ratón, y CD63 (Dil. 1:500, #cat. ab217345, Abcam), Anexina A2 (Dil. 1:2000, #cat. ab178677, Abcam), de conejo, como marcadores de vesículas, y calnexina (Dil. 1:10,000, #cat. SC-6465, Santa Cruz) de cabra como marcador de contaminación celular en la muestra. Se utilizó anti-IgG κ -BP (#cat. SC-516102, Santa Cruz) para detectar los anticuerpos de ratón, un anticuerpo monoclonal de conejo-HRP (#cat. SC-2357, Santa Cruz) y un anticuerpo monoclonal de cabra (SC-2020, Santa Cruz) para detectar los anticuerpos del mismo origen.

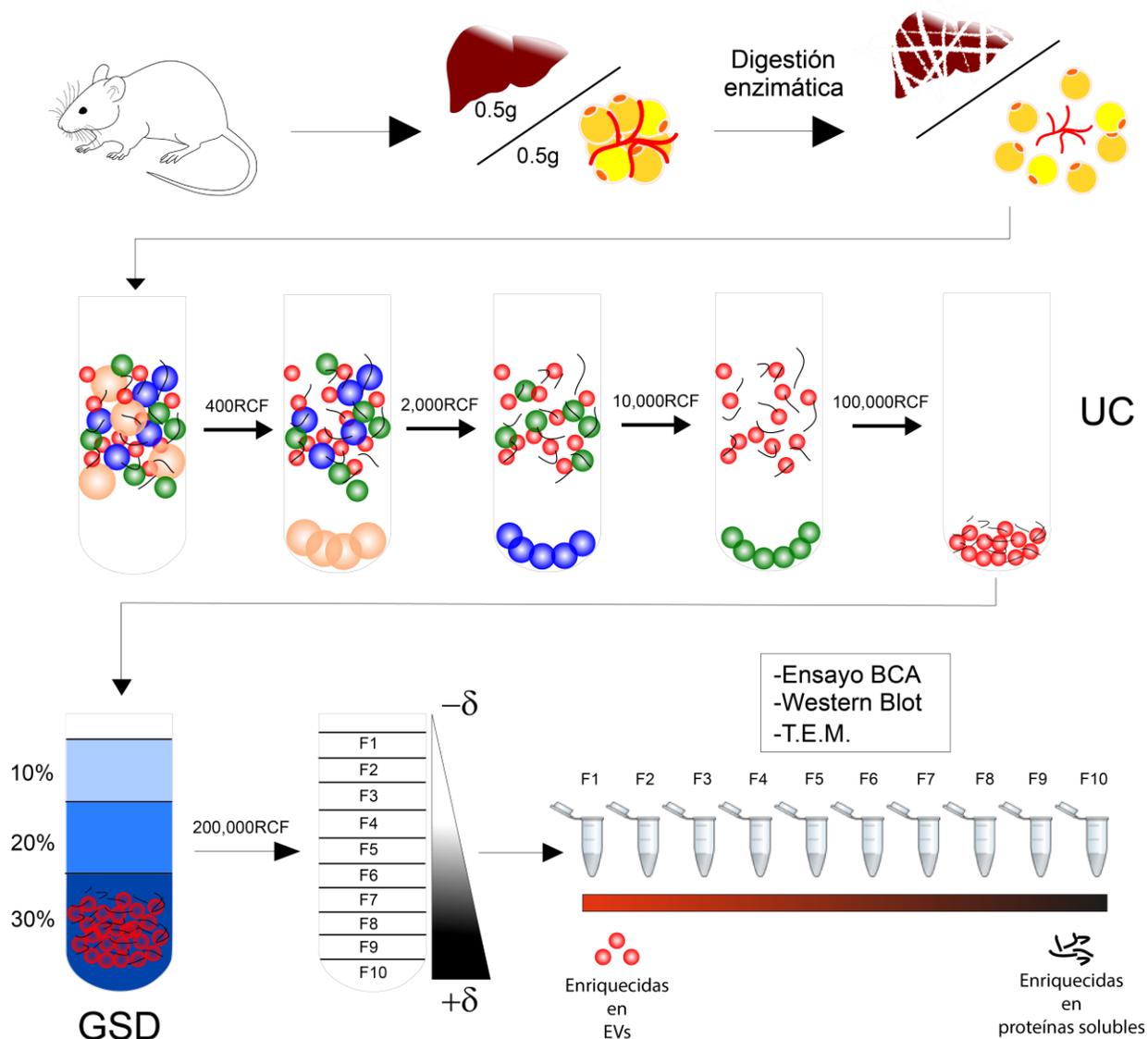


Figura 2. Diagrama de aislamiento de vesículas extracelulares a partir de muestras de tejido adiposo y hepático. Brevemente, el tejido es extraído del ratón y se somete a una digestión enzimática. Posteriormente, la muestra pasa por varios pasos de centrifugación diferencial, hasta terminar en un paso de ultracentrifugación. El sedimento obtenido se coloca en el fondo de un gradiente de separación por densidad, el cual es ultracentrifugado a 200,000RCF durante una hora, sin freno. Finalmente, se colectan 10 fracciones de 490 microlitros cada una y se les da un último paso de lavado por ultracentrifugación. Las muestras finales fueron cuantificadas para determinar la cantidad total de proteína analizadas por western blot y microscopía electrónica de transmisión. Abreviaturas: RCF=Fuerza Centrifuga Relativa, por sus siglas en inglés; UC=Ultracentrifugación; GSD=Gradiente de Separación por Densidad.

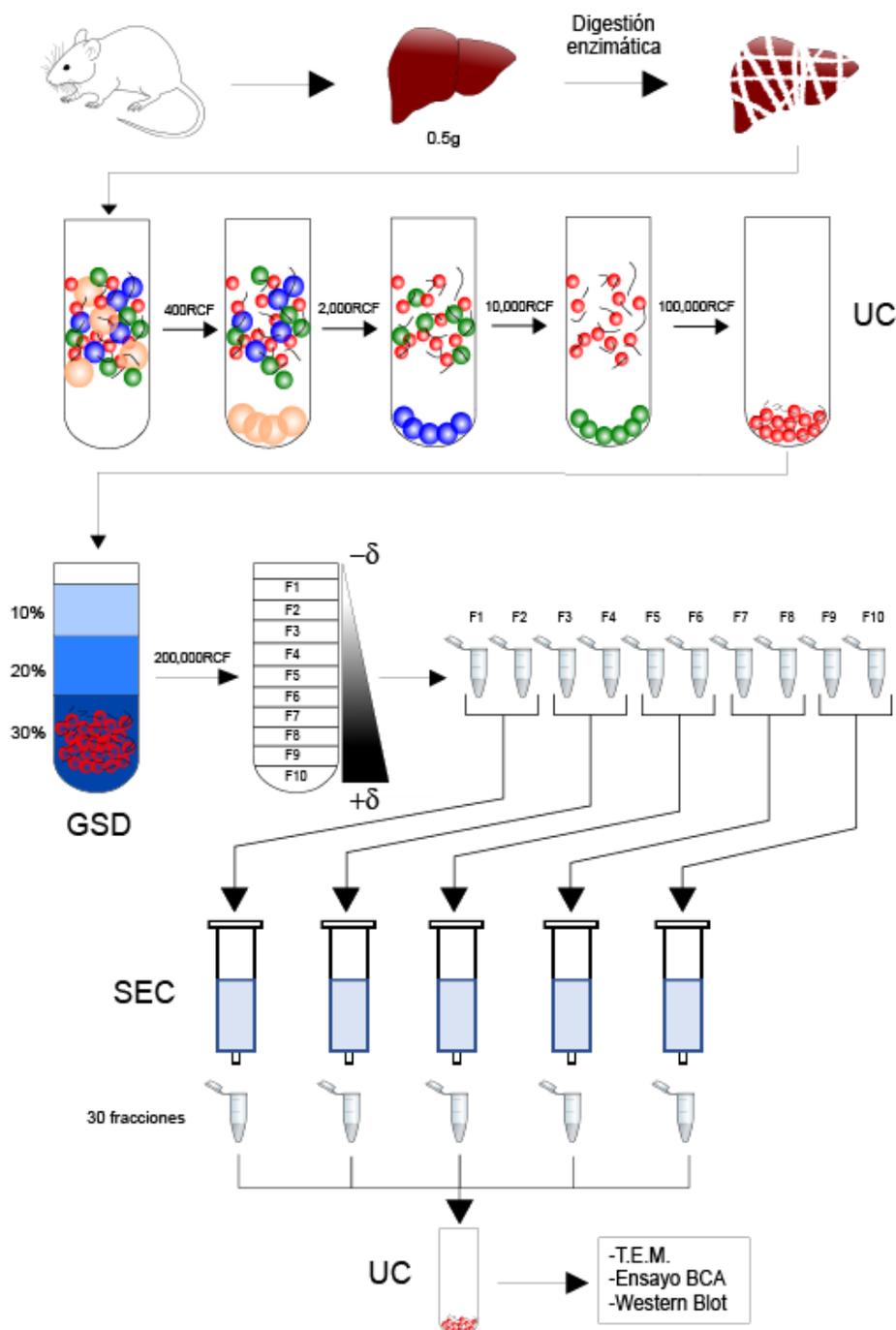


Figura 3. Diagrama de aislamiento de vesículas a partir de muestra de tejido hepático. Siguiendo el protocolo descrito en la figura 3, las fracciones obtenidas del gradiente de densidad se juntaron en parejas. Posteriormente, cada pareja fue sometida a una separación por cromatografía de exclusión por tamaño, donde se colectaron 30 fracciones de cada pareja. Utilizando los valores de absorbancia a 280nm de las fracciones, se concentraron las fracciones 5 a 10 por ultracentrifugación para ser analizadas por cuantificación de proteína total y western blot, así como microscopía electrónica de transmisión. Abreviaturas: RCF=Fuerza Centrifuga Relativa, por sus siglas en inglés; UC=Ultracentrifugación; GSD=Gradiente de Separación por Densidad; SEC=Cromatografía de exclusión por tamaño, por sus siglas en inglés.

RESULTADOS

Caracterización de marcadores de vesículas en órganos de ratón

Para determinar el contenido de marcadores tradicionales de vesículas extracelulares en distintos órganos, realizamos un ensayo WB en extractos de proteínas citosólicas y membranales para identificar la presencia de los siguientes marcadores: CD63, CD81, TSG101, Alix, Anexinas A2 y A5, y MFG-E8. La figura 4a resume los resultados obtenidos en las muestras de cerebro, corazón, riñón, hígado y tejido adiposo. La expresión de los marcadores de vesículas fue distinta para cada órgano. La tetraspanina CD63 solamente se detectó en ambos extractos de cerebro, y en los extractos membranales de riñón y tejido adiposo, mientras que los extractos de corazón e hígado no mostraron señal. La proteína TSG101 fue detectada en los extractos citosólico y membranal de cerebro, y en los extractos citosólicos de corazón y tejido adiposo. No fue posible detectar TSG101 en riñón e hígado. Anexina A5 se encontró enriquecido en los extractos citosólicos de cerebro y riñón, y en ambos extractos del tejido adiposo. El marcador MFG-E8 solamente fue detectado altamente enriquecido en ambos extractos de hígado y una menor presencia en los extractos de cerebro, mientras que en el resto de los tejidos no fue posible detectarlo. Por último, los marcadores CD81 y Alix no fueron detectados en ningún caso.

Para buscar amplificar la señal de los marcadores, se utilizó un protocolo de fijación de proteínas a la membrana de PVDF con acetona [78]. Los resultados de la señal de los marcadores se encuentran en la figura 4b. La presencia e intensidad de los marcadores cambió con respecto a su detección sin fijación. Por ejemplo, CD81, que anteriormente no había sido detectado en ningún extracto, pudo detectarse en todos los extractos membranales, siendo el extracto de cerebro el que presentó la señal más intensa. TSG101 pudo detectarse ahora en el extracto membranal de riñón y en ambos extractos de hígado. El marcador Alix pudo detectarse en todos los extractos citosólicos, y en el extracto membranal del tejido adiposo. Anexina A5 pudo detectarse en todos los extractos citosólicos y en los extractos membranales de riñón y tejido adiposo. Finalmente, la señal de MFG-E8 no cambió con la fijación.

Estos resultados demostraron que el enriquecimiento de los marcadores de vesículas varía dependiendo del tejido analizado, por lo que decidimos evaluar aquellos marcadores que fueron exclusivamente detectados en el hígado y el tejido adiposo en experimentos posteriores.

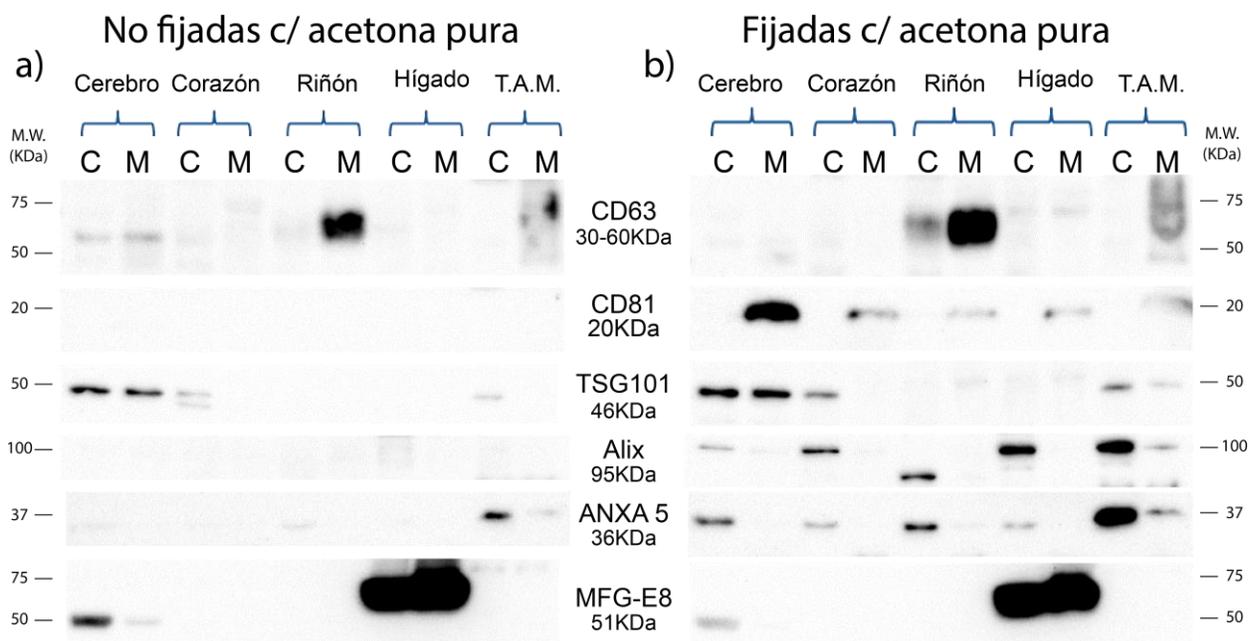


Figura 4. Caracterización de marcadores de vesículas en extractos de órganos de ratón. a) Panel de muestras de extractos citosólicos (C) y membranales (M) de tejido que no fueron fijadas a la membrana con acetona. b) muestras del mismo tejido que fueron transferidas a una membrana y posteriormente fijadas con acetona pura. En ambos casos, se cargó la misma cantidad de proteína (50 μ g/pozo), excepto en el tejido adiposo mesentérico (T.A.M.), donde se cargó 25 μ g/pozo.

Aislamiento de vesículas extracelulares a partir de tejido

En el caso del aislamiento de vesículas de hígado, la mayor concentración de proteína se encontró en las primeras fracciones del gradiente, siendo la fracción 3 la que mayor cantidad de proteína presentó, con casi 5 veces más proteína que las fracciones 2 y 4 (figura 5a). Los marcadores de vesículas Anexina A2, Anexina A5 y MFG-E8 se encontraron distribuidos en las primeras 5 fracciones del gradiente (figura 5b). La microscopía electrónica confirmó la presencia de partículas con forma de copa y esféricas, características de las vesículas, en las fracciones 1 a 4, mientras que en las fracciones 5 y 6 se encontró una mezcla de partículas con una baja presencia de vesículas, y de la fracción 7 hasta la fracción 10, solamente se observaron fragmentos celulares y agregados de proteínas (figura 5c).

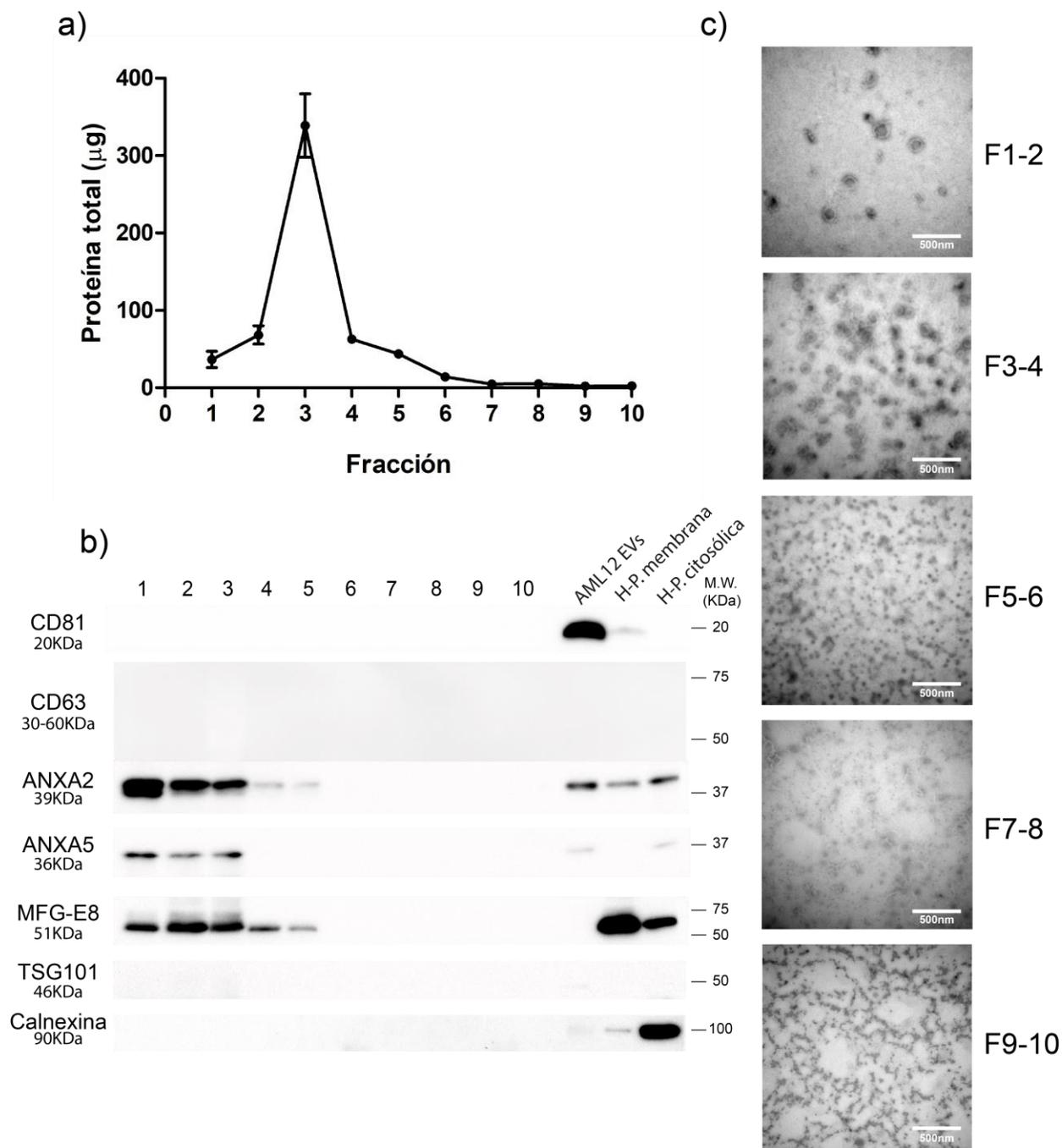


Figura 5. Caracterización de vesículas extracelulares obtenidas a partir de tejido hepático de ratón.

a) Microgramos totales de proteína recuperada de las fracciones colectadas del gradiente de densidad (n=3) b) Panel de ensayos tipo western blot para detectar la presencia y distribución de los marcadores de vesículas extracelulares en las fracciones de gradiente. Se utilizó a la calnexina como marcador de contaminación. Como controles, se utilizaron 20 microgramos de vesículas aisladas de la línea celular hepática AML12 de ratón y 50 microgramos de extractos de proteínas de membrana (H.-p. membrana) y citosólicas (H-p.citosólica) de hígado de ratón CD1 macho. c) Microscopía electrónica de transmisión de las parejas de fracciones obtenidas del gradiente de densidad. Escala=500nm.

Para confirmar la efectividad del método de aislamiento, decidimos aislar vesículas a partir de 0.5g de tejido adiposo mesentérico de ratón. Inicialmente, utilizamos la misma enzima, papaína, para disgregar el tejido. Sin embargo, la digestión con papaína desintegró completamente el tejido y generó ruptura celular, confirmado por la presencia de calnexina en las fracciones de gradiente (fracciones western blot Pap+). Por ello, decidimos evaluar la acción de la enzima colagenasa tipo II. Nuevamente, la mayor cantidad de proteína se encontró aislada en las primeras fracciones del gradiente (figura 6a). La figura 6b muestra la ausencia de calnexina al utilizar colagenasa tipo II, lo que se traduce en que no hubo ruptura celular. En cambio, los marcadores CD81, CD63, Anexina A2 y Anexina A5 se encontraron nuevamente enriquecidos en las primeras 5 fracciones del gradiente, a excepción de Anexina A5 que tuvo una distribución más amplia. Los marcadores MFG-E8 y TSG101 no pudieron detectarse en las fracciones del gradiente.

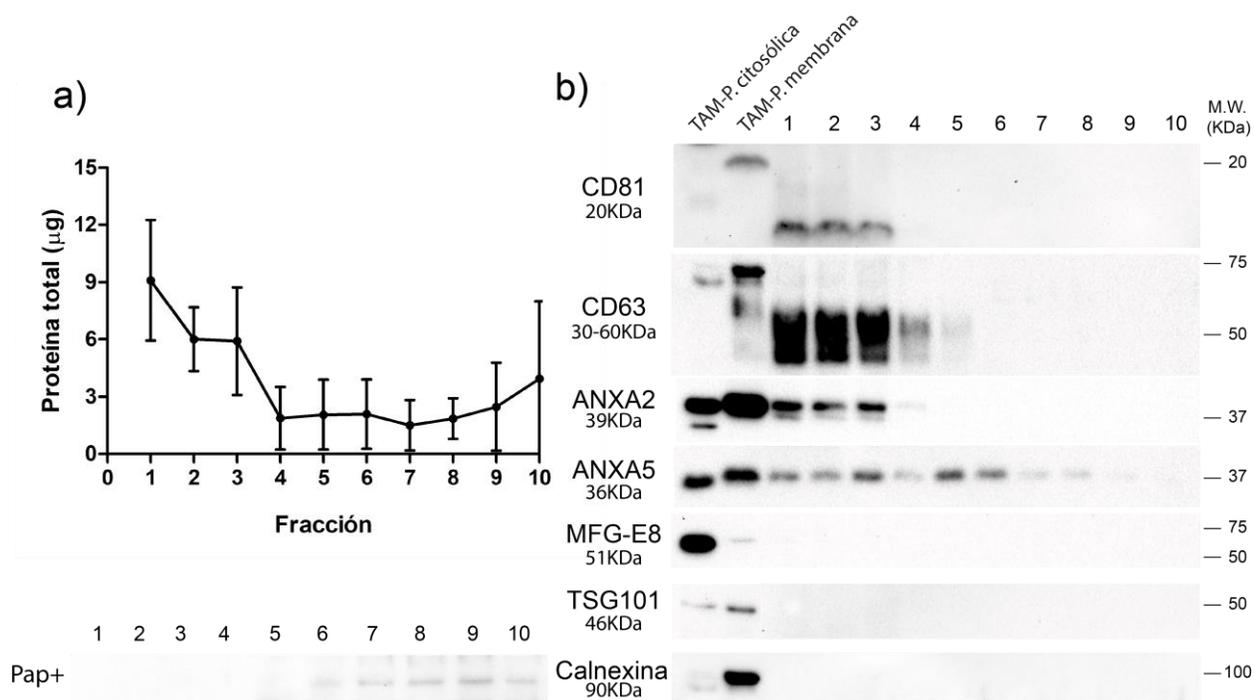


Figura 6. Caracterización de vesículas extracelulares obtenidas a partir de tejido adiposo mesentérico de ratón. a) Proteína total en las fracciones obtenidas por gradiente de densidad. La cuantificación se realizó por triplicado. b) Panel de ensayos tipo Western para detectar la presencia y distribución de los marcadores de vesículas extracelulares en las fracciones de gradiente. Se utilizó a la calnexina como marcador de ruptura celular. Se cargaron 30 microlitros de cada fracción, excepto la muestra donde se utilizó papaína (Pap+) para disgregar el tejido, ya que se cargaron 3 microgramos por carril. Como controles, se utilizaron 50 microgramos de extractos de proteínas de membrana (TAM.-p.membrana) y citosólicas (TAM-p.citosólica) de tejido adiposo mesentérico de ratón CD1 macho.

Debido al resultado obtenido al cambiar la enzima con el tejido adiposo, también comparamos el uso de colagenasa tipo II con el tejido hepático. Los resultados de la comparación están resumidos en la figura 7a y 7c. La cantidad de proteína total obtenida entre las fracciones fue similar a la obtenida utilizando papaína, siendo nuevamente las primeras fracciones donde se concentró la mayor cantidad de proteína (figura 7a). A diferencia del tejido adiposo, la enzima colagenasa tipo II causó ruptura celular en el hígado, ya que detectamos la presencia de calnexina en las fracciones. Los marcadores Anexina A2 y MFG-E8 continuaron presentes en las fracciones, mientras que Anexina A5 disminuyó casi por completo su señal. Además, el marcador TSG101 pudo ser detectado en las primeras fracciones del gradiente, contrario al caso del uso de papaína donde no pudo detectarse. Finalmente, el marcador CD81 no pudo detectarse en ninguna de las fracciones (figura 7c).

Para determinar si parte de la proteína colectada provenía de componentes de la sangre, decidimos comparar también el aislamiento de vesículas a partir de tejido hepático proveniente de ratones perfundidos con solución salina. La proteína total aislada en las fracciones del gradiente disminuyó casi 6 veces, comparado con el aislamiento sin perfusión (figura 7b). Además, los marcadores de vesículas cambiaron la presencia e intensidad de su señal. Los marcadores Anexina A2 y Anexina A5 disminuyeron drásticamente su señal, mientras que el marcador MFG-E8 desapareció por completo de las fracciones. Finalmente, el marcador CD81 no pudo detectarse, y el marcador de contaminación calnexina se mantuvo ausente de las fracciones (figura 7d).

Con estos resultados, encontramos que la elección de la enzima para cada tejido es fundamental para obtener el grado de disgregación de matriz extracelular adecuado para extraer las vesículas, sin causar ruptura celular. Por lo tanto, en adelante utilizamos papaína para el tejido hepático y colagenasa tipo II para el tejido adiposo. Por otro lado, encontramos que la perfusión altera drásticamente la cantidad de proteína total obtenida y la presencia y enriquecimiento de la señal de marcadores de vesículas en el material aislado del tejido.

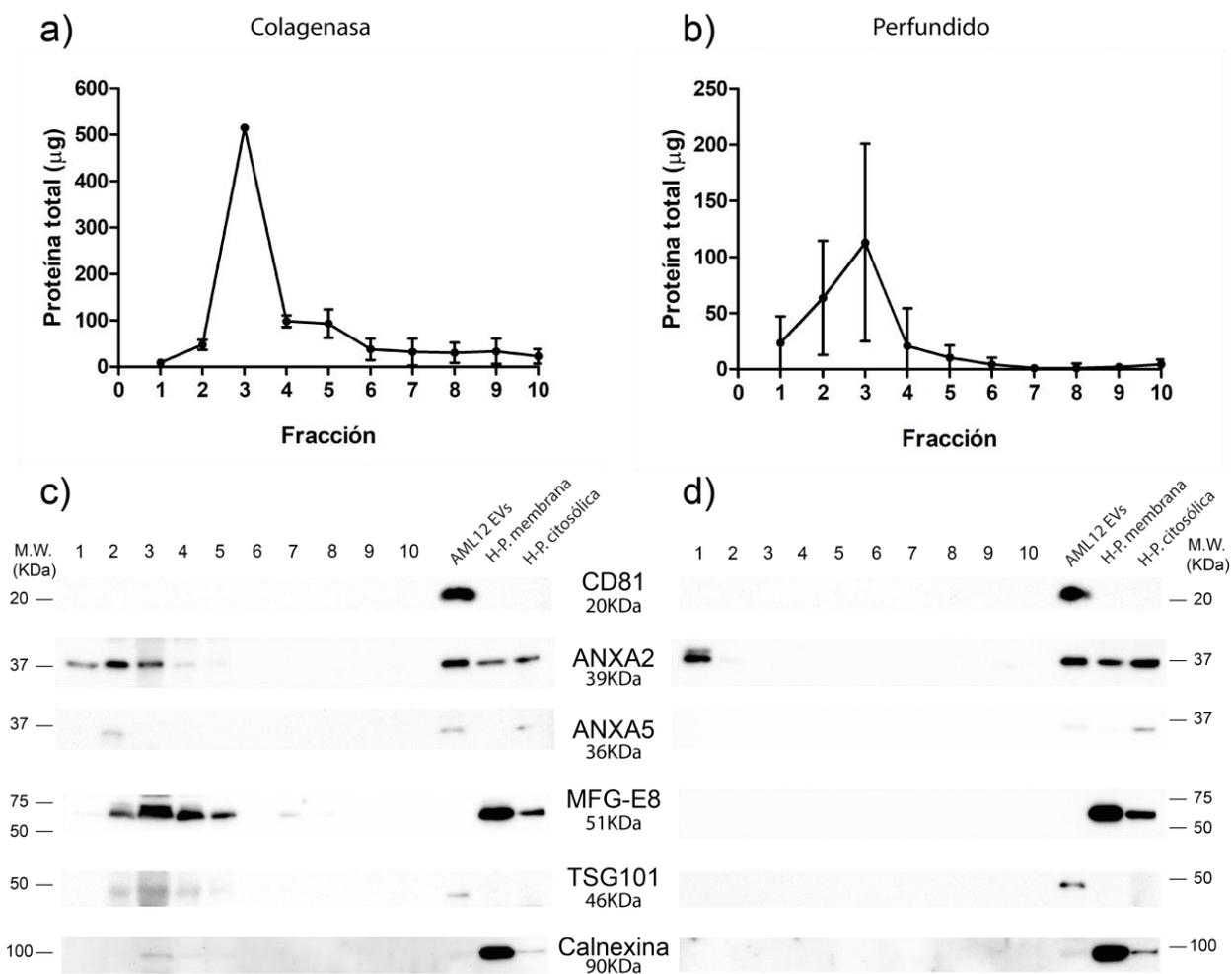


Figura 7. Efecto del cambio de enzima para la digestión enzimática o la perfusión del tejido en el aislamiento de vesículas extracelulares de hígado de ratón. Cuantificación de proteína total de las fracciones colectadas del gradiente de hígado con colagenasa (a) y de hígado con perfusión y disgregado con papaína (b). Ensayos tipo western blot para identificar marcadores de vesículas en las fracciones colectadas de hígado disgregado con colagenasa (c) y de hígado con perfusión y disgregado con papaína (d).

Validación de aislamiento de vesículas en otros tejidos

Para explorar el alcance de aplicación del método de aislamiento, decidimos probar aislar vesículas a partir de 0.5g de cerebro y riñones de ratones CD1 machos. En ambos casos, la mayor cantidad de proteína aislada se concentró en las primeras fracciones del gradiente, siendo la fracción 3 la que concentró una mayor cantidad de proteína total (figuras 8a y 8b). Tal como se vio en las fracciones de hígado y tejido adiposo, la mayor intensidad del marcador Anexina A2 se observó en las primeras fracciones, mientras que no se detectó la presencia de calnexina en ninguno de los casos (figuras 8c y 8d). Esto confirmó la reproducibilidad del método de aislamiento utilizando diferentes tipos de tejidos.

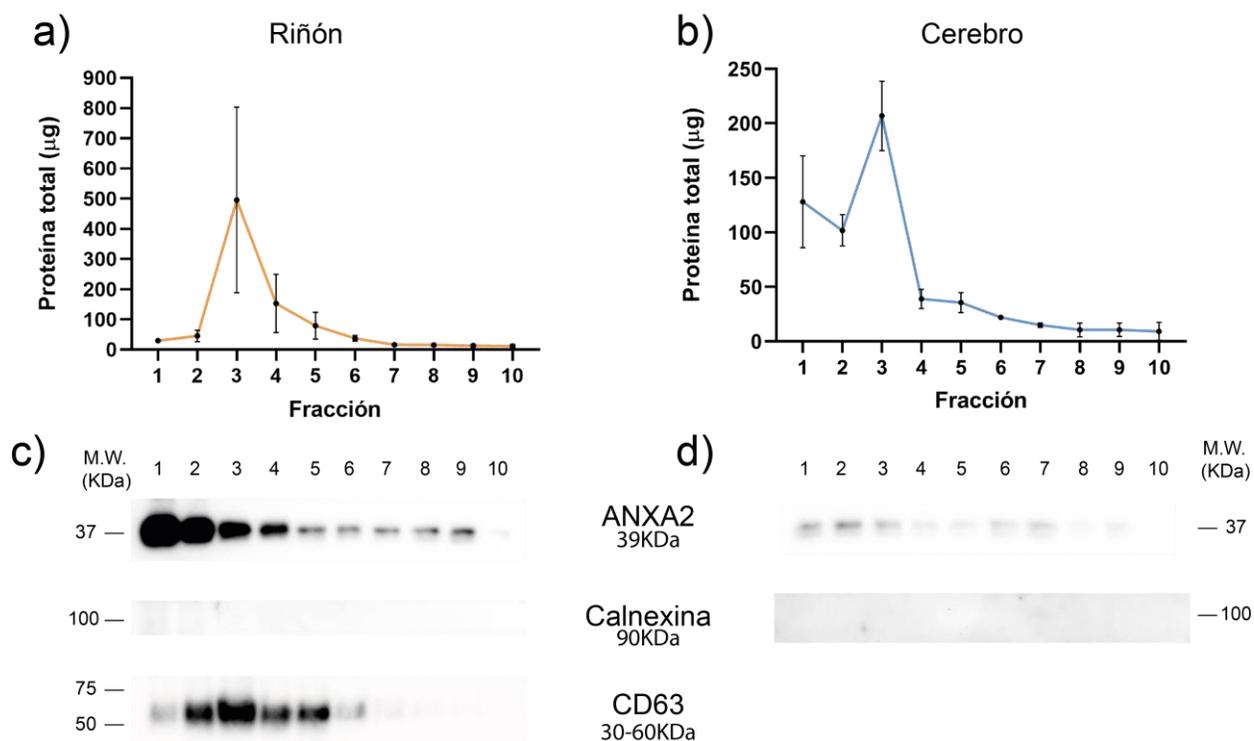


Figura 8. Caracterización de aislamiento de vesículas extracelulares a partir de tejido de riñón y cerebro. Se cuantificó la proteína total de cada fracción del gradiente de densidad del riñón (a) y el cerebro (b). Se evaluó la presencia de los marcadores Anexina A2 y calnexina en las fracciones de riñón (c) y de cerebro (d).

La pureza de las vesículas extracelulares de hígado aumenta con un tercer paso de purificación

La discrepancia entre la cantidad de proteína total aislada en las fracciones de gradiente y la intensidad de los marcadores de vesículas nos hizo suponer que la mayoría de la proteína aislada no pertenecía a material vesicular, por lo que se decidió realizar un tercer paso de aislamiento para tratar de purificar aún más la muestra de vesículas (ver diagrama de la figura 3).

Las fracciones obtenidas del gradiente de iodixanol/sacarosa se juntaron en parejas y se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño de cada pareja. La absorbancia a 280nm de las 30 fracciones colectadas se encuentra representada en la figura 9a. Se lograron identificar dos crestas en los valores de absorbancia, la primera corresponde desde la fracción 5 hasta la fracción 10, y la segunda desde la fracción 13 hasta la fracción 28. Puesto que las vesículas son esperadas en las primeras fracciones [79], sólo se concentraron las fracciones 5 a 10 por ultracentrifugación de cada pareja y se determinó la cantidad total de proteína recuperada, la presencia de marcadores y estructuras vesiculares. La cuantificación de proteína total mostró una disminución de casi un 50% de proteína total en las fracciones de la pareja F1-2 en comparación con las mismas fracciones del gradiente previas a la separación por columna (figura 9b). De la misma manera observamos una disminución de un poco más del 75% en las parejas F3-4 y F5-6 y, por último, no hubo cambios significativos en la proteína total de las parejas F7-8 y F9-10. (figura 9b), La caracterización por Western Blot reveló que los marcadores MFG-E8, Anexina A2 aún se encontraron presentes en las fracciones F1-2 y F3-4, tal como se había visto anteriormente en las fracciones de gradiente. En las fracciones F5-6, solamente se detectó la presencia de MFG-E8. Algo importante a destacar fue que el marcador de vesículas CD81 fue detectado en las parejas F1-2 y F3-4 posterior a la cromatografía, donde no había podido detectarse previamente en las fracciones del gradiente. Además, logramos detectar una banda de entre 10-15KDa con el anticuerpo de CD81. En cambio, en las parejas de fracciones F7-8 y F9-10 no fue posible detectar ninguno de los marcadores de vesículas (figura 9c). La microscopía electrónica confirmó la presencia de vesículas en las parejas de fracciones F1-2 y F3-4, mientras que en la pareja F5-6 se observó una población heterogénea de partículas, con mínima presencia de vesículas. Finalmente, en las parejas F7-8 y F9-10 no se detectaron vesículas (figura 9d).

Con estos resultados determinamos que la adición de la cromatografía de exclusión por tamaño como tercer paso de aislamiento removió una cantidad significativa proteínas solubles de la muestra, sin alterar la integridad de las vesículas.

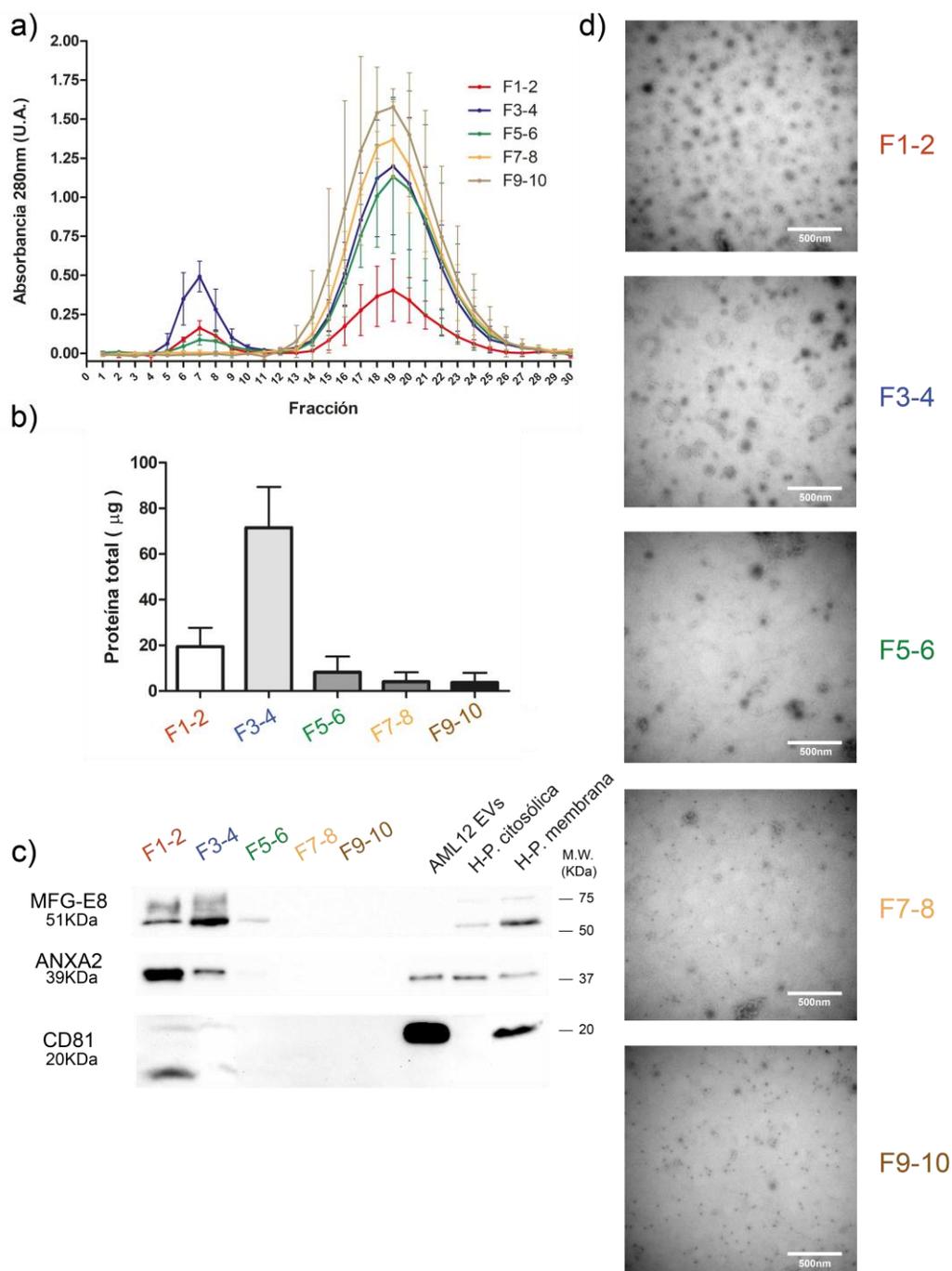


Figura 9. Optimización de aislamiento de vesículas extracelulares a partir de tejido hepático, agregando un paso de cromatografía de exclusión por tamaño. a) Absorbancia a 280nm de las fracciones colectadas de la cromatografía de exclusión por tamaño (n=3). b-d) Las fracciones 5-10 de cada pareja fueron concentradas por ultracentrifugación y evaluadas por concentración por proteína total (b); ensayos de Western blot a volumen constante (para evaluar el enriquecimiento de los marcadores de vesículas MFG-E8, Anexina A2 (ANXA2) y CD81 (c); y por microscopía electrónica de transmisión (d). Escala=500nm.

DISCUSIÓN

Recientemente, el aislamiento de vesículas extracelulares a partir de muestras de tejido ha cobrado enorme interés, ya que se ha visto que es posible obtener las vesículas que han sido secretadas al espacio intersticial de los tejidos, sin causar ruptura celular. Varios estudios han logrado aislar satisfactoriamente vesículas de órganos y tejidos, tales como cerebro, tumores y tejido adiposo [5-7, 68, 80]. Hasta donde sabemos, no se ha reportado previamente el aislamiento de vesículas a partir de tejido hepático ni renal.

Inicialmente, nos fue difícil detectar algunos de los marcadores clásicos de vesículas. Pensamos que esto podía deberse a que la abundancia de estas proteínas podría ser distinta en cada tejido y, por lo tanto, en las vesículas aisladas. Los resultados obtenidos de la comparación de presencia e intensidad de marcadores entre los lisados de hígado, tejido adiposo, riñón y cerebro nos permitieron demostrar que la expresión de estos marcadores depende del tejido. Además, el aumento en la señal de los marcadores, posterior a la fijación de las proteínas a la membrana utilizando acetona, demuestra que hay marcadores que sí se encuentran presentes en ciertos tejidos, pero que su abundancia es tan baja que no es posible detectarlos sin el paso de la fijación. Incluso, hay marcadores que, aun empleando el paso de fijación, no es posible detectarlos en ciertos tejidos. Esto quizá explique la ausencia de ciertos marcadores de vesículas en nuestros extractos. Otros estudios han demostrado una alta heterogeneidad en la composición de las vesículas dependiendo de su origen celular y tisular [24, 81, 82]. Por ejemplo, Lee et al demostraron, utilizando un dispositivo de inmunocaptura de EVs, que las vesículas producidas por la línea celular de glioblastoma Gli36, varían en su composición proteica dependiendo de los niveles de expresión de ciertos genes, como EGFRvIII y IDH1R132H [81]. Encontraron que las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 varían drásticamente su presencia y enriquecimiento en las vesículas, dependiendo de la célula de origen. En otro trabajo independiente, Gyuris et al demostraron, mediante un análisis de subpoblaciones, que las vesículas producidas por cultivos primarios de células de glioblastoma de ratones *wild-type*, o con sobreexpresión de EGFR o PDGFRA, presentan diferencias en su composición proteica [82]. Nuevamente encontraron que las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 se encuentran enriquecidas diferencialmente entre subpoblaciones de vesículas divididas por tamaño, así como otros marcadores que definen ciertas subpoblaciones como TSG101 y Alix. Finalmente, Jeppesen et al encontraron que las líneas celulares Gli36 y DKO-1 secretan subpoblaciones de vesículas que comparten los marcadores CD9, CD63, CD81, pero difieren en otros marcadores clásicos, como TSG101, Annexina A1, A2 y A5, HSC70 y ARRDC1 [32]. Esto podría explicar las diferencias en la

distribución de marcadores que encontramos en los extractos de tejidos y en las vesículas aisladas por nosotros.

En todos los casos, el aislamiento se lleva a cabo mediante una combinación de digestión enzimática con varios pasos posteriores de purificación de la muestra. Dado que esta forma de aislar vesículas es relativamente reciente [76], aún no existen parámetros o protocolos de aislamiento estandarizados que permitan una mejor comparación entre los resultados de los estudios. Por ejemplo, se han propuesto varias enzimas y soluciones diferentes para la digestión enzimática. Perez-González et al, quienes establecieron el primer protocolo de aislamiento de vesículas a partir de tejido de cerebro, utilizaron papaína (20 unidades/mL) disuelta en medio Hibernate-E, el cual es un medio de cultivo utilizado para cultivar células o tejido neuronal embrionario en niveles de CO₂ ambientales. [4]. Posteriormente, Polanco et al modificaron este protocolo y utilizaron 20 unidades/mL de papaína disuelta en solución Hibernate-A, que es un medio de cultivo para células neuronales adultas [83], mientras que Vella et al establecieron un protocolo donde utilizaron Colagenasa tipo III disuelta en medio Hibernate-E [6]; Hurwitz et al utilizaron papaína (1mg/mL) disuelta en medio Hibernate-E [5], y Muraoka et al proponen utilizar papaína (20unidades/mL) disuelta en solución Hibernate-E y EBSS, que es una solución salina complementaria la cual asiste al mantenimiento del cultivo celular en niveles de CO₂ ambientales [7], siendo todos ellos utilizados para tejido de cerebro. Estos son solo algunos ejemplos que subrayan la heterogeneidad de protocolos que existen para aislar vesículas de un mismo tejido. En nuestro caso, decidimos utilizar papaína (10 unidades/mL) o colagenasa tipo II (0.15%) disuelta en PBS 1x, ya que adaptamos un protocolo de digestión enzimática para el aislamiento de células mesenquimales a partir de tejido adiposo publicado por Araña et al [84]. Utilizamos PBS para la digestión enzimática ya que es una solución fisiológica amortiguadora de pH que permite que tanto la colagenasa tipo 2 (pH óptimo=6.3-8.5) como la papaína (pH óptimo=6.0-7.0) mantengan su actividad catalítica, ya que mantiene un pH alrededor de 7.2, además de ser un medio isotónico en el que las células pueden mantener su integridad.

Para conocer el efecto y la importancia que tiene la elección de la enzima sobre un tejido, decidimos probar la digestión enzimática con papaína (10 unidades/mL) y colagenasa tipo II (0.15%) sobre el tejido hepático y el tejido adiposo. La papaína es una enzima que pertenece a la familia de las cisteína-hidrolasas que rompe enlaces peptídicos, por lo cual presenta un amplio rango de especificidad [85]. Por otro lado, las colagenasas son endopeptidasas que escinden fibras de colágena en la región de triple hélice. Generalmente, las colagenasas que se utilizan en laboratorio son de origen bacteriano, y éstas tienen un mayor rango de especificidad que las

colagenasas de origen animal. Esto les permite degradar a casi todos los tipos de colágenas presentes en un tejido. La colagenasa tipo II se refiere a una mezcla de enzimas, principalmente enriquecida en colagenasa, donde también están presentes enzimas como la caseinasa, tripsina y clostripaina, siendo esta última una proteínasa que escinde proteínas en el enlace peptídico del extremo carboxilo del aminoácido arginina, y está particularmente enriquecida en esta mezcla [85]. Esto le brinda altos niveles de actividad de proteasa a la mezcla. Ambas enzimas son recomendadas para disgregar tejido hepático, adiposo, cerebral y renal [85]. En el caso del tejido hepático, la digestión con colagenasa causó ruptura celular, determinada por la presencia de la proteína intracelular calnexina en las muestras, mientras que con la papaína no fue detectable. Por otro lado, en el caso del tejido adiposo, la colagenasa permitió la disgregación del tejido sin causar ruptura celular. Es importante mencionar que se ha visto que la digestión de tejidos utilizando colagenasa no altera significativamente las proteínas de membrana de las células [86]. En el caso de la papaína, se ha visto que no disminuye significativamente la viabilidad celular [87], aunque no se ha demostrado si altera la estructura de las proteínas de membrana de las células.

Es probable que la diferencia en los resultados de la disgregación de los tejidos esté relacionada con un conjunto de factores, como la composición de matriz extracelular, los cortes del tejido, la frescura de la muestra, entre otros. Por ejemplo, la concentración de colágenas en la matriz extracelular del tejido adiposo [88] es casi 60 veces más abundante que la encontrada en la matriz del tejido hepático [89]. Por otra parte, Vella et al han reportado que la disgregación del tejido, durante la incubación de la enzima, es sensible a la orientación y profundidad de los cortes que se realizan en la muestra previamente [6]. Finalmente, Pérez González et al demostraron que la congelación del tejido no altera el aislamiento de vesículas de tejido cerebral [4], aunque esto no ha sido demostrado para el hígado, el tejido adiposo o el riñón. Es probable que todos estos factores pudieran alterar la efectividad de la digestión del tejido con una u otra enzima, por lo que hacen falta más experimentos que determinen con mayor claridad la causa por la que una colagenasa disgregó mejor el tejido adiposo y la papaína al tejido hepático.

Los ensayos de western blot revelaron una alta heterogeneidad en la presencia y enriquecimiento de marcadores proteicos en las vesículas aisladas de los distintos tejidos. Por ejemplo, las vesículas aisladas de hígado mostraron la presencia de los marcadores MFG-E8, Anexina A2 y Anexina A5. Estas tres proteínas se encuentran en una alta concentración en las membranas de las células y en la sangre, ya que se encuentran involucradas en procesos tales como la coagulación, reparación de membranas, fibrinólisis y angiogénesis. Se ha visto que la presencia

de estas proteínas en la sangre no está en forma soluble, sino que están fuertemente asociadas a vesículas. Las anexinas, por ejemplo, se encuentran principalmente en el interior celular, por lo que su presencia en la sangre se encuentra asociada a una vía de secreción asociada a vesículas. Por otro lado, MFG-E8 es capaz de reconocer al fosfolípido fosfatidilserina presente en las membranas celulares, por lo que también se ha asociado su presencia con el transporte vesicular [90, 91]. Finalmente, la proteína CD81, considerada un marcador común de vesículas extracelulares, fue detectada en las vesículas de hígado solamente después de añadir el paso de cromatografía de exclusión por tamaño. Esto puede deberse a dos razones: 1) que las vesículas de hígado presenten un bajo enriquecimiento de esta proteína, o 2) que la muestra aún presente una gran cantidad de proteínas solubles que enmascaren la señal de esta proteína, incluso después de haber sido separadas por la cromatografía.

Algunos estudios, como el de Huang et al, han optado por perfundir los tejidos previamente al aislamiento de vesículas (cuando el tejido es obtenido de animales) para reducir la posible contaminación proveniente de la sangre en las muestras y facilitar los análisis proteómicos [80]. Sin embargo, el tejido humano no es posible perfundirlo, por lo que se deben desarrollar protocolos que logren purificar vesículas directamente de tejidos sin perfundir. Esto aumenta la heterogeneidad en el procesamiento inicial de las muestras, lo que a su vez aumenta la dificultad de poder comparar resultados entre estudios. Nosotros comparamos el efecto de la perfusión del tejido hepático en el resultado del aislamiento de vesículas, utilizando nuestro protocolo. La cantidad de proteína total obtenida disminuyó una tercera parte con el tejido perfundido, en comparación con la obtenida sin perfundir el tejido. Huang et al evaluaron el efecto de la perfusión en tejido cerebral de ratón y macaco. Ellos encontraron que la perfusión, si bien disminuye la intensidad de algunos marcadores de vesículas, como CD9 y TSG101, no cambia significativamente el resultado del aislamiento de vesículas directamente del tejido [80], aunque esto solamente se ha demostrado en tejido de cerebro. En nuestro caso, la perfusión sí alteró de forma significativa la cantidad media de proteína aislada (Prueba T de Student no pareada, valor- $P=0.0336$).

Algo sorprendente fue que, al perfundir el tejido hepático previo a la extracción de vesículas, las señales de MFG-E8 y Anexina A5 prácticamente desaparecieron de las fracciones, quedando solamente la señal de Anexina A2 con una baja intensidad en las fracciones 1 y 2. Esto sugiere que la señal de estos marcadores pudiera provenir de vesículas contenidas en los vasos sanguíneos y no del espacio intersticial intercelular. Sin embargo, se sabe que el sistema vascular tiene un intercambio de fluidos y moléculas con el espacio intersticial de los tejidos

mediante el proceso llamado intercambio capilar [92]. Este intercambio es dependiente de varios factores, tales como la presión hidrostática, la presión osmótica, la posición espacial del capilar. Se ha visto que, con solo incrementar el flujo capilar, la superficie de área de permeabilidad capilar también aumenta [93]. Por ello, también puede ser posible que, al perfundir los tejidos, exista una pérdida de líquido intersticial por el incremento en el flujo capilar y, por lo tanto, se pierda material vesicular presente en el espacio intersticial. Otros trabajos han encontrado a CD81, Anexina A2 y A5 y MFG-E8 enriquecidas en las vesículas aisladas de cerebro y tumores [3, 7, 94]. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos han evaluado los cambios en el tejido al ser perfundido, por lo que se necesitan más experimentos para determinar con mayor precisión el origen de las vesículas aisladas.

En contraste con las vesículas de hígado, las vesículas obtenidas del tejido adiposo mesentérico mostraron la presencia de los marcadores CD81, CD63, Anexina A2 y Anexina A5. Contrario a las vesículas de hígado, la proteína MFG-E8 no fue detectable en las vesículas de tejido adiposo. La proteína CD63, también considerada un marcador común de vesículas extracelulares, mostró un fuerte enriquecimiento en las vesículas de tejido adiposo. También detectamos una señal intensa de CD63 en las vesículas aisladas de tejido renal. CD63, que pertenece a la familia de las tetraspaninas, se encuentra fuertemente enriquecida en tejidos como los riñones, el bazo y la médula ósea. Dado que las tetraspaninas, como CD63 y CD81 presentan cuatro regiones transmembranales, se les asocia con la membrana plasmática y no como proteínas solubles. Se han detectado vesículas extracelulares enriquecidas en CD63, y por ello es considerada un importante marcador vesicular [32]. La presencia de este marcador tanto en las vesículas aisladas de tejido adiposo como de riñón, y su ausencia en las vesículas de hígado, puede deberse a dos posibles razones: que las vesículas de cada tejido presenten una composición específica de proteínas y otras biomoléculas, o que la cantidad de irrigación sanguínea sea distinta en cada tejido y, por lo tanto, se hayan recuperado muestras con distinta composición proteica. Crescitelli et al han caracterizado distintas subpoblaciones de vesículas extraídas de diferentes tejidos tumorales de melanoma y han encontrado que hay variación en la presencia y enriquecimiento de marcadores tanto entre tejidos del mismo tipo como entre subpoblaciones de vesículas [3]. Por ejemplo, la presencia de CD9, CD63, CD81 y Flotilina-1 varió significativamente entre un tumor y otro. Además, las subpoblaciones caracterizadas mostraron que hay una alta variabilidad de estos mismos marcadores, dependiendo del tamaño y la densidad de las vesículas analizadas. Por otro lado, Desafortunadamente, no comparamos la diferencia entre el aislamiento de tejido adiposo y renal perfundido y no perfundido, así que es necesario llevar a

cabo estos experimentos en el futuro para determinar si las vesículas aisladas provienen del espacio intersticial o de la sangre de los tejidos.

Un detalle clave en el aislamiento de vesículas a partir de tejidos es lograr la disgregación de la matriz extracelular sin causar ruptura celular, esto para evitar la contaminación de material intracelular en la muestra final de vesículas extracelulares. Para evaluar la posible contaminación de material intracelular en las muestras, generalmente se evalúa la presencia de un marcador intracelular. Uno de los marcadores más utilizados para evaluar este tipo de contaminación es la calnexina, ya que es una proteína enriquecida en la membrana del retículo endoplásmico [95]. Algunos estudios que han aislado vesículas a partir de tejido han detectado la presencia de calnexina en sus muestras, lo que refleja la presencia de contaminantes aislados junto con sus vesículas [3, 5, 80, 83, 94]. En nuestras muestras de tejido hepático y adiposo no detectamos la presencia de calnexina después de haber sido procesadas. Tampoco se detectó calnexina en las fracciones de gradiente de cerebro y riñones que procesamos para validar el protocolo de aislamiento, lo que sugiere que las vesículas aisladas con nuestro protocolo no presentan contaminación intracelular de este tipo. La ruptura celular puede causarse por varios motivos: el corte excesivo del tejido, una digestión enzimática prolongada o utilizando una enzima muy agresiva para el tejido, la exposición prolongada del tejido a la temperatura ambiente. Por ello, se requiere un balance entre estos factores para lograr una disgregación de tejido exitosa. Sin embargo, se necesitan más experimentos que evalúen la presencia de otros posibles contaminantes, como las lipoproteínas y la albúmina provenientes de la sangre, así como otros componentes de la matriz extracelular, como la familia de las colágenas, para evaluar la pureza de las muestras con mayor precisión.

Para conocer el proteoma de las vesículas aisladas de los tejidos, es necesario realizar un análisis por espectrometría de masas. Uno de los principales requisitos de este tipo de análisis es la eliminación de proteínas abundantes (i.e. albúmina, IgGs, etc) que impidan la detección de proteínas que estén en menor proporción como las proteínas de las vesículas . [96, 97]. Por ello, es indispensable que cualquier método de aislamiento que se utilice para aislar vesículas de tejido asegure un alto grado de pureza de la muestra. En el caso de las vesículas aisladas de hígado, utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño como tercer paso de aislamiento, nos permitió incrementar la pureza de las vesículas aisladas, ya que eliminamos el 80% de la proteína total aislada previamente del gradiente de densidad, sin comprometer el material vesicular. Esto permitirá analizar con mayor detalle su composición proteica utilizando espectrometría de masas en el futuro. Otros trabajos como el de Hurwitz, Muraoka, Huang y

colaboradores han realizado análisis proteómicos de vesículas aisladas de tejido cerebral y líquido cerebroespinal [5, 7, 80]. Sin embargo, la presencia de calnexina en sus muestras, y la cantidad de proteína total aislada que ellos han obtenido es similar a la que nosotros obtuvimos en las fracciones de gradiente de las muestras de hígado. Esto sugiere que sus muestras pudieran contener contaminación proveniente de partículas y/o proteínas solubles ajenas a las vesículas, como por ejemplo lipoproteínas, albúmina, colágenas de matriz extracelular, por mencionar algunas de ellas.

Es importante mencionar también las limitaciones que tiene este trabajo. Primero, el aislamiento fue satisfactorio en tejidos derivados de dos cepas de ratones diferentes. Sin embargo, no se evaluaron otras condiciones de los animales, tales como edad, dieta, régimen alimenticio, sexo y/o actividad física, y su efecto en la cantidad y calidad de vesículas obtenidas de los tejidos. Se sabe que todos estos factores influyen de manera importante en el proceso de secreción y recepción de las vesículas extracelulares [72] y, aunque no afectan directamente al método de aislamiento, sí pueden afectar tanto la cantidad como la calidad de las vesículas obtenidas, por lo que se necesitan estudios posteriores para evaluar cómo influyen estas variables en la muestra final obtenida. Segundo, la evaluación de los cambios entre las vesículas de tejido perfundido y no perfundido permitieron mostrar el cambio drástico que sufre la muestra final al tratarse previamente el tejido con la perfusión o no. Sin embargo, es necesario caracterizar con mayor detalle la muestra obtenida en cada caso, a fin de determinar qué proporción de las vesículas aisladas corresponde a las encontradas en el espacio intersticial del tejido y qué parte proviene de la sangre u otro origen. Tercero, el acoplamiento de tres pasos de aislamiento para obtener vesículas del tejido hepático permitió eliminar una gran cantidad de material no-vesicular de las vesículas aisladas. Sin embargo, no se evaluó directamente la pureza de las vesículas, por lo que hace falta un análisis más detallado que permita determinar la calidad de la muestra final obtenida.

CONCLUSIONES

Utilizando una combinación de ultracentrifugación y gradiente de separación por densidad logramos obtener satisfactoriamente vesículas extracelulares a partir de muestras de tejido congelado hepático, adiposo, renal y cerebral. Además, demostramos que las vesículas extracelulares de cada tejido presentan un enriquecimiento diferencial de marcadores proteicos, resaltando la heterogeneidad en la composición, y posible función, de las vesículas presentes en el microambiente de cada tejido. La adición de la cromatografía de exclusión por tamaño como tercer paso para el aislamiento de vesículas de hígado, removió material proteico soluble de las muestras, sin comprometer la integridad de las vesículas. Esto permitirá generar muestras de vesículas con alto grado de pureza adecuadas para futuros análisis -ómicos. Con este trabajo, contribuimos a la estandarización de un método de aislamiento de vesículas a partir de muestras de tejido congelado que es efectivo y reproducible, lo que permitirá conocer el cargamento molecular de las vesículas en diferentes modelos experimentales y potencialmente en biopsias humanas.

PERSPECTIVAS

La obtención de vesículas extracelulares a partir de biopsias de tejido abre una nueva ventana hacia el descubrimiento de potenciales biomarcadores que puedan utilizarse para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades que usualmente requieren de una caracterización más compleja para ser detectadas. En el futuro, buscamos aplicar el método de aislamiento de vesículas descrito en este trabajo para determinar cambios moleculares que presentan las vesículas en el contexto de la obesidad, diabetes y cáncer. Dada la versatilidad del método para obtener vesículas de distintos tejidos, las posibilidades de su aplicación en diversos contextos de enfermedades son amplias, desde enfermedades neurológicas, metabólicas, y cardiovasculares. Adicionalmente, buscaremos aplicar este método de aislamiento de vesículas para generar un mapa proteómico de la composición de vesículas obtenidas de distintos tejidos para generar una base de datos que sirva de referencia para otros estudios que hagan análisis proteómicos de un tejido en particular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stahl, P.D. and G. Raposo, *Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis*. Physiology (Bethesda), 2019. **34**(3): p. 169-177.
2. Mathieu, M., et al., *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(1): p. 9-17.
3. Crescitelli, R., et al., *Subpopulations of extracellular vesicles from human metastatic melanoma tissue identified by quantitative proteomics after optimized isolation*. J Extracell Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1722433.
4. Perez-Gonzalez, R., et al., *The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space*. J Biol Chem, 2012. **287**(51): p. 43108-15.
5. Hurwitz, S.N., et al., *An optimized method for enrichment of whole brain-derived extracellular vesicles reveals insight into neurodegenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci Methods, 2018. **307**: p. 210-220.
6. Vella, L.J., et al., *A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue*. J Extracell Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1348885.
7. Muraoka, S., et al., *Assessment of separation methods for extracellular vesicles from human and mouse brain tissues and human cerebrospinal fluids*. Methods, 2020. **177**: p. 35-49.
8. 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.
9. 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.
10. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(3): p. 1161-1172.
11. Mallocci, M., et al., *Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease*. Antioxidants & redox signaling, 2019. **30**(6): p. 813-856.
12. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*. Science, 2020. **367**(6478).
13. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
14. Thery, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
15. van der Pol, E., et al., *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 676-705.
16. Skryabin, G.O., et al., *Lipid Rafts in Exosome Biogenesis*. Biochemistry (Mosc), 2020. **85**(2): p. 177-191.
17. Wollert, T. and J.H. Hurley, *Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 864-9.
18. Babst, M., *MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(4): p. 452-7.
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. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(3): p. 301-12.

21. Bilyy, R.O., et al., *Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles*. J Biol Chem, 2012. **287**(1): p. 496-503.
22. Fevrier, B. and G. Raposo, *Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 415-21.
23. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
24. Vagner, T., et al., *Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity*. Proteomics, 2019. **19**(8): p. e1800167.
25. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study*. Bioscience, 2015. **65**(8): p. 783-797.
26. Haraszti, R.A., et al., *High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 32570.
27. Minciocchi, V.R., M.R. Freeman, and D. Di Vizio, *Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 41-51.
28. Santangelo, L., et al., *The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting*. Cell Rep, 2016. **17**(3): p. 799-808.
29. Hobor, F., et al., *A cryptic RNA-binding domain mediates Syncrip recognition and exosomal partitioning of miRNA targets*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 831.
30. Lazaro-Ibanez, E., et al., *Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes*. Prostate, 2014. **74**(14): p. 1379-90.
31. Lazaro-Ibanez, E., et al., *DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology*. J Extracell Vesicles, 2019. **8**(1): p. 1656993.
32. Jeppesen, D.K., et al., *Reassessment of Exosome Composition*. Cell, 2019. **177**(2): p. 428-445 e18.
33. Skotland, T., et al., *Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology*. J Lipid Res, 2019. **60**(1): p. 9-18.
34. Nishida-Aoki, N., et al., *Lipidomic Analysis of Cells and Extracellular Vesicles from High- and Low-Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. Metabolites, 2020. **10**(2).
35. Rodriguez-Suarez, E., et al., *Quantitative proteomic analysis of hepatocyte-secreted extracellular vesicles reveals candidate markers for liver toxicity*. J Proteomics, 2014. **103**: p. 227-40.
36. Conde-Vancells, J., et al., *Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes*. Journal of Proteome Research, 2008. **7**(12): p. 5157-5166.
37. Ibrahim, S.H., et al., *Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes*. Hepatology, 2016. **63**(3): p. 731-44.
38. Kakazu, E., et al., *Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1alpha-dependent manner*. J Lipid Res, 2016. **57**(2): p. 233-45.
39. Durcin, M., et al., *Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2017. **6**(1): p. 1305677.
40. Kranendonk, M.E., et al., *Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages*. Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(5): p. 1296-308.
41. Eguchi, A., et al., *Microparticles release by adipocytes act as "find-me" signals to promote macrophage migration*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123110.
42. Aoki, N., et al., *Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles*. Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 3850-62.

43. Muller, G., *Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2012. **5**: p. 247-82.
44. Sano, S., et al., *Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **445**(2): p. 327-33.
45. Zhang, W., et al., *HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017. **313**(4): p. F906-F913.
46. Hernandez, A., et al., *Extracellular vesicles derived from fat-laden hepatocytes undergoing chemical hypoxia promote a pro-fibrotic phenotype in hepatic stellate cells*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020. **1866**(10): p. 165857.
47. Povero, D., et al., *Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells*. *Sci. Signal.*, 2013. **6**(296): p. ra88-ra88.
48. Povero, D., et al., *Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cell via microRNAs targeting PPAR-gamma*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015. **1**(6): p. 646-663 e4.
49. Hirsova, P., et al., *Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(4): p. 956-67.
50. Zhao, Y., et al., *Liver governs adipose remodelling via extracellular vesicles in response to lipid overload*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 719.
51. Ciardiello, C., et al., *Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(2): p. 175.
52. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(4): p. 213-228.
53. Deatherage, B.L. and B.T. Cookson, *Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life*. *Infect Immun*, 2012. **80**(6): p. 1948-57.
54. Crewe, C., et al., *An Endothelial-to-Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State*. *Cell*, 2018. **175**(3): p. 695-708.e13.
55. Miyaki, S. and M.K. Lotz, *Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2018. **30**(1): p. 129-135.
56. Desdin-Mico, G. and M. Mittelbrunn, *Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis*. *Cell Adh Migr*, 2017. **11**(2): p. 127-134.
57. Hutcheson, J.D. and E. Aikawa, *Extracellular vesicles in cardiovascular homeostasis and disease*. *Curr Opin Cardiol*, 2018. **33**(3): p. 290-297.
58. Dyer, M.R., et al., *Platelet-derived extracellular vesicles released after trauma promote hemostasis and contribute to DVT in mice*. *J Thromb Haemost*, 2019. **17**(10): p. 1733-1745.
59. Peruzzotti-Jametti, L., et al., *Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles to correct mitochondrial dysfunction in target cells*. *bioRxiv*, 2020: p. 2020.01.29.923441.
60. Liu, X., et al., *Extracellular Vesicles Released From Articular Chondrocytes Play a Major Role in Cell-Cell Communication*. *J Orthop Res*, 2020. **38**(4): p. 731-739.
61. Terlecki-Zaniewicz, L., et al., *Extracellular Vesicles in Human Skin: Cross-Talk from Senescent Fibroblasts to Keratinocytes by miRNAs*. *J Invest Dermatol*, 2019. **139**(12): p. 2425-2436 e5.
62. Li, G., et al., *Exosomes are the novel players involved in the beneficial effects of exercise on type 2 diabetes*. *J Cell Physiol*, 2019.
63. Matsumoto, A., et al., *Blood concentrations of small extracellular vesicles are determined by a balance between abundant secretion and rapid clearance*. *J Extracell Vesicles*, 2020. **9**(1): p. 1696517.

64. Kranendonk, M.E., et al., *Effect of extracellular vesicles of human adipose tissue on insulin signaling in liver and muscle cells*. Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(10): p. 2216-23.
65. Huang, X., et al., *Analysis of salivary exosomal proteins in young adults with severe periodontitis*. Oral Dis, 2020. **26**(1): p. 173-181.
66. Park, S., et al., *The profiles of microRNAs from urinary extracellular vesicles (EVs) prepared by various isolation methods and their correlation with serum EV microRNAs*. Diabetes Res Clin Pract, 2020. **160**: p. 108010.
67. Brennan, K., et al., *A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 1039.
68. Silverman, J.M., et al., *CNS-derived extracellular vesicles from superoxide dismutase 1 (SOD1)(G93A) ALS mice originate from astrocytes and neurons and carry misfolded SOD1*. J Biol Chem, 2019. **294**(10): p. 3744-3759.
69. Vojtech, L., et al., *Extracellular vesicles in human semen modulate antigen-presenting cell function and decrease downstream antiviral T cell responses*. PLoS One, 2019. **14**(10): p. e0223901.
70. Konoshenko, M.Y., et al., *Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 8545347.
71. Gardiner, C., et al., *Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey*. J Extracell Vesicles, 2016. **5**: p. 32945.
72. Witwer, K.W., et al., *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
73. Pariset, E., V. Agache, and A. Millet, *Extracellular Vesicles: Isolation Methods*. Advanced Biosystems, 2017. **1**(5): p. 1700040.
74. 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.
75. Taylor, D.D. and S. Shah, *Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes*. Methods, 2015. **87**: p. 3-10.
76. Royo, F., et al., *Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee*. Cells, 2020. **9**(9): p. 1955.
77. Consortium, E.-T., et al., *EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research*. Nat Methods, 2017. **14**(3): p. 228-232.
78. Xu, J., et al., *A fixation method for the optimisation of western blotting*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 6649.
79. Boing, A.N., et al., *Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
80. Huang, Y., et al., *Influence of species and processing parameters on recovery and content of brain tissue-derived extracellular vesicles*. Journal of Extracellular Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1785746.
81. Lee, K., et al., *Multiplexed Profiling of Single Extracellular Vesicles*. ACS Nano, 2018. **12**(1): p. 494-503.
82. Gyuris, A., et al., *Physical and Molecular Landscapes of Mouse Glioma Extracellular Vesicles Define Heterogeneity*. Cell Rep, 2019. **27**(13): p. 3972-3987 e6.
83. Polanco, J.C., et al., *Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner*. J Biol Chem, 2016. **291**(24): p. 12445-66.
84. Araña, M., et al., *Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, and Characterization*, in *Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols*, R.L. Kao, Editor. 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 47-61.

85. Worthington Enzyme Manual. Worthington, K., and Worthington, V. (2011). Worthington Biochemical Corporation. 12/17/2020. (<http://www.worthington-biochem.com/pap/default.html>).
86. Autengruber, A., et al., *Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function*. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2012. **2**(2): p. 112-20.
87. Kakebeen, A.D., A.D. Chitsazan, and A.E. Wills, *Tissue disaggregation and isolation of specific cell types from transgenic Xenopus appendages for transcriptional analysis by FACS*. Dev Dyn, 2020.
88. McKee, T.J., et al., *Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 10542.
89. Rojkind, M. and P. Ponce-Noyola, *The Extracellular Matrix of the Liver*. Collagen and Related Research, 1982. **2**(2): p. 151-175.
90. Kaminska, A., F.J. Enguita, and E.L. Stepien, *Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent*. Vascul Pharmacol, 2018. **101**: p. 21-28.
91. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, *Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 449-61.
92. Renkin, E.M. and C. Crone, *Microcirculation and Capillary Exchange*, in *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*, R. Greger and U. Windhorst, Editors. 1996, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1965-1979.
93. Cousineau, D.F., et al., *Effects of flow, perfusion pressure, and oxygen consumption on cardiac capillary exchange*. Journal of Applied Physiology, 1995. **78**(4): p. 1350-1359.
94. Jang, S.C., et al., *Mitochondrial protein enriched extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues can be detected in patient plasma*. J Extracell Vesicles, 2019. **8**(1): p. 1635420.
95. Kozlov, G. and K. Gehring, *Calnexin cycle - structural features of the ER chaperone system*. FEBS J, 2020. **287**(20): p. 4322-4340.
96. Abramowicz, A., P. Widlak, and M. Pietrowska, *Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation*. Mol Biosyst, 2016. **12**(5): p. 1407-19.
97. Feist, P. and A.B. Hummon, *Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 3537-63.