



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**



Facultad de Ciencias

**“Comparación de dos métodos de purificación de
exosomas efectuados en medio condicionado de dos
líneas celulares diferentes”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Hilda Arely Hernández Hernández

Directora:

Dra. María Cristina Negrete García

Codirectora:

Dra. Carla García Morales



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 5 DE OCTUBRE DE 2023

Este trabajo fue desarrollado en el Departamento de Biología Molecular de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” de la Secretaría de Salud, bajo la dirección de la Dra. María Cristina Negrete García.

Agradecimientos

Contenido

Abreviaturas	i
Resumen	ii
Introducción	1
Antecedentes.....	2
1. Exosomas	2
1.1 Biogénesis	3
1.1.1 Vía dependiente de ESCRT	5
1.1.2 Vía independiente de ESCRT	8
1.1.3 Liberación y acoplamiento a célula diana	10
1.2 Composición y contenido	12
1.3 Funciones	14
1.3.1 Funciones Fisiológicas	15
1.3.2 Funciones Patológicas.....	16
1.4 Uso Terapéutico	18
2. Métodos de purificación de exosomas	21
2.1 Método de ultracentrifugación	22
2.2 Método de precipitación con Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)	23
Justificación	25
Objetivos.....	26
Material y métodos.....	27
Purificación de exosomas	28
Ultracentrifugación (UC)	28
Precipitación por polietilenglicol (PPEG)	29
Preparación de las muestras para Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)	31
Cuantificación de proteínas	32
Electroforesis Vertical	32
Western Blot	33
Análisis estadístico	34
Resultados	35
Discusión de Resultados.....	50
Conclusiones.....	53

Referencias bibliográficas.....	54
APÉNDICE.....	70
A. Reactivos y Soluciones	70
1. Medio DMEM con SFB al 10%	70
2. Medio DMEM-F12 con suero fetal bovino (SFB) al 10%.....	70
3. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X.....	70
4. Solución 1M de cloruro de sodio (NaCl)	70
5. Solución Madre de PEG 6000 2X	71
6. Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	71
7. TRIS 0.5M, pH 6.8	71
8. TRIS 1.5M, pH 8.8	71
9. Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 10%.....	71
10. Persulfato de Amonio 10%.....	71
11. Buffer de corrida 1X.....	71
12. Solución de Bloqueo	72
13. Diluyente de anticuerpo	72
14. Albúmina de suero bovino (BSA) al 1%.....	72
15. PBS-Tween (PBS-T) al 0.05%.....	72
16. Buffer de Transferencia.....	72
B. Técnicas	73
1. Tripsinización	73
2. Descomplementación de SFB.....	73
C. Micrografías	74

Abreviaturas

A549: Células epiteliales cancerígenas de pulmón humano

ATP: Adenosin Trifosfato

CHMP: Charged Multi-vesicular body Protein

CMF: Citometría de Flujo

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

Hsp: Heat shock protein

ILV: Intra-Luminal Vesicles

ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

LAMPs: Proteínas de tipo transmembranales

LBA: Lavado Bronquioalveolar

MC: Medio Condicionado

MET: Microscopia Electrónica de Transmisión

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

miRNA: microRNA

MISEV: Minimal information for studies of extracellular vesicles

MVB: Multivesicular Bodies

MVs: Microvesículas

NHLF: Normal Human Lung Fibroblast

NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas

PEG: Polietilenglicol

PPEG: Precipitación por Polietilenglicol

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAm: RNA-mensajero

siRNAs: RNAs pequeño de interferencia

SND: Sobrenadante

TSG101: Gen de Susceptibilidad Tumoral 101

UC: Ultracentrifugación

VEs: Vesículas Extracelulares

WB: Western blot

Resumen

Los exosomas son un subgrupo de vesículas extracelulares (VEs) liberados por casi todos los tipos celulares. Dentro del contenido de los exosomas desatacan lípidos, proteínas, RNAm y RNAs no codificantes, los cuales pueden ser de mucha utilidad para el diagnóstico, tratamiento y comunicación intercelular de diversas patologías. Por lo que, uno de los retos actuales es encontrar un método factible y accesible para purificar dichas vesículas con alta pureza y rendimiento.

En este trabajo, se aislaron exosomas liberados en el medio condicionado de dos diferentes líneas celulares, fibroblastos normales de pulmón (NHLF) y células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón (A549). Además, se evaluaron dos diferentes métodos de purificación de exosomas: El de ultracentrifugación (UC) y el de precipitación por polímeros con uso del polietilenglicol (PPEG). Los parámetros de evaluación y comparación entre ambos métodos fueron, morfología por microscopía electrónica de transmisión (MET), pureza por Western blot (WB) y rendimiento por concentración de proteínas totales. El análisis morfológico por MET de los exosomas purificados por UC de ambas líneas celulares, mostró estructuras regulares en forma de copa con tamaño entre 50 y 200nm. Mientras que los obtenidos por PPEG mostraron una forma muy irregular y poco definida. El marcador CD81, específico de exosomas, fue positivo por WB en los exosomas obtenidos por UC de ambas líneas celulares, pero negativo para las obtenidas por PPEG. Y, finalmente la concentración proteica de exosomas fue mayor por el método de UC en comparación con el PPEG (498.79 μ g/mL versus 176.67 μ g/mL) tanto para las células A549, como para los exosomas liberados por las células NHLF (279.20 μ g/mL versus 221.50 μ g/mL).

De acuerdo con los resultados, se puede concluir que se logró obtener exosomas puros y con un buen rendimiento por UC para ambas líneas celulares, pero no por PPEG. Por lo que, sería factible, de acuerdo con literatura reciente, combinar ambas metodologías y optimizar resultados.

Introducción

Las vesículas extracelulares (VEs) son cuerpos membranosos liberados de diferentes tipos celulares (Raposo & Stoorvogel, 2013). De acuerdo con el tamaño de su diámetro se clasifican en exosomas (30-150 nm), microvesículas (MVs, 50-1000nm) y cuerpos apoptóticos (50-2000nm) (Zerlinger et al., 2015). Los exosomas participan principalmente en la regulación de la respuesta inmune, en procesos tumorales, en la regeneración tisular y como comunicadores celulares (Colombo et al., 2014; Guo et al., 2017; Konoshenko et al., 2018; Raposo & Stoorvogel, 2013; Yang et al., 2021). Adicionalmente, en estudios recientes los exosomas han demostrado su utilidad como vehículos para la ministración de medicamentos, gracias a su capacidad de evitar la activación de la respuesta inmune (Huang et al., 2022; Kumar et al., 2022). Los exosomas están presentes en fluidos corporales como la orina, leche materna, suero y semen entre otros. Además, se encuentran en secreciones pulmonares como lavado bronquioalveolar (LBA), lavado nasal, saliva y esputo inducido; por lo que, pueden funcionar como potenciales biomarcadores diagnósticos y pronóstico en diferentes enfermedades (Livshits et al., 2015). El contenido de los exosomas varía dependiendo de su célula de origen, donde se destaca la presencia de RNA mensajeros (RNAm), RNAs no codificantes, lípidos y proteínas (He et al., 2018). Además, se encuentra bien documentado que la transferencia de esta carga o contenido exosomal a una célula receptora, contribuye en diferentes procesos celulares como la proliferación, diferenciación, angiogénesis y como moduladores de la respuesta inmune (Goulet et al., 2018; Vlassov et al., 2012).

Debido a la gran participación que tienen los exosomas en diversos procesos biológicos, y a que una de las mayores limitaciones durante su obtención es el bajo rendimiento y pureza, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar dos métodos de purificación de exosomas, previamente reportados en la literatura, y comparar su rendimiento, pureza, factibilidad y su costo-beneficio, ya que, actualmente dicho proceso es un gran reto en el área de investigación y de la biotecnología.

Antecedentes

1. Exosomas

Los exosomas fueron descubiertos en la década de los 80's por científicos Harding y Johnstone, quienes a partir de reticulocitos de oveja observaron la formación de unas vesículas extracelulares (VEs) peculiares liberadas por exocitosis desde la membrana plasmática. Dichos autores acuñaron por primera vez el término exosomas a las VEs obtenidas (Harding et al., 1983; Ludwig & Giebel, 2012). En los primeros años de su descubrimiento se creía que los exosomas solo funcionaban como basurero celular, debido a que la función que hasta entonces se les conocía, era de desechos de moléculas innecesarias o restos celulares (Alipoor et al., 2016; Vlassov et al., 2012). Con el paso del tiempo y varias investigaciones, se observó que estas microvesículas (MVs), desempeñaban varias funciones biológicas que van desde comunicadores intercelulares, inmunomoduladores (Ludwig et al., 2012) hasta el grado de ser vehículos de administración de fármacos (Ha et al., 2016).

Los exosomas son vesículas membranosas que cuentan con una bicapa lipídica que delimita su citosol, el cual está ausente de organelos; cuentan con un tamaño que varía entre los 30 a 150nm de diámetro con morfología de “copa” redondeada y bicóncava (Alipoor et al., 2016; Li et al., 2017; Mathivanan et al., 2010; Njock et al., 2018; Taylor et al., 2011; Urbanelli et al., 2013). Los exosomas son producidos por casi todos los tipos celulares en estado normal y patológico (Kubo, 2018; Yuana et al., 2013). Como, por ejemplo, células embrionarias, hepatocitos, células dendríticas, células de la neuroglia, células tumorales, células epiteliales y fibroblastos entre otros (Mathivanan et al., 2010; Ludwig & Giebel, 2012). Al ser secretados por diferentes estirpes celulares, se han encontrado en varios fluidos corporales como la orina, leche materna, suero, semen; así como en secreciones pulmonares, como lavado bronquioalveolar (LBA), lavado nasal y esputo principalmente (Livshits et al., 2015).

1.1 Biogénesis

La biogénesis de los exosomas es uno de los temas de mayor controversia ya que se han encontrado diferentes mecanismos, algunos mediados por ciertos complejos o compuestos. Sin embargo, uno de los más descritos es la vía endosomal (también llamado vía clásica), que consiste en la formación de vesículas endocíticas mediante el proceso de endocitosis que puede ser través de receptores como la clatrina o sin la participación de estos (Keller et al., 2006). Las vesículas endocíticas son orgánulos que transportan material sintetizado por el aparato de Golgi, así como material que ha sido endocitado del exterior, que posteriormente son transportadas al endosoma temprano. Una vez que el endosoma temprano madura se convierte en endosoma tardío también llamado cuerpo multivesicular, (MVB, del inglés Multivesicular bodies). Posteriormente, la membrana endosomal brota inversamente o sea hacia dentro, formando las vesículas intraluminales (ILV, del inglés Intraluminal Vesicles). Sin embargo, los MVB tienen dos opciones para continuar su camino, una de ellas es fusionarse con la membrana plasmática de la célula para secretar las ILV hacia el espacio extracelular, las cuales al ser liberadas dan origen a los exosomas (Keller et al., 2006). La segunda opción es cuando los MVB no son fusionados con la membrana plasmática celular ni son liberadas las ILV al espacio extracelular, y en su lugar son fusionados con los lisosomas lo que los conduce a su degradación (Futter et al., 1996) (Fig.1).

Aunque la vía endosomal parece ser sencilla, no lo es. Para la formación de los MVB/ILV se tienen dos vías, la primera es mediante la participación de la maquinaria ESCRT (Del inglés, Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Fig. 2) y la segunda, la vía independientes de ESCRT (Manfredi et al., 2016; Urbanelli et al., 2013) (Fig. 3).

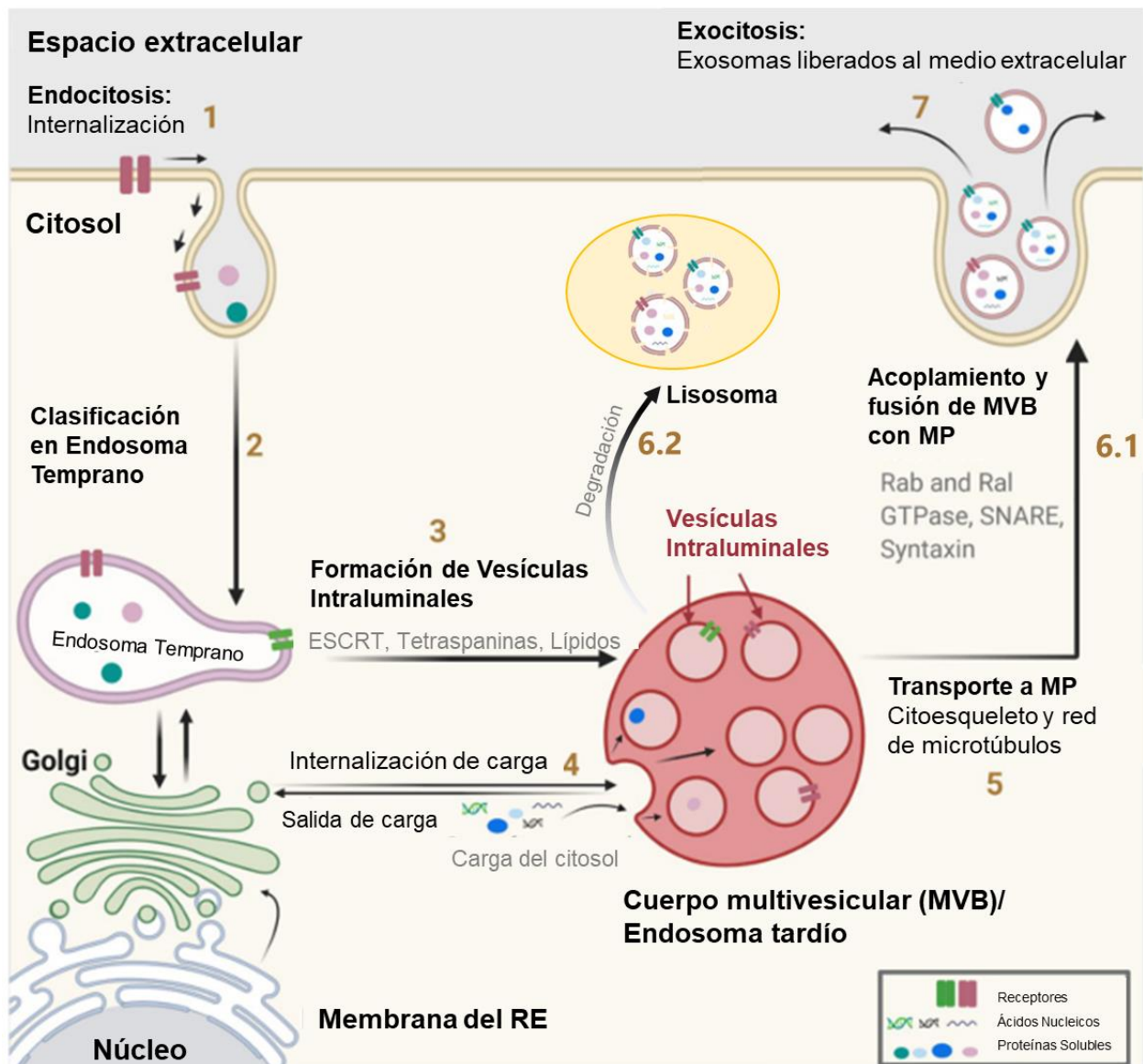


Figura 1. Biogénesis de los exosomas. [1] Internalización de cargas mediante endocitosis [2] formando así el endosoma temprano, [3] que luego madurará en endosoma tardío o cuerpos multivesiculares. Dentro de los MVB se encuentran las vesículas intraluminales (ILV) formadas mediante el complejo ESCRT o por componentes ajenas a él. [5] Los cuerpos multivesiculares son transportados a la membrana plasmática, [6.1] se fusionan con la superficie celular [7] y los ILV se secretan como exosomas. [6.2] Los ILV no secretadas se fusionan con los lisosomas para su degradación. RE: retículo endoplásmico; MVB: cuerpos multivesiculares; MP: Membrana plasmática. (Imagen tomada y modificada de Gurung et al., 2021)

1.1.1 Vía dependiente de ESCRT

La maquinaria o complejo ESCRT está compuesta por cinco complejos proteicos de unión a ubiquitina ESCRT-0, -I, -II, -III y Vps4 y algunas proteínas asociadas como VTA1, TSG101, ALIX, STAM, entre otras (Hessvik et al, 2018).

El primer complejo en actuar es ESCRT-0, el cual está compuesto por el sustrato de Tirosina-cinasa regulada por el factor de crecimiento de hepatocitos (Hrs del inglés, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), y la Molécula Adaptadora Transductora de Señales (STAM1 del inglés, Signal Transducing Adaptor Molecule) (Williams et al., 2007). Este complejo reconoce las proteínas transmembranales ubiquitinadas de la membrana endosomal mediante su proteína accesoria Hrs (Gurung et al., 2021; Lakkaraju et al., 2008).

Posteriormente ESCRT-0 mediante Hrs recluta a ESCRT-I a través de una de sus tres horquillas llamada TSG101 (gen de susceptibilidad tumoral 101), mediante la cual reconoce las cargas ubiquitinadas (Williams et al., 2007). Este complejo formado se encarga de clasificar y empaquetar la carga ubiquitinada en compartimentos endosomales enriquecidos en fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) para las ILV (Lakkaraju et al., 2008; Schmidt et al., 2012).

Ahora ESCRT-I y ESCRT-II son capaces de iniciar la generación de las ILV mediante el proceso de brotación hacia el interior de las membranas de los MVBs (Patil et al., 2019), y en simultáneo interactuar con la subunidad de la proteína-6 corporal multivesicular cargada (CHMP6 del inglés, Charged multi-vesicular body protein-6) del complejo ESCRT-III para así unirse al MVB. Al mismo tiempo CHMP6 recluta a CHMP4 mediante Alix, promoviendo así la formación del cuello en las MVBs para generar las ILV (Gurung et al., 2021; Schmidt et al., 2012). La proteína accesoria Alix funciona gracias a la vía Sindecan/Sintenin/Alix, donde los sindecanos se proveen de heparán sulfato para agruparse e interactuar con la sintenina que a su vez se relacionará con Alix, esto con la finalidad de apoyar en los procesos de clasificación de carga, brote y escisión de las ILVs (Baietti et al., 2012).

Ahora bien, ESCRT-III no reconoce moléculas ubiquitinadas a diferencia de los otros complejos ESCRT, por lo que, se encarga de localizar enzimas que remuevan la ubiquitina antes de incorporarlas a las ILVs. También, se ocupa de realizar el corte o escisión de la membrana para finalmente formar las ILVs (Schmidt et al., 2012; Williams et al., 2007). Otra de sus funciones es el desmontaje de toda la maquinaria ESCRT, mediante la unión de la ATPasa Vps4 a través de su cofactor VTA1, liberando las moléculas de ubiquitina al citoplasma para su reciclaje para mantener la función de los MVBs (Lakkaraju et al., 2008; Patil et al., 2019; Schmidt et al., 2012).

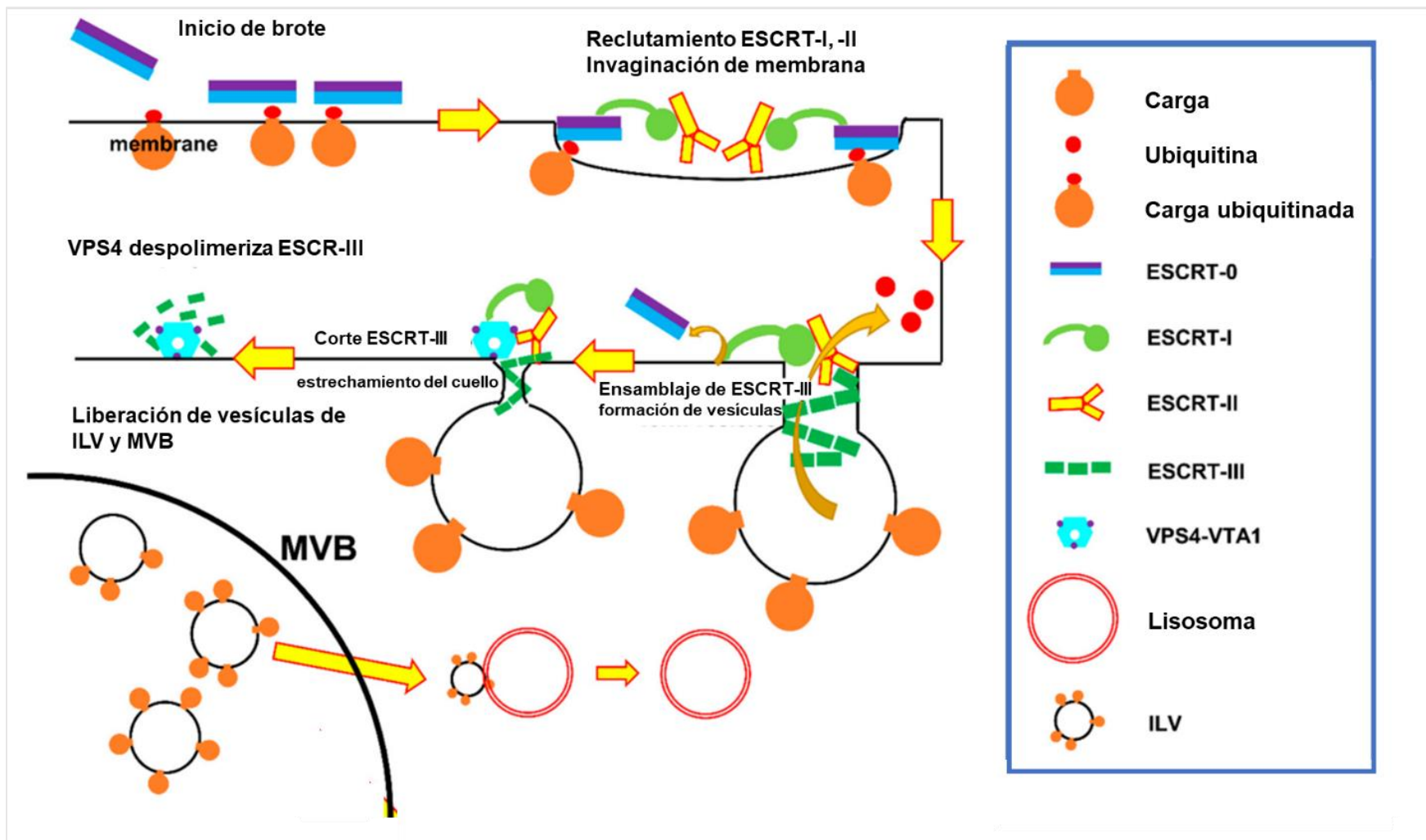


Figura 2. Biogénesis dependiente de ESCRT. En el proceso de formación vesicular mediante ESCRT, el primer complejo en actuar es ESCRT-0 el cual se encarga de reconocer la carga ubiquitinada, después se acopla a ESCRT-I y ESCRT-II los cuales comienzan el proceso de invaginación o brote hacia el interior de la membrana endosomal. Una vez iniciado el proceso de brote se une el siguiente complejo ESCRT-III el cual se encarga de desubiquitinar la carga, formar el cuello y el corte de la membrana para así formar las ILVs. Finalmente, al complejo ESCRT-III se le une la ATPasa VPS4 la cual se encargará del desmontaje y reciclaje de toda la maquinaria ESCRT (Imagen tomada y modificada de Ju et al., 2021)

1.1.2 Vía independiente de ESCRT

Una de las vías independientes de ESCRT, se genera gracias al enriquecimiento de los exosomas por lípidos como las ceramidas, colesterol y esfingomiélin. De acuerdo con la hipótesis de McGough et al., 2016 y Trajkovic, 2008, se dice que fragmentos de los endosomas ricos en ceramidas, pueden producir ILVs, las cuales podrían ser liberadas como exosomas, tras su fusión con la membrana plasmática gracias a la estructura en forma de cono de la ceramida (Abels et al., 2016) (Fig. 3). Sin embargo, este mecanismo se da gracias a la actividad de la esfingomiélinasa neutra (nSMase), la cual sintetiza ceramida a partir de esfingomiélin, que es necesaria para brotación interna de los MVBs y la liberación de las ILVs (Trajkovic, 2008).

Otro ejemplo de vía independiente del complejo de ESCRT, es la mediada por las tetraspaninas. Las tetraspaninas, son proteínas de membrana que, si bien son utilizadas como biomarcadores para la caracterización de los exosomas, también ayudan en su liberación al medio extracelular (Gurung et al., 2021). Ejemplo de ello es la tetraspanina CD63, que regula la expresión de LMP1, por lo que, su sobreexpresión produce mayor liberación de exosomas (Chairoungdua et al., 2010; Hessvik et al., 2018). Por el contrario, la tetraspanina 6, que interactúa con la sintenina, provoca alteraciones en ALIX-Sindecan-Sintenina generando el efecto contrario de CD63, donde los MVBs van hacia la degradación lisosomal (Gurung et al., 2021).

Es importante mencionar que las dos vías de biogénesis de exosomas mencionadas, pueden activarse al mismo tiempo. Tomando en cuenta que cuando se inhibe la actividad de nSMase también se inhibirá la vía Sindecan/Sintenina/Alix. O en algunos casos, se ha reportado que la vía ESCRT y la ceramida pueden funcionar al mismo tiempo (Baietti et al., 2012; Juan et al., 2018).

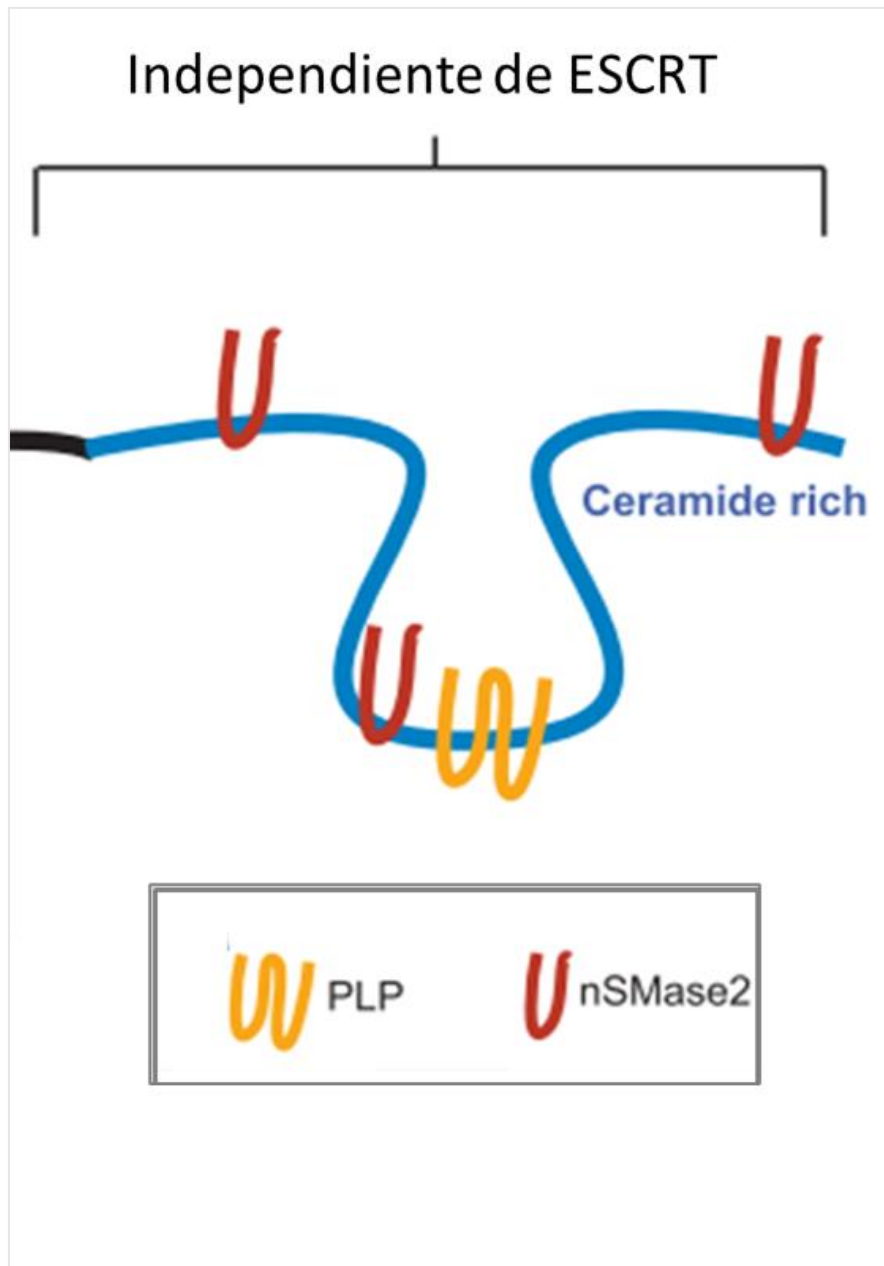


Figura 3. Biogénesis independiente de ESCRT. Los endosomas que se encuentran ricos en ceramidas inducen la invaginación de la membrana endosomal sin ayuda de alguna otra molécula (Imagen tomada y modificada de McGough & Vincent, 2016).

1.1.3 Liberación y acoplamiento a célula diana

De acuerdo con varios autores la liberación de los exosomas se encuentra mediada por algunas proteínas GTPasas (Rab y Ras) y Receptores de proteína de unión al factor sensible de la N-etilmaleimida soluble (SNAREs por sus siglas en inglés, Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors). Dentro de las GTPasas Rab encontramos la Rab11 que se ha encontrado implicada en la exocitosis de los MVBs, liberando así las ILVs al espacio extracelular (Lakkaraju et al., 2008). Otras proteínas tipo Rab como el 27A y 27B, también se han visto implicadas en procesos de liberación exosomal en células inmunes (Urbanelli et al., 2013). Una de las proteínas Rab más importantes es la Rab7, ya que ayuda a la liberación de los exosomas que fueron formados con la ayuda de la vía Sindecin/Sintenin/Alix (Baietti et al., 2012). Dentro de los SNAREs encontramos el complejo v-SNARE que contiene VAMP7 el cual está involucrado en la fusión de los MVBS con la membrana plasmática (Urbanelli et al., 2013).

También se han encontrado factores en el entorno celular que promueven la liberación de exosomas como los cambios de concentración de calcio intracelular, así como altos niveles de estrés celular donde se ve implicado p53 que activa a TSAP6 que promueve la liberación de exosomas (Urbanelli et al., 2013) Otros factores encontrados con efecto contrario son los postraduccionales como la ISGilación, la cual en lugar de liberar las ILV, las dirige hacia los lisosomas para su degradación (Hessvik et al., 2018).

Los exosomas liberados emprenden su camino hacia su célula diana, donde mediante algunos receptores como la clatrina y/o caveolina, entre otros, internalizan a la célula receptora. Algunos otros procesos de internalización son: la endocitosis dependiente de clatrina (macropinocitosis y fagocitosis), la captación mediada por caveolina, la internalización mediada por cadenas lipídicas o por fusión directa (Fig. 4) (Gurung et al., 2021; Negrete-García et al., 2022).

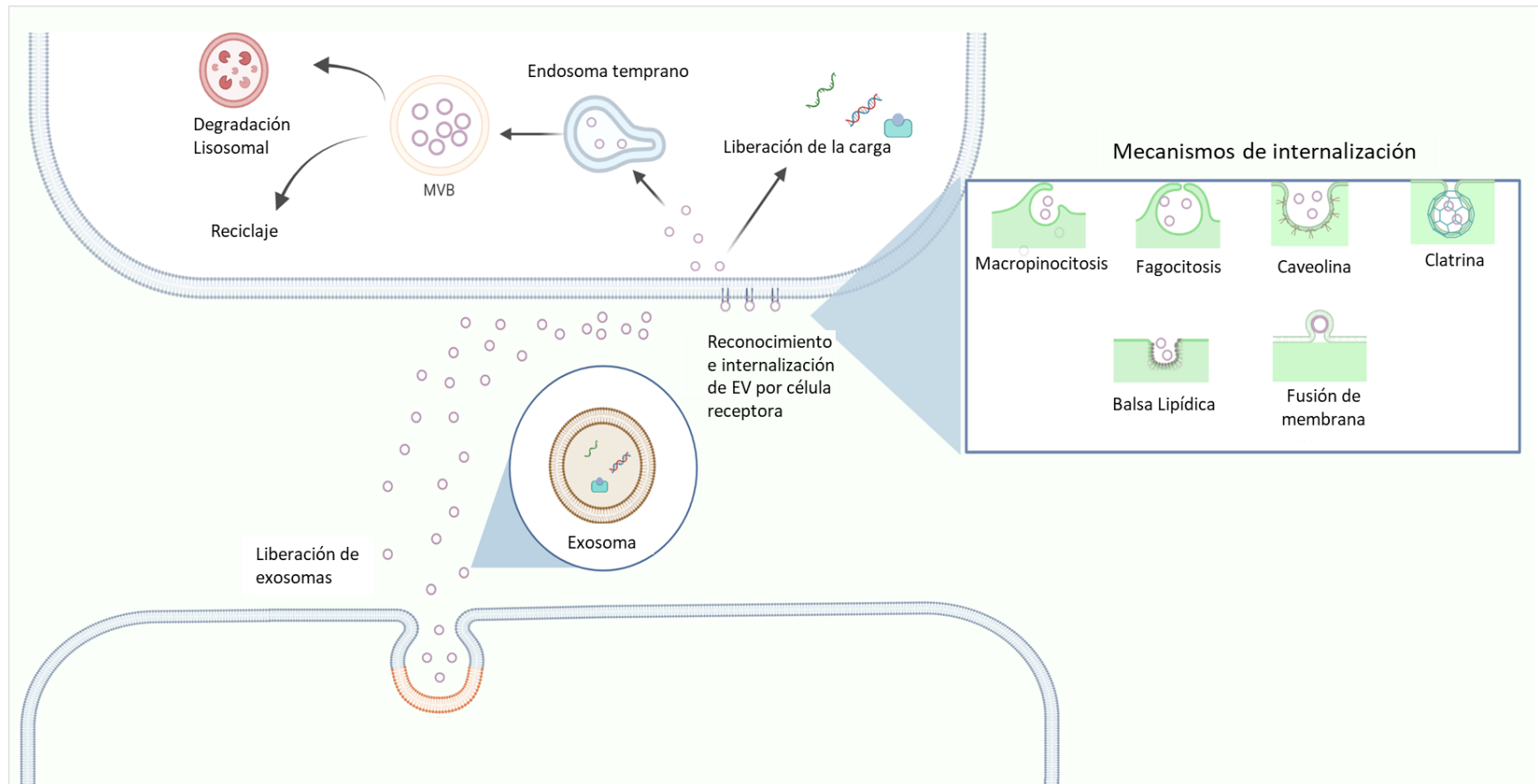


Figura 4. Internalización de los exosomas a su célula diana. Al llegar los exosomas con su célula diana tienen varias opciones de internalización entre ellas está la macropinocitosis, la fagocitosis, endocitosis mediada por receptores como caveolina y clatrina, fusión de membrana y mediante balsa lipídica. Una vez que son internalizados por su célula receptora los exosomas liberan su carga (Imagen tomada y modificada de Negrete-García et al., 2022)

1.2 Composición y contenido

La composición y contenido de los exosomas es altamente selectivo y heterogéneo. Sin embargo, la mayoría se encuentran compuestos por colesterol, esfingomiélin, ceramidas y fosfatidilserina (Colombo et al., 2014). Otros de sus componentes son, proteínas de tipo transmembranales (LAMPs), proteínas de presentación de antígenos (Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) I y II), moléculas de adhesión como las integrinas y tetraspaninas entre ellas CD63, CD81 y CD9 que son elementales ya que les dan orientación y adhesión celular (He et al., 2018; Mathivanan et al., 2010). Además, moléculas que permiten el transporte y la fusión de la membrana como las anexinas, y proteínas relacionadas con Ras (Rab) (Simons et al., 2009); finalmente encontramos TSG101 (del inglés, Tumor Susceptibility Gene 101) y Alix que se encuentran ligadas a la biogénesis de las MVBs (Urbanelli et al., 2013). En el interior de los exosomas se encuentran componentes de la maquinaria ESCRT, proteínas de señalización (EGFR, P13K, β -catenina, sintenina), proteínas del citoesqueleto (actina, miosina, tubulina), proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsp90) (He et al., 2018), proteínas metabólicas (GADPH y ENO1) (Urbanelli et al., 2013) y ácidos nucleicos como los DNA mitocondrial, RNAm, miRNAs y otros RNAs no codificantes (He et al., 2018) (Fig. 5). Sin embargo, su contenido extra o diferente dependerá de su origen, así como el estado físico y patológico de la célula de origen.

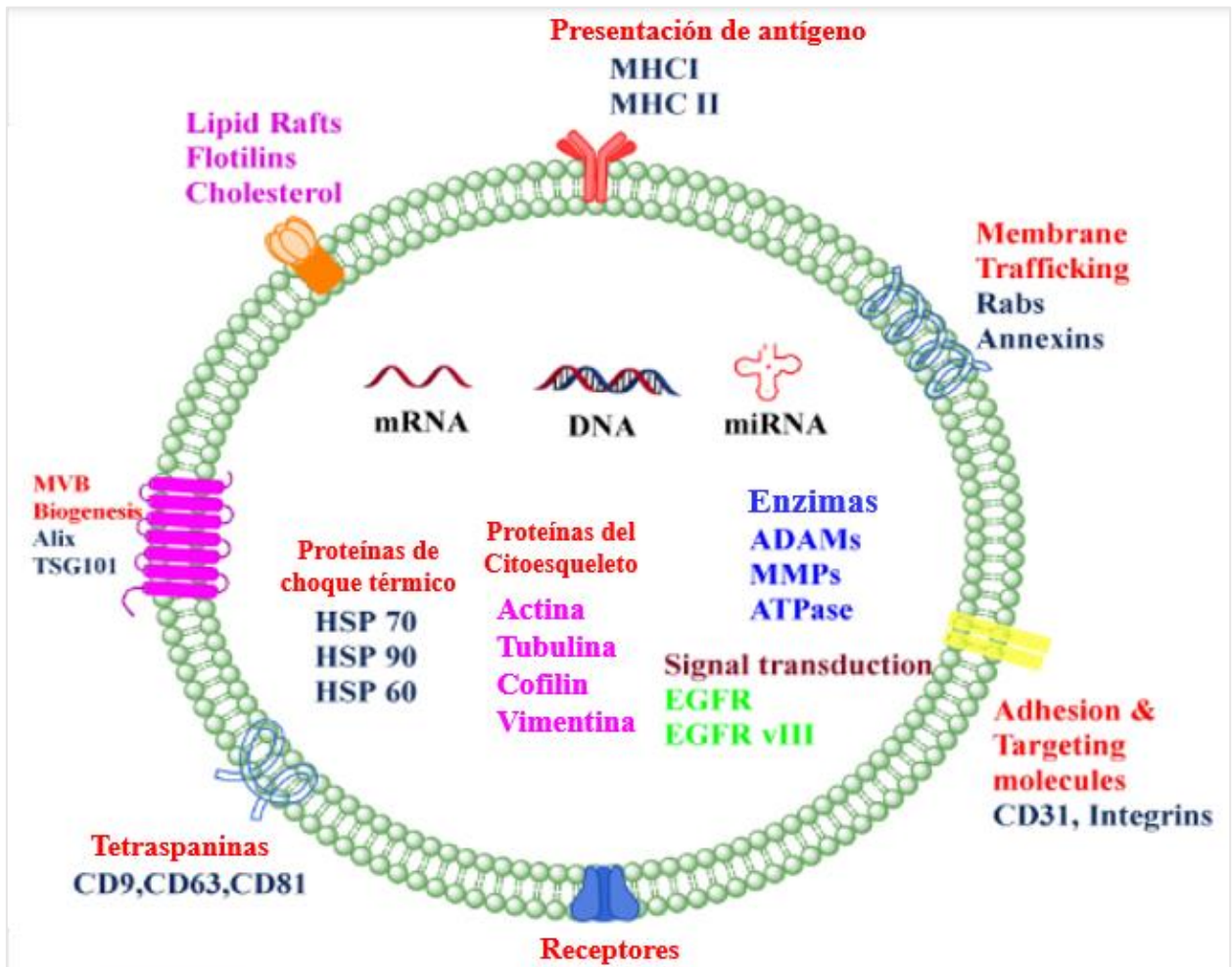


Figura 5. Composición y estructura de los exosomas. Los exosomas están compuestos de una bicapa de fosfolípidos, receptores y proteínas de membrana, en el interior encontramos algunos tipos de ácidos nucleicos, así como proteínas del citoesqueleto, proteínas de choque de calor, enzimas, etc. (Imagen tomada y modificada de Kumar et al., 2022).

1.3 Funciones

Los exosomas se han visto involucrados en varios procesos biológicos dentro de los que destacan ser mediadores de la comunicación intercelular, gracias a la liberación de estos al medio extracelular, los cuales viajan a un tipo celular diferente al del origen (Schorey et al., 2008). Una vez acoplado el exosoma con la célula receptora o diana, se promueven cascadas de señalización en la superficie celular o en su membrana, ocasionando de esta manera afectaciones en las funciones celulares normales y/o patológicas como lo son daños en la señalización celular, en la expresión génica, cambios en la migración celular, en patrones de adhesión y en la regulación de la proliferación celular (Sanderson et al., 2019), etc. Por lo anterior, esta es la función de más renombre cuando se habla de los exosomas (Guo et al., 2017; Mathivanan et al., 2010; Raposo et al., 1997; Simons et al., 2009; Zitvogel et al., 1998). Sin embargo, las funciones de los exosomas son variadas y dependerán del tipo celular de donde provengan, así como de su composición (Ha et al., 2016; Schorey et al., 2008), por lo que, algunos autores dividen sus funciones biológicas en dos grupos: Fisiológicas y Patológicas (Bobrie et al., 2011; Ludwig et al., 2012; Patil et al., 2019).

1.3.1 Funciones Fisiológicas

La función biológica más importante de los exosomas es la comunicación intercelular como se mencionó con anterioridad. No obstante, los exosomas también tienen otras funciones igual de importantes, algunas de ellas es su participación como mediadores de la respuesta inmune (Raposo et al., 1997), terapias regenerativas (Ludwig et al., 2012), coagulación (del Conde et al., 2005), reproducción y desarrollo de mamíferos (De Toro et al., 2015; Kalluri et al., 2020), estrés celular (Atienzar-Aroca et al., 2016; Baixauli et al., 2014), etc.

En cuanto a la respuesta inmune, el papel de los exosomas ha sido descrito desde años atrás, con el descubrimiento de liberación de exosomas por parte de los linfocitos B, que contenían MHC-II (Raposo et al., 1997). Por otro lado, en estudios más recientes se ha encontrado que la respuesta inmune ocasionada por los exosomas se debe a la transferencia y presentación de algunos péptidos de antígenos, lo cual desencadena una cascada de señalización en la vía inmune donde comienza la expresión de genes inflamatorios (Admyre et al., 2003; Bobrie et al., 2011; Kalluri & LeBleu, 2020; Robbins & Morelli, 2014; Ventimiglia & Alonso, 2016).

Por otro lado, en la reproducción y desarrollo de mamíferos, los exosomas tienen cierta actividad inmunosupresora la cual se encuentra aumentada en el embarazo, donde es importante la supresión del sistema inmune para un buen desarrollo fetal, para ello los exosomas liberan gran cantidad de moléculas pro-apoptóticas lo que llevan a la muerte de las células T (De Toro et al., 2015).

1.3.2 Funciones Patológicas

Dentro de las funciones patológicas en donde los exosomas han sido involucrados son en algunas enfermedades respiratorias (Admyre et al., 2003; Alipoor et al., 2016), cardiovasculares y metabólicas (De Toro et al., 2015; Kalluri et al., 2020), neurodegenerativas (De Toro et al., 2015; Sanderson et al., 2019), procesos inflamatorios (Yuana et al., 2013), hipoxia (Bister et al., 2020), cáncer (supervivencia celular, angiogénesis, metástasis (Guo et al., 2017; Yang et al., 2021)), etc.

Dentro de las enfermedades respiratorias los exosomas se ven involucrados en enfermedades como la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA), Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma y cáncer de pulmón. Varios estudios han demostrado que los miRNAs contenidos en los exosomas son los principales involucrados en el mecanismo de patogénesis de la mayoría de las enfermedades pulmonares mencionadas (Guiot et al., 2019; Hoefel et al., 2019; Kim et al., 2019; Negrete-García et al., 2022; Rupani et al., 2013). Por lo que, actualmente los exosomas han ido tomando gran importancia en su estudio, tanto como biomarcador diagnóstico y pronóstico, así como protagonistas en diferentes mecanismos de patogénesis de dichas patologías. Es de resaltar que el estudio de la función de los exosomas está muy avanzado en investigaciones hechas sobre enfermedades malignas. En este campo se tiene amplio conocimiento de su participación en los procesos de crecimiento y supervivencia tumoral, angiogénesis, resistencia a los fármacos, metástasis; en diferentes tumores sólidos (Huang et al., 2022; Kumar et al., 2022; Milane et al., 2015; Munagala et al., 2017; Schorey et al., 2008; Yang et al., 2021). Por ejemplo., en un estudio realizado por Goulet et al., 2018 encontraron que los exosomas favorecen el crecimiento invasivo y la metástasis del cáncer de vejiga, mediante la transformación de fibroblastos sanos en fibroblastos asociados al cáncer, debido al TGF- β transferido mediante exosomas. Por otro lado, se sabe que, en la mayoría de los diferentes tipos de cáncer, prevalece un ambiente hipóxico, lo cual favorece la progresión tumoral, debido a una baja administración sanguínea. Sin embargo, en una investigación hecha con modelos *in vivo* e *in vitro* se demostró que los exosomas eran los responsables en el incremento de la vascularización y crecimiento

del tumor (Umezu et al., 2014). También se ha reportado que el efecto angiogénico causado por el microambiente hipóxico puede deberse a diferentes proteínas y mRNAs presentes en el contenido de los exosomas (Atienzar-Aroca et al., 2016). En contraste, también se ha observado que los exosomas presentan funciones anti angiogénicas, ya que promueven la secreción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca la inhibición de la angiogénesis (Yuana et al., 2013).

1.4 Uso Terapéutico

Al estar los exosomas involucrados en diferentes procesos patológicos, se ha visto gran interés en su posible uso como herramientas de tratamiento, prevención y diagnóstico. De acuerdo con algunos estudios, la mayoría de los exosomas que son usados para uso terapéutico son provenientes de leche de origen bovino. Esto es debido a que este tipo de leche contiene gran cantidad de exosomas, así como su baja respuesta inmune e inflamatoria inter especie. Adicionalmente, presenta una gran resistencia a la digestión enzimática, una vida media larga en circulación, gran especificidad y selectividad a su célula blanco (Aqil et al., 2017, 2019; Munagala et al., 2016).

Por otro lado, aprovechando la capacidad de los exosomas de funcionar como vehículos de transporte de biomoléculas, actualmente ya hay algunos estudios sobre su utilidad en la ministración de medicamentos (Aqil et al., 2019; Ha et al., 2016; Kumar et al., 2022; Munagala et al., 2016). Un ejemplo de ello es una investigación realizada por Munagala et al., 2017, donde encapsularon una formulación llamada Anthos, compuesta de antocianidinas y antocianinas (compuestos flavonoides que confieren el color rojo, púrpura o azul a algunas hojas, flores y frutos) provenientes del arándano en exosomas. Dichos compuestos, tienen propiedades antioxidantes, antiproliferativas, antiapoptóticas y antiinflamatorias pero baja biodisponibilidad y estabilidad. Por lo que, se utilizaron exosomas como nanotransportadores farmacológicos, aprovechando sus características de biocompatibilidad, escalabilidad y abundancia. Que en comparación con otros nanotransportadores, los exosomas no generan toxicidad ni de farmacocinética y reproducibilidad. Además, son más estables y específicos hacia su célula blanco. Para este estudio los exosomas fueron aislados de leche de vaca mediante centrifugación diferencial alcanzando los 135,000 x g. Para cargar los exosomas con esta formulación, realizaron una mezcla de los exosomas con la formulación de Anthos, que incubaron a temperatura ambiente por 15min y después centrifugaron a baja velocidad para obtener el pellet de exosomas cargados. Para evaluar la pureza y especificidad de los exosomas utilizados, se midió su tamaño y su concentración proteica, así como la detección de marcadores específicos mediante Western Blot. La morfología fue analizada mediante Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope)

y Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (Munagala et al., 2016). Otro ejemplo sobre la utilidad de los exosomas como nanotransportadores de bioactivos vegetales, es el estudio de Aqil et al., 2017, este estudio consistió en la generación de un tratamiento con curcumina, el cual resultó ser exitoso para células de cáncer de pulmón, mama y cérvix actuando como antiinflamatorio, antitumoral y antiproliferativo. Un estudio más reciente, donde se utilizaron exosomas aislados de leche bovina fue el reportado por Aqil et al., en 2019, aquí los exosomas fueron cargados por métodos de electroporación y/o transfección con siRNAs, para los genes EGFR, AKT y MAPK. De acuerdo con los resultados, los autores demostraron la alta eficiencia de los exosomas cargados con siRNAs, en su capacidad de silenciar oncogenes de varios tipos de cáncer con ensayos *in vitro*. Pero, además también observaron una actividad antitumoral cuando manejaron un xenoinjerto de tumor de pulmón en modelos *in vivo* de ratón (Aqil et al., 2019).

Por otro lado, ha habido un gran avance en la generación de vacunas mediante exosomas. Un estudio respecto a este tema fue publicado por Guo et al., 2018, en este trabajo utilizaron exosomas derivados de la línea celular MC38 (células epiteliales de cáncer de colon murino) transfectados con HSP70 (del inglés, Heat Shock Protein 70) o sometidas a estrés térmico, los cuales mostraron propiedades antitumorales de tipo inmune. La validación de su pureza se realizó mediante la evaluación de marcadores de superficie característicos de los exosomas como CD63, TSG101, ALIX, HSP70 y HSC70 por western blot. Uno de sus resultados más destacados, fue comprobar que los exosomas provenientes de las células MC38 que fueron sometidas a estrés térmico contenían altos niveles de HSP70, lo que promovió la síntesis de la IL-6, la cual estimula a las células T reguladoras en su transformación en células T helper tipo 17 con efectos antitumorales, por lo que, podría considerarse como una opción de vacuna tipo anticancerígena (Guo et al., 2018). En un estudio más publicado por Huang et al., 2022 activaron células dendríticas con la finalidad de incrementar la respuesta inmune potenciando los efectos antitumorales de las células T CD8+, dirigidas al cáncer de mama. En esta investigación los exosomas fueron obtenidos de una línea celular transfectada con lentivirus, los cuales poseían en su superficie una proteína propia del cáncer de mama lo que les daba orientación e inmunogenicidad a los exosomas, estos fueron cargados mediante electroporación con Hiltonol (agonista de TLR3) y con el

inductor de muerte celular inmunogénica (DIC) elastasa de neutrófilos humanos (ELANE). Después fueron purificados mediante centrifugaciones diferenciales llegando a los 100,000 x g e identificados por cuantificación proteica, Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), citometría de flujo a nanoescala y análisis Western blot. Esto fue probado exitosamente *in situ* en un modelo de xenoinjerto de ratón y en organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer mamario.

Por otro lado, los exosomas también han demostrado tener efectos regenerativos de tipo tisular, en algunas cardiopatías. Esto fue demostrado en un modelo de ratón con lesiones por isquemia/reperfusión miocárdica. En este caso se utilizaron exosomas de medio condicionado de células madre mesenquimales derivadas de células madre embrionarias, purificados por HPLC. Los cuales, para llevar la función deseada, fueron empaquetados con proteínas funcionales y RNAs específicos (Lai et al., 2010).

Como se puede apreciar, a la fecha el uso de exosomas como transportadores de biomoléculas ha tenido gran avance y con mucha promesa para su uso terapéutico. Entre sus atributos se encuentran su baja citotoxicidad, su capacidad para maximizar la biodisponibilidad de los fármacos y su gran especificidad. Adicionalmente, es importante destacar que, en la mayoría de los estudios mencionados, los exosomas fueron purificados mediante ultracentrifugaciones diferenciales y cuantificados e identificados por concentración total de proteínas, MET y Western blot. Lo que nos indica que son metodologías que a la fecha se consideran como “estándares universales”. Adicionalmente, también se puede resaltar la importancia de mejorar y encontrar tecnologías que arrojen una alta producción y pureza de exosomas, lo que permitiría analizar con mayor precisión su contenido llevándonos a generar mayor conocimiento sobre su comportamiento en la célula blanco a la que están destinados.

2. Métodos de purificación de exosomas

Gracias a su relevancia en el área médica, actualmente existe un creciente interés por purificar estas vesículas, con un alto grado de pureza y cantidad. Por lo que, a la fecha, se han reportado varias publicaciones con diferentes métodos de purificación de los exosomas (Cheng et al., 2020; Gardiner et al., 2016; Momen-Heravi et al., 2013; Tang et al., 2017; Zeringer et al., 2015). Entre ellos se encuentran, la separación por gradiente de densidad (Konoshenko et al., 2018; Momen-Heravi et al., 2013; Witwer et al., 2013), cromatografía de exclusión por tamaño molecular (Witwer et al., 2013; Wu et al., 2021), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC del inglés, high-performance liquid chromatography) (Lai et al., 2010), ultrafiltración (Li et al., 2017; Zeringer et al., 2015), tecnología basada en microfluidos (C. Chen et al., 2010; Kimiz-Gebologlu & Oncel, 2022; Momen-Heravi et al., 2013), inmunoafinidad o inmunoaislamiento (J. Chen et al., 2022; Greening et al., 2015; Konoshenko et al., 2018; Wu et al., 2021), el uso de polímeros excluyentes de volumen como el polietilenglicol (PEG) (Chang et al., 2018; Ludwig et al., 2018; Rider et al., 2016), y la más utilizada a la fecha, la ultracentrifugación (UC) (Purushothaman, 2019; Tang et al., 2017; Vlassov et al., 2012; Zeringer et al., 2015) (Fig. 6). Adicionalmente, hoy en día podemos encontrar en venta algunos kits de purificación de exosomas, tales como Exoquick-TC™ (System Biosciences) y Total Exosomes Isolation Reagent (TEI™) (Invitrogen) (Caradec et al., 2014; Cheng et al., 2020; Tian et al., 2020). Estos kits se basan en el uso de polímeros excluyentes de volumen como el PEG. Entre las desventajas en el uso de estos kits, son la baja pureza y alto costo-rendimiento de las VEs obtenidas. Por lo que, según la bibliografía Konoshenko et al., 2018 el método más auxiliado es el de la UC. Si bien a la fecha no hay un método donde nos asegure un 100% de pureza en la obtención de exosomas, si se deben de cumplir con los requerimientos mínimos, exigidos por la “Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares” (ISEV, por sus siglas en inglés) (Théry et al., 2018).

En este trabajo, nosotros solo seleccionamos dos de los métodos para su estudio y comparación, el de UC, considerado hasta cierto punto como “estándar de oro” (Wu et al., 2021) y el de uso de agentes precipitantes con PEG. Nuestra selección se basó principalmente a que la UC tiene la capacidad de manejar volúmenes altos de muestra

inicial y el contar con una ultracentrífuga en el laboratorio. Por otro lado, el elegir el método de PEG como comparativo, fue tomando en cuenta al ser el reactivo base en los kits comerciales.

2.1 Método de ultracentrifugación

El método de UC consiste básicamente en realizar varias centrifugaciones a diferentes velocidades y tiempos, a este proceso se le conoce como centrifugaciones diferenciales (Livshits et al., 2015). La primer centrifugación se realiza a una velocidad de 200-400g por 10 min para sedimentar porciones celulares que no son de nuestro interés. En seguida, se centrifuga a 2000g para eliminar restos celulares y luego a 10,000g para eliminar agregados que se pudieron generar a causa de los biopolímeros (si es que se usaron), así como también cuerpos apoptóticos y demás partículas que son superiores en densidad a los exosomas; el sobrenadante obtenido se ultracentrifuga con velocidades que varían entre los 100,000-120,000g durante aproximadamente 2h para que los exosomas precipiten (Konoshenko et al., 2018; Livshits et al., 2015; Théry et al., 2006).

Una de las desventajas de la UC son los tiempos prolongados que se necesita para la purificación, el uso de equipos especializados que son realmente caros y de difícil acceso para muchos laboratorios (Torres Cigna et al., 2021), cabe mencionar también que la replicación es inestable e inexacta, ya que existe demasiada variabilidad que depende en gran parte del operador (Chen et al., 2022; Torres Cigna et al., 2021). Por otro lado, las ventajas son que se pueden procesar diferentes tipos de muestra como sobrenadantes de cultivos celulares y varios fluidos biológicos (Konoshenko et al., 2018)., puede ser considerado como uno de los métodos más baratos, siempre y cuando se cuente con el equipo adecuado que incluye una ultracentrífuga y un rotor de columpio. Algunos autores sugieren complementar esta metodología con gradientes de sacarosa y microfiltración para una mayor pureza, esto debido a que puede existir contaminación por impurezas en el precipitado como agregados de proteínas copurificadas, viriones, etc (Chen et al., 2019; Chen et al., 2022; Mincheva-Nilsson et al., 2016).

2.2 Método de precipitación con Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)

El método de purificación mediante precipitación está basado en el uso de polímeros como el polietilenglicol (PEG). El PEG ($\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$), que es un polímero hidrosoluble con la capacidad de precipitar proteínas de una solución acuosa, por un mecanismo de volumen excluido (Ingham, 1984). Es un químico inerte, no tóxico, no absorbente, incoloro, sin sabor y sin olor (Humphreys et al., 2005). Este polímero es comúnmente usado como agente precipitante en la cristalización de proteínas (Radaev et al., 2006) y purificación de virus (Killington et al., 1996).

Dada la noble naturaleza del PEG se comenzó a utilizar como agente precipitante para los exosomas, gracias a su similitud en la biogénesis, composición y tamaño con los virus (Pelchen-Matthews et al., 2004). Por ello se han propuesto varios protocolos que usan como base el de la purificación de virus (Chang et al., 2018; Ingham, 1984; Ludwig et al., 2018). Cabe mencionar que es uno de los métodos más populares seguido de la ultracentrifugación de acuerdo con Torres Crigna et al., 2021. El objetivo de los polímeros en este caso el PEG, es reducir la solubilidad de los exosomas para que estos precipiten (Chen et al., 2022), básicamente consiste en mezclar la muestra con la solución del polímero, incubar y centrifugar a bajas velocidades para que los exosomas sedimenten (Torres Crigna et al., 2021). Dentro de sus ventajas podemos encontrar que es sencillo, rápido y no requiere equipo especializado (Weng et al., 2016), sin embargo, algunas de sus desventajas es la posible contaminación a casusa de agregados proteicos que podrían arrastrar moléculas del polímero, así como contaminación por el mismo polímero que no fue lavado correctamente en las centrifugaciones para la precipitación de los exosomas (Konoshenko et al., 2018).

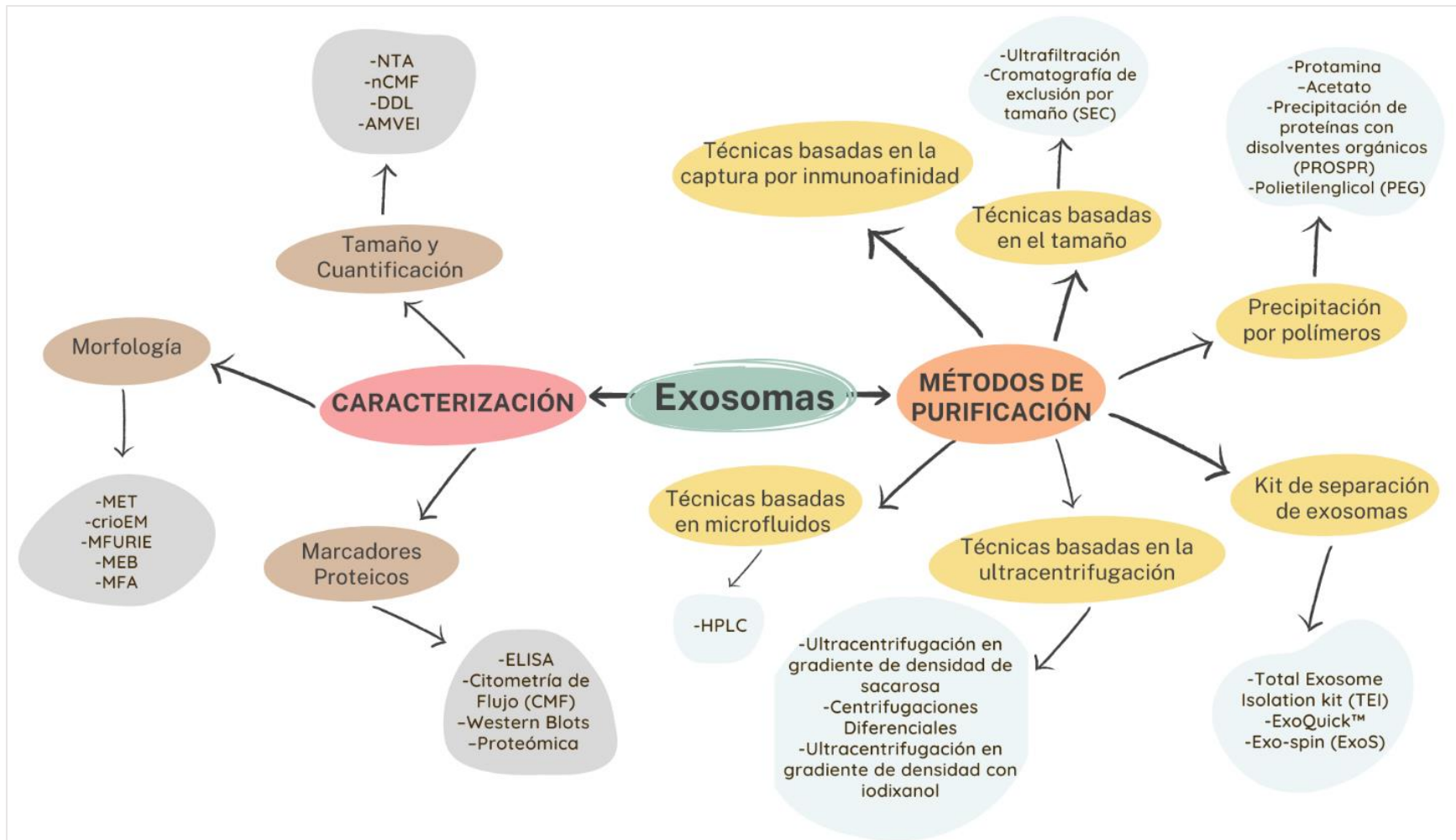


Figura 6. Los métodos de purificación de exosomas más comunes son los basados en inmunofinidad, tamaño, microfluidos, ultracentrifugaciones, precipitación por polímeros y algunos kits. Para la verificación de exosomas se emplean técnicas como las de cuantificación mediante NTA, nCMF, etc., otras para la morfología como la microscopía de transmisión electrónica (MET) y criomicroscopía electrónica (crioME), finalmente las que implican marcadores proteicos característicos de los exosomas como ELISA y Western Blots. (NTA: Análisis de Seguimiento de Nanopartículas, nCMF: nano-Citometría de Flujo, DDL: Dispersión Dinámica de la Luz, AMVel: Análisis Microscópico de EV Individuales, MET: Microscopía Electrónica de Transmisión, crioME: crio-Microscopía Electrónica, MFURIE: Microscopía de Fluorescencia de Ultra-alta Resolución con Iluminación Estructurada, MEB: Microscopía Electrónica de Barrido, MFA: Microscopía de Fuerza Atómica, ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Justificación

Desde hace más de una década los exosomas derivados de diversos fluidos corporales y cultivos celulares, han ido tomando gran trascendencia, principalmente por su utilidad como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y potencial terapéutico en algunas enfermedades. Por otro lado, el estudio sobre la comunicación intercelular mediado por exosomas, ha demostrado ser fundamental para la adquisición de nuevos conocimientos sobre diferentes mecanismos de patogénesis de algunas enfermedades respiratorias, como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, y principalmente en enfermedades de tipo tumoral.

Es por lo que, el contar con métodos de purificación óptimos y de bajo costo, son fundamentales para su estudio y utilidad en las diferentes áreas mencionadas. Además, actualmente en el laboratorio de investigación de donde se emprendió este trabajo, se están manejando diferentes proyectos de investigación donde el objetivo principal es el estudio de los exosomas como comunicadores celulares, por lo que, nos interesó investigar y comparar dos métodos de purificación de estas vesículas, donde se evaluó principalmente, el rendimiento, pureza, y costos de purificación. Para ello se hizo uso de dos líneas celulares comerciales, una epitelial y otra fibroblastos. Además, de dos métodos de purificación, más ampliamente usados, como es la UC y el método de PPEG.

Objetivos

General:

Comparar dos diferentes métodos de purificación de exosomas ultracentrifugación y precipitación con polietilenglicol, a partir de medio condicionado de dos diferentes líneas celulares, fibroblastos normales de pulmón humano (NHLF) y células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón (A549).

Particulares:

- Establecer las condiciones ideales para el cultivo y obtención de medio condicionado de las líneas celulares en estudio.
- Evaluar diferentes parámetros de comparación entre los dos métodos de purificación de exosomas como cantidad, calidad, factibilidad y costos.
- Determinar el mejor método de purificación de exosomas de acuerdo con los resultados.

Material y métodos

Líneas celulares:

Se utilizaron dos líneas celulares comerciales: 1) fibroblastos normales de pulmón humano (NHLF (Normal Human Lung Fibroblasts), LONZA) y 2) células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano (A549, ATCC), como células productoras de exosomas.

Cultivo y propagación celular

Las líneas celulares NHLF y A549 provinieron de viales de células “jóvenes”, considerados así porque no superaban los 20 pases. Dichas células se encontraban almacenadas en tanque de nitrógeno para su preservación.

Las células NHLF fueron crecidas en cajas T-75 con medio de cultivo completo, DMEM-F12 (Gibco AB) con suero fetal bovino (Gibco AB) descomplementado (ver apéndice B2) al 10% y antibiótico-antimicótico (estreptomina, penicilina-anfotericina B) (Gibco) al 1%, en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa).

Para el caso de las células A549 se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente, con la diferencia de que el medio utilizado para esta línea celular fue el D-MEM (Gibo AB).

Una vez que las primeras cajas T-75 de ambas líneas alcanzaron una confluencia del 80-90 fueron tripsinizadas (ver apéndice B1) para posteriormente ser propagadas a más cajas, con el objetivo de llegar a las cajas necesarias para obtener 60 ml de medio condicionado (MC), o sea 6 cajas de cultivo.

Obtención del medio condicionado (MC)

Una vez alcanzada una confluencia celular del 80%, en las 6 cajas de cultivo de cada línea celular, se retiró sobrenadante y se reemplazó con medio nuevo sin SFB por 24h, con la finalidad de “sincronizarlas”. Pasado este tiempo se retiró el medio y se le adicionó medio nuevo de DMEM-F12 o DMEM según sea el caso, con 1% SFB libre de exosomas (Gibco), y se colocaron en la incubadora durante 72 h, en las condiciones estándar ya mencionadas. Al término de ese tiempo, se recolectó el MC de cada una de las cajas de

cultivo y de cada línea celular por separado. El volumen total de MC obtenido para cada línea celular fue medido y dividido en dos. Una parte se utilizó para la purificación de exosomas por UC y la otra parte con PEG 6000.

Purificación de exosomas

Ultracentrifugación (UC)

Este método de purificación está basado y modificado de la propuesta por dos diferentes autores Théry et al., 2006 y Vlassov et al., 2012 (Fig. 7).

1. 30 ml de MC se centrifugaron a 200g por 10min a 4°C (Eppendorf 5810R Centrifuge).
2. Se recuperó el SND y se centrifugó por segunda vez a 2000g por 10min a 4°C.
3. El SND obtenido se añadió a tubos Corex® USA (No.8446) de 25mL y se procedió a centrifugar a 10,000g por 40min a 4°C (Beckman J2-MC Centrifuge).
4. Se recuperó el SND el cual fue distribuido en tubos para ultracentrifuga (Thermo Fisher), los cuales se centrifugaron a 100,000g por 70min a 4°C en una ultracentrífuga Sorvall® RC100 con un rotor AH629 de Thermo Scientific.
5. Transcurrido este tiempo se retiró el SND y se añadieron 7ml de PBS estéril, para volver a centrifugar a 100,000g por 70min a 4°C.
6. Finalmente se retiró completamente el SND dejando solo el pellet, el cual fue resuspendido cuidadosamente con 50 a 100uL de PBS estéril, dependiendo del tamaño del botón.

*El resuspendido se repartió en diferentes volúmenes para su análisis por microscopia electrónica, cuantificación de proteínas y electroforesis. La muestra para microscopia electrónica fue preparada de forma inmediata y el resto es conservado a -70°C hasta su uso.

Precipitación por polietilenglicol (PEG)

La siguiente metodología se encuentra descrita por Rider et al., 2016, donde la vía elegida es el lavado por ultracentrifugación (Fig.7).

1. Se preparó la solución madre de PEG 6000 2x pesando 3.2g de PEG 6000 (Sigma Aldrich) en 20mL de solución de NaCl (Sigma Aldrich) 1M, para una concentración final del 16% de PEG. (Esto es para 20mL de SND. Por lo que, se preparó lo necesario de acuerdo con el volumen de SND a procesar)

Después se filtró la solución de NaCl con el PEG y fue almacenada en refrigeración, hasta su uso.

2. El MC se centrifugó a 500g durante 5 min a 4°C (Eppendorf 5810R Centrifuge).

3. Se recupero el SND y se centrifugó por segunda vez a 2000g durante 30min a 4°C.

4. El SND obtenido se combinó con PEG 2x a 4 °C en una proporción 1:1 para lograr una concentración del 8% en tubos Corex® USA (No.8446) de 25mL. Este paso se realizó sobre una cama de hielo.

5. Se mezcló por inversión y se procedió a incubar a 4 °C durante toda la noche.

6. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 10,000g por 60 min a 4°C (Beckman J2-MC Centrifuge) (Yao et al., 2019).

7. Se decantaron los tubos y se dejó secar el precipitado por 5min. También se golpeó de vez en cuando para resuspender el pellet.

8. Después se le adicionó 5-8 mL de PBS estéril y se ultracentrifugó a 100,000g por 70min a 4°C para lavar el PEG excedente (Sorvall® RC100 y rotor AH629 de Thermo Scientific).

9.El precipitado se resuspendió con 50 a 500 µL de PBS estéril dependiendo del tamaño del botón.

*De igual forma que en el método de UC, el resuspendido fue almacenado a -70°C para usos posteriores.

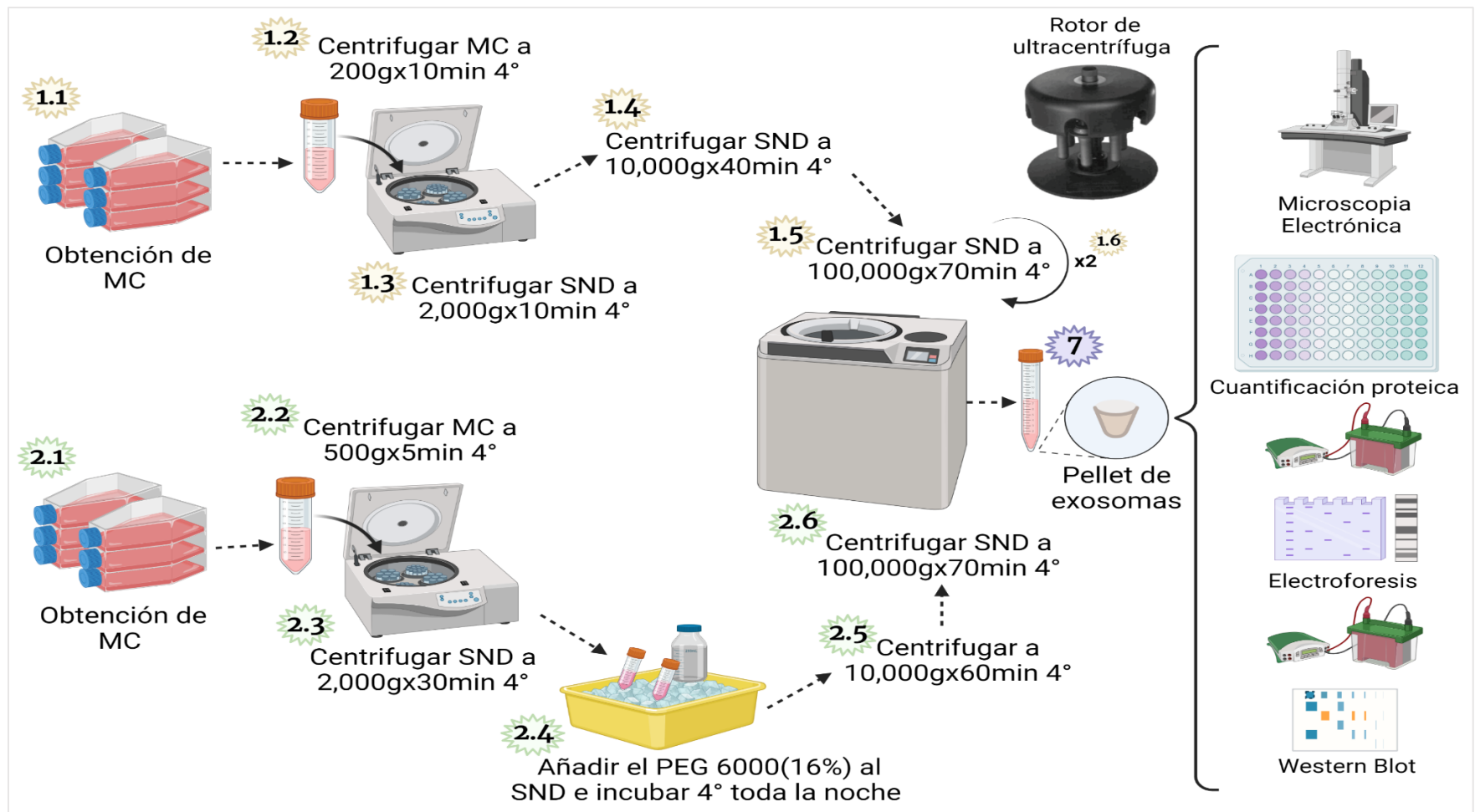


Figura 7. Descripción metodológica de los métodos de purificación utilizados. Método de UC 1.1) Obtención del MC. 1.2) El MC es centrifugado a 200g x 10min a 4°. 1.3) El SND se centrifuga en la misma centrifuga a 2,000g x 10min a 4°. 1.4) Después se utiliza una centrifuga de piso donde el SND es centrifugado a 10,000g x 40min a 4°. 1.5) El SND se centrifuga en ultracentrífuga a 100,000g x 70min a 4°. 1.6) Se repite el paso anterior, por lo tanto, son dos centrifugaciones en ultracentrífuga. Método de PPEG 2.1) El MC es centrifugado a 500g x 5min a 4°. 2.2) El SND se centrifuga a 2000g x 30min a 4°. 2.3) Centrifugar a 2,000g x 30min a 4°. 2.4) En este paso se añade la preparación de PEG al SND sobre una cama de hielo, posterior a ello se incuban a 4° toda la noche. 2.5) Al día siguiente la mezcla se centrifuga a 10,000g x 60min a 4°. 2.6) El SND se centrifuga en ultracentrífuga a 100,000g x 70min a 4°. 7) Una vez terminadas las centrifugaciones de cada método lo que se conserva es el pellet el cual será utilizado para las diferentes técnicas de caracterización, como lo son la cuantificación proteica, electroforesis, western blot y microscopía electrónica. Creado con BioRender.com

Preparación de las muestras para Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Para la caracterización de los exosomas por MET, se tomó una alícuota del pellet resuspendido de cada método de purificación y se siguió la siguiente metodología.

1. En una caja Petri de vidrio, se colocó dentro Parafilm™ y con ayuda de unas pinzas se puso encima de este, unas rejillas de cobre.
2. Sobre las rejillas de cobre se añadió cuidadosamente 3µl de cada muestra y se dejó reposar por 5min.
3. Transcurridos los 5min, se absorbió el exceso de la muestra con papel filtro y se añadió 1 gota de uranilo sobre la rejilla con la muestra.
4. Después se cubrió de manera inmediata la caja Petri donde estaban contenidas las muestras de tal manera que no entrará la luz, dejando actuar de esta manera por 1min al uranilo.
6. Pasado el tiempo se tomó cada una de las rejillas con las pinzas y se lavaron a chorro de agua con ayuda de una piseta.
7. Se secó el exceso de agua con papel filtro y se volvió a colocar la rejilla sobre el Parafilm™ de la caja Petri.
8. Se cerró y selló la caja Petri alrededor con Parafilm™ para su transporte hacia la Facultad de Ciencias, UNAM donde se encuentra el microscopio electrónico de transmisión.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica se realizó con el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit” de Thermo Scientific, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en principios químicos similares a los ensayos de Biuret y Lowry, donde la proteína a analizar se hace reaccionar con Cu^{2+} (que produce Cu^+) y ácido bicinchonínico (BCA). El Cu^+ es quelado por el BCA, que convierte el color verde manzana del BCA libre en el color púrpura del complejo cobre-BCA (Smith et al., 1985).

Se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de proteínas (en este caso, albumina sérica bovina) de acuerdo con la tabla del instructivo. Así como diferentes diluciones de la muestra a determinar. La absorbancia del color producido se leyó a 595nm en el espectrofotómetro.

Electroforesis Vertical

Una vez cuantificadas las proteínas, se llevó a cabo la electroforesis vertical en condiciones reductoras. El gel que se usó tenía una concentración de Acrilamida al 12% (Laemmli, 1970) para ello se realizó lo siguiente:

1. Se prepararon geles de acrilamida al 12% (Concentrador y Resolución).
2. Después se trataron las muestras a analizar, para ello se les 200 μl añadió buffer de carga (Laemmli Sample Buffer, BioRad) y 10 μl β -mercaptoetanol (Sigma).
3. Una vez tratadas se llevaron al termociclador a 95°C por 5min, terminado el tiempo se colocaron de inmediato en hielo.
4. Posteriormente se cargaron los pozos de los geles con las muestras tratadas y el marcador de peso molecular, en la cámara de electroforesis que ya contenía el buffer de corrida.
5. Finalmente se colocó la fuente de poder a 100V por 1.30hr.

Western Blot

Terminado el tiempo de la electroforesis se realizó una electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa (BioRad). La transferencia se realizó a 100V durante 45min. Al término de la transferencia se bloqueó la membrana en una solución de leche en polvo libre de grasa al 5% a 37°C durante 1.30hrs.

Incubación con los anticuerpos

Una vez bloqueada la membrana se colocó el anticuerpo primario de interés, en nuestro caso fue el CD81(Santa Cruz Biotechnology sc 166029) y β -tubulina, diluidos en una solución de PBA 1% (PBS 1X y albúmina), que después fueron incubados toda la noche a 4°C y en agitación suave.

Al día siguiente la membrana fue lavada perfectamente (5 veces) con solución de TBS-Tween por 10min cada vez. La membrana se incubó nuevamente ahora con el anticuerpo secundario (el cual está marcado con peroxidasa) por 1.30hrs a temperatura ambiente con en agitación suave.

Pasado el tiempo se dieron otros 4 lavados con TBS-Tween antes de revelar.

Revelado

La membrana fue revelada mediante una solución 1:1 de luminol y peróxido de hidrogeno, que después fue colocada en el digitalizador de imágenes (ChemiDoc XRS+, BioRad), lo que nos permitió observar la existencia de bandas en la membrana gracias a la quimioluminiscencia de la reacción, indicándonos de esta forma la presencia de los exosomas en las muestras evaluadas.

Las imágenes fueron obtenidas mediante el programa Image Lab, que después fueron analizadas mediante un programa llamado ImageJ, el cual tiene como objetivo calcular los valores de área y pixel, sin embargo, como la diferencia del grosor entre los bandeos de cada marcador proteico evaluado es notorio a simple vista estos resultados no fueron mostrados.

Análisis estadístico

Para la verificación de la distribución normal de los datos analizados, se aplicó la prueba de Shapiro Wilks a los conjuntos de datos para asegurar su distribución normal. La comparación y diferencia de los datos con este tipo de distribución se llevó a cabo mediante las pruebas estadísticas U de Mann Whitney y ANOVA tanto unidireccional como bidireccional. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Cada experimento se realizó por triplicado.

Resultados

Parte de las muestras obtenidas de cada método de purificación de exosomas, fueron analizadas mediante TEM. En las figuras 8 y 9 se observan los exosomas extraídos por el método UC, los cuales mostraron una forma redondeada y bien definida, característicos de su forma en “copa” (Li et al., 2017; Théry et al., 2006; Torres Crigna et al., 2021). Cabe destacar que en la figura 9C se observan las medidas exactas de este exosoma, con 189.28nm de ancho y 192.39nm de largo.

Las figuras 10 y 11 corresponden al método de PPEG, donde se observaron vesículas de forma irregular (fig. 10), indicándonos cierto deterioro en su membrana y por lo tanto en la morfología, a excepción de la micrografía obtenida de la línea celular NHLF, la cual está bien definida (fig.11) y su forma muy peculiar de copita.

Es importante mencionar que los exosomas mostrados en todas las micrografías tienen diámetros que rondan entre 50-200nm aproximadamente, esto independiente del método de purificación utilizado, a diferencia de la fig.9C la cual muestra el tamaño exacto.

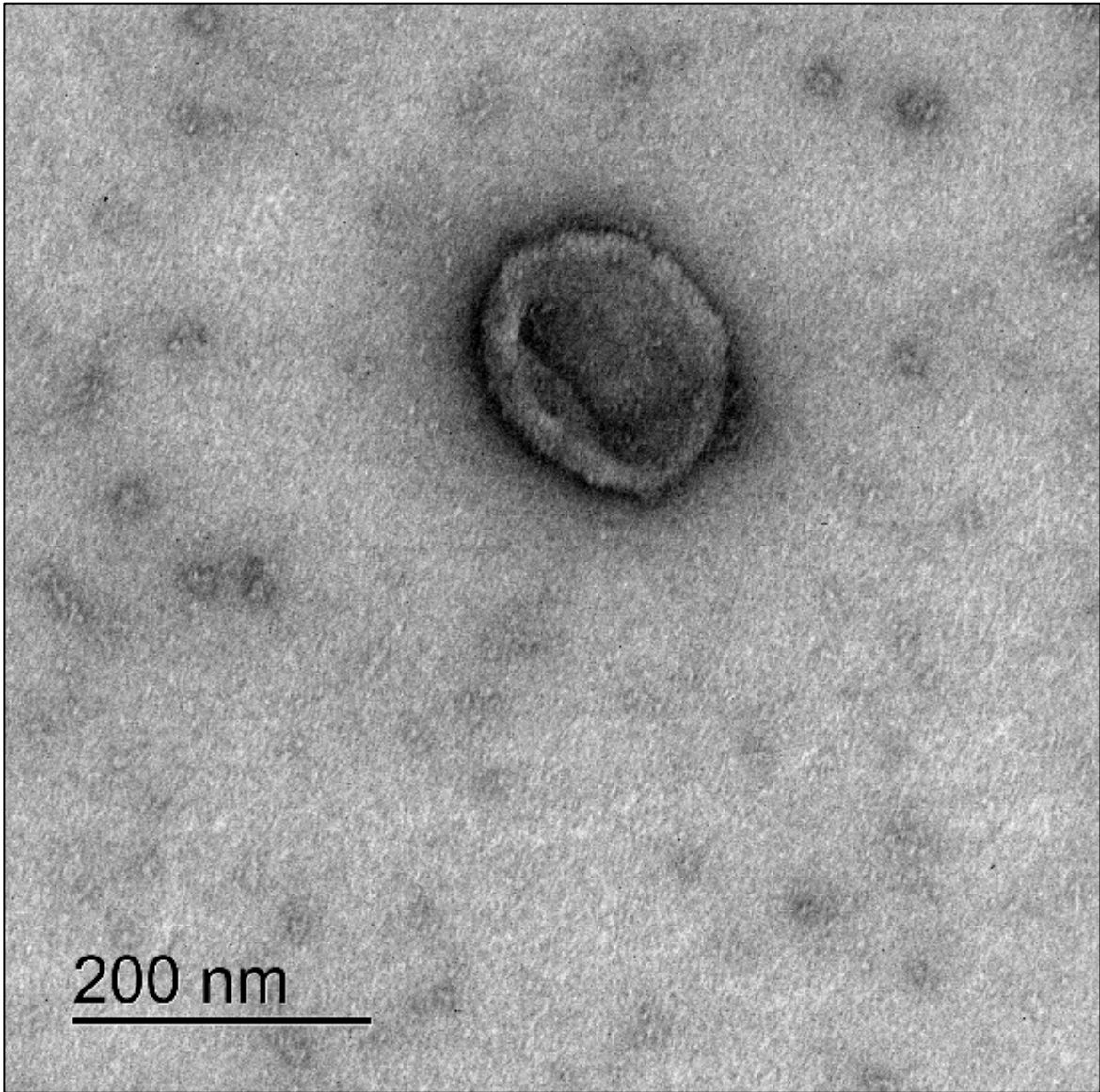


Figura 8. Micrografía de exosoma de la línea celular A549, derivado del método de purificación UC.

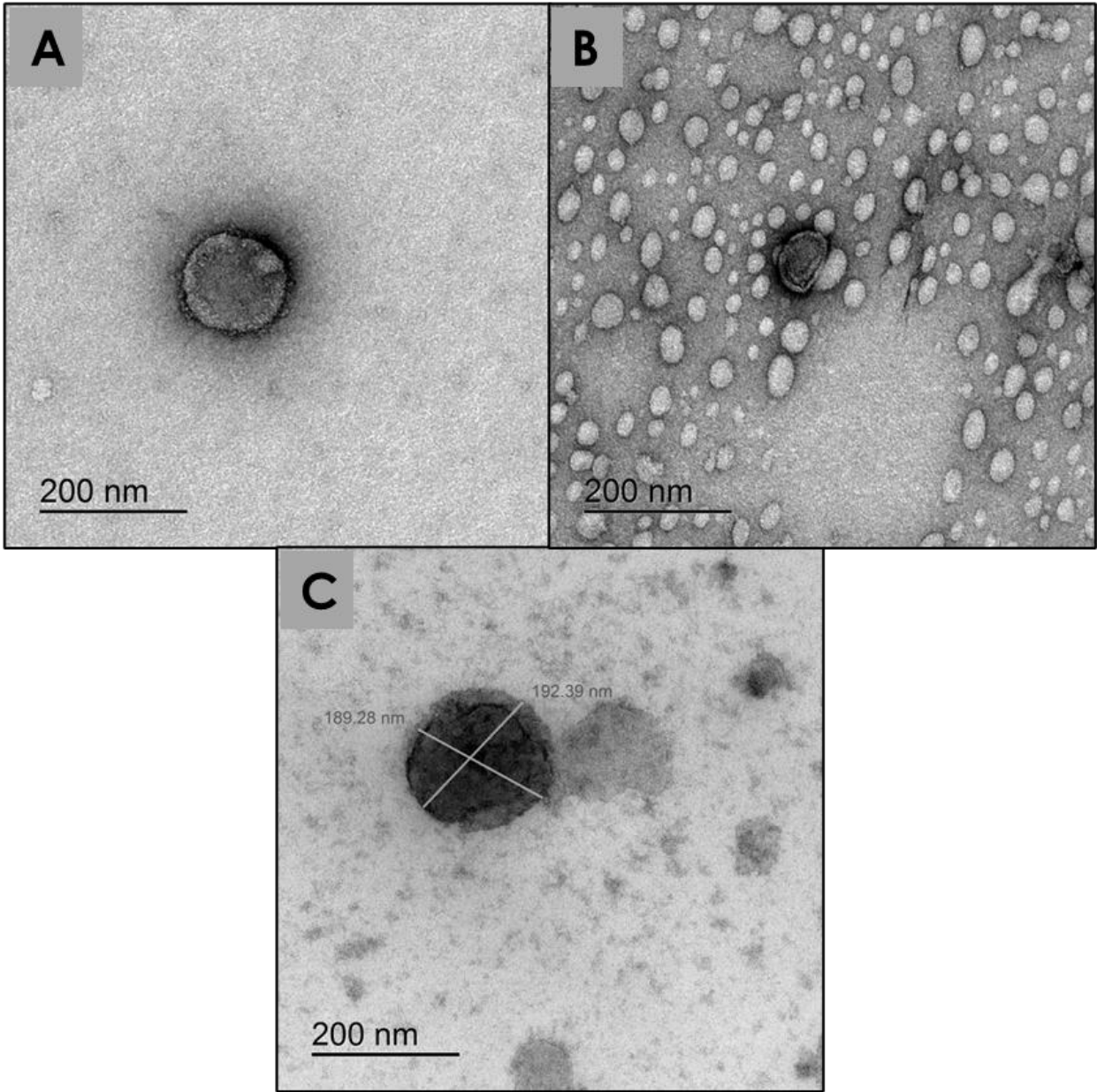


Figura 9. Micrografía de exomas de línea celular NHLF, derivado del método de purificación UC.

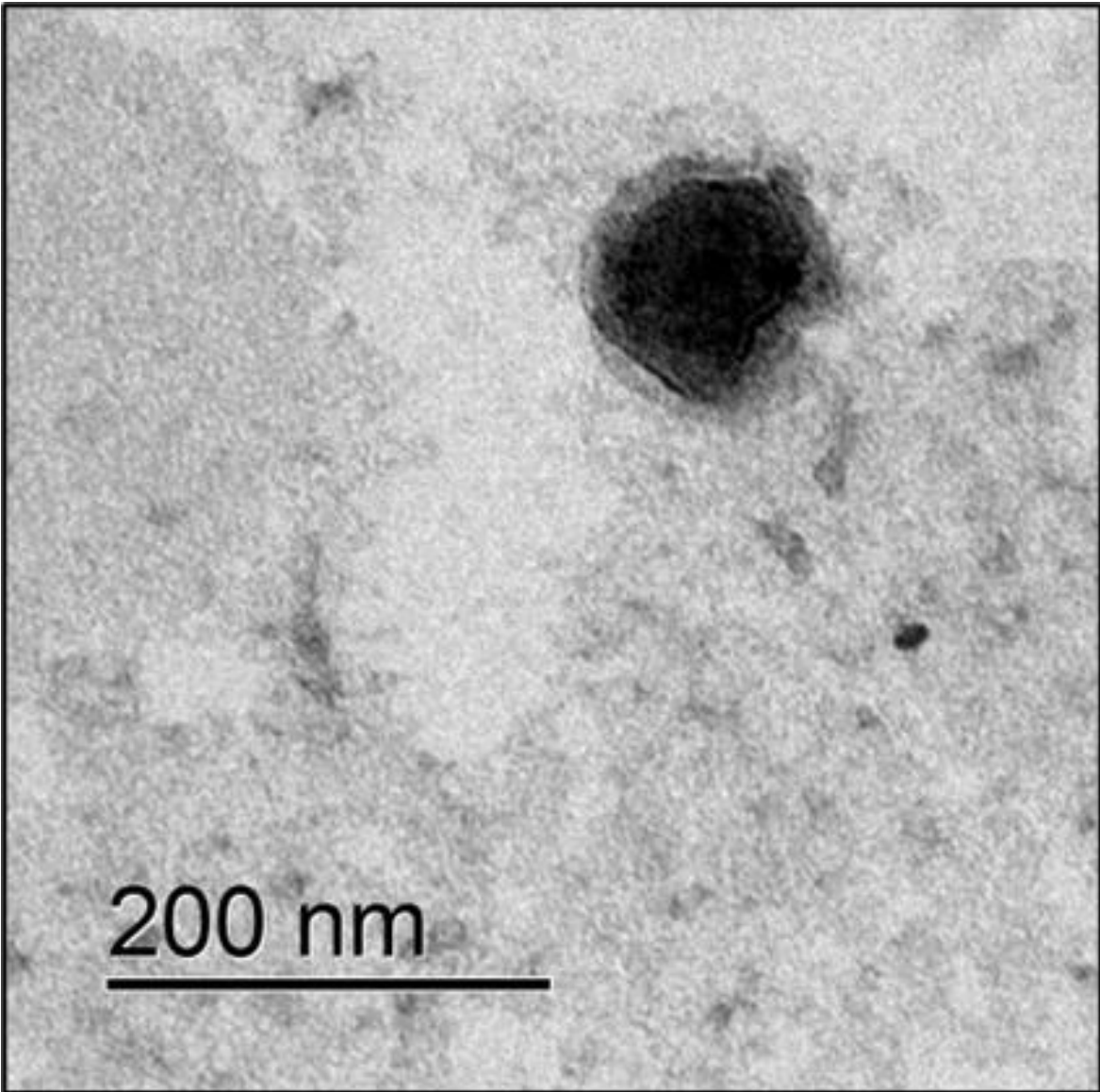


Figura 10. Micrografía de exosoma de la línea celular A549, derivado del método de purificación PPEG.

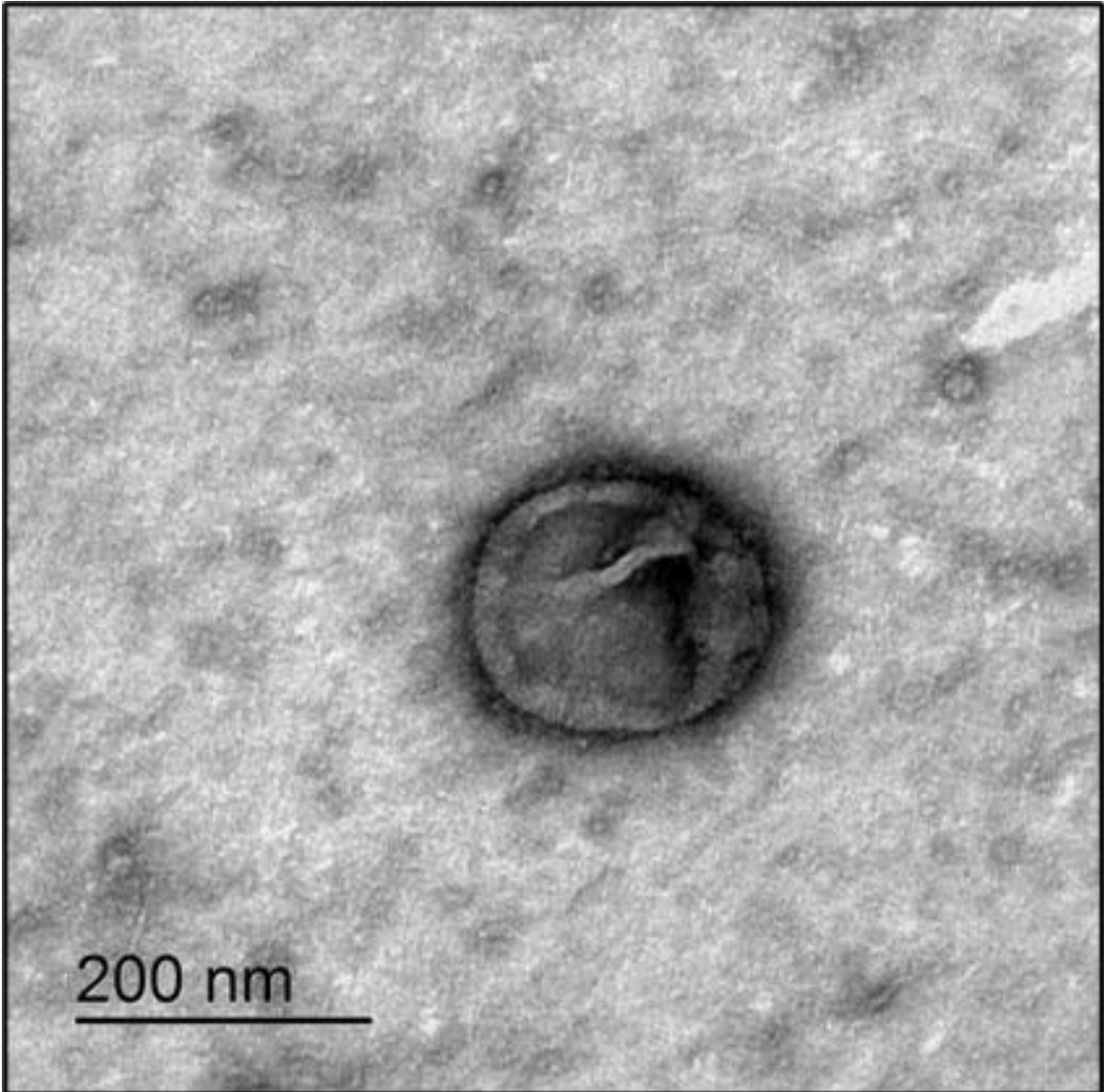


Figura 11. Micrografía de exosoma de la línea celular NHLF, derivado del método de purificación PPEG.

Cuantificación de Proteínas totales

Por otro lado, en la cuantificación de proteínas se obtuvieron los siguientes resultados: en la tabla 1 correspondiente a la línea celular A549 el método por UC obtuvo mayor concentración proteica, así como mayor rendimiento con valores promedios de 498.79 $\mu\text{g/mL}$ y 89.92 μg , respectivamente. Por otro lado, en la tabla 2 que pertenece a la línea celular NHLF se observa nuevamente que el método por UC obtuvo valores ligeramente mayores en concentración proteica y rendimiento de 279.20 $\mu\text{g/mL}$ y 48.61 μg respectivamente. Sin embargo, cabe destacar que en esta línea celular no existió una gran diferencia entre ambos métodos a diferencia de la línea celular A549, ya que por el método de PPEG se obtuvieron los siguientes valores promedios de 221.50 $\mu\text{g/mL}$ y 40.20 μg .

Al comparar las tablas de ambas líneas celulares podemos concluir que el mejor método de purificación es el de UC ya que, obtuvo valores mayores de concentración proteica y rendimiento promedio a diferencia del método por PPEG.

En cuanto se hace una comparación entre líneas celulares se observa que en la línea A549 pareciera una ligera mayor concentración y rendimiento, que por ende nos indicaría una mayor liberación de exosomas, a pesar de que el volumen inicial de MC fue el mismo para ambas líneas celulares, el número de células epiteliales (A549) (2×10^6 células) era mucho mayor en cada caja T-75 debidas a su tamaño inferior al de un fibroblasto (NHLF) (1×10^6 células).

Adicionalmente, al ser la línea celular tumoral, tiene la capacidad de una mayor producción de vesículas extracelulares, en comparación con una línea de células normales (NHLF) (Kamikawaji et al., 2016).

Tabla 1. Concentraciones promedio de proteínas obtenidas de la línea celular A549 por diferentes métodos de purificación de exosomas.

Método de purificación	Volumen inicial (mL)	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Rendimiento (μg)
UC	30	498.79	89.92
PPEG	30	176.67	26.73

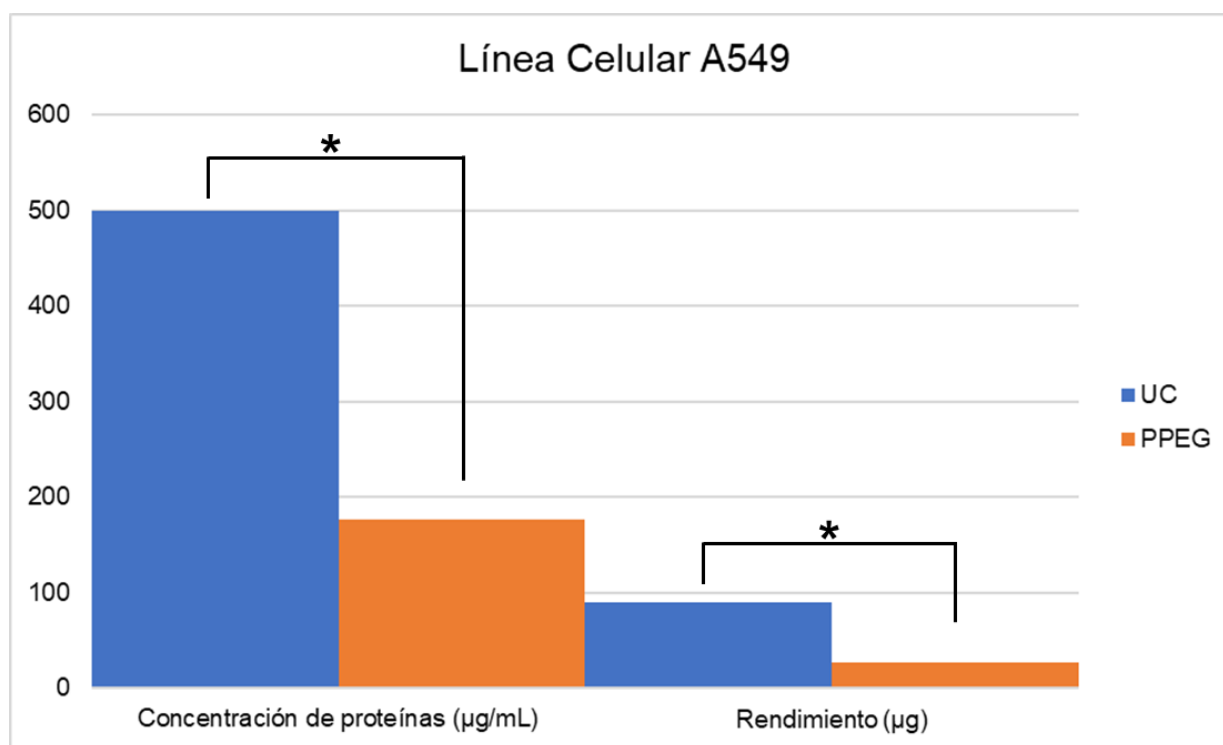


Figura 12. Gráfica de la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y el rendimiento (μg) promedio obtenidos por los métodos de purificación de ultracentrifugación (UC) y precipitación por polietilenglicol (PPEG) de las células de adenocarcinoma de pulmón (A549). *: Diferencia Significativa

Tabla 2. Concentraciones promedio de proteínas obtenidas de la línea celular NHLF por diferentes métodos de purificación de exosomas.

Método de purificación	Volumen inicial (mL)	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Rendimiento (μg)
UC	30	279.20	48.61
PPEG	30	221.50	40.20

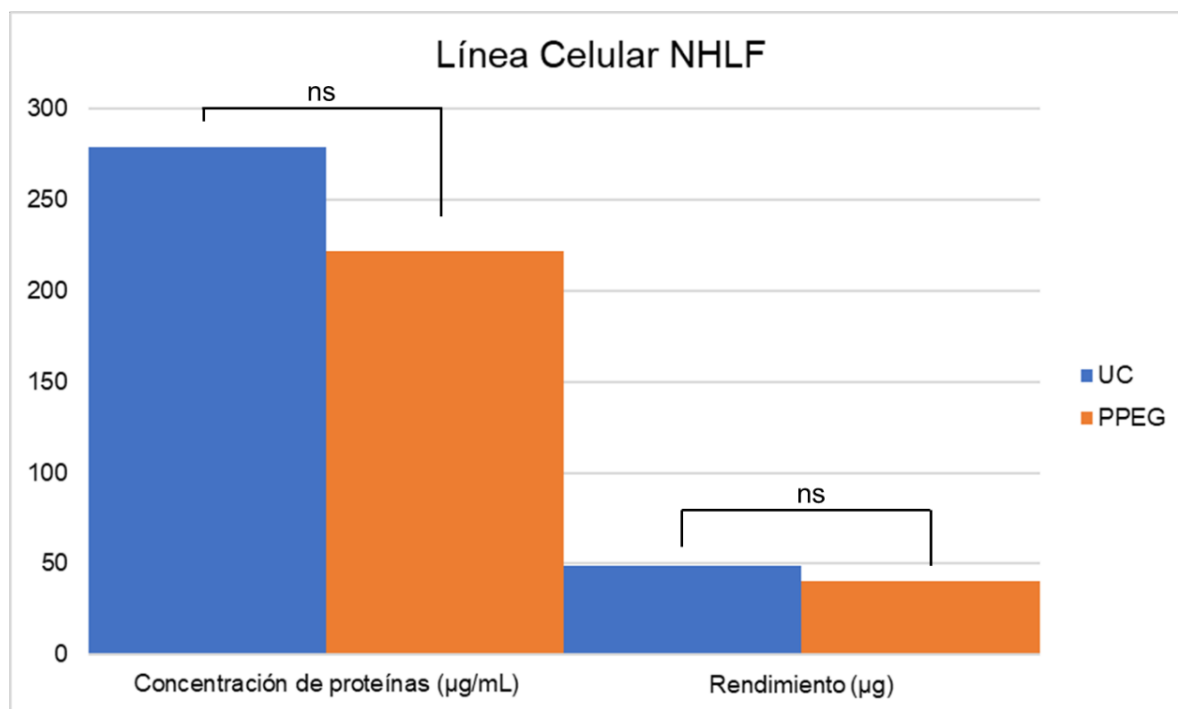


Figura 13. Gráfica de la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y el rendimiento (μg) promedio obtenidos por los métodos de purificación de ultracentrifugación (UC) y precipitación por polietilenglicol (PPEG) de los fibroblastos normales de pulmón humano (NHLF). ns: diferencia no significativa

El western blot reveló que, los pellets obtenidos al final de cada método de purificación de ambas líneas celulares se encontraban enriquecidos con los marcadores proteicos CD81 y β -tubulina. Al observar las figuras 14 y 15 notamos que el marcador de superficie CD81 se encuentra presente únicamente para el método de UC, pero no en el método de PPEG. Sin embargo, en el bandeado correspondiente al método PPEG perteneciente a la línea celular NHLF se ve de manera tenue una ligera sombra de una banda (Fig. 15). Cabe resaltar que el control de carga (β -actina) fue positivo para todos los casos mostrados (Fig. 14-15), lo que nos indica la especificidad para el anticuerpo probado para exosomas.

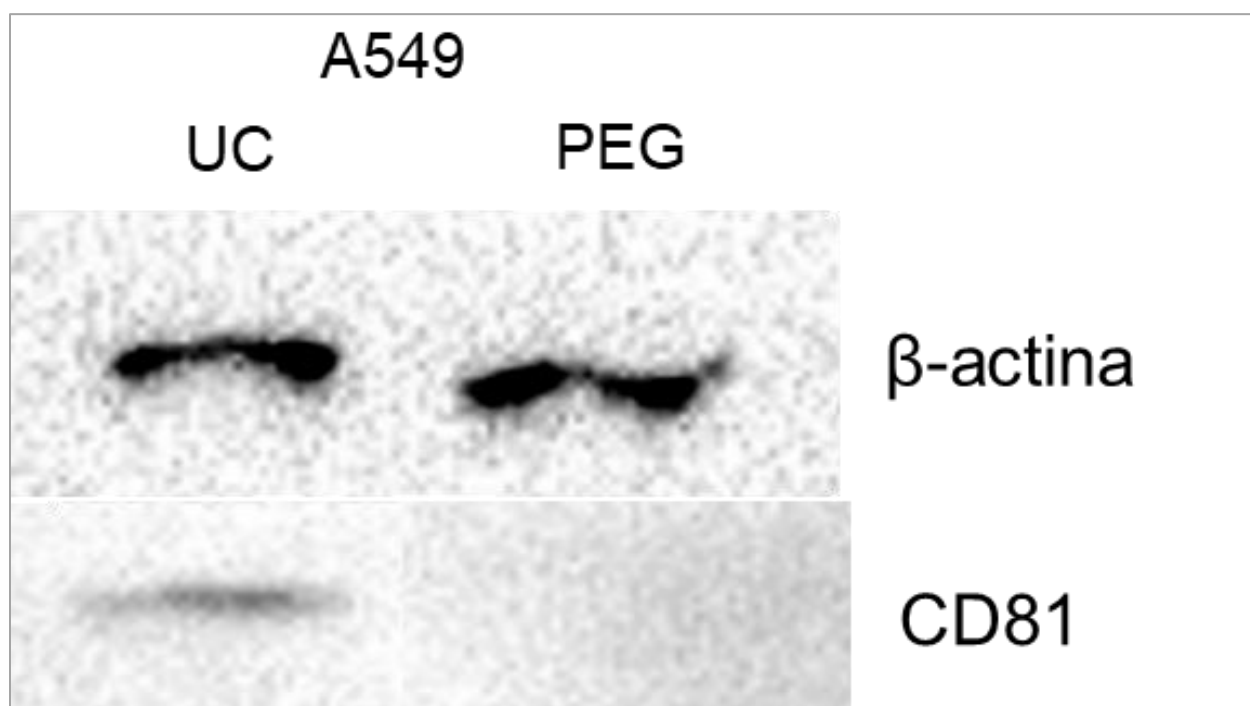


Figura 14. Expresión del marcador proteico exosomal CD81 en la línea celular A549 detectada mediante western blot.

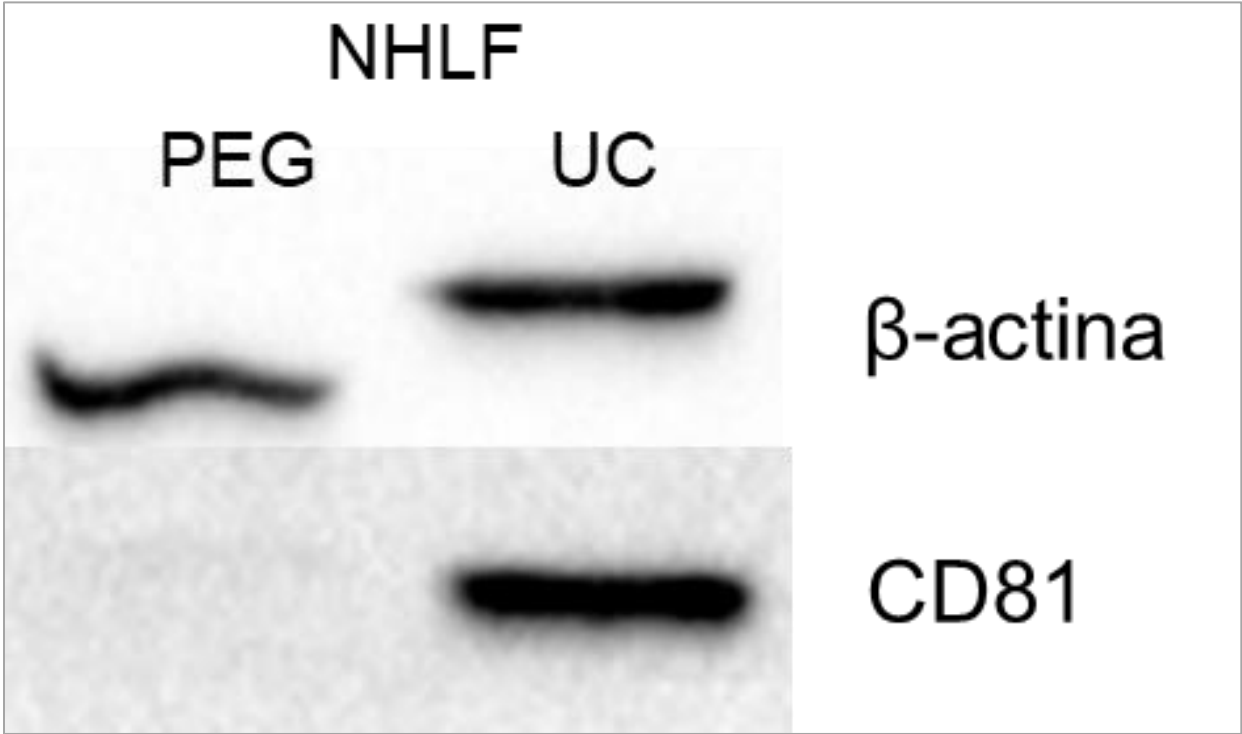


Figura 15. Expresión del marcador proteico exosomal CD81 en la línea celular NHLF detectada mediante western blot.

Finalmente, en el análisis estadístico realizado mediante la prueba U de Mann Whitney observamos que si existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los métodos de purificación evaluados, donde el método por UC sigue siendo el mejor método de purificación de exosomas.

En la figura 16 observamos que para línea celular A549 el método de UC es mejor para la purificación de exosomas ya que existió una diferencia significativa entre ambos métodos, con una $P < 0.05$, esto debido a que la línea celular A549 es un tipo celular epitelial cancerígena y la línea NHLF es una línea de fibroblastos normales, la cual tiene una morfología mayor a las células epiteliales. Por otro lado, en la figura 17 correspondiente a la línea celular NHLF no existe una diferencia significativa entre ambos métodos de purificación por lo que, no importa el método de purificación que se use, sin embargo, se obtiene una mayor concentración por UC.

Con respecto a las gráficas por método de purificación observamos que la línea celular A549 tiene mayor concentración proteica que la línea celular NHLF por el método de UC (Fig. 18), no obstante, al purificar mediante PPEG no existe diferencia significativa entre la concentración proteica exosomal obtenida de ambas líneas celulares (Fig.19).

La distribución fue analizada mediante las pruebas de Shapiro Wilks para verificar la normalidad. Las pruebas estadísticas usadas fueron U de Mann Whitney debido a la distribución muestral mediante el programa JASP y Statgraphics tomando como significancia una $P < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95%.

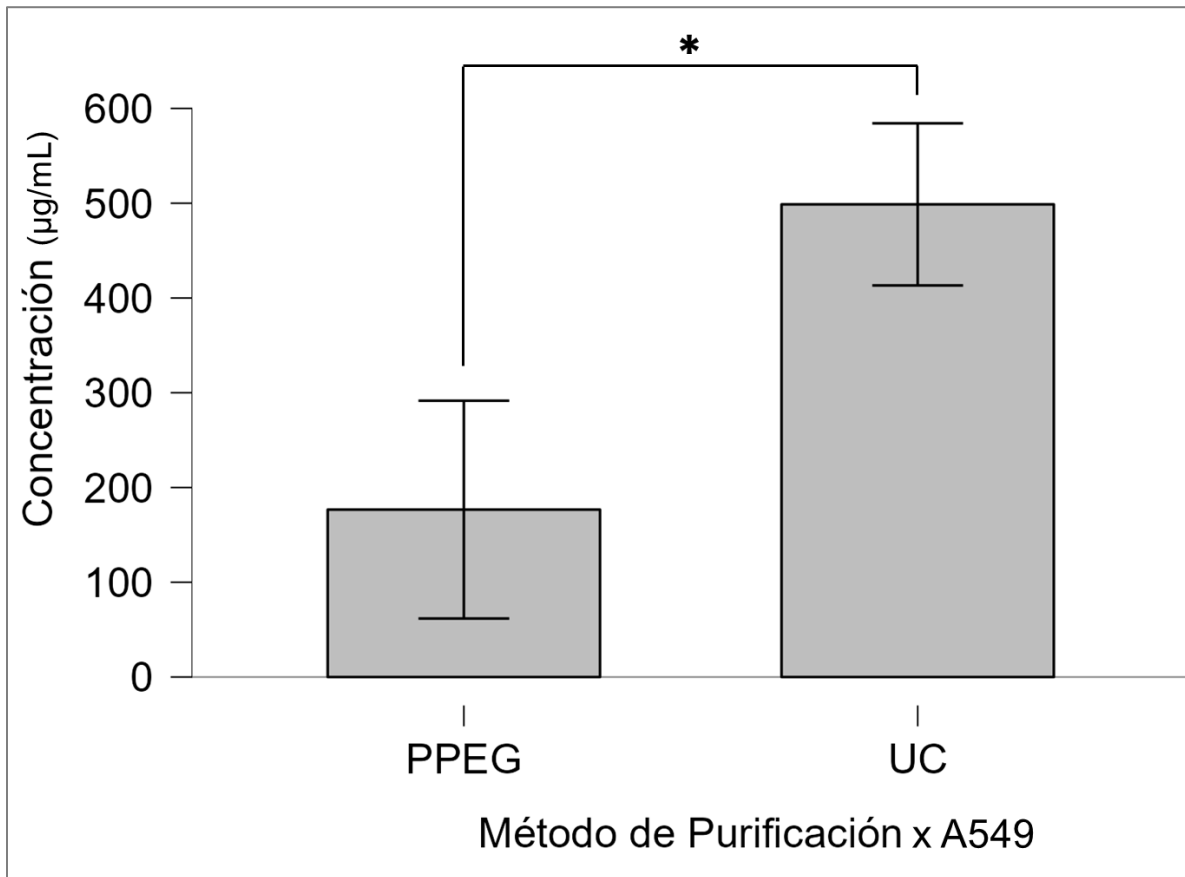


Figura 16. Concentración proteica total exosomal obtenida de la línea celular A549, mediante los métodos de purificación PPEG y UC.

PPEG: Precipitación por Polietilenglicol. UC: Ultracentrifugación. *: $P < 0.05$

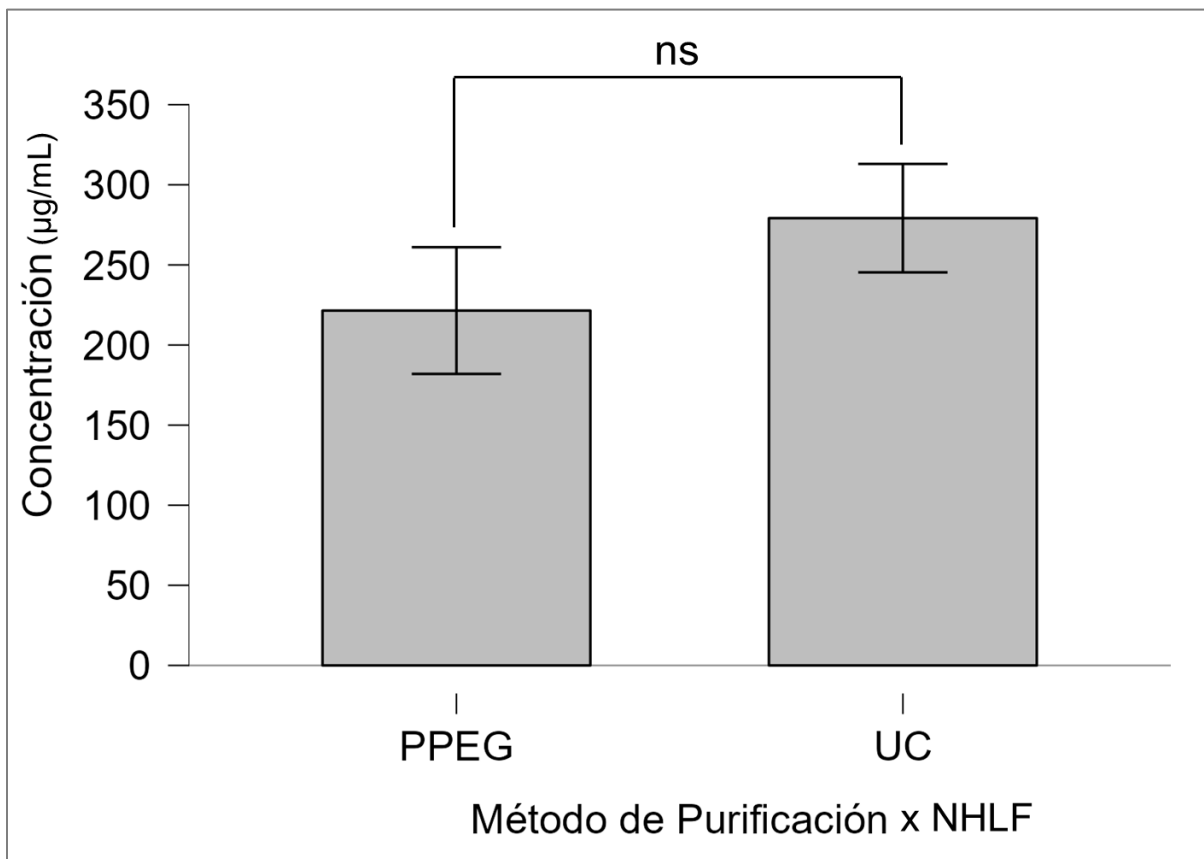


Figura 17. Concentración proteica total exosomal obtenida de la línea celular NHLF, mediante los métodos de purificación PPEG y UC.

PPEG: Precipitación por Polietilenglicol. UC: Ultracentrifugación. ns: no significativo

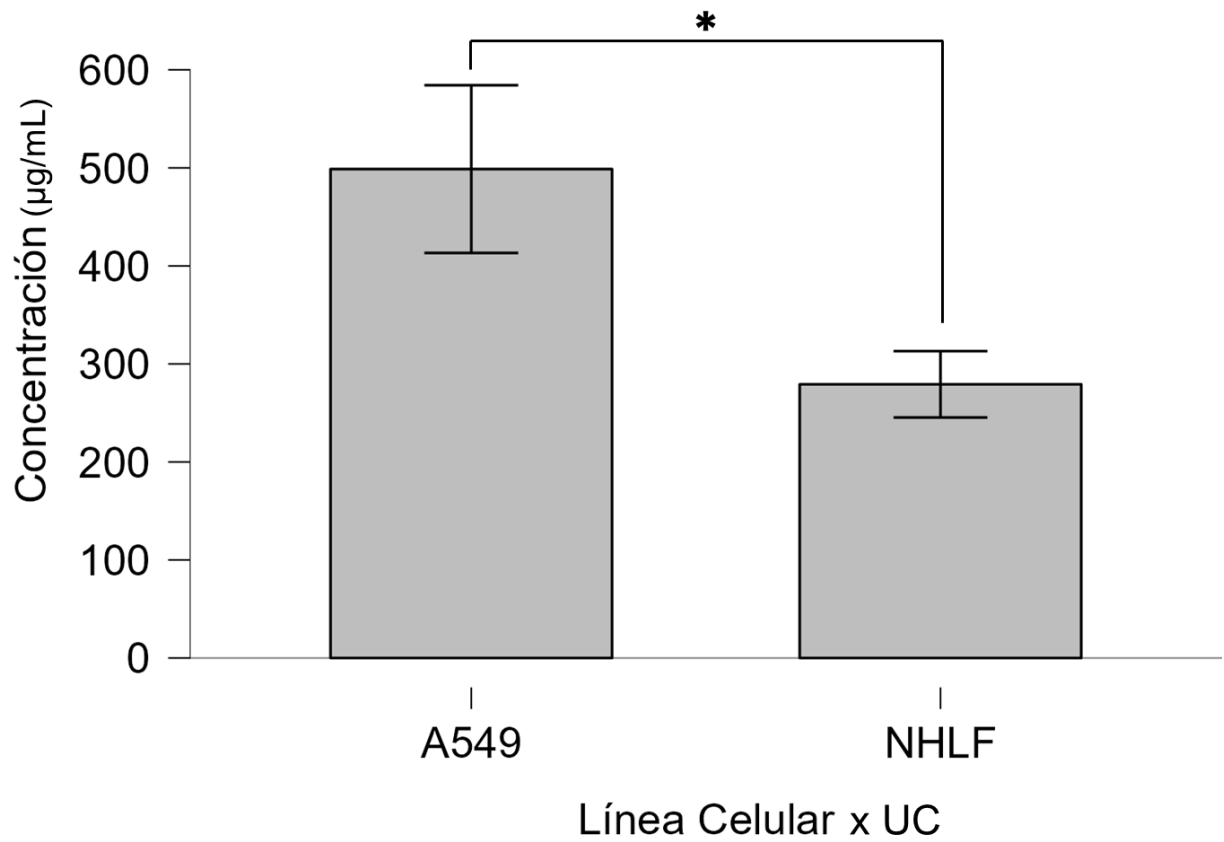


Figura 18. Concentración proteica total exosomal obtenida mediante el método de UC de la línea celular A549 y NHLF.
PEG: Precipitación por Polietilenglicol. UC: Ultracentrifugación. *: $P < 0.05$

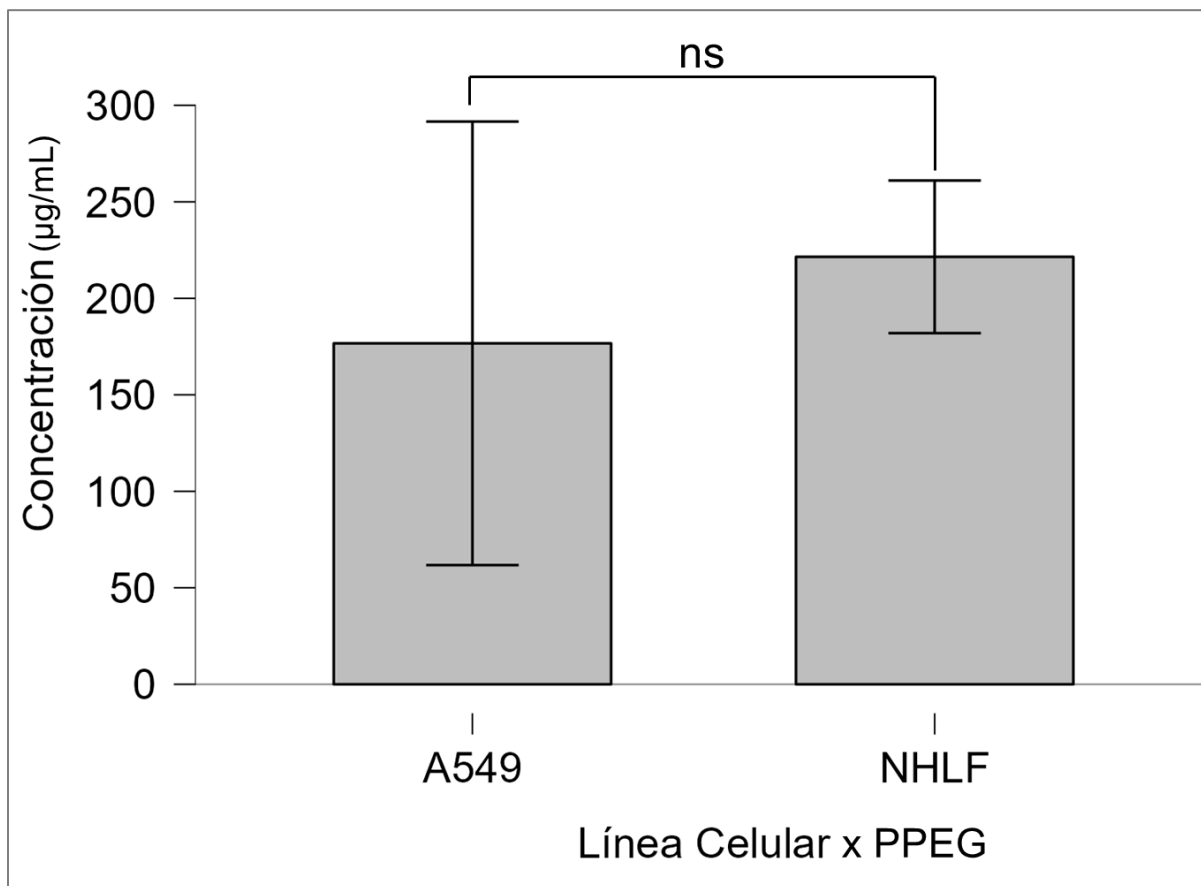


Figura 19. Concentración proteica exosomal obtenida mediante el método de PPEG de la línea celular A549 y NHLF.

PPEG: Precipitación por Polietilenglicol. UC: Ultracentrifugación. ns: no significativo

Discusión de Resultados

Los exosomas han ido tomando gran importancia en el área médica, debido a sus características de comunicadores celulares, por lo que, contar con métodos de purificación que garanticen mantener la integridad y calidad de estas vesículas, para estudiar su función sigue siendo una tarea bajo investigación. Es por esta razón que uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar dos líneas celulares, donde una de ellas es cancerígena (A549), la cual demostró tener mayor capacidad en la producción exosomas (Croce et al., 1999; Foster et al., 1998), a diferencia de la línea celular de pulmón normal (NHLF). Ya que como es bien sabido el cáncer es un crecimiento incontrolable de células, las cuales se comunican entre si mediante los exosomas, por lo tanto, existe una mayor liberación de estas vesículas (Bibaki et al., 2018; Goulet et al., 2018; Guo et al., 2017; Kalluri, 2016; Milane et al., 2015; Zhang et al., 2020), sin embargo, en nuestro caso no existió una diferencia significativa de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis estadístico (Fig. 19, 21) a excepción del caso de UC (Fig. 20).

Ahora bien, para la garantizar la obtención de los exosomas se deben cumplir con ciertos criterios de aprobación para ser considerados como puros de acuerdo con las guías publicadas por Théry et al., 2018. Algunos de estos criterios son que al menos deben ser positivos a 3 marcadores proteicos, así como caracterización individual en este caso por medio de MET. En nuestro trabajo no tuvimos la oportunidad de manejar tres anticuerpos diferentes debido a los altos costos de cada uno. Sin embargo, los resultados en la MET, nos dio la certeza de la pureza y calidad de los exosomas obtenidos.

Para la cuantificación de la concentración de los exosomas obtenidos se utilizó un kit comercial, el cual nos revela el contenido de proteínas totales, y no el número de vesículas. Si bien existen métodos que evalúan el número de partículas (exosomas) purificadas, como el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Grunt et al., 2020; Livshits et al., 2015), a la fecha sigue siendo válido el reporte de concentración total de proteínas para hacer un análisis comparativo más profundo (Greening et al., 2015; Jiao et al., 2020).

En la evaluación de los marcadores de superficie nosotros solo utilizamos uno (CD81) por cuestiones de economía. Sin embargo, de acuerdo con las guías MISEV, se deben utilizar como mínimo 3, y esto es debido a que a la fecha no existe un solo marcador que se considere específico para exosomas. De acuerdo con los resultados se puede observar que el método de PPEG es mucho menos efectivo en cuanto a pureza y rendimiento, en comparación con el de UC. Una de las razones que puede explicar dicho resultado es que en nuestro estudio solo probamos una concentración de PEG (8%), basándonos en estudios realizados por Lee et al., 2021 que nos indicaban que concentraciones mayores al 10% inhiben la detección de marcadores proteicos provocando también una disminución de RNA y miRNAs. Pero, por otro lado, este mismo autor menciona que la concentración ideal fue del 5% para su experimento. Por lo que, decidimos usar una concentración intermedia.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas, así como en el análisis estadístico, determinamos que el método de purificación mediante UC sigue siendo el más efectivo y confiable para la obtención de una mayor cantidad de exosomas (Fig. 16-19) con un valor de $P < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95%. Esto evidencia claramente que se debe seguir optimizando el método de PPEG, ya que el polietilenglicol que se usa para este método es el reactivo base de los kits comerciales. Nuestra propuesta, en base a la experiencia adquirida sobre el método de PPEG, es anular el uso de cloruro de sodio, ya que de acuerdo con Weng et al., 2016 esto podría deteriorar la capacidad del PEG en la red polimérica que forma. Y como ya fue mencionado, evaluar diferentes concentraciones de PEG que se utiliza, porque concentraciones arriba del 10% deteriora la morfología del exosoma, así como su contenido según Lee et al., 2021.

Finalmente, pero no menos importante, se deben de tomar en cuenta varias consideraciones durante el desarrollo de ambas metodologías. Una de ellas que ya ha sido reportada, es que el procedimiento debería realizarse siempre por la misma persona, sobre todo porque uno de los puntos críticos es la resuspensión del “pellet” obtenido en el paso final de cada método (Torres Crigna et al., 2021). El cual la mayoría de las veces suele ser no visible, por lo que, hay que tener cierta técnica para su

resuspensión. Además, el tipo de rotor que se use para su proceso, el almacenamiento y descongelamiento que se les dé a los exosomas antes de su uso, son otros de los puntos clave a considerar (Théry et al., 2018).

Conclusiones

Es de suma importancia como lo menciona la ISEV, que se busquen y estandaricen nuevos métodos de purificación para las vesículas, específicamente los exosomas que son poseedores de información de gran relevancia para varias enfermedades que no son detectables mediante estudios de laboratorio existentes. En este trabajo se volvió a comprobar que el método de purificación mediante UC sigue siendo la mejor opción para la obtención de exosomas, cabe destacar su adaptabilidad a cualquier fluido biológico o sobrenadante celular que se desee procesar. Por otro lado, el método de PPEG es una buena alternativa, sin embargo, se deben seguir evaluando las variables antes mencionadas para lograr un protocolo más eficiente. Es importante mencionar que de acuerdo con la literatura el método de UC sigue siendo el más utilizado en comparación con los demás existentes (Konoshenko et al., 2018).

Referencias bibliográficas

- Abels, E., & Xandra, B. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 301–312. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Admyre, C., Grunewald, J., Thyberg, J., Bripenäck, S., Tornling, G., Eklund, A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2003). Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *European Respiratory Journal*, 22(4), 578–583. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00041703>
- Alipoor, S. D., Mortaz, E., Garssen, J., Movassaghi, M., Mirsaeidi, M., & Adcock, I. M. (2016). Exosomes and Exosomal miRNA in Respiratory Diseases. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/5628404>
- Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., Agrawal, A. K., & Gupta, R. (2017). Exosomes for the Enhanced Tissue Bioavailability and Efficacy of Curcumin. *AAPS Journal*, 19(6), 1691–1702. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0154-9>
- Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., Agrawal, A. K., Kyakulaga, A. H., Wilcher, S. A., & Gupta, R. C. (2019). Milk exosomes - Natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Letters*, 449(January), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.011>
- Atienzar-Aroca, S., Flores-Bellver, M., Serrano-Heras, G., Martinez-Gil, N., Barcia, J. M., Aparicio, S., Perez-Cremades, D., Garcia-Verdugo, J. M., Diaz-Llopis, M., Romero, F. J., & Sancho-Pelluz, J. (2016). Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(8), 1457–1466. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12834>

- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Baixaui, F., López-Otín, C., & Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and autophagy: Coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Frontiers in Immunology*, *5*(AUG), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00403>
- Bibaki, E., Tsitoura, E., Vasarmidi, E., Margaritopoulos, G., Trachalaki, A., Koutoulaki, C., Georgopoulou, T., Spandidos, D. A., Tzanakis, N., & Antoniou, K. M. (2018). MiR-185 and miR-29a are similarly expressed in the bronchoalveolar lavage cells in IPF and lung cancer but common targets DNMT1 and COL1A1 show disease specific patterns. *Molecular Medicine Reports*, *17*(5), 7105–7112. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8778>
- Bister, N., Pistono, C., Huremagic, B., Jolkkonen, J., Giugno, R., & Malm, T. (2020). Hypoxia and extracellular vesicles: A review on methods, vesicular cargo and functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(1). <https://doi.org/10.1002/jev2.12002>
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic*, *12*(12), 1659–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>
- Caradec, J., Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Adomat, H., Gleave, M., & Guns, E. (2014). Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clinical Biochemistry*, *47*(13–14), 1286–1292. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011>

- Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1079–1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>
- Chang, M., Chang, Y. J., Chao, P. Y., & Yu, Q. (2018). Exosome purification based on peg-coated Fe₃O₄ Nanoparticles. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199438>
- Chen, B. Y., Sung, C. W. H., Chen, C., Cheng, C. M., Lin, D. P. C., Huang, C. te, & Hsu, M. Y. (2019). Advances in exosomes technology. *Clinica Chimica Acta*, *493*(December 2018), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.021>
- Chen, C., Skog, J., Hsu, C.-H., Lessard, R. T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B. S., Breakefield, X. O., Toner, M., & Irimia, D. (2010). Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip*, *10*(4), 505–511. <https://doi.org/10.1039/B916199F>
- Chen, J., Li, P., Zhang, T., Xu, Z., Huang, X., Wang, R., & Du, L. (2022). Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971>
- Cheng, Y., Qu, X., Dong, Z., Zeng, Q., Ma, X., Jia, Y., Li, R., Jiang, X., Williams, C., Wang, T., & Xia, W. (2020). Comparison of serum exosome isolation methods on co-precipitated free microRNAs. *PeerJ*, *8*, e9434. <https://doi.org/10.7717/peerj.9434>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *30*(1), 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>

- Croce, M. V., Colussi, A. G., Price, M. R., & Segal-Eiras, A. (1999). Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549). *Pathology and Oncology Research*, 5(3), 197–204. <https://doi.org/10.1053/paor.1999.0212>
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., & Mongini, C. (2015). Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00203>
- del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P., & López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 106(5), 1604–1611. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1095>
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, 243(2), 359–366. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172>
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J., & Hopkins, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *The Journal of Cell Biology*, 132(6), 1011–1023. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.6.1011>
- Gardiner, C., Vizio, D. di, Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>
- Goulet, C. R., Bernard, G., Tremblay, S., Chabaud, S., Bolduc, S., & Pouliot, F. (2018). Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF β signaling. *Molecular Cancer*

Research, 16(7), 1196–1204. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0784>

- Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., & Simpson, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: Evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1295). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_15
- Grunt, M., Failla, A. V., Stevic, I., Hillebrand, T., & Schwarzenbach, H. (2020). A novel assay for exosomal and cell-free miRNA isolation and quantification. In *RNA Biology* (Vol. 17, Issue 4). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1721204>
- Guiot, J., Struman, I., Louis, E., Louis, R., Malaise, M., & Njock, M.-S. (2019). Exosomal miRNAs in Lung Diseases: From Biologic Function to Therapeutic Targets. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1345. <https://doi.org/10.3390/jcm8091345>
- Guo, D., Chen, Y., Wang, S., Yu, L., Shen, Y., Zhong, H., & Yang, Y. (2018). Exosomes from heat-stressed tumour cells inhibit tumour growth by converting regulatory T cells to Th17 cells via IL-6. *Immunology*, 154(1), 132–143. <https://doi.org/10.1111/imm.12874>
- Guo, W., Gao, Y., Li, N., Shao, F., Wang, C., Wang, P., Yang, Z., Li, R., & He, J. (2017). Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncology Reports*, 38(2), 665–675. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5714>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
- Ha, D., Yang, N., & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current

perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>

Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>

He, C., Zheng, S., Luo, Y., & Wang, B. (2018). Exosome theranostics: Biology and translational medicine. *Theranostics*, 8(1), 237–255. <https://doi.org/10.7150/thno.21945>

Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>

Hoefel, G., Tay, H., & Foster, P. (2019). MicroRNAs in Lung Diseases. In *Chest* (Vol. 156, Issue 5, pp. 991–1000). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.06.008>

Huang, L., Rong, Y., Tang, X., Yi, K., Qi, P., Hou, J., Liu, W., He, Y., Gao, X., Yuan, C., & Wang, F. (2022). Engineered exosomes as an in situ DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer. *Molecular Cancer*, 21(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01515-x>

Humphreys, M. R., & Reinberg, Y. E. (2005). Contemporary and emerging drug treatments for urinary incontinence in children. *Pediatric Drugs*, 7(3), 151–162. <https://doi.org/10.2165/00148581-200507030-00002>

Ingham, K. C. (1984). Protein Precipitation with Polyethylene Glycol. *Methods in Enzymology*, 104(C), 351–356. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)04101-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)04101-X)

Jiao, R., Sun, S., Gao, X., Cui, R., Cao, G., Wei, H., Wang, S., Zhang, Z., & Bai, H. (2020). A polyethylene glycol-based method for enrichment

of extracellular vesicles from culture supernatant of human ovarian cancer cell line a2780 and body fluids of high-grade serous carcinoma patients. *Cancer Management and Research*, 12, 6291–6301. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S228288>

Ju, Y., Bai, H., Ren, L., & Zhang, L. (2021). The role of exosome and the escrt pathway on enveloped virus infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169060>

Juan, T., & Fürthauer, M. (2018). Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 74, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.022>

Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1208–1215. <https://doi.org/10.1172/JCI81135>

Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>

Kamikawaji, K., Seki, N., Watanabe, M., Mataka, H., Kumamoto, T., Takagi, K., Mizuno, K., & Inoue, H. (2016). Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by antitumor microRNA-29a in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Human Genetics*, 61(12), 985–993. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.99>

Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*, 107(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.09.005>

Killington, R. A., Stokes, A., & Hierholzer, J. C. (1996). Virus purification. In *Virology Methods Manual* (pp. 71–89).

Kim, Hong, Lim, Koh, Jang, & Huh. (2019). The Role of Exosomes in Bronchoalveolar Lavage from Patients with Acute Respiratory Distress

Syndrome. *Journal of Clinical Medicine*, 8(8), 1148.
<https://doi.org/10.3390/jcm8081148>

Kimiz-Gebologlu, I., & Oncel, S. S. (2022). Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake. *Journal of Controlled Release*, 347(May), 533–543.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.027>

Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/8545347>

Kubo, H. (2018). Extracellular Vesicles in Lung Disease. *Chest*, 153(1), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.06.026>

Kumar, D. N., Chaudhuri, A., Aqil, F., Dehari, D., Munagala, R., Singh, S., Gupta, R. C., & Agrawal, A. K. (2022). Exosomes as Emerging Drug Delivery and Diagnostic Modality for Breast Cancer: Recent Advances in Isolation and Application. *Cancers*, 14(6).
<https://doi.org/10.3390/cancers14061435>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003>

Lakkaraju, A., & Rodriguez-Boulan, E. (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends in Cell Biology*, 18(5), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.03.002>

- Lee, H., He, X., Ni, K., Carnino, J. M., & Jin, Y. (2021). Low concentration of polyethylene glycol facilitates separation of extracellular vesicles from bronchoalveolar lavage fluid. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 320(4), L522–L529. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00318.2020>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Livshts, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., & Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*, 5(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep17319>
- Ludwig, A. K., De Miroschedji, K., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B. B., Jastrow, H., Kuhlmann, J. D., El Magraoui, F., Meyer, H. E., Hermann, D. M., Opalka, B., Raunser, S., Eppele, M., ... Giebel, B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1528109>
- Ludwig, A. K., & Giebel, B. (2012). Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.005>
- Manfredi, F., Bonito, P. di, Arenaccio, C., Anticoli, S., & Federico, M. (2016). *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools*. 1448, 249–260. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3753-0>

- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- McGough, I. J., & Vincent, J. P. (2016). Exosomes in developmental signalling. *Development (Cambridge)*, 143(14), 2482–2493. <https://doi.org/10.1242/dev.126516>
- Milane, L., Singh, A., Mattheolabakis, G., Suresh, M., & Amiji, M. M. (2015). Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 219). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.029>
- Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., Nagaeva, O., & Dehlin, E. (2016). Isolation and characterization of exosomes from cultures of tissue explants and cell lines. *Current Protocols in Immunology*, 2016(November), 14.42.1-14.42.21. <https://doi.org/10.1002/cpim.17>
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., Saracoglu, E., Skog, J., & Kuo, W. P. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological Chemistry*, 394(10), 1253–1262. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141>
- Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., Agrawal, A. K., Mudd, A. M., Kyakulaga, A. H., Singh, I. P., Vadhanam, M. V., & Gupta, R. C. (2017). Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types. *Cancer Letters*, 393(5), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.004>
- Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., & Gupta, R. C. (2016). Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*, 371(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.020>

- Negrete-García, M. C., de Jesús Ramos-Abundis, J., Alvarado-Vasquez, N., Montes-Martínez, E., Montañó, M., Ramos, C., & Sommer, B. (2022). Exosomal Micro-RNAs as Intercellular Communicators in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911047>
- Njock, M. S., Guiot, J., Henket, M. A., Nivelles, O., Thiry, M., Dequiedt, F., Corhay, J. L., Louis, R. E., & Struman, I. (2018). Sputum exosomes: Promising biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, D, 309–312. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211897>
- Patil, A. A., & Rhee, W. J. (2019). Exosomes: Biogenesis, Composition, Functions, and Their Role in Pre-metastatic Niche Formation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(5), 689–701. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0170-y>
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, G., & Marsh, M. (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends in Microbiology*, 12(7), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.004>
- Purushothaman, A. (2019). Exosomes from cell culture-conditioned medium: Isolation by ultracentrifugation and characterization. *Methods in Molecular Biology*, 1952, 233–244. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9133-4_19
- Radaev, S., Li, S., & Sun, P. D. (2006). A survey of protein-protein complex crystallizations. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(6), 605–612. <https://doi.org/10.1107/S0907444906011735>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., & Desaymard, C. (1997). Accumulation of Major Histocompatibility

Complex Class II Molecules in Mast Cell Secretory Granules and Their Release upon Degranulation. *Molecular Biology of the Cellular Biology*, 8(December), 2631–2645.

Rider, M. A., Hurwitz, S. N., & Meckes, D. G. (2016). ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Scientific Reports*, 6(April), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep23978>

Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 195–208. <https://doi.org/10.1038/nri3622>

Rupani, H., Sanchez-Elsner, T., & Howarth, P. (2013). MicroRNAs and respiratory diseases. In *European Respiratory Journal* (Vol. 41, Issue 3, pp. 695–705). <https://doi.org/10.1183/09031936.00212011>

Sanderson, R. D., Bandari, S. K., & Vlodaysky, I. (2019). Proteases and glycosidases on the surface of exosomes: Newly discovered mechanisms for extracellular remodeling. *Matrix Biology*, 75–76, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.007>

Schmidt, O., & Teis, D. (2012). The ESCRT machinery. *Current Biology*, 22(4), R116–R120. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>

Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871–881. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>

Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid.

Analytical Biochemistry, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

Tang, Y. T., Huang, Y. Y., Zheng, L., Qin, S. H., Xu, X. P., An, T. X., Xu, Y., Wu, Y. S., Hu, X. M., Ping, B. H., & Wang, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 834–844. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>

Taylor, D. D., Zacharias, W., & Gercel-Taylor, C. (2011). Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods in Molecular Biology*, 728(1), 235–246. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-068-3_15

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3.22.1-3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). 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. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Tian, Y., Gong, M., Hu, Y., Liu, H., Zhang, W., Zhang, M., Hu, X., Aubert, D., Zhu, S., Wu, L., & Yan, X. (2020). Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1697028>

- Torres Crigna, A., Fricke, F., Nitschke, K., Worst, T., Erb, U., Karremann, M., Buschmann, D., Elvers-Hornung, S., Tucher, C., Schiller, M., Hausser, I., Gebert, J., & Bieback, K. (2021). Inter-Laboratory Comparison of Extracellular Vesicle Isolation Based on Ultracentrifugation. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *48*(1), 48–59. <https://doi.org/10.1159/000508712>
- Trajkovic, K. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, *320*(5873), 179. <https://doi.org/10.1126/science.320.5873.179>
- Umezu, T., Tadokoro, H., Azuma, K., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K., & Ohyashiki, J. H. (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*, *124*(25), 3748–3757. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-576116>
- Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2013). Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, *4*(2), 152–170. <https://doi.org/10.3390/genes4020152>
- Ventimiglia, L. N., & Alonso, M. A. (2016). Biogenesis and function of T cell-derived exosomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00084>
- Vlassov, A. v., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1820*(7), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017>
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2016). Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell

culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 141(15), 4640–4646. <https://doi.org/10.1039/c6an00892e>

Williams, R. L., & Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 355–368. <https://doi.org/10.1038/nrm2162>

Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>

Wu, P., Zhang, B., Ocansey, D. K. W., Xu, W., & Qian, H. (2021). Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. *Biomaterials*, 269, 120467. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120467>

Yang, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, L., Zhuang, Z., Wei, M., Deng, X., Wang, Z., & Han, J. (2021). The Key Role of Exosomes on the Pre-metastatic Niche Formation in Tumors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.703640>

Yao, M. Y., Zhang, W. H., Ma, W. T., Liu, Q. H., Xing, L. H., & Zhao, G. F. (2019). microRNA-328 in exosomes derived from M2 macrophages exerts a promotive effect on the progression of pulmonary fibrosis via FAM13A in a rat model. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(6). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0255-x>

Yuana, Y., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2013). Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Reviews*, 27(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.002>

Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. v. (2015). Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4), 319–323. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074476>

Zhang, Y., Liu, Z., Li, S., Wang, M., Dai, D., Jing, H., & Liu, L. (2020). Upregulation of E-cadherin in bronchoalveolar lavage fluid-derived exosomes in patients with lung cancer. *Thoracic Cancer*, 11(1), 41–47. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13220>

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., ... Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 4, 594–600.

APÉNDICE

A. Reactivos y Soluciones

1. Medio DMEM con SFB al 10%

A 89 mL de medio DMEM (Gibco) se les suplementó con 1 mL de antibiótico-antimicótico (penicilina 10,000 U/estreptomicina 10 mg/anfotericina B 10 µg por mL; Gibco) y 10 mL de SFB (Gibco) descomplementado, para obtener un volumen final de 100 mL, en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso.

2. Medio DMEM-F12 con suero fetal bovino (SFB) al 10%

A 89 mL de medio DMEM-F12 (Gibco) se les suplementó con 1 mL de antibiótico-antimicótico (penicilina 10,000 U/estreptomicina 10 mg/anfotericina B 10 µg por mL; Gibco) y 10 mL de SFB (Gibco) descomplementado (ver apéndice B.2), para obtener un volumen final de 100 mL, en condiciones de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso.

3. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X

Se disolvieron 80 g de Cloruro de Sodio (NaCl/J.T. Baker), 2 g de Cloruro de Potasio (KCl/ J.T. Baker), 14.4 g de Fosfato de Sodio (Na₂HPO₄/Sigma Aldrich) y 2.4 g de Fosfato de potasio (KH₂PO₄/Sigma Aldrich) en 500 mL de agua destilada estéril y se llevó a un volumen final de 1000 mL, para obtener una solución 10X; se midió el pH y se ajustó a 7.2. Se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 µm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

Se atemperó y se midieron 100 mL del PBS 10X se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua destilada estéril, para obtener una solución 1X; se midió el pH y se ajustó a 7.2. Se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 µm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

4. Solución 1M de cloruro de sodio (NaCl)

Se colocaron 5.84 g de NaCl (Sigma Aldrich) en un matraz aforado de 100 mL, después se añadió agua destilada estéril hasta llegar al volumen marcado en el matraz.

5. Solución Madre de PEG 6000 2X

Se disolvieron 3.2 g de PEG 6000 (Sigma Aldrich) en 20 mL de la solución 1M de NaCl. Se filtró en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22 μm y se conservó a 4 °C hasta su uso.

6. Acrilamida/Bis-acrilamida 30%

Se disolvieron 8.76 g de acrilamida (BioRad) y 0.24g de Bis-acrilamida (Sigma Aldrich) en 30 mL de agua destilada. Se filtró mediante papel filtro y se conservó en oscuridad a 4°C hasta su uso.

7. TRIS 0.5M, pH 6.8

Se disolvieron 3.025 g de TRIS (BioRad) en 30 mL de agua destilada, se midió y ajustó el pH a 6.8. Se aforo a 50 mL y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

8. TRIS 1.5M, pH 8.8

Se disolvieron 9.085 g de TRIS (BioRad) en 30 mL de agua destilada, se midió y ajustó el pH a 8.8. Se aforo a 50 mL y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

9. Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 10%

Se disolvieron 5 g de SDS en 50 mL de agua destilada y se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.

10. Persulfato de Amonio 10%

Se disolvieron 0.025 g de persulfato de amonio en 250 μL de agua destilada, se agitó y se usó al momento.

11. Buffer de corrida 1X

Se disolvieron 15 g de TRIS y 72 g de glicina en 450 mL de agua destilada y se llevó a un volumen final de 500 mL, para obtener una solución 10X, se conservó a 4°C hasta su uso.

Se midieron 100 mL de buffer de corrida 10X, que fueron añadidos a 890 mL de agua destilada junto con 10 mL de SDS 10%, para obtener una solución 1X; se almacenó a 4°C hasta su uso.

12. Solución de Bloqueo

Se disolvieron 2.5 g de leche libre de grasa en 50 mL de BSA 1%, se agitó y se usó al momento.

13. Diluyente de anticuerpo

Se disolvió 1g de albumina serica bovina en 90 mL de PBS-T, se midió y ajustó pH a 7.4, se aforó a 100 mL, se almacenó a 4°C hasta su uso.

14. Albúmina de suero bovino (BSA) al 1%

Se disolvió 5 g de albúmina bovina (BSA, Equitech-Bio) y 250 µL de Tween 20 en 450 mL de PBS 1X, se llevó a un volumen final de 500 mL con PBS 1X, se conservó a 4°C hasta su uso.

15. PBS-Tween (PBS-T) al 0.05%

Se disolvieron 500 µL de Tween 20 (Sigma Aldrich) en 700 mL de PBS 1X, se llevó a un volumen final de 1000 mL y se conservó a 4 °C hasta su uso.

16. Buffer de Transferencia

Se disolvieron 3.03 g de TRIS y 14.4 g de glicina en 500 mL de agua destilada, se adicionaron también 200 mL de metanol y se aforó a 1 L. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

B. Técnicas

1. Tripsinización

Toda solución que estuvo en contacto con los cultivos celulares primarios y la línea celular A549 o NHLF según el caso, fueron atemperadas a 37 °C. La monocapa celular se lavó 3 veces con 14 mL de PBS 1X, se le adicionó 2 mL de tripsina 1X e incubó a 37°C, 5% de CO₂ Y 100% de humedad durante 3 minutos. Transcurrido el tiempo se observó la monocapa en el microscopio invertido (10X) para verificar que las células se hubieran desprendido; sino no era así se le daban pequeños golpecitos en la base de la caja para mejorar su desprendimiento. Se adicionó 10 mL del medio correspondiente con SFB al 10% al cultivo o 10 mL de medio DMEM-F12 sin RF al cultivo de células sincronizadas (A549 o NHLF), se recolectó la suspensión celular y se pasó a un tubo de 15 mL estéril y se centrifugó la suspensión celular a 1300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y resuspendió el pellet celular en 5 mL del medio correspondiente para resembrar y/o contar las células.

2. Descomplementación de SFB

El SFB congelado (-20 °C) se atemperó 4 horas antes a 4°C y después se atemperó en baño de agua a temperatura ambiente. Se inició el calentamiento en el baño de agua hasta que llegó a 56 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos con agitación suave cada 10 minutos (se verificó la temperatura con un termómetro en el baño maría). Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se realizaron alícuotas en esterilidad y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

*RF: Rojo de Fenol

C. Micrografías

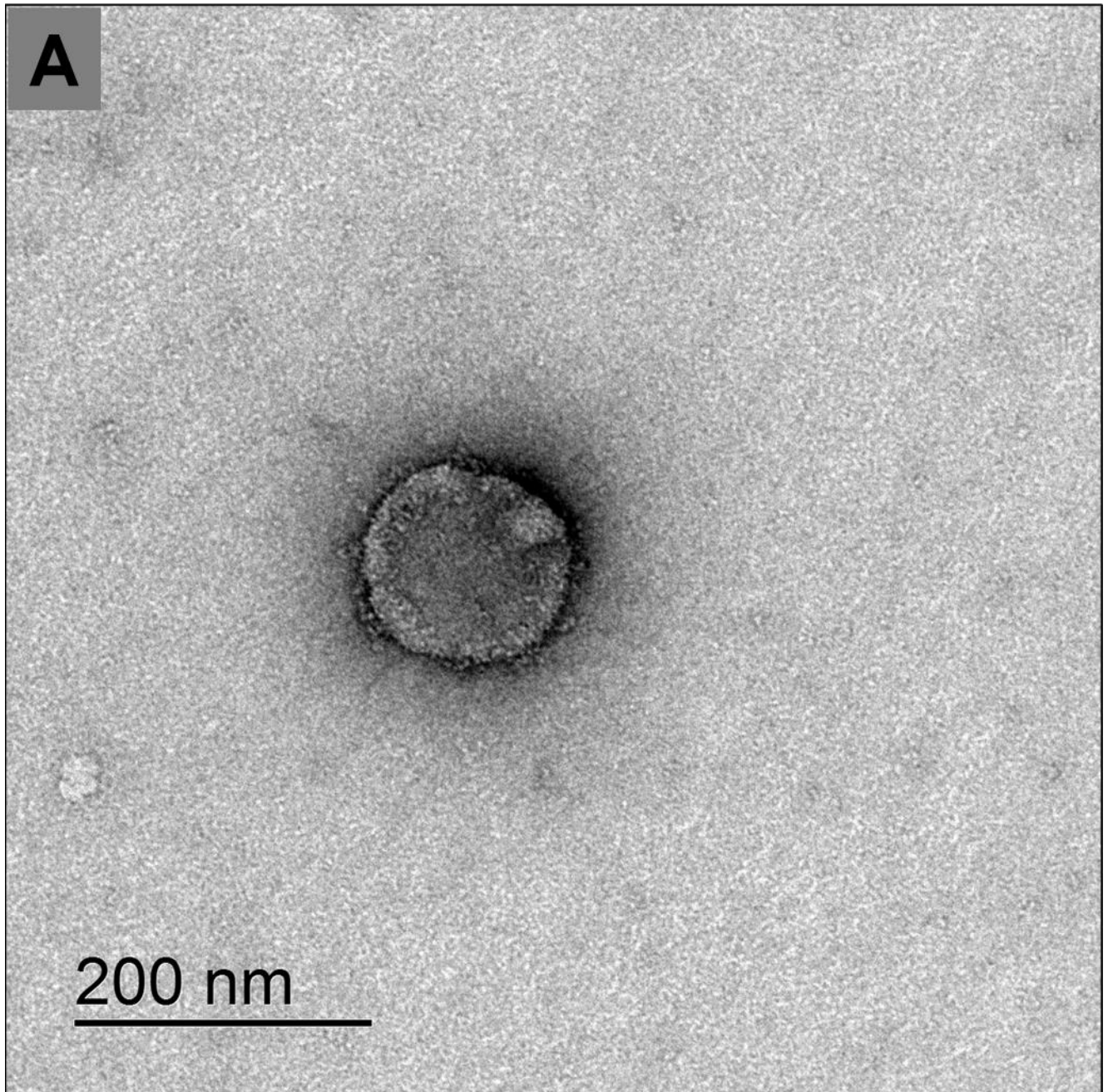


Figura 9A. Micrografía de exosoma de línea celular NHLF, derivado del método de purificación UC

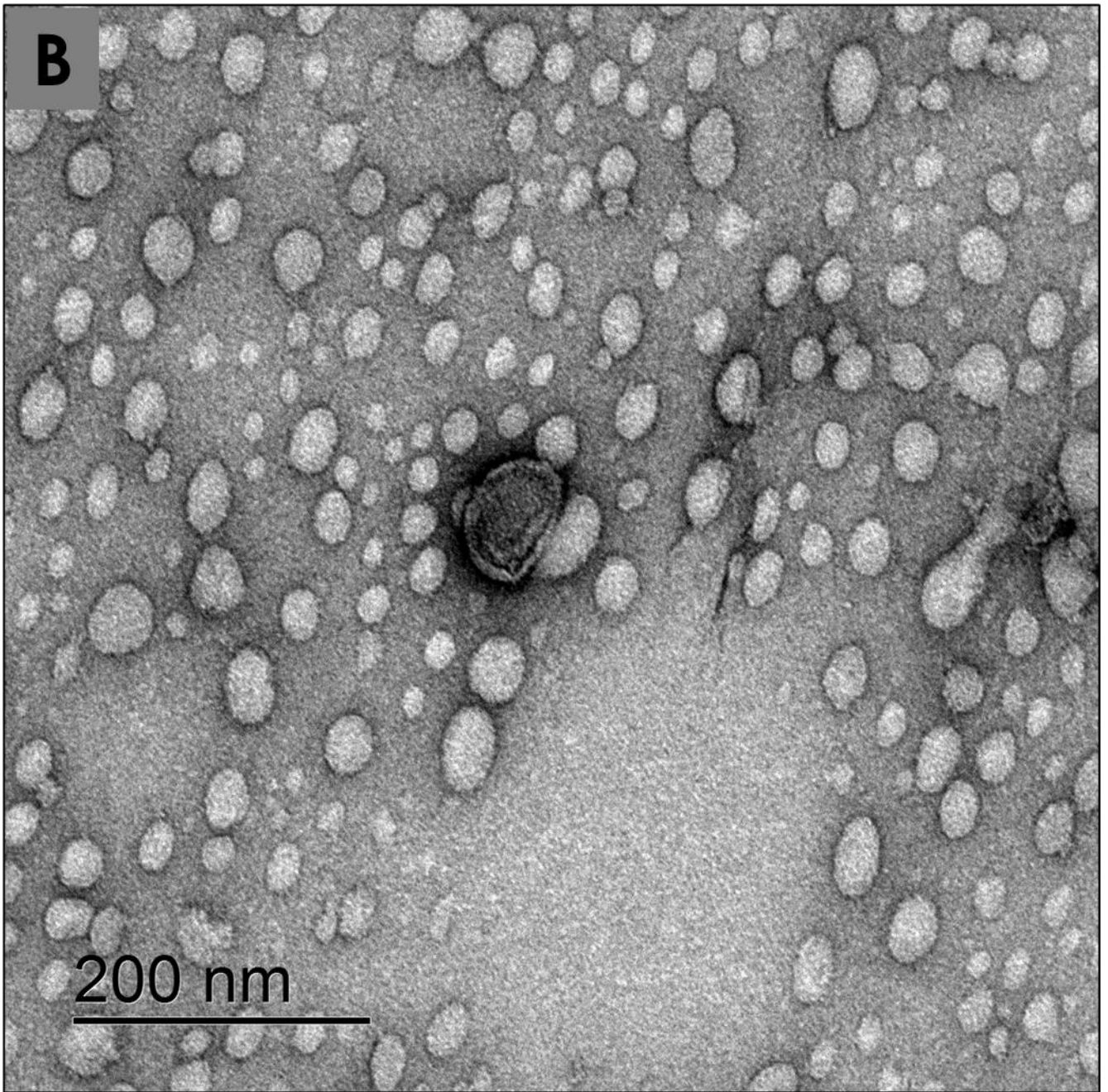


Figura 9B. Micrografía de exosoma de línea celular NHLF, derivado del método de purificación UC

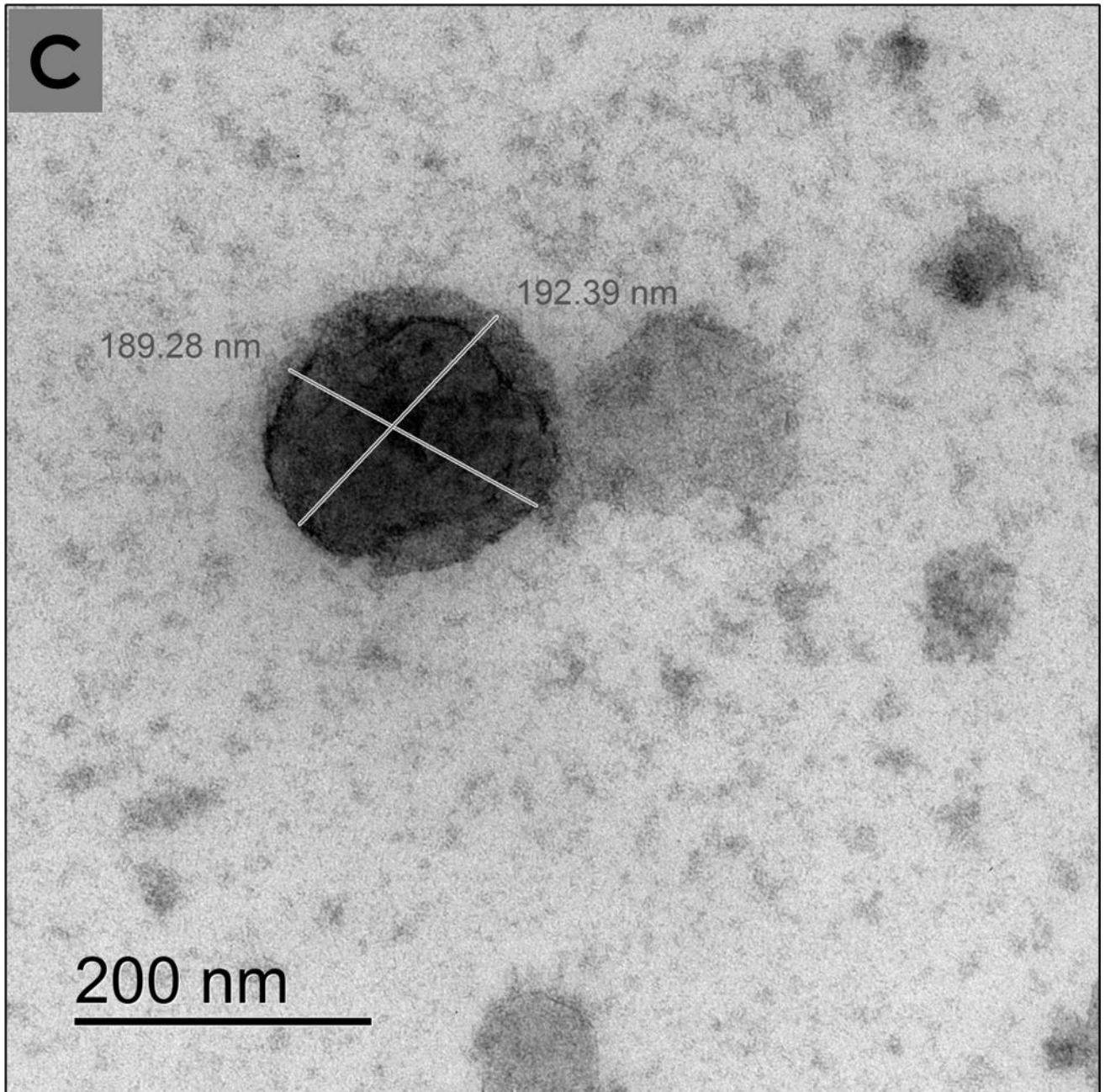


Figura 9C. Micrografía de exosoma de línea celular NHLF, derivado del método de purificación UC.