



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en

Salud Global

Estudio comparativo de dos métodos de aislamiento de exosomas en plasma humano para la búsqueda de biomarcadores en sarcopenia

Comparative study of two methods for isolating exosomes in human plasma for the research for biomarkers in sarcopenia

Autor/es

Paula Aparicio Berdejo

Director/es

Rosario Osta Pinzolas
Raquel Manzano Martínez

Facultad de Veterinaria

2020/2021

Índice

I.	Resumen.....	Pág. 2
II.	Abstract	Pág. 2
III.	Introducción.....	Pág. 3
	1. Sarcopenia: Causas, Epidemiología y Prevalencia, Consecuencias.....	Pág. 3
	2. Métodos clásicos para la detección y el diagnóstico de la sarcopenia..	Pág. 6
	3. Exosomas: Descripción, Aplicaciones y Métodos de Aislamiento.....	Pág. 10
	4. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Size-exclusion Chromatography, SEC).....	Pág. 17
IV.	Justificación	Pág. 20
V.	Objetivos	Pág. 21
VI.	Metodología	Pág. 22
	1. Toma de muestras de plasma sanguíneo.....	Pág. 22
	2. Aislamiento de exosomas del plasma humano mediante SEC.....	Pág. 22
	3. Ensayo de proteína BCA.....	Pág. 28
	4. Análisis proteómico mediante espectrometría de masas.....	Pág. 28
	5. Análisis bioinformático de los resultados.....	Pág. 28
VII.	Resultados.....	Pág. 29
	1. Método 1: SEC acoplado a ultrafiltración única	Pág. 29
	2. Método 2: SEC acoplado a doble ultrafiltración.....	Pág. 29
	3. Comparación entre ambos métodos.....	Pág. 30
VIII.	Discusión	Pág. 34
IX.	Conclusiones.....	Pág. 38
X.	Conclusions	Pág. 38
XI.	Bibliografía	Pág. 39

I. Resumen

La sarcopenia, la pérdida gradual y generalizada de la masa y función muscular con el envejecimiento, es uno de los principales problemas de salud en personas mayores, dada su alta prevalencia y enormes implicaciones clínicas y socioeconómicas.

El plasma sanguíneo es una fuente mínimamente invasiva para descubrir biomarcadores de proteínas para el diagnóstico, seguimiento y evaluación de respuestas terapéuticas en enfermedades. Centrar el análisis en los exosomas, un subtipo de vesículas extracelulares (VE) contenidas en el plasma, es una nueva posibilidad de diagnóstico, que permite el análisis de biomarcadores proteicos a pesar de la complejidad del plasma. Un tamaño y morfología similar dificultan la diferenciación entre los exosomas y el resto de subtipos de VE y proteínas plasmáticas. La búsqueda de un método adecuado que permita una buena separación de los subtipos de VE supone un importante paso para la utilización de los mismos como biomarcadores.

El **objetivo de este trabajo** fue poner a punto un método de extracción de exosomas de plasma humano con la mayor pureza posible basado en la Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) para, en un futuro, estudiar su aplicación a la búsqueda de biomarcadores para la sarcopenia. Para ello, tras realizar dos métodos distintos, evaluamos las diferencias en la abundancia de proteínas y la contaminación de la muestra según la caracterización del proteoma por espectrometría de masas (MS) y su comparación con las bases de datos existentes.

Los resultados muestran que la combinación de SEC con el uso de dos filtros podría mejorar significativamente la pureza y disminuir la contaminación en base al análisis del perfil proteómico de los exosomas derivados de plasma aislados por este método dada la disminución de contaminantes comunes, como las lipoproteínas y las cadenas de inmunoglobulinas.

II. Abstract

Sarcopenia, the gradual and generalised loss of muscle mass and function with ageing, is one of the major health problems in older people, given its high prevalence and enormous clinical and socio-economic implications.

Blood plasma is a minimally invasive source for discovering protein biomarkers for the diagnosis, monitoring and evaluation of therapeutic responses in diseases. Focusing the analysis on exosomes, a subtype of extracellular vesicles (EVs) contained in plasma, is a new diagnostic possibility, allowing the analysis of protein biomarkers despite the complexity of plasma. Similar size and morphology make it difficult to differentiate exosomes from other EV subtypes and plasma proteins. The search for a suitable method that allows a good separation of EV subtypes is an important step towards the use of EVs as biomarkers.

The aim of this work was to develop a method for extracting exosomes from human plasma with the highest possible purity based on SEC (Size Exclusion Chromatography) in order to, in the future, study its application to the search for biomarkers for sarcopenia. To this end, after performing two different methods, we evaluated the differences in protein abundance and sample contamination according to the characterisation of the proteome by mass spectrometry (MS) and its comparison with existing databases.

The results show that the combination of SEC with the use of two filters could significantly improve purity and decrease contamination based on the analysis of the proteomic profile of plasma-derived exosomes isolated by this method given the decrease of common contaminants, such as lipoproteins and immunoglobulin chains.

III. Introducción

1. SARCOPENIA: CAUSAS, EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA, CONSECUENCIAS

La sarcopenia es una enfermedad caracterizada por cambios degenerativos en el músculo esquelético que se acumulan a lo largo de la vida del paciente y que se asocia al envejecimiento. Se trata de un trastorno progresivo y generalizado donde destaca una disminución de la función, masa, fuerza y cambios en la estructura muscular.

Es un problema importante de salud pública en la población de edad avanzada debido a su alta prevalencia y a las consecuencias que ocasionan tanto a los pacientes como a los sistemas sanitarios (caídas, hospitalizaciones prolongadas, fracturas, pérdida de movilidad y función física, calidad de vida reducida).

1. 1. CAUSAS

El proceso de envejecimiento humano conlleva una serie de cambios fisiológicos en todos los sistemas del organismo que se traducen en una pérdida progresiva de diferentes funciones.

La senescencia celular es el proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula, que constituye una ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada y que es de vital importancia pues impide la proliferación de células con riesgo de transformación neoplásica. La acumulación de células senescentes relacionada con la edad favorece el envejecimiento, al menos en parte, debido al fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), que incluye cambios en la secreción de múltiples moléculas orgánicas. La disminución de señales anabólicas hormonales (hormona del crecimiento, hormonas sexuales como la testosterona y los estrógenos, la hormona tiroidea o el factor de crecimiento insulínico tipo 1) contribuye a la pérdida de masa y fuerza muscular (Dennison, Sayer y Cooper, 2017). Esta pérdida es acrecentada por un aumento de señales catabólicas mediadas, entre otros, por los procesos de inflamación crónica presentes durante el envejecimiento, como las citocinas proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleucina-6 (IL-6) (Bistrrian, 2007).

Otro de los cambios es el que se produce en la composición corporal y que se caracteriza por una disminución de la masa muscular junto con un incremento paralelo de la masa grasa. El desgaste, pérdida o disminución del músculo esquelético, conocido con el término “atrofia” conlleva una pérdida de fuerza muscular. En este trastorno también influyen otros procesos celulares y moleculares a nivel de las fibras. Podemos citar la disfunción de las células madre musculares (células satélite), la transformación de las fibras de tipo II (de contracción rápida) a tipo I (de contracción lenta) o la disminución en las motoneuronas (Verdijk et al., 2007; Miljkovic et al., 2015; Ciciliot, et al., 2013).

En el desarrollo de la sarcopenia intervienen múltiples factores que, con diferente intensidad, modulan su evolución. Son las denominadas causas secundarias o factores de riesgo. Entre estos factores podemos citar la falta de ejercicio, un estilo de vida sedentario, una ingesta

insuficiente de proteínas o la deficiencia de Vitamina D (Steffl et al, 2017; Bauer et al., 2013; Deutz et al., 2014; Dennison, Sayer y Cooper, 2017).

Otros factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad son las enfermedades crónicas asociadas con una pérdida acelerada de masa y fuerza muscular, bien por efecto inflamatorio directo, malnutrición, disminución en la capilaridad muscular, alteraciones en el aporte capilar de O₂ o por alteraciones de la función mitocondrial. Podemos citar la enfermedad obstructiva crónica (Gea et al., 2015), la insuficiencia cardíaca (Duscha et al., 2008), enfermedades endocrinas como la diabetes y las enfermedades inflamatorias o neoplasias (Dennison, Sayer y Cooper, 2017).

1. 2. EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA

El progresivo envejecimiento poblacional de nuestra sociedad a lo largo del último siglo se traduce en un incremento del número de personas ancianas, con un incremento cada vez mayor de las personas muy mayores. Estos cambios demográficos hacen que la sarcopenia sea un problema de salud global cada vez mayor.

Incluso con una estimación conservadora de la prevalencia, la sarcopenia afecta a más de 50 millones de personas en la actualidad y afectará a más de 200 millones en los próximos 40 años. Se estima que en 2045 habrá entre 18 y 32 millones de personas padeciendo este síndrome en Europa (Ethgen et al., 2017).

La edad por sí misma influye en la prevalencia de sarcopenia, pues como ya se ha comentado, los procesos degenerativos en la masa muscular y la disminución de fibras son inherentes al envejecimiento. Estudios han demostrado que a partir de los 50 años la masa muscular disminuye entre un 1–2 % anualmente y la fuerza muscular lo hace entre un 1,5–3% a partir de los 60 años, acentuándose a partir de los 65-70 años (Morley, 2008).

Dependiendo de los estudios publicados, la prevalencia de la sarcopenia en personas de 60 a 70 años se encuentra entre el 5 y 13%, mientras que en personas mayores de 80 años puede alcanzar el 50% (Morley, 2008). Según las fuentes consultadas los datos de prevalencia pueden variar, esto es debido a que actualmente no existe un único método unificado y

estandarizado para diagnosticar la sarcopenia, siendo deseable poder unificar criterios objetivos para su diagnóstico.

1. 3. CONSECUENCIAS SOCIOECONÓMICAS

Las consecuencias sobre la salud en el anciano derivadas de la presencia de sarcopenia engloban una disminución de la capacidad funcional, con el consecuente desarrollo de discapacidad secundaria, que contribuye de manera decisiva en la pérdida de independencia funcional y al desarrollo del denominado síndrome de fragilidad. La sarcopenia aumenta el riesgo de caídas y fracturas y conduce a trastornos de movilidad y deterioro cognitivo. El riesgo de mortalidad es 3,6 veces superior en los sujetos que sufren la enfermedad en comparación con los que no la tienen, incrementándose esta asociación en sujetos mayores de 79 años (Beaudart et al., 2017). Además, aumenta el riesgo de hospitalización y también el coste de la atención durante la hospitalización (Cawthon et al., 2017).

Un estudio de 2017 informó de que, entre los adultos mayores hospitalizados, aquellos con sarcopenia al ingreso tenían 5 veces más de probabilidades de tener costos hospitalarios más altos que aquellos sin sarcopenia (Antunes et al., 2017). En un estudio de 2019 en Estados Unidos se estimó que el costo total derivado de las hospitalizaciones en personas con sarcopenia fue de 40,4 mil millones de dólares (Goates et al., 2019).

A pesar de haber logrado un mejor conocimiento sobre la sarcopenia, todavía no se ha alcanzado la comprensión total de sus consecuencias sobre la salud pública, y específicamente la carga económica de la enfermedad.

2. MÉTODOS CLÁSICOS PARA LA DETECCIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DE LA SARCOPENIA

La ausencia de una definición operativa unificada de la sarcopenia ha obstaculizado su pleno reconocimiento y diagnóstico por parte de los profesionales sanitarios e investigadores.

En la práctica clínica, la búsqueda de casos puede comenzar cuando un paciente informa de síntomas o signos característicos, como, por ejemplo, caídas, sensación de debilidad, velocidad lenta para caminar, o dificultad para levantarse de una silla.

Para intentar solucionar este problema, en 2018 el EWGSOP (European Working Group on Sarcopenia in Older People) acordó y diseñó un algoritmo con una serie de herramientas para la búsqueda de casos, diagnóstico y cuantificación de la gravedad de la misma en la práctica clínica y en la investigación (Cruz-Jentoft et al., 2019).

En primer lugar, se señaló la **fuerza muscular baja** como criterio diagnóstico principal de la sarcopenia. La medición de la Fuerza de agarre / prensión mediante dinamómetro o Prueba de sentarse y levantarse de una silla son métodos muy usados para evaluar la fuerza muscular y diagnosticarla, ya que se trata de pruebas sencillas, rápidas, económicas y realizables en entornos con pocos instrumentos técnicos como por ejemplo las residencias o las clínicas ambulatorias.

Por otro lado, la detección de una **baja masa muscular** también es usada para confirmar el diagnóstico. La Resonancia Magnética (RMN) y la Tomografía Axial Computarizada (TAC) se consideran los estándares de oro para la evaluación no invasiva de la masa muscular debido a su gran precisión para separar la grasa de otros tejidos blandos. Sin embargo, estas herramientas de imagen no se utilizan habitualmente en la práctica clínica debido a su elevado coste, la complejidad técnica, el acceso limitado al equipo por su falta de portabilidad y las preocupaciones sobre la exposición a la radiación (TAC).

Otra forma de medir la baja masa muscular es la Absorciometría dual de rayos X (*Dual-energy X-ray absorptiometry, DEXA*), una opción generalmente bien aceptada, ya que es más económico que la RMN y el TAC. Expone al paciente a una dosis de radiación muy pequeña, además de ser rápida y no invasiva.

Por último, recientemente el Análisis de Impedancia Bioeléctrica (*Bioelectrical Impedance Analysis, BIA*) ha crecido en importancia. Este método proporciona una estimación de la masa muscular esquelética basada en la conductividad eléctrica de todo el cuerpo. El BIA es una prueba económica, fácil de usar, fácilmente reproducible y portátil, por lo que resulta especialmente útil en pacientes ambulatorios y encamados.

Finalmente, el **rendimiento físico** se utiliza como indicativo de severidad y para la predicción de resultados adversos. Se trata de un concepto multidimensional que no solo

involucra los músculos, sino también la función nerviosa central y periférica, incluido el equilibrio. La Velocidad de la marcha en un tramo de 4 metros o la Serie corta de rendimiento físico (*Short Physical Performance Battery, SPPB*) son ejemplos de pruebas que se usan para evaluar el rendimiento.

Todas estas pruebas y herramientas permiten la caracterización de la sarcopenia en la práctica y en la investigación. Sin embargo, estos métodos solo son eficaces tras el inicio o la progresión de la enfermedad (por ejemplo, tras el comienzo de la pérdida de masa muscular o discapacidad de movilidad). Además, los aparatos y las personas formadas para medir estos parámetros suelen encontrarse en hospitales y no en los centros de salud o residencias por lo que los ancianos han de desplazarse.

Otro inconveniente es que no siempre es posible utilizar algunos de estos métodos, por ejemplo, en pacientes afectados por demencia, trastornos de la marcha, problemas articulares o déficits neurológicos, de alta prevalencia en la población con sarcopenia. Todos estos inconvenientes han dado lugar a que la sarcopenia se haya infradiagnosticado y tratado de manera insuficiente hasta la actualidad.

Por tanto, surge la necesidad de investigar y desarrollar nuevos métodos diagnósticos para la enfermedad que sean sensibles, específicos y de fácil realización y medición en centros de salud o residencias, que no necesiten personal ni infraestructuras muy especializadas y costosas. Para su uso en la práctica, las técnicas estudiadas deben ser rentables, estandarizadas y repetibles por los profesionales, además de estar probada su validez, fiabilidad y precisión.

Es necesario el desarrollo y validación de un panel de múltiples biomarcadores, incluidos los posibles marcadores séricos y marcadores tisulares, que reflejen los procesos fisiopatológicos directa y/o indirectamente vinculados al complejo envejecimiento muscular y sus consecuencias. Esta idea se presenta como una posibilidad de ser una forma fácil y rentable de estratificar el riesgo de sarcopenia, facilitar la identificación y diagnóstico y monitorizar la efectividad de un posible tratamiento en una amplia variedad de entornos clínicos y en diferentes poblaciones de pacientes. Es evidente que la falta de una definición

unívoca para la sarcopenia y su compleja fisiopatología subyacente hacen que el desarrollo de marcadores biológicos para esta afección sea extremadamente desafiante.

Con el desarrollo de las ciencias “-ómicas”, muchos investigadores han utilizado estos métodos para la identificación de biomarcadores fiables. Entre las muchas plataformas ómicas disponibles, algunas de las más comunes en uso incluyen la genómica, la epigenómica, la transcriptómica, la metabolómica o la proteómica. En este sentido, cabe destacar en particular los avances en los campos de la genómica y la transcriptómica relacionados con el envejecimiento.

Mediante técnicas genómicas, se ha propuesto una asociación entre las variantes alélicas en el gen de la miostatina y la diferencia interindividual en la pérdida de masa muscular con el envejecimiento (Corsi et al., 2002). Más recientemente un estudio demostró que los ratones “knockout” para la miostatina exhiben un aumento de la masa muscular debido tanto a la hipertrofia como a la hiperplasia en comparación con los ratones de tipo salvaje (Shan et al., 2017).

En el campo de la transcriptómica, los estudios se centran en encontrar microARN (miARN), pequeñas moléculas de ARN que no codifican proteínas y que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional, que medien en los mecanismos epigenéticos relacionados con el envejecimiento inflamatorio, la atrofia muscular y el daño mitocondrial (Rusanova et al., 2019). Un estudio encontró 8 miARN derivados de exosomas aumentados en individuos frágiles, incluidos miR-10a-3p, miR-92a-3p, miR-185-3p, miR-194-5p, miR-326, miR-532-5p, miR-576-5p y miR-760 (Ipson et al., 2018). Los estudios realizados hasta el momento para la búsqueda de biomarcadores séricos en sarcopenia no son muy numerosos. Recientemente, un estudio demostró que pacientes sarcopénicos tienen un conjunto de miARN desregulados entre los que destacan miR-181a, miR-434-3p, miR-431, miR-29 y miR-126. Curiosamente, se ha descubierto que estos biomarcadores participan en la apoptosis, la senescencia y la señalización del factor de crecimiento insulínico tipo 1 en células musculares envejecidas (Kinser y Pincus, 2020).

En el campo de la proteómica, el estudio de las vesículas extracelulares y los exosomas se alza como una de las estrategias futuras de búsqueda de biomarcadores más prometedoras en muchas enfermedades, incluida la sarcopenia.

Estudios recientes indican que las vesículas extracelulares desempeñan un papel importante en muchos aspectos del envejecimiento y son importantes mediadores de los efectos de las células senescentes en su microentorno. Un estudio de 2020 que caracterizó la composición de los exosomas plasmáticos liberados por las células senescentes (eSASP) reveló un subconjunto de proteínas elevadas en todas las muestras analizadas. Sus análisis identificaron varios biomarcadores candidatos de senescencia celular en el plasma humano, entre ellos el factor de crecimiento/diferenciación 15 (GDF15), la estanniocalcina 1 (STC1) y los inhibidores de la serina proteasa (SERPINs) (Basisty et al., 2020). Otro estudio de 2018 observó que las vesículas extracelulares secretadas por las células senescentes pueden promover la proliferación de las células cancerosas y la inflamación, y también podrían afectar a la regulación de los telómeros (Takasugi, 2018).

Así pues, las VE y particularmente los exosomas, representan una herramienta única para estudiar la compleja red de mecanismos involucrados en el envejecimiento y sus enfermedades asociadas, como puede ser la sarcopenia, permitiendo la identificación de biomarcadores específicos y permitiendo el diseño de estrategias de tratamiento personalizadas. Es por ello que esta línea de investigación constituye el tema principal de este trabajo.

3. EXOSOMAS

3.1. DESCRIPCIÓN Y APLICACIONES

Las Vesículas Extracelulares (VE) se clasifican en tres tipos principales según su origen, densidad, expresión de marcadores y/o tamaño (Fig. 1). En primer lugar, los cuerpos apoptóticos que son liberados por la formación de ampollas en una membrana celular apoptótica (500 a 5000 nm). Las segundas son las microvesículas que se desprenden de la gemación hacia afuera de la membrana plasmática (100-1000 nm). Por último, encontramos los exosomas, que tienen una longitud entre los 30 y 150 nm de diámetro aproximadamente. Se forman cuando los cuerpos multivesiculares, endosomas intracelulares formados por

gemación hacia el interior, se fusionan con la membrana plasmática, lo que permite la liberación de su contenido al medio extracelular. Tienen una membrana lipídica y pueden contener diversos tipos de moléculas orgánicas tales como proteínas, diferentes clases de ácidos nucleicos como los microARNs, o lípidos (Théry, Zitvogel y Amigorena, 2002).

Los exosomas son producidos por prácticamente todos los tipos celulares y una vez secretados se distribuyen en los diversos fluidos corporales (sangre, orina, saliva, líquido sinovial, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, leche materna, plasma seminal y secreciones nasales) de manera periférica. Transportan moléculas que son controladores vitales de los datos intracelulares y permiten la comunicación entre células, llevando información de un lugar a otro, enseñando a las células cuándo y cómo funcionar y reaccionar (Théry, Zitvogel y Amigorena, 2002). Además, estas vesículas estarían relacionadas con distintos procesos celulares, tanto de proliferación, toxicidad y control de la actividad celular (Rong et al., 2020). Sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales estas vesículas son capaces de controlar las diferentes respuestas no se conocen todavía con claridad y deben examinarse más a fondo en estudios futuros.



FIGURA 1 | Ilustración esquemática de la biogénesis de vesículas extracelulares y subpoblaciones.
Abreviaciones: Cuerpos Apoptóticos (AB); Microvesículas (MV); Exosomas (EXO); Cuerpo Multivesicular (MVB). (Sidhom y Saleem, 2020)

Curiosamente, el contenido de los exosomas refleja condiciones específicas de las células que los produce, pudiendo cambiar según su estado fisiológico, por ejemplo, en el curso de una patología (Denzer et al., 2000). Por lo tanto, el análisis del contenido de los exosomas podría evidenciar los eventos que están ocurriendo en su célula progenitora. Este hecho hace que en los últimos años los exosomas se hayan anunciado como candidatos muy interesantes para su utilización como biomarcadores, presentándose como una posible estrategia de investigación en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, incluido en la sarcopenia, ya que se ha demostrado que están relacionados con la fisiología de los órganos. Entre ellas podemos citar la enfermedad de Párkinson, en la que los exosomas pueden presentar un avance terapéutico al transportar fármacos a través de la barrera hematoencefálica (Qu et al., 2018); la lesión renal inducida por sepsis, en la se demostró el papel renoprotector de ciertas proteínas exosomales y su posible uso terapéutico (Pan et al., 2019); el infarto de miocardio, donde los exosomas liberados de parches de músculo cardíaco humano parecen tener propiedades citoprotectoras que mejoran la supervivencia de los cardiomiocitos (Gao et al., 2018) y diversos cánceres, en los que se sugiere un papel considerable de los exosomas para la modulación del inicio del cáncer, la progresión y la metástasis (Kahroba et al., 2019).

Con respecto al músculo esquelético, un estudio de 2015 demostró que los exosomas actúan como mediadores de los efectos beneficiosos tras el ejercicio en el músculo. Se observó que los exosomas aumentaron significativamente inmediatamente después de la sesión intensiva de ciclismo y vuelven a caer durante los siguientes 90 minutos en reposo. Los exosomas secretados entregan moléculas de señal específicas, incluidos factores de crecimiento miogénicos, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 y el factor de crecimiento de hepatocitos (Frühbeis et al., 2015).

Este fenómeno se observó también en un estudio en 2020, donde los niveles de exosomas aumentaron durante el ejercicio, con los niveles más altos en el pico de ejercicio en todas las subclases de vesículas extracelulares analizadas (Brahmer et al., 2020). Estos autores concluyeron que múltiples tipos de células asociadas al sistema circulatorio contribuyen a un conjunto de vesículas heterogéneas liberadas durante el ejercicio, que pueden estar implicados en los mecanismos de señalización relacionados con el ejercicio. Por lo tanto, la

identificación de sus mecanismos de señalización, asociados a los beneficios adaptativos del ejercicio, puede traducirse en futuras aplicaciones diagnósticas y terapéuticas basadas en estas vesículas.

Otro estudio realizado en 2016 demostró que los exosomas derivados de los mioblastos esqueléticos humanos pueden desencadenar la miogénesis de las células madre, proporcionando señales bioquímicas importantes para la regeneración muscular y que los exosomas derivados de la proteína del suero de leche aumentaban la síntesis e hipertrofia de proteínas musculares “*in vitro*” (Choi et al., 2016).

En este sentido, estudios muy recientes ya han demostrado la aplicabilidad terapéutica y paliativa de los exosomas en enfermedades musculares. En 2021 el estudio de Leng et al. evidenció que los exosomas pueden provocar mejoras funcionales en ratones con Distrofia muscular de Duchenne gracias a la mejora de la integridad de la membrana muscular. Sus resultados mostraron que la administración sistémica de exosomas de diferentes fuentes (particularmente los exosomas derivados de los miotubos) indujo el rescate fenotípico, mejoras funcionales y mitigó la progresión patológica del músculo, estabilizando la membrana muscular dañada en ratones distróficos sin toxicidad detectable (Leng et al., 2021).

Todos estos resultados resultan muy esperanzadores y por todo ello, los exosomas se alzan como una de las estrategias futuras más prometedoras de investigación de muchas enfermedades musculares, entre ellas la sarcopenia.

3. 2. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS

Para el estudio de estas moléculas es necesario, en primer lugar, conseguir aislarlas y diferenciarlas del resto de subpoblaciones de VE que se encuentran en el fluido o tejido biológico. Los exosomas pueden compartir tamaño y densidad similares con el resto de VE, como las microvesículas o los cuerpos apoptóticos, lo que hace desafiante su distinción de las mismas. Además, si trabajamos con muestras de plasma debemos tener en cuenta que otros componentes del mismo, como diversos tipos de lipoproteínas y albúminas, tienen

también tamaños y densidades similares con los exosomas, lo que complica su aislamiento selectivo basado en estos parámetros (Mathieu et al., 2019). Por lo tanto, estos componentes plasmáticos deben tratarse como contaminantes en términos de estudios orientados al aislamiento selectivo de exosomas (Smolarz et al., 2019). La albúmina, las lipoproteínas (Apo-E, Apo-L1, Apo-A1, Apo-A2, etc) y los fragmentos de anticuerpos IgG son las contaminaciones más comunes en el análisis proteómico de exosomas en plasma (Wei et al., 2020).

Para que un aislado de vesículas extracelulares pueda emplearse para el descubrimiento de biomarcadores, el método de aislamiento debe garantizar una abundancia adecuada y una baja contaminación con otros tipos de moléculas. Además, las tecnologías de aislamiento y purificación deben ser escalables, automatizadas y selectivas para subpoblaciones específicas y capaces de ser aplicables a fluidos biológicos complejos. En el caso de los exosomas, el aislamiento reproducible de exosomas intactos, biológicamente activos, con alta eficiencia y sin impurezas a partir de matrices tan complejas como el plasma es un desafío técnico objeto de constante debate.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los principales problemas en el aislamiento de exosomas a partir de muestras sanguíneas es la contaminación por lipoproteínas y otras proteínas como la albúmina. Otro punto importante es la preservación de la integridad, funcionalidad e identidad exosómicas.

Las técnicas utilizadas para el aislamiento de exosomas, incluyen la ultracentrifugación (UC), la ultrafiltración (UF), la precipitación basada en polietilenglicol (PEG), la precipitación, la captura por inmutafinidad (IA) y la Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC). La microfluídica es una técnica emergente que utiliza chips con unión mediada por anticuerpos específicos para capturar exosomas de manera eficiente.

Por otro lado, otra posibilidad son los métodos combinados de varios pasos que a menudo son la mejor opción para el aislamiento de vesículas extracelulares, ya que el origen diverso, la naturaleza compleja y la heterogeneidad de las subpoblaciones requieren enfoques de aislamiento sofisticados.

Un análisis sistemático de la bibliografía demostró que el 90% de los estudios sobre aislamiento de VE realizados antes de 2015 utilizaron la ultracentrifugación, seguido del uso de reactivos comerciales, la captura por inmunoafinidad y la ultrafiltración (Gudbergsson et al., 2016).

En esta última parte se realizará una descripción de cada una de las técnicas de forma detallada.

La **ultracentrifugación (UC)** se basa en la separación de subpoblaciones de VE a través de tasas de aceleración gradualmente más altas. En la ultracentrifugación se alcanzan velocidades de hasta 200.000g por lo que se requiere de un equipo centrífugo muy potente y costoso que muchas veces sólo está disponible en centros especializados. Además, los protocolos son largos en el tiempo, pues las muestras se someten a varios ciclos de centrifugaciones a distintas velocidades, durando alguno de ellos hasta 14 horas (dependiendo del protocolo).

Debido a las altas velocidades, la preservación de la integridad, funcionalidad e identidad exosómicas se puede poner en compromiso, ya que los exosomas aislados sufren altas fuerzas de cizallamiento que pueden romper o dañar las moléculas de la superficie de las vesículas aisladas. La pérdida de integridad en la superficie del exosoma a su vez afecta su funcionalidad: los exosomas derivados de UC pueden ser ineficaces para unirse o activar otras células, interrumpiendo así el mensaje que de otro modo comunicarían.

Otro inconveniente asociado con el aislamiento exosómico basado en UC es la agregación y cambios morfológicos en las vesículas extraídas. La centrifugación a altas velocidades puede formar agregados de VE heterogéneos, variables tanto en tamaño como en número de vesículas, lo que puede disminuir la eficiencia del aislamiento (Taylor y Shah, 2015).

Finalmente, la albúmina es común en los aislados basados en centrifugación, debido a la incapacidad de esta técnica para eliminar por completo las proteínas plasmáticas muy abundantes (Abramowicz, Widlak y Pietrowska, 2016).

La **ultrafiltración (UF)** se basa en el uso de un filtro de tamaño de poro específico (*molecular weight cut-off, MWCO*), que varía de 10 a 300 kDa para la mayoría de los

estudios, que crea un filtrado rico en vesículas para el tamaño deseado. La ultrafiltración es una técnica relativamente simple y fácil de usar que ofrece un aislamiento de VE más rápido y sencillo que con la UC. La ultrafiltración no requiere de ningún equipo especial, simplemente son necesarios el filtro de tamaño de poro deseado y una centrífuga común. Sin embargo, como sucede en la UC, en este método también encontramos contaminación con péptidos humorales libres no exosómicos como la alfa-1-antitripsina y la albúmina. Además, en los aislados obtenidos mediante esta técnica encontramos una baja cantidad de proteínas exosomales y un rendimiento y pureza de exosomas menor al de otras técnicas como la UC (Konoshenko et al., 2018). Esto se debe probablemente a la interacción entre las vesículas y las membranas, que actúan como una superficie de unión para los exosomas y las proteínas en la solución, creando agregados y bloqueando efectivamente los poros. Además, diversos estudios también informan de cambios morfológicos y deformación de vesículas en las muestras aisladas por ultrafiltración (Taylor y Shah, 2015; Lobb et al., 2015).

La **precipitación basada en polietilenglicol (PEG)** utiliza una solución acuosa de polietilenglicol que crea un agregado de una gran cantidad de vesículas atrapadas en este polímero, que luego pueden precipitarse mediante centrifugación a baja velocidad.

Si bien es una técnica relativamente rápida, sencilla y poco costosa, en la PEG la pureza y la especificidad se pierden en gran medida debido a la coprecipitación de proteínas solubles no exosomales. Además de los exosomas, en las muestras aisladas por esta técnica se encuentran normalmente proteínas no exosomales, inmunoglobulinas, partículas virales, complejos inmunes y otros contaminantes (Konoshenko et al., 2018).

La **captura por inmunoafinidad (IA)** utiliza anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la superficie exosómica para aislar una población de vesículas específicas.

Este método presenta como ventaja que el aislado los exosomas será de mayor pureza. Sin embargo, esto sucede a costa de reducir el rendimiento exosómico, ya que con los anticuerpos específicos se selecciona un subconjunto de vesículas que puede no ser representativo de todos los exosomas. En general, la captura de inmunidad es uno de los métodos más costosos de aislamiento de exosomas. Además, es necesario un gran volumen de muestra, lo que puede limitar su uso a investigaciones con un tamaño de muestra pequeño

o combinado con otras técnicas para aumentar la pureza de los exosomas aislados y, por consiguiente, suponer una barrera para cualquier uso clínico potencial (Sidhom, Obi y Saleem, 2020).

Con la **microfluídica** obtenemos un alto nivel de pureza y especificidad del sedimento exosómico resultante mediante un procesamiento eficiente y rápido (Chen et al., 2010). Sin embargo, su elevado coste, complejidad y la necesidad de un equipamiento especializado reduce su aplicabilidad en la práctica.

Cada uno de estos métodos tienen grandes ventajas, pero también presentan numerosos inconvenientes. Estas deficiencias pueden contribuir a conclusiones erróneas relacionadas con las características biofísicas y la funcionalidad de los exosomas aislados.

4. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (*SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY, SEC*)

Debido a que esta es la técnica utilizada en este estudio, se ha considerado importante el describirla en un apartado independiente.

La Cromatografía de Exclusión por Tamaño (*Size-exclusion Chromatography, SEC*) es una técnica relativamente novedosa que se utiliza para la separación de macromoléculas en función de su tamaño molecular o volúmenes hidrodinámicos. La técnica utiliza un biofluido de partida como fase móvil y un polímero de filtración en gel poroso como fase estacionaria (Mori y Barth, 1999). La naturaleza de la fase estacionaria permite la elución diferencial de las moléculas con una relación de velocidad inversa a su tamaño: las partículas más grandes eluyen primero, luego las vesículas más pequeñas y luego las proteínas no unidas a la membrana. Esto se debe a que cuanto más grande sea la partícula, menos poros podrá atravesar y, por lo tanto, atravesará un camino más corto hasta el final de la columna, lo que hará que eluya más rápido en comparación con las vesículas más pequeñas (Mori y Barth, 1999).

El primer esbozo funcional detrás de este sistema se remonta a 1955, cuando Lindqvist y Storgårds lo utilizaron para la separación de péptidos de aminoácidos (Lindqvist y Storgårds, 1955). En 2014, esta técnica se adaptó a un sistema de aislamiento de exosomas en un solo paso a partir de fluidos biológicos (Coumans et al., 2014). En los últimos años la SEC se ha utilizado para el aislamiento de VE a partir de una gran variedad de matrices de muestras de procariotas y eucariotas, incluidas muestras derivadas de cultivos celulares, muestras de plasma y suero (Baranyai et al., 2015), orina (Guan et al., 2020), leche (Vaswani et al., 2019), saliva (Aqrawi et al., 2019), lavado nasal (Bartel et al., 2020), líquido sinovial (Foers et al., 2018) o líquido cefalorraquídeo (Prieto-Fernández et al., 2019).

La fase estacionaria o la columna de cromatografía se pueden rellenar con varios polímeros en gel que incluyen dextranos reticulados (Sephadex), agarosa (Sephacrose), poliacrilamida (Biogel P) o alildextrano (Sephacryl).

Las vesículas más pequeñas, supuestamente enriquecidas con exosomas, se eluyen después de que las partículas más grandes hayan pasado. Una vez capturados los exosomas, las últimas fracciones obtenidas se concentran con proteínas no exosomales, mayoritariamente albúmina.

La UC y precipitación con agentes químicos se basan únicamente en la diferencia de densidad de las partículas, por lo que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y los VE que compartan un rango de densidad similar con los exosomas se aislarán conjuntamente, contaminando el aislado (Yuana et al., 2014). La SEC, sin embargo, tiene en cuenta tanto la densidad como el tamaño de las partículas, por lo que eliminaremos aquellas partículas que a pesar de tener densidades similares tienen distinto tamaño. Por tanto, la SEC separa las vesículas pequeñas de las vesículas grandes, además de eliminar la contaminación de las proteínas solubles no unidas al exosoma, lo que da como resultado un sistema de recuperación de exosomas comparativamente más puro que las técnicas más usadas actualmente (Baranyai et al., 2015).

Además de su especificidad, es eficiente, con un tiempo medio de procesamiento menos al de otras técnicas. La mayoría de las tecnologías actuales requieren mucho tiempo y un trabajo manual tedioso.

Además, SEC evita otro inconveniente asociado con el aislamiento exosómico basado en UC: la agregación y cambios morfológicos en las vesículas extraídas. Las preparaciones exosómicas aisladas mediante esta técnica tienen una integridad superior (Mol et al., 2017), probablemente porque se basa en el uso de la gravedad en lugar de la fuerza pura como técnica de aislamiento. Los exosomas aislados también mantienen sus características vesiculares adecuadas, al contrario que con la UC (Sidhom y Saleem, 2020).

Uno de sus inconvenientes es el menor rendimiento total de los exosomas aislados respecto al de otras técnicas, si bien puede compensarse con un mayor volumen de biofluidos de partida (Guerreiro et al., 2018).

Es importante señalar que SEC tiene dificultad para diferenciar entre exosomas y microvesículas del mismo tamaño, como ciertas lipoproteínas (Mori y Barth, 1999). Se usa comúnmente para aislar poblaciones heterogéneas de VE, mientras que la separación de distintas subpoblaciones de VE sigue siendo un desafío debido a la resolución limitada. Cuando es importante abordar la identificación del subtipo de VE, se recomienda combinarla con otros métodos de aislamiento.

La SEC se ha utilizado ampliamente en combinación con la micro o ultrafiltración para aislar los VE de los medios de cultivo celular, la orina, el líquido de lavado broncoalveolar, suero y plasma, logrando una mayor pureza y selectividad que con las técnicas por separado (Guerreiro et al., 2018; Corso et al., 2017; Parimon et al., 2018; Tataruch-Weinert et al., 2016; Diaz et al., 20218).

La ultrafiltración utiliza la centrifugación para purificar y concentrar las vesículas utilizando una membrana de celulosa. Los exosomas quedan retenidos por encima del filtro, mientras que las impurezas más pequeñas y otras proteínas pasan a través de la membrana. Los filtros de membrana comerciales disponibles actualmente tienen poros de varios diámetros con un

rango estrecho de distribución del tamaño de los poros, lo que simplifica el aislamiento de las partículas con un tamaño específico.

La ultrafiltración resulta muy útil tras la SEC, donde se obtiene un número variable de fracciones con un volumen que varía de 2ml a 500 μ l dependiendo de la columna utilizada. Estos volúmenes pueden resultar demasiado grandes para su utilización en pruebas posteriores, más aún cuando se requiere mezclar varias fracciones. Es por ello, que en la mayoría de trabajos se incorpora una concentración de las fracciones posterior al aislamiento de los exosomas purificados con filtros de pequeño tamaño de poro (entre **3 y 10 kDa**) (Corso et al., 2017; Diez et al., 2018). Los exosomas concentrados quedan retenidos por encima del filtro y así se logra reducir el volumen de la muestra hasta 50-200 μ l.

Por otro lado, en estudios recientes se ha observado que la incorporación de una centrifugación posterior al aislamiento con SEC utilizando un filtro de mayor tamaño de poro conseguía aumentar la pureza de la muestra aislada. Dos estudios de 2017 mostraron que la ultrafiltración con filtros de **300kDa** previa a la concentración de la muestra con un filtro de pequeño poro mejoraba considerablemente su pureza y selectividad (Corso et al., 2017; Mol et al., 2017).

Como se ha comentado anteriormente, la UC ha sido la técnica más utilizada hasta el 2020. Sin embargo, actualmente hay un incremento significativo en las aplicaciones de SEC que ya comenzó en 2010 (Royo et al., 2020). Debe tenerse en cuenta que, si bien la SEC es un buen método candidato para aislar exosomas, se requieren más estudios comparativos directos para respaldar esta conclusión.

IV. Justificación

Ante la necesidad de investigar y desarrollar nuevos métodos diagnósticos para la sarcopenia sensibles, específicos y de fácil realización, los exosomas se presentan como una de las estrategias futuras más prometedoras. Estudios ya han demostrado que los exosomas están relacionados con la fisiología de los órganos y pueden ser beneficiosos en la investigación

de muchas enfermedades, incluidas enfermedades musculares, por lo que se plantea una posible utilidad también en la sarcopenia.

Se ha demostrado que la SEC supera a otras técnicas en la pureza de los exosomas aislados, (en gran parte al mejorar la contaminación de las proteínas plasmáticas), en el tiempo de procesado (unos 20 minutos), y en la preservación de la integridad, funcionalidad e identidad exosómicas. Por ello, la SEC se presenta como el mejor de los métodos actuales para el aislamiento de exosomas, especialmente si se planean aplicaciones posteriores de descubrimiento de biomarcadores. No obstante, como se ha comentado, presenta varios inconvenientes.

La combinación de las técnicas SEC y ultrafiltración ha demostrado una mayor pureza y selectividad que con las técnicas por separado gracias a la eliminación de pequeñas proteínas y péptidos a través del filtro, lo que repercute en una mejora en la separación e identificación de los subtipos de VE y por lo tanto en la selectividad y pureza de la muestra.

V. Objetivos

Ante estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos para este TFM. El **objetivo general** es poner a punto un método de extracción de exosomas de plasma humano con la mayor pureza posible basado en la SEC para, en un futuro, estudiar su aplicación a la búsqueda de biomarcadores para la sarcopenia. Para conseguir este objetivo principal nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Combinar la metodología SEC con una filtración única de pequeño tamaño (10 kDa).
2. Combinar la metodología SEC con dos filtraciones, con mayor (300 kDa) y menor (10 kDa) tamaño de poro.
3. Comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas, evaluando las diferencias en la abundancia de proteínas y la contaminación de las muestras según la caracterización proteómica.

VI. Metodología y materiales

1. TOMA DE MUESTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO

Se extrajo sangre periférica de 2 donantes sanos varones de edades similares siguiendo los procedimientos estándar que minimizan la contaminación.

Se llevó a cabo la centrifugación de las muestras por gradiente de densidad usando Ficoll para separar los PBMC (células mononucleares de sangre periférica, que contienen linfocitos y monocitos) de los glóbulos rojos (eritrocitos).

En primer lugar, se diluyó la sangre (volumen inicial 3ml) en el mismo tubo de recogida, el cual contiene factores anticoagulantes (heparina), con 1,5 ml de PBS. A continuación, se pipetearon 2,3 ml de Lymphoprep™ en un tubo Falcon® de 15 ml y se añadió lentamente la sangre diluida. Se centrifugó a 800g 20 minutos a 4°C en centrífuga de rotor oscilante. En caso de que la sangre hubiese sido extraída hace más de 2 horas, la centrifugación se realizó durante 30 minutos. Tras la centrifugación la muestra queda separada en tres fases debido a las diferencias en la densidad. La capa superior contiene el plasma y las plaquetas, más abajo hay un anillo blanquecino que contiene las PBMCs y la inferior contiene los eritrocitos.

Posteriormente se recogieron 2 ml de plasma de la fase superior y se conservaron a -80°C.

2. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS DEL PLASMA HUMANO MEDIANTE SEC

Las dos muestras de 2 ml plasma humano (A y B) almacenadas a -80°C se descongelaron a 4°C. En las dos se utilizó el mismo método de aislamiento de exosomas, la Cromatografía de Exclusión por Tamaño siguiendo el protocolo del fabricante. Cada muestra se asignó a una columna concreta. Las muestras se eluyeron a través de la columna y se recolectaron las 24 fracciones (500 µl/fracción). Se guardó una alícuota de cada preparación para la estimación de proteínas utilizando un kit micro-BCA (#23235, ThermoScientific). Después, en ambos casos se descartaron las fracciones 1 a 6 y 12 a 24 y se seleccionaron las fracciones 7 a 11 pues son las que, según el protocolo, contienen la mayor cantidad de exosomas.

Tras el protocolo de aislamiento, cada muestra se trató de una forma diferente:

- En el caso de la **muestra 1**, las fracciones 7-11 se concentraron por separado a través de filtros centrífugos de 10 kDa MWCO (Fig. 5), el cual a partir de ahora denominaremos como “Método 1”

- En el caso de la **muestra 2**, las fracciones 7-11 se sometieron a una etapa de centrifugación de dos pasos para eliminar los desechos celulares y las microvesículas. En primer lugar, cada fracción transfirió a un concentrador centrífugo de 300 kDa MWCO, y posteriormente se centrifugó en un filtro de 10 kDa MWCO (Fig. 6), a partir de ahora llamado “Método 2”.

Todas las muestras se almacenaron a -80 ° C hasta su posterior procesamiento.

2. 1. PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS DEL PLASMA HUMANO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Los materiales utilizados fueron los siguientes:

- PURE-EVs: Size exclusion chromatography columns (#HBM-PEV, HansaBiomed)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (#10010-015, Gibco)
- 32 mm Syringe Filters with 0.2 µm Supor Membrane, Sterile (#4652, PALL Acrodisc)
- Filtro centrífugo de 10 KDa MWCO Amicon Ultra-0.5 (#UFC501096, Merck Millipore)
- Concentrador centrífugo Vivaspin6 de 300 kDa MWCO (#VS0651, Sartorius)
- Puntas con filtro de 10 a 1000 ml (#311-4150, #348-4150 y #361-4150, BioPointe Scientific)
- Soporte de columna
- Cubeta para desechos
- Vortex
- Centrífuga refrigerada

I. Preparación de la muestra (Fig. 2):

En primer lugar, es necesario centrifugar la muestra varias veces para eliminar las vesículas mayores a 200nm.

1. Se centrifuga 10 minutos a 300 g a 4°C. Se recoge el sobrenadante en otro Eppendorf de 2ml. Se desecha el pellet.
2. Se centrifuga 20 minutos a 1.200 g a 4°C. Se recoge el sobrenadante en otro Eppendorf de 2ml. Se desecha el pellet.
3. Se centrifuga 30 minutos a 10.000 g a 4°C. Se recoge el sobrenadante en otro Eppendorf de 2ml. Se desecha el pellet.

I. Preparación de la muestra

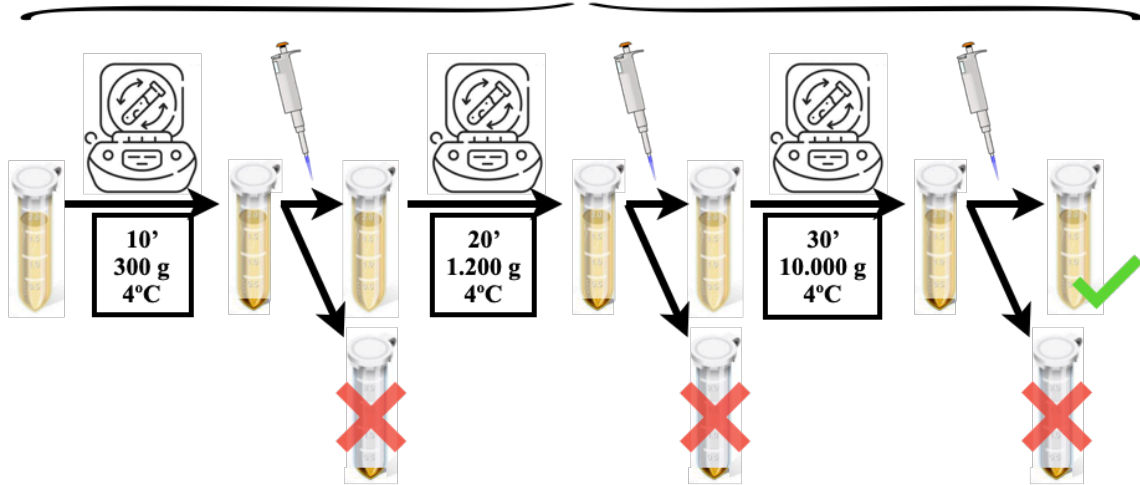


FIGURA 2 | Esquema de la preparación de la muestra previa al aislamiento. La muestra es centrifugada tres veces a distintos tiempos y velocidades para eliminar las vesículas mayores a 200nm.



FIGURA 3 | Fotografía de la disposición del sistema de Cromatografía de Exclusión de Tamaño. Se coloca la columna en un soporte y debajo de ella una cubeta para desechos.

II. Preparación y lavado de la columna (Fig. 4):

Se coloca la columna en un soporte y una cubeta para desechos debajo (Fig. 3). Las columnas están provistas de una capa de tampón conservante.

Se abre la tapa superior e inferior de la columna y se deja fluir casi todo el tampón por la columna, evitando secar la superficie del gel.

Antes de cargar las fracciones, es necesario lavar la columna con aproximadamente 30 ml de PBS 1x previamente filtrado a través de una membrana de filtro de 0.2 μm . Nunca se debe dejar seca la columna.

III. Depósito de la muestra (Fig. 4):

Se deposita en la columna la muestra de 500 μl hasta 2 ml resultante de las centrifugaciones que contenga VE. Se recolectan las fracciones de 500 μl en tubos eppendorf de 1,5 ml, reservándolas en hielo.

Cuando toda la muestra esta dentro de la matriz de gel, se enjuaga la columna con 10 ml de PBS 1x filtrado. El PBS 1x es la fase móvil de la columna SEC, nunca se debe dejar seca la superficie del gel.

IV. Recolección de fracciones y Aislamiento de VE (Fig. 4):

En total se recolectan 24 fracciones de 500 μl por cada muestra. La separación entre las VE y las proteínas circulantes en cada una de las fracciones es la siguiente:

- Las fracciones de la 1 a la 6 contienen mayoritariamente PBS 1x.
- Las fracciones de la 7 a la 11 contienen la mayoría de las VE eluidas.
- Las fracciones de la 12 a la 24 contienen una mayor cantidad de proteínas circulantes del plasma, mayoritariamente albúmina.

Se almacenó una alícuota de cada una de las 7 fracciones enriquecidas en VE de cada muestra para la estimación de proteínas utilizando un kit micro-BCA (#23235, ThermoScientific).

V. Lavado de la columna (Fig. 4):

Tras recolectar las 24 fracciones, se lava la columna con aproximadamente 20 ml de PBS 1x filtrado. Es importante no deja nunca la columna seca. Después del último lavado se añadió a la columna 1 ml de PBS 1x y se cerraron los tapones. Las columnas se almacenaron a 4°C.

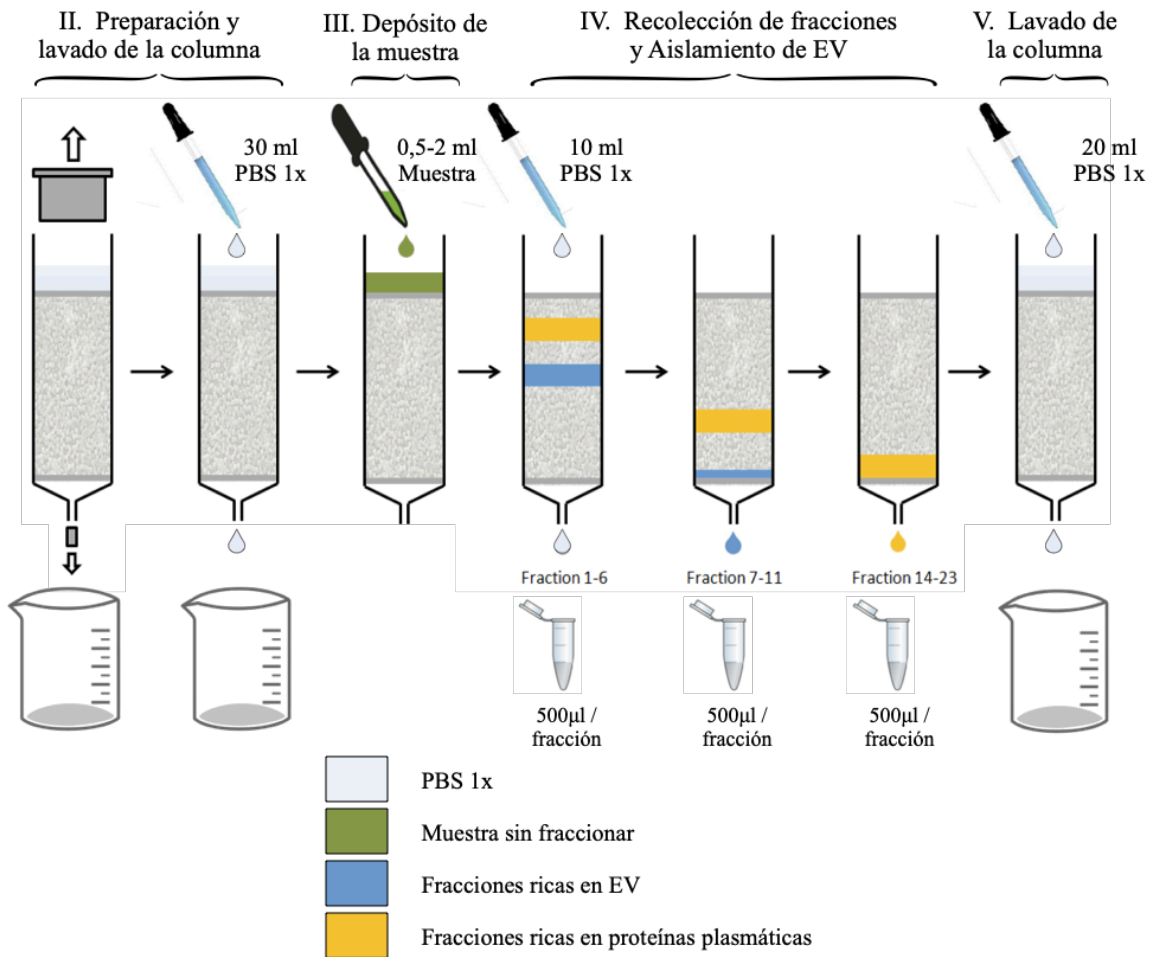


FIGURA 4 | Descripción esquemática del protocolo de aislamiento de exosomas mediante el uso de columnas de Cromatografía de Exclusión de Tamaño

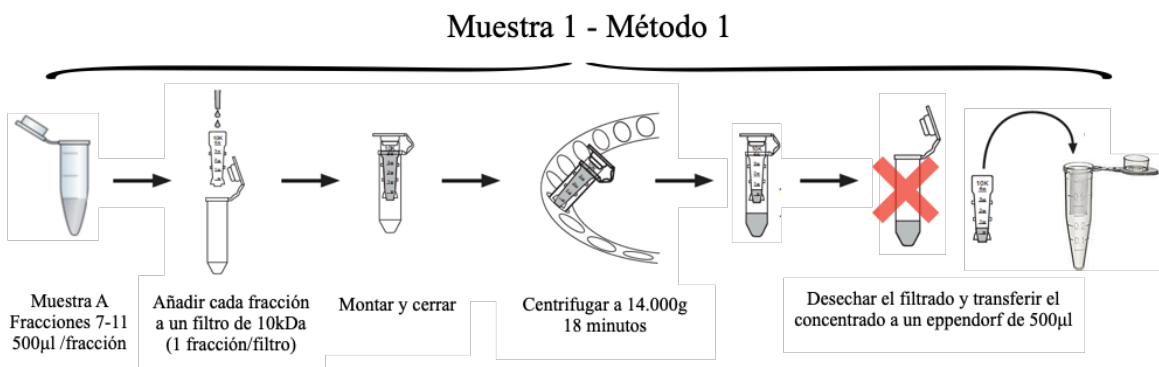


FIGURA 5 | Esquema del procesamiento posterior al aislamiento por SEC de la Muestra 1 mediante el método 1. Solo se lleva a cabo una filtración a través de filtros de 10 kDa

2.2 MUESTRA 1

En el caso de la **muestra 1** (Fig. 5), las fracciones 7-11 se concentraron individualmente a través de filtros centrífugos de 10 kDa MWCO a 14.000g, durante 18 minutos, a 4°C. El sobrenadante se recogió y se almacenó en un tubo Eppendorf de 500µl (Fig. 5).

2.3 MUESTRA 2

En el caso de la **muestra 2** (Fig. 6), las fracciones 7-11 se sometieron a una etapa de centrifugación de dos pasos para eliminar los desechos celulares y las microvesículas. En primer lugar, cada fracción transfirió a un concentrador centrífugo de 300 kDa MWCO, previamente enjuagado según las indicaciones del fabricante para eliminar las cantidades mínimas de glicerina y de ácido sódico que hay en las membranas de los concentradores. Se centrifugó a 4.000g durante 5-15 minutos, a 4°C. El sobrenadante resultante se centrifugó en un filtro de 10 kDa MWCO a 14.000g, durante 5 minutos, a 4°C. El sobrenadante se recogió y se almacenó en un tubo Eppendorf de 500µl.

Todas las muestras se almacenaron a -80 ° C hasta su posterior análisis.

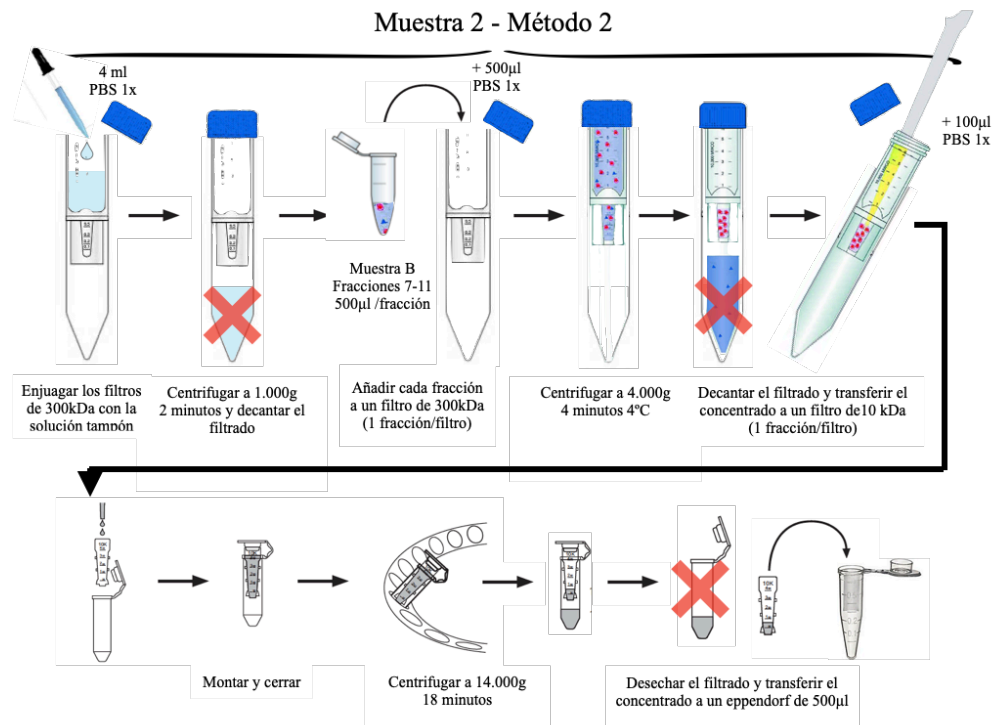


FIGURA 6 | Esquema del procesamiento posterior al aislamiento por SEC de la Muestra 2 mediante el método 2. Primero se realiza una filtración a través de filtros de 300kDa y posteriormente se lleva a cabo una centrifugación a través de filtros de 10 kDa como en el método 1

3. ENSAYO DE PROTEÍNA BCA

Previamente a la centrifugación de las muestras se realizó la cuantificación de la proteína mediante BCA para evaluar el contenido de proteína total.

Las concentraciones de proteína de las fracciones enriquecidas en exosomas se midieron mediante el ensayo de Bradford usando una curva estándar de dilución en serie de albúmina de suero bovino (BSA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (# 23235, ThermoScientific).

Una muestra de 20 μ l de cada una de las fracciones 7 a 11 aisladas por cada método se pipetearon por duplicado en placas de 96 pocillos. Luego se añadió 480 μ l del kit BCA a cada pocillo y se incubó la placa tapada a 37 ° C durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 560 nm en un lector de placas TECAN Infinite 200.

Los valores se extrapolaron de esta curva, utilizando una ecuación polinomial de tercer orden, con $r^2 > 0,99$ para cada ensayo.

4. ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se llevó a cabo el análisis proteómico de las muestras obtenidas por ambos métodos. Tras la extracción y digestión triptica de las proteínas, los péptidos resultantes se analizaron mediante un espectrómetro de masas Exploris Orbitrap 480 acoplado a un nanocromatógrafo Ultimate 3000. La obtención de estos datos, así como los análisis bioinformáticos, se realizó en colaboración con la Plataforma de Proteómica de Navarrabiomed (Pamplona, España).

5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS

Las listas de proteínas identificadas en el presente estudio se compararon con las de las bases de datos de dos repositorios de acceso abierto online de datos experimentales de estudios sobre vesículas extracelulares, Exocarta (Simpson, Kalra y Mathivanan, 2012; Keerthikumar et al., 2016). y Vesiclepedia (Pathan et al., 2019; Kalra et al., 2012).

Con estos datos se construyeron distintos diagramas de Venn basados en: por un lado, distintas combinaciones de las listas de proteínas de cada muestra y por último la comparación entre ellas y las listas de proteínas de las bases de datos anteriormente comentadas.

VII. Resultados

A continuación, se describen los resultados obtenidos por ambos métodos, siendo el método 1 la metodología SEC combinada con filtración única de pequeño tamaño de poro (10 kDa) y el método 2 la SEC combinada con dos filtraciones, una con mayor tamaño de poro (300kDa) y otra con menor (10 kDa). En el último capítulo se realizará la comparación entre ellos.

1. MÉTODO 1: SEC combinada con filtración única de pequeño poro (10 kDa)

1.1. BCA

El ensayo de BCA realizado sobre las fracciones enriquecidas en VE aisladas por el método 1 mostró que dichas fracciones presentaban un contenido medio de proteína de 35,10 μg / ml de plasma.

1.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En el análisis proteómico de la muestra aislada por este método fueron identificadas 348 proteínas. Revisando esta lista llamó la atención la presencia de: albúmina en **todas** las fracciones que fueron aisladas mediante el método 1; 77 especies diferentes de fragmentos de inmunoglobulinas y 14 especies de lipoproteínas. Estas moléculas son consideradas contaminantes en el aislamiento de exosomas.

Esta lista de proteínas se comparó con las listas de proteínas de las bases de datos Exocarta (Versión 5, Fecha de lanzamiento: 29 de julio de 2015) y Vesiclepedia (Versión 4.1, Fecha de lanzamiento: 15 de agosto de 2018).

En el análisis de los exosomas aislados mediante el este método 1 (Fig. 7C) encontramos que 245 de las 348 proteínas identificadas se encuentran ambas bases de datos (intersección del diagrama de Venn), es decir, el **70,4%** de las proteínas. Además, mediante el uso de este método se identificaron 70 (20,11%) especies de proteínas no identificadas y no reportadas antes en exosomas plasmáticos.

2. MÉTODO 2: SEC combinada con dos filtraciones, una con mayor tamaño de poro (300kDa) y otra con menor (10 kDa)

2. 1. BCA

Los resultados del ensayo de BCA realizado sobre las fracciones enriquecidas en VE aisladas mediante el método 2 mostraron que contenían 15,71 µg de proteína /ml de plasma de media.

2. 2. ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En el análisis proteómico de la muestra aislada por el método fueron identificadas 344 proteínas. El análisis de la lista de proteínas reveló que no había presencia de albúmina en **ninguna** fracción aislada mediante el método 2. Además, las especies de fragmentos de inmunoglobulinas y de lipoproteínas se habían reducido a 15 y 7 respectivamente.

De la misma forma que en el método 1, esta lista de proteínas se comparó con las listas de proteínas de las bases de datos Exocarta y Vesiclepedia. En el análisis de los exomas aislados mediante el método 2 (Fig. 7D) encontramos que 271 de las 344 proteínas identificadas se encuentran ambas bases de datos (intersección del diagrama de Venn), es decir, el **78,78%** de las proteínas. Por otro lado, solamente 36 (10,47%) de las proteínas identificadas no se encontraron en ninguna de las dos bases de datos.

3. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS MÉTODOS

A continuación, se procederá a comparar y comentar los resultados obtenidos con las dos técnicas (SEC combinada con filtración única de pequeño tamaño y SEC combinada con dos filtraciones, una con mayor tamaño de poro y otra con menor), evaluando las diferencias en la abundancia de proteínas y la contaminación de las muestras según la caracterización proteómica.

3. 1. BCA

Los resultados mostraron que las fracciones aisladas por el método de dos filtros tenían menos de la mitad de contenido de proteína (media = 15,71 µg/ml de plasma) que las fracciones aisladas por el método de un filtro (media = 35,10 µg/ml de plasma). La concentración de proteína obtenida en ambos casos fue menor que la obtenida en otros estudios que utilizan el método de la ultracentrifugación o SEC simple sin filtros posteriores. Wei, R et al, en el año 2020 obtuvieron una media de 239,55 µg/ml plasma aislado mediante

ultracentrifugación y una media de 101,37 $\mu\text{g/ml}$ plasma mediante SEC convencional, valores muy superiores al obtenido.

Estos resultados fueron muy satisfactorios ya que la reducción en la cantidad media de proteína por mililitro de plasma en las fracciones ricas en vesículas extracelulares sugiere que en nuestra muestra se han eliminado en gran medida las lipoproteínas y otras partículas contaminantes gracias al uso de los filtros respecto a los métodos tradicionales. Por otra parte, de los dos métodos utilizados se observó una mayor eliminación de contaminantes con el uso de SEC y los dos filtros respecto al uso de un único filtro.

3. 2. ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3. 2. 1. Mayor porcentaje de solapamiento con el uso del método 2

En el presente estudio, se identificaron un total de 601 proteínas únicas en exosomas séricos combinando los datos del análisis proteómico cuantitativo mediante espectrometría de masas en ambas muestras. Entre ellas, 348 fueron identificadas en la muestra aislada por el método 1 y 344 por el método 2. Como se muestra en la Figura 7A, 91 proteínas eran comunes a los dos métodos, mientras que 257 y 253 proteínas eran exclusivas de las muestras preparadas utilizando los métodos 1 y 2, respectivamente.

En primer lugar, se comparó todas las proteínas identificadas en nuestro estudio con las proteínas vesiculares conocidas en las bases de datos Exocarta y Vesiclepedia. Entre las 601 proteínas identificadas por ambos métodos, se encontraron 433 (72,05%) proteínas en datos publicados anteriormente (Fig. 7B), incluidos los marcadores exosomales comunes CD81 y HSP90AA1. Además, también se identificaron 103 proteínas exosómicas probables, que no están presentes en las bases de datos de Exocarta y Vesiclepedia. Estos datos confirmaron que los exosomas de nuestras preparaciones contenían abundantes proteínas exosomales.

Después se compararon todas las proteínas identificadas en ambos métodos por separado con las bases de datos Exocarta y Vesiclepedia. Los datos demuestran que la incorporación de una ultrafiltración con un filtro de 300kDa previa a la concentración de la muestra mediante centrifugación con un filtro de 10 kDa mejora notablemente el porcentaje de

solapamiento (**78,78%**, Fig. 7D) de las proteínas reportadas previamente en exosomas, respecto a la metodología sin ultrafiltración con 300kDa (**70,4%**, Fig. 7C).

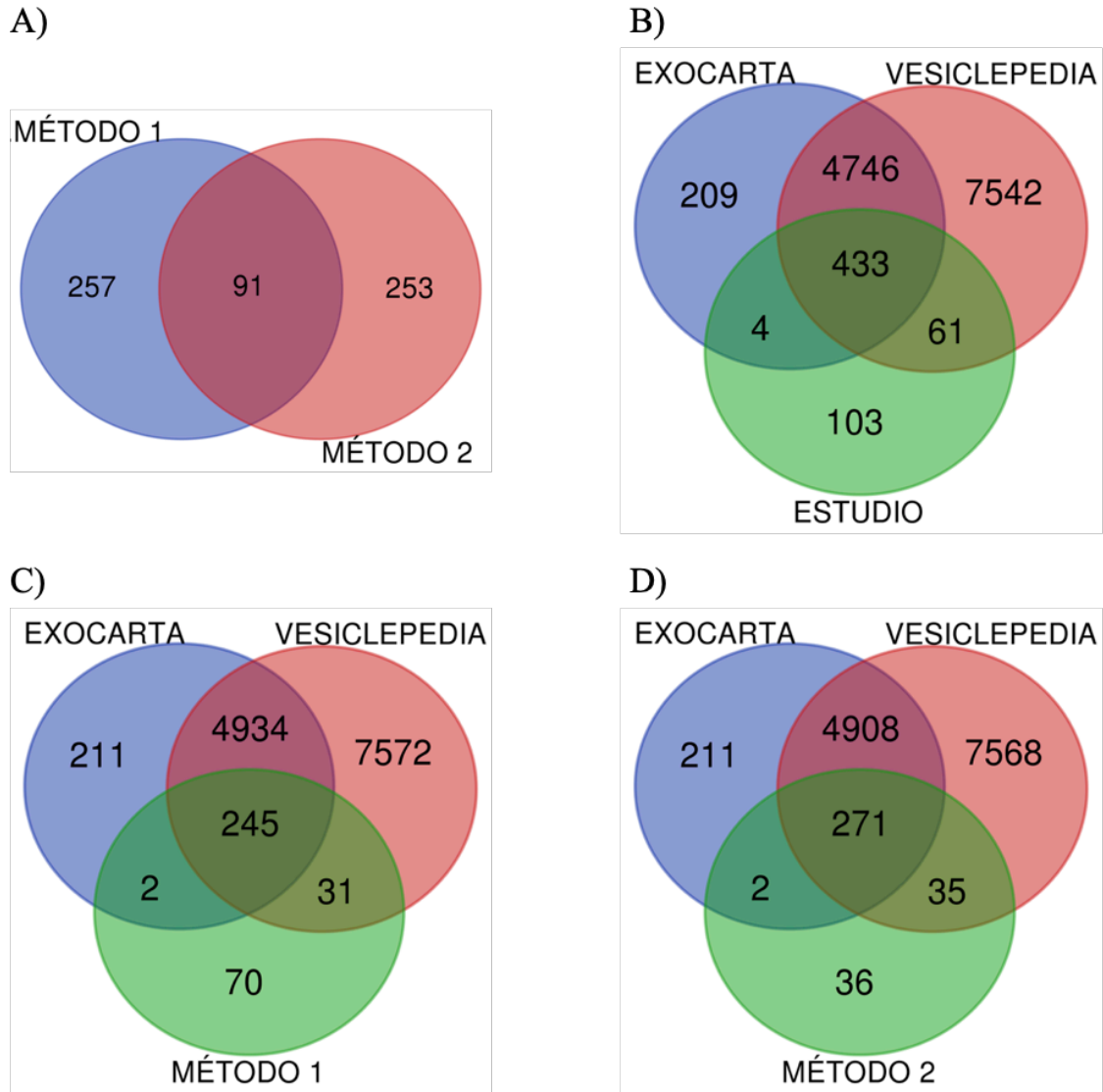


FIGURA 7 | Análisis proteómico de los exosomas obtenidos por los dos métodos a partir de plasma humano. (A) Diagrama de Venn del número de proteínas aisladas por cada método y su intersección/solapamiento (91 proteínas). (B) Diagrama de Venn comprando el total de proteínas aisladas mediante los dos métodos con las bases de datos de Exocarta y Vesiclepedia (Exocarta Versión 5, Fecha de lanzamiento: 29 de julio de 2015; Vesiclepedia Versión 4.1, Fecha de lanzamiento: 15 de agosto de 2018). En total, en el área de intersección del diagrama de Venn, se identificaron 433 proteínas asociadas en el estudio que se encontraban en ambas bases de datos. (C-D) Comparación de proteínas detectadas por cada método por separado con Vesiclepedia y Exocarta. Los diagramas de Venn ilustran que, de las 348 proteínas identificadas mediante el método 1, 245 (el 70,4%) se encontraban en ambas bases de datos mientras que, de las 344 proteínas identificadas mediante el método 2, 271 (el 78,78%) se encontraban en ambas bases de datos y tan solo 36 proteínas no se

Paralelamente, el porcentaje de especies de proteínas no identificadas ni descritas antes en exosomas plasmáticos también mejoró en el método 2 (10,47%), respecto al método 1 (20,11%), produciéndose una disminución del mismo. Solamente 36 de las proteínas identificadas mediante el método 2 no se encontraron en ninguna de las dos bases de datos (Fig. 7D), en comparación con las 70 del método 1 (Fig. 7C).

Estos datos demuestran que la muestra aislada por el método 2 contiene un mayor enriquecimiento en proteínas exosomales que las muestras aisladas por el método 1 y, por lo tanto, presenta una mayor pureza y selectividad.

3. 2. 2. Menor contaminación con proteínas plasmáticas

Como se ha comentado anteriormente, las microvesículas, los cuerpos apoptóticos y los componentes solubles de la sangre como las lipoproteínas y la albúmina sérica deben entenderse como una contaminación de la muestra si nuestro objetivo es obtener una muestra pura de exosomas.

La **albúmina** es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo humano y se considera el indicador de contaminación más común (Anderson y Anderson, 2002)

La albúmina se encontró en el análisis de **todas** las fracciones estudiadas que fueron aisladas mediante el método 1 y, por el contrario, en **ninguna** fracción aislada por el método 2, lo que sugiere que el aislamiento y purificación mediante SEC unido al uso de estos dos filtros podría eliminar la albúmina del aislado de manera eficiente y mejorará en gran medida los posteriores estudios.

Otro de los contaminantes más comunes en el análisis proteómico de exosomas en plasma son los **fragmentos de anticuerpos IgG**. Los resultados mostraron que las fracciones aisladas mediante el método 2 tenían un contenido en inmunoglobulinas significativamente más bajo (77 especies diferentes de fragmentos de inmunoglobulinas), respecto al encontrado en el aislado obtenido mediante el método 1 (15 especies de fragmentos de inmunoglobulinas, $***p = 5,8843E-12$) (Fig. 8A).

Respecto a las **lipoproteínas**, en las muestras aisladas mediante el método 1 encontramos 14 especies de lipoproteínas respecto a las 7 que encontramos en el aislado mediante el método 2 (Fig. 8B). Estos datos sugieren que el uso de dos filtros podría hacer disminuir la presencia de estos contaminantes en la muestra purificada y que se observa una tendencia ($p=0,1274$), aunque no llegó a ser significativa.

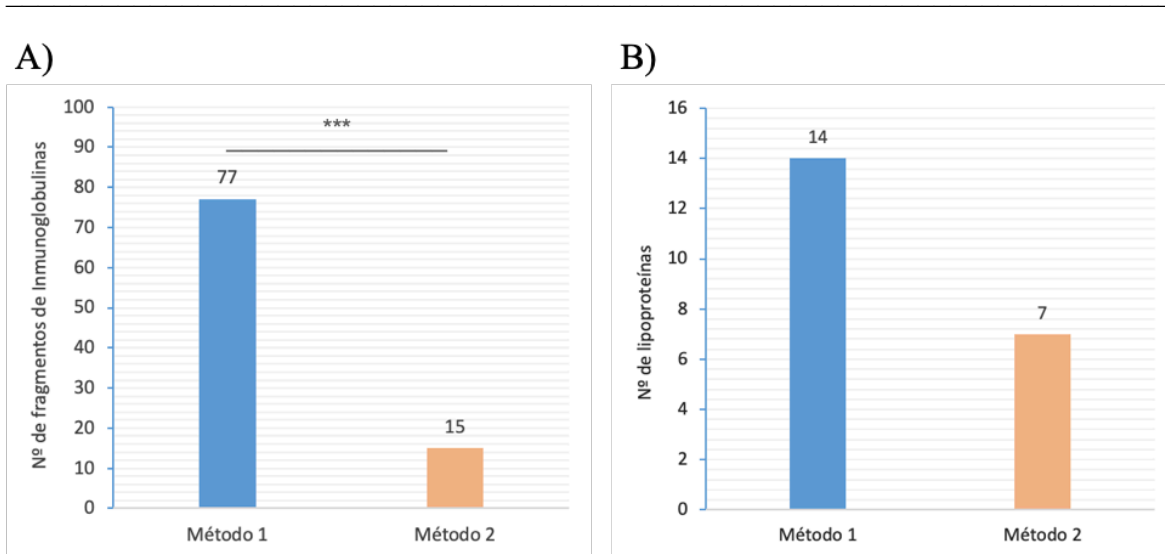


FIGURA 8 | Gráficas comparativas de la cantidad de dos proteínas plasmáticas contaminantes en el análisis proteómico de las dos muestras. (A) Diferencias en la cantidad de fragmentos de inmunoglobulinas en los dos aislados. Se observa una disminución significativa ($***p<0,001$) en la cantidad de especies de inmunoglobulinas en el análisis proteómico del aislado del Método 2 respecto al del Método 1 **(B)** Diferencias en el número de tipos de lipoproteínas en los dos aislados. Observamos que la cantidad de lipoproteínas se ha reducido a la mitad en el análisis proteómico del aislado del Método 2 respecto al del Método 1.

Estos resultados indican que tras la aplicación del método 2 se eliminaron la mayoría de las proteínas plasmáticas altamente abundantes de la preparación exosomal y por lo tanto mejora la pureza de las fracciones exosómicas aisladas.

VIII. Discusión

Hasta ahora, la identificación de la sarcopenia se ha basado en parámetros clínicos, funcionales y de imagen. Como alternativa a estos métodos de diagnóstico tradicionales, se

está estudiando el uso de marcadores biológicos sensibles, específicos y fáciles de detectar para identificar y caracterizar esta condición. Aunque algunos estudios han asociado biomoléculas circulantes o tisulares con sarcopenia (Kinser y Pincus, 2020; Ipson et al., 2018), la evaluación de dichos mediadores aún no se ha incorporado a la práctica clínica, en parte porque ningún estudio ha encontrado un biomarcador “estándar de oro” que prediga de manera confiable el deterioro funcional en ancianos.

Los cambios relacionados con la edad en el músculo esquelético son el resultado de una serie de complejas interacciones entre factores que incluyen alteraciones de la unión neuromuscular, el sistema endocrino, los factores de crecimiento o la función y recambio de proteínas musculares (Rolland et al., 2008). Dada la naturaleza multifactorial de la sarcopenia, la determinación y validación de un panel de múltiples mediadores circulantes o tisulares puede representar la estrategia óptima para identificar la sarcopenia en las personas mayores e integrar mediciones bioquímicas específicas en la evaluación clínica de la enfermedad.

En los últimos años las vesículas extracelulares plasmáticas han atraído la atención como posibles nuevos biomarcadores de diagnóstico para el cáncer, la inflamación y otras enfermedades (Qu et al., 2018; Gao et al., 2018; Pan et al., 2019; Kahroba et al., 2019). El estudio de estas vesículas puede ayudar a descubrir nuevas vías fisiopatológicas del envejecimiento y de las enfermedades, así como nuevos biomarcadores para ser utilizados en la investigación y en el ámbito clínico. En concreto se ha dado un incremento en los estudios que investigan la función potencial de las proteínas contenidas en los exosomas plasmáticos. Se debe tener en cuenta que el plasma es fluido complejo que contiene una gran cantidad de proteínas libres no exosómicas, como la albúmina y la familia de las apolipoproteínas, lo que incrementa la dificultad de su diferenciación efectiva. Los diferentes métodos de aislamiento influyen en la pureza y el rendimiento de los exosomas. Todavía no existe un método perfecto para aislar las VE sin contaminantes, por lo que la optimización de una técnica de aislamiento es una necesidad.

En este estudio se han analizado y comparado dos métodos de aislamiento de exosomas basados en la combinación de la cromatografía de exclusión por tamaño y la filtración. Si bien lo ideal habría sido que las muestras utilizadas hubieran pertenecido al mismo donante, la disponibilidad real de muestras y el volumen inicial necesario en esta técnica imposibilitaron esta opción. Se debe tener en cuenta que, como se ha comentado anteriormente, la ganancia en pureza y selectividad de la SEC suceden a costa de una pérdida en el rendimiento total de los exosomas aislados. Para compensarlo debe utilizarse un mayor volumen de biofluidos de partida que en otras técnicas, teniendo también en cuenta que, como se ha explicado, la muestra debe procesarse antes de comenzar con el protocolo de la cromatografía de exclusión por tamaño. Además, ambas muestras fueron seleccionadas por su similitud (sexo, edad, etc.)

El análisis de los resultados muestra que los porcentajes de solapamiento obtenidos por los dos métodos testados son superiores a los descritos en otros trabajos recientes. En el estudio de Wei et al., (2020) se comparó el total de las proteínas obtenidas mediante distintos métodos de aislamiento de exosomas con las mismas bases de datos (Exocarta y Vesiclepedia). Estos autores observaron unos porcentajes de solapamiento de **39,74%** en las muestras aisladas mediante ultracentrifugación y de **53,67%** en las muestras aisladas mediante SEC simple. Otro equipo de investigación logró alcanzar un **62%** de solapamiento entre las muestras aisladas mediante ultracentrifugación y ambas bases de datos. (Ding et al., 2020). En ambos estudios el porcentaje de solapamiento es inferior a los obtenidos en este trabajo con ambos métodos.

Los resultados obtenidos mediante el método 1 supone una gran mejora en la pureza de la muestra. Esto demuestra que la incorporación de la filtración posterior al aislado mediante SEC supone, “*per se*”, una mejora en la pureza de las muestras obtenidas respecto a las técnicas convencionales y también frente a la SEC de un solo paso. Sin embargo, a pesar de haber logrado una mejora respecto a los estudios recientes, no logramos alcanzar la cifra del 80% de solapamiento, la cual habíamos fijado como meta y que nos recomendaban los especialistas en proteómica de NavarraBiomed. Con la incorporación de una ultrafiltración con un filtro de mayor tamaño de poro previa a la concentración de la muestra mediante

centrifugación con un filtro de pequeño tamaño de poro, se consigue alcanzar un solapamiento cercano al 80% con las proteínas previamente identificadas en exosomas (Método 2).

Por tanto, nuestros datos demuestran que las columnas SEC en combinación con la filtración posterior pueden aislar exosomas de forma fiable con una pureza que oscila entre el 70 y el 80%, basada en la comparación con las listas de proteínas identificadas previamente en las bases de datos de Exocarta y Vesiclepedia. Esto supone una mejora considerable sobre los resultados de estudios anteriores que llevan a cabo las técnicas por separado. Además, el método SEC permite aislar las VE de forma eficiente en cuanto a tiempo (el tiempo total de procesamiento de cada muestra oscila entre 120 y 150 minutos) y en cuanto a materiales y equipación necesarios.

Por lo tanto, basándonos en nuestros datos, proponemos que el método SEC unido a la centrifugación con filtros de 300 kDa y 10 kDa sería una forma óptima para el aislamiento y la purificación de exosomas plasmáticos ya que: 1) se maximiza su separación de las proteínas plasmáticas no deseadas; 2) se trata de un método comparativamente más sencillo y rápido que no requiere aparatos específicos ni experiencia previa; 3) es eficaz en fluidos complejos como el plasma.

Este trabajo fin de máster se engloba dentro de mi tesis doctoral cuyo objetivo principal es la caracterización de las proteínas específicas contenidas en exosomas de pacientes sarcopénicos, reflejo de los cambios tempranos en la enfermedad. Dentro del plan de investigación, el primer paso ha sido poner a punto y optimizar la técnica que utilizaremos para la obtención y aislamiento de estos exosomas. Este trabajo nos ha llevado casi un año debido a diferentes problemas técnicos y de falta de suministro de material. Actualmente, tras los resultados obtenidos en este trabajo se está utilizando el método 2 para la extracción de exosomas en pacientes y controles. Estas muestras serán utilizadas en la búsqueda de biomarcadores proteicos contenidos en los exosomas para el diagnóstico precoz y seguimiento terapéutico tras el ejercicio en los pacientes con sarcopenia.

IX. Conclusiones

De los resultados obtenidos a partir de las experiencias realizadas en el presente estudio, y de su discusión y contraste con otras aportaciones, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. Los métodos basados en la cromatografía de exclusión por tamaño acoplado a la ultrafiltración resultan útiles para aislar una cantidad suficiente de exosomas para la realización de estudios proteómicos a partir de 2 ml de muestra de plasma.
2. Ambos métodos (ultrafiltración única o doble) permiten generar muestras con una pureza superior en proteínas exosomales a los descritos por grupos de investigación que utilizan otros métodos de aislamiento y purificación.
3. Ambos métodos cumplen los estándares suficientes para ser utilizados para el aislamiento de exosomas para estudios proteómicos.
4. La utilización de una doble ultrafiltración posterior a la cromatografía de exclusión por tamaño permite eliminar de forma más eficiente los principales contaminantes en el aislamiento selectivo de exosomas que la filtración única.
5. El método de doble ultrafiltración es el más adecuado en la búsqueda de biomarcadores proteicos exosomales para el diagnóstico precoz y seguimiento terapéutico tras el ejercicio en los pacientes con sarcopenia.

X. Conclusions

The following conclusions can be drawn from the results obtained from the experiments carried out in this study, and from their discussion and comparison with other contributions:

1. Methods based on size exclusion chromatography coupled to ultrafiltration are useful to isolate a sufficient amount of exosomes for proteomic studies from 2 ml of plasma sample.
2. Both methods (single or double ultrafiltration) allow the generation of samples with a higher purity of exosomal proteins than those described by research groups using other isolation and purification methods.
3. Both methods meet sufficient standards to be used for the isolation of exosomes for proteomic studies.

4. The use of double ultrafiltration following size exclusion chromatography allows more efficient removal of major contaminants in the selective isolation of exosomes than single filtration.
5. The double ultrafiltration method is the most suitable in the search for exosomal protein biomarkers for early diagnosis and therapeutic follow-up after exercise in patients with sarcopenia.

XI. Bibliografía

- Abramowicz, A., Widlak, P., y Pietrowska, M. (2016). “Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation”. *Molecular bioSystems*, 12(5), pp. 1407–1419. DOI: 10.1039/c6mb00082g
- Anderson, N. L., y Anderson, N. G. (2002). “The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects”. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 1(11), pp. 845–867. DOI: 10.1074/mcp.r200007-mcp200
- Antunes, A. C., Araújo, D. A., Veríssimo, M. T. y Amaral, T. F. (2017). “Sarcopenia and hospitalisation costs in older adults: a cross-sectional study”. *Nutrition & dietetics: the journal of the Dietitians Association of Australia*, 74(1), pp. 46–50. DOI: 10.1111/1747-0080.12287
- Aqrawi, L.A., Galtung, H.K., Guerreiro, E.M., Øvstebø, R., Thiede, B., Utheim, T.P., Chen, X., Utheim, Ø.A., Palm, Ø., Skarstein, K. y Jensen, J.L. (2019). “Proteomic and histopathological characterisation of sicca subjects and primary Sjögren’s syndrome patients reveals promising tear, saliva and extracellular vesicle disease biomarkers”. *Arthritis Res Ther* 21, pp. 1-14. DOI: 10.1186/s13075-019-1961-4
- Baranyai, T., Herczeg, K., Onódi, Z., Voszka, I., Módos, K., Marton, N., Nagy, G., Mäger, I., Wood, M. J., El Andaloussi, S., Pálincás, Z., Kumar, V., Nagy, P., Kittel, Á., Buzás, E. I., Ferdinandy, P., y Giricz, Z. (2015). “Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods”. *PloS one*, 10(12), e0145686. DOI: 10.1371/journal.pone.0145686

- Bartel, S., La Grutta, S., Cilluffo, G., Perconti, G., Bongiovanni, A., Giallongo, A., Behrends, J., Kruppa, J., Hermann, S., Chiang, D., Pfaffl, M.W. y Krauss-Etschmann, S. (2020). “Human airway epithelial extracellular vesicle miRNA signature is altered upon asthma development”. *Allergy*. 75: pp. 346– 356. DOI: 10.1111/all.14008
- Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., & Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS biology*, 18(1), e3000599. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000599
- Bauer, J., Biolo, G., Cederholm, T., Cesari, M., Cruz-Jentoft, A. J., Morley, J. E., Phillips, S., Sieber, C., Stehle, P., Teta, D., Visvanathan, R., Volpi, E. y Boirie, Y. (2013). “Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group”. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(8), pp. 542–559. DOI: 10.1016/j.jamda.2013.05.021
- Beaudart, C., Zaaria, M., Pasleau, F., Reginster, J. Y. y Bruyère, O. (2017). “Health Outcomes of Sarcopenia: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *PloS one*, 12(1), e0169548. DOI: 10.1371/journal.pone.0169548
- Bistrrian, B. (2007). “Systemic response to inflammation”. *Nutrition reviews*, 65(12 Pt 2), S170–S172. DOI: 10.1301/nr.2007.dec.s170-s172
- Brahmer, A., Neuberger, E., Esch-Heisser, L., Haller, N., Jorgensen, M. M., Baek, R., Möbius, W., Simon, P., y Krämer-Albers, E. M. (2019). “Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation”. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8, 1615820. DOI: 10.1080/20013078.2019.1615820
- Cawthon, P. M., Lui, L. Y., Taylor, B. C., McCulloch, C. E., Cauley, J. A., Lapidus, J., Orwoll, E. y Ensrud, K. E. (2017). “Clinical Definitions of Sarcopenia and Risk of Hospitalization in Community-Dwelling Older Men: The Osteoporotic Fractures in Men Study”. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 72(10), pp. 1383–1389. DOI: 10.1093/gerona/glw327
- Chen, C., Skog, J., Hsu, C. H., Lessard, R. T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B. S., Breakefield, X. O., Toner, M., y Irimia, D. (2010). “Microfluidic isolation and

transcriptome analysis of serum microvesicles”. *Lab on a chip*, 10(4), pp. 505–511. DOI: 10.1039/b916199f

- Choi, J. S., Yoon, H. I., Lee, K. S., Choi, Y. C., Yang, S. H., Kim, I. S., y Cho, Y. W. (2016). “Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration”. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 222, pp. 107–115. DOI: 0.1016/j.jconrel.2015.12.018
- Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B. y Schiaffino, S. (2013). “Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting”. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), pp. 2191–2199. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.05.016
- Corsi, A. M., Ferrucci, L., Gozzini, A., Tanini, A., y Brandi, M. L. (2002). “Myostatin polymorphisms and age-related sarcopenia in the Italian population”. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(8), 1463. DOI: 10.1046/j.1532-5415.2002.50376.x
- Corso, G., Mäger, I., Lee, Y., Görgens, A., Bultema, J., Giebel, B., Wood, M., Nordin, J. Z., y Andaloussi, S. E. (2017). “Reproducible and scalable purification of extracellular vesicles using combined bind-elute and size exclusion chromatography”. *Scientific reports*, 7(1), 11561. DOI: 10.1038/s41598-017-10646-x
- Coumans, F. A., van der Pol, E., Böing, A. N., Hajji, N., Sturk, G., van Leeuwen, T. G., y Nieuwland, R. (2014). “Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing”. *Journal of extracellular vesicles*, 3, 25922. DOI: 10.3402/jev.v3.25922
- Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M. y Writing Group for the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2), and the Extended Group for EWGSOP2 (2019). “Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis”, *Age and Ageing*, 48 (1), pp. 16-31, DOI: 10.1093/ageing/afy169
- Dennison, E. M., Sayer, A. A. y Cooper, C. (2017). “Epidemiology of sarcopenia and insight into possible therapeutic targets”. *Nature reviews. Rheumatology*, 13(6), pp. 340–347. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.60

- Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W., y Geuze, H. J. (2000). “Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device”. *Journal of cell science*, 113 Pt 19, pp. 3365–3374. DOI: 10.1242/jcs.113.19.3365
- Deutz, N. E., Bauer, J. M., Barazzoni, R., Biolo, G., Boirie, Y., Bosy-Westphal, A., Cederholm, T., Cruz-Jentoft, A., Krznarić, Z., Nair, K. S., Singer, P., Teta, D., Tipton, K. y Calder, P. C. (2014). “Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: recommendations from the ESPEN Expert Group”. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 33(6), pp. 929–936. DOI: 10.1016/j.clnu.2014.04.007
- Diaz, G., Bridges, C., Lucas, M., Cheng, Y., Schorey, J. S., Dobos, K. M., y Kruh-Garcia, N. A. (2018). “Protein Digestion, Ultrafiltration, and Size Exclusion Chromatography to Optimize the Isolation of Exosomes from Human Blood Plasma and Serum”. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (134), 57467. DOI:10.3791/57467
- Ding, X. Q., Wang, Z. Y., Xia, D., Wang, R. X., Pan, X. R., y Tong, J. H. (2020). “Proteomic Profiling of Serum Exosomes From Patients With Metastatic Gastric Cancer”. *Frontiers in oncology*, 10, 1113. DOI: 10.3389/fonc.2020.01113
- Duscha, B. D., Schulze, P. C., Robbins, J. L. y Forman, D. E. (2008). “Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training”. *Heart failure reviews*, 13(1), pp. 21–37. DOI: 10.1007/s10741-007-9056-8
- Ethgen, O., Beaudart, C., Buckinx, F., Bruyère, O. y Reginster, J. Y. (2017). “The Future Prevalence of Sarcopenia in Europe: A Claim for Public Health Action”. *Calcified tissue international*, 100(3), pp. 229–234. DOI: 10.1007/s00223-016-0220-9
- Foers, A. D., Chatfield, S., Dagle, L. F., Scicluna, B. J., Webb, A. I., Cheng, L., Hill, A. F., Wicks, I. P., y Pang, K. C. (2018). “Enrichment of extracellular vesicles from human synovial fluid using size exclusion chromatography”. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1490145. DOI: 10.1080/20013078.2018.1490145
- Frühbeis, C., Helmig, S., Tug, S., Simon, P., y Krämer-Albers, E. M. (2015). “Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation”. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 28239. DOI: 10.3402/jev.v4.28239
- Gao, L., Gregorich, Z. R., Zhu, W., Mattapally, S., Oduk, Y., Lou, X., Kannappan, R., Borovjagin, A. V., Walcott, G. P., Pollard, A. E., Fast, V. G., Hu, X., Lloyd, S. G., Ge, Y.,

- y Zhang, J. (2018). “Large Cardiac Muscle Patches Engineered From Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cells Improve Recovery From Myocardial Infarction in Swine”. *Circulation*, 137(16), 1712–1730. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030785
- Gea, J., Pascual, S., Casadevall, C., Orozco-Levi, M. y Barreiro, E. (2015). “Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings”. *Journal of thoracic disease*, 7(10), E418–E438. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.08.04
 - Goates, S., Du, K., Arensberg, M. B., Gaillard, T., Guralnik, J. y Pereira, S. L. (2019). “Economic Impact of Hospitalizations in US Adults with Sarcopenia”. *The Journal of frailty & aging*, 8(2), pp. 93–99. DOI: 10.14283/jfa.2019.10
 - Guan, S., Yu, H., Yan, G., Gao, M., Sun, W. y Zhang, X. (2020). “Characterization of Urinary Exosomes Purified with Size Exclusion Chromatography and Ultracentrifugation”. *J. Proteome Res.* 19, 6, pp. 2217–2225 DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00693
 - Gudbergsson, J. M., Johnsen, K. B., Skov, M. N., y Duroux, M. (2016). “Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures”. *Cytotechnology*, 68(4), pp. 579–592. DOI: 10.1007/s10616-015-9913-6
 - Guerreiro, E. M., Vestad, B., Steffensen, L. A., Aass, H., Saeed, M., Øvstebø, R., Costea, D. E., Galtung, H. K., y Søland, T. M. (2018). “Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography”. *PLoS one*, 13(9), e0204276. DOI: 10.1371/journal.pone.0204276
 - Ipson, B. R., Fletcher, M. B., Espinoza, S. E., Y Fisher, A. L. (2018). “Identifying Exosome-Derived MicroRNAs as Candidate Biomarkers of Frailty”. *The Journal of frailty & aging*, 7(2), 100–103. DOI: 10.14283/jfa.2017.45
 - Kahroba, H., Hejazi, M. S., y Samadi, N. (2019). “Exosomes: from carcinogenesis and metastasis to diagnosis and treatment of gastric cancer”. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(9), pp. 1747–1758. DOI: 10.1007/s00018-019-03035-2
 - Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borràs, F. E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J. M., Gabrielsson, S., Ghossein, Y. S., Gupta, D., Harsha, H. C., Hendrix, A.

- y Mathivanan, S. (2012). “Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation”. *PLoS biology*, *10*(12), e1001450. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001450
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., y Mathivanan, S. (2016). “ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo”. *Journal of molecular biology*, *428*(4), pp. 688–692. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.019
 - Kinser, H. E., y Pincus, Z. (2020). “MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process”. *Human genetics*, *139*(3), 291–308. DOI: 10.1007/s00439-019-02046-0
 - Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., y Laktionov, P. P. (2018). “Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends”. *BioMed research international*, *2018*, 8545347. DOI: 10.1155/2018/8545347
 - Leng, L., Dong, X., Gao, X., Ran, N., Geng, M., Zuo, B., Wu, Y., Li, W., Yan, H., Han, G., y Yin, H. (2021). “Exosome-mediated improvement in membrane integrity and muscle function in dystrophic mice”. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *29*(4), 1459–1470. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.12.018
 - Lindqvist, B. y Storgårds, T. (1955). “Molecular-sieving Properties of Starch”. *Nature*, *175*, pp. 511–512. DOI:10.1038/175511a0
 - Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., y Möller, A. (2015). “Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma”. *Journal of extracellular vesicles*, *4*, 27031. DOI: 10.3402/jev.v4.27031
 - Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., y Théry, C. (2019). “Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication”. *Nature cell biology*, *21*(1), pp. 9–17. DOI: 10.1038/s41556-018-0250-9
 - Miljkovic, N., Lim, J. Y., Miljkovic, I. y Frontera, W. R. (2015). “Aging of skeletal muscle fibers”. *Annals of rehabilitation medicine*, *39*(2), pp. 155–162. DOI: 10.5535/arm.2015.39.2.155
 - Mol, E. A., Goumans, M. J., Doevendans, P. A., Sluijter, J., y Vader, P. (2017). “Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography

compared to ultracentrifugation”. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 13(6), pp. 2061–2065. DOI:10.1016/j.nano.2017.03.011

- Mori, S., y Barth, G. H. (1999). *Size Exclusion Chromatography*. Springer
- Morley J. E. (2008). “Sarcopenia: diagnosis and treatment”. “*The journal of nutrition, health & aging*”, 12(7), pp. 452–456. DOI: 10.1007/BF02982705
- Pan, T., Jia, P., Chen, N., Fang, Y., Liang, Y., Guo, M., y Ding, X. (2019). “Delayed Remote Ischemic Preconditioning Confers Renoprotection against Septic Acute Kidney Injury via Exosomal miR-21”. *Theranostics*, 9(2), pp. 405–423. DOI: 10.7150/thno.29832
- Parimon, T., Garrett, N. E., 3rd, Chen, P., y Antes, T. J. (2018). “Isolation of Extracellular Vesicles from Murine Bronchoalveolar Lavage Fluid Using an Ultrafiltration Centrifugation Technique”. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (141), DOI: 10.3791/58310
- Pathan, M., Fonseka, P., Chitti, S. V., Kang, T., Sanwlani, R., Van Deun, J., Hendrix, A., y Mathivanan, S. (2019). “Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles”. *Nucleic acids research*, 47(D1), D516–D519. DOI: 10.1093/nar/gky1029
- Prieto-Fernández, E., Aransay, A. M., Royo, F., González, E., Lozano, J. J., Santos-Zorrozua, B., Macias-Camara, N., González, M., Garay, R. P., Benito, J., Garcia-Orad, A., y Falcón-Pérez, J. M. (2019). “A Comprehensive Study of Vesicular and Non-Vesicular miRNAs from a Volume of Cerebrospinal Fluid Compatible with Clinical Practice”. *Theranostics*, 9(16), pp. 4567–4579. DOI: 10.7150/thno.31502
- Qu, M., Lin, Q., Huang, L., Fu, Y., Wang, L., He, S., Fu, Y., Yang, S., Zhang, Z., Zhang, L., y Sun, X. (2018). “Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease”. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 287, pp. 156–166. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.08.035
- Rolland, Y., Czerwinski, S., Abellan Van Kan, G., Morley, J. E., Cesari, M., Onder, G., Woo, J., Baumgartner, R., Pillard, F., Boirie, Y., Chumlea, W. M. y Vellas, B. (2008). “Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives”. *The journal of nutrition, health & aging*, 12(7), pp. 433–450. DOI: 10.1007/BF02982704

- Rong, S., Wang, L., Peng, Z., Liao, Y., Li, D., Yang, X., Nuessler, A. K., Liu, L., Bao, W., y Yang, W. (2020). “The mechanisms and treatments for sarcopenia: could exosomes be a perspective research strategy in the future?”. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 11(2), pp. 348–365. DOI: 10.1002/jcsm.12536
- Royo, F., Théry, C., Falcón-Pérez, J. M., Nieuwland, R., y Witwer, K. W. (2020). “Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee”. *Cells*, 9(9), 1955. DOI: 10.3390/cells9091955
- Rusanova, I., Fernández-Martínez, J., Fernández-Ortiz, M., Aranda-Martínez, P., Escames, G., García-García, F. J., Mañas, L., & Acuña-Castroviejo, D. (2019). “Involvement of plasma miRNAs, muscle miRNAs and mitochondrial miRNAs in the pathophysiology of frailty”. *Experimental gerontology*, 124, 110637. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110637
- Shan, T., Liang, X., Bi, P., y Kuang, S. (2013). “Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1 α -Fndc5 pathway in muscle”. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(5), 1981–1989. DOI: 10.1096/fj.12-225755
- Sidhom, K., Obi, P. O., y Saleem, A. (2020). “A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option?”. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6466. DOI: 10.3390/ijms21186466
- Simpson, R. J., Kalra, H., y Mathivanan, S. (2012). “ExoCarta as a resource for exosomal research”. *Journal of extracellular vesicles*, 1, DOI: 10.3402/jev.v1i0.18374
- Smolarz, M., Pietrowska, M., Matysiak, N., Mielańczyk, Ł., y Widłak, P. (2019). “Proteome Profiling of Exosomes Purified from a Small Amount of Human Serum: The Problem of Co-Purified Serum Components”. *Proteomes*, 7(2), 18. DOI: 10.3390/proteomes7020018
- Steffl, M., Bohannon, R. W., Sontakova, L., Tufano, J. J., Shiells, K. y Holmerova, I. (2017). “Relationship between sarcopenia and physical activity in older people: a systematic review and meta-analysis”. *Clinical interventions in aging*, 12, pp. 835–845. DOI: 10.2147/CIA.S132940

- Takasugi M. (2018). Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging cell*, 17(2), e12734. DOI: 10.1111/accel.12734
- Tataruch-Weinert, D., Musante, L., Kretz, O., y Holthofer, H. (2016). “Urinary extracellular vesicles for RNA extraction: optimization of a protocol devoid of prokaryote contamination”. *Journal of extracellular vesicles*, 5, 30281. DOI: 10.3402/jev.v5.30281
- Taylor, D. D., y Shah, S. (2015). “Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes”. *Methods (San Diego, Calif.)*, 87, pp. 3–10. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.02.019
- Théry, C., Zitvogel, L. y Amigorena, S. (2002). “Exosomes: composition, biogenesis and function”. *Nat Rev Immunol* 2, pp. 569–579. DOI: 10.1038/nri855
- Vaswani, K., Mitchell, M.D., Holland, O.J., Qin Koh, Y., Hill, R.J., Harb, T., Davies, P.S.W., y Peiris, H. (2019). “A Method for the Isolation of Exosomes from Human and Bovine Milk” *Journal of Nutrition and Metabolism*. Volume 2019. DOI: 10.1155/2019/5764740
- Verdijk, L. B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H. H. y Van Loon, L. J. (2007). “Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly”. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292(1), E151–E157. DOI: 10.1152/ajpendo.00278.2006
- Wei, R., Zhao, L., Kong, G., Liu, X., Zhu, S., Zhang, S. y Min, L. (2020). “Combination of Size-Exclusion Chromatography and Ultracentrifugation Improves the Proteomic Profiling of Plasma-Derived Small Extracellular Vesicles”. *Biological procedures online*, 22, 12. DOI: 10.1186/s12575-020-00125-5
- Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A., y Nieuwland, R. (2014). “Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation”. *Journal of extracellular vesicles*, 3, DOI: 10.3402/jev.v3.23262