



Universidad Zaragoza

Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares de tejido pulmonar

María Guerra Andrés

Trabajo de Fin de Grado supervisado por
Dr. David Sanz-Rubio y Dr. José María Marín Trigo

Trastornos respiratorios del sueño, GIIS-041, Hospital
Universitario Miguel Servet

2021

Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción	4
2.1. Cáncer de pulmón.....	4
2.2. Vesículas extracelulares	5
2.3. Vesículas extracelulares y cáncer.....	7
2.4. Vesículas extracelulares de tejido sólido.....	8
3. Hipótesis y objetivos	10
4. Materiales y métodos.....	11
4.1. Población de estudio.....	11
4.2. Aislamiento de exosomas de parénquima pulmonar	11
4.2.1. Procesamiento de muestra primaria y homogeneización.....	11
4.2.2. Aislamiento de exosomas a partir del homogenizado de pulmón	12
4.3. Aislamiento de exosomas de plasma sanguíneo.....	12
4.4. Caracterización de exosomas	13
4.4.1. Marcadores proteicos mediante inmunoensayo, ELISA	13
4.4.2. Cuantificación de exosomas mediante tecnología NTA.....	14
4.4.3. Visualización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión...	15
4.5. Extracción del RNA presente en los exosomas de tejido pulmonar	15
5. Resultados y discusión	16
5.1. Sujetos de estudio.....	16
5.2. Caracterización morfológica de las VE mediante microscopía electrónica de transmisión	16
5.3. Comprobación de la presencia de exosomas mediante ExoElisa	17
5.4. Cuantificación de exosomas mediante tecnología NTA.....	19
5.5. Secuenciación del miRNA presente en los exosomas de tejido pulmonar.....	22
5.6. Próximos abordamientos del estudio.....	23
6. Conclusión.....	24
7. Referencias	25

1. Resumen

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor tasa de mortalidad a nivel mundial. Actualmente no existe un método de diagnóstico específico y sensible, lo que provoca un diagnóstico tardío, factor que contribuye a su mal pronóstico. Por ello, existe un creciente interés por encontrar nuevos biomarcadores, entre los que destacan los exosomas, un subgrupo de vesículas extracelulares (VE) de 30-150 nm, las cuales presentan un cargamento específico dependiendo del estado fisiopatológico de la célula. Los exosomas se han aislado de distintos fluidos corporales, pero solo ha sido descrito su aislamiento de tejido sólido en cerebro. En este trabajo, nos planteamos la hipótesis de que los exosomas se encuentran también retenidos en tejido pulmonar

Las vesículas extracelulares se aislaron de parénquima pulmonar de 4 pacientes con lesiones benignas y 6 pacientes con adenocarcinoma pulmonar mediante precipitación con un polímero artificial. Se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y ELISA, comparándolas con las aisladas de plasma de esos mismos pacientes. Finalmente, se cuantificaron mediante *Nanoparticle Tracking Assay* (NTA) y se extrajo su RNA.

Los resultados de caracterización morfológica y proteica mostraron que el aislamiento se realizó exitosamente. En cuanto a la cuantificación, se observó que los pacientes con lesiones tumorales tenían una mayor cantidad de exosomas retenidos en el parénquima pulmonar ($5,5 \cdot 10^8$ VE/ml) respecto a los intervenidos de otra lesión ($2,5 \cdot 10^8$ VE/ml) ($p < 0.05$). Por último, los análisis de cuantificación del RNA mostraron que su aislamiento también fue optimizado.

Los resultados expuestos muestran que el protocolo establecido permite obtener por primera vez exosomas de tejido pulmonar. Además, su abundancia en pacientes con adenocarcinoma indica su posible participación en la fisiopatología del cáncer de pulmón. Finalmente, el éxito en el aislamiento de su RNA permitirá el análisis de su carga genética para su futuro uso como biomarcadores.

Abstract

Lung cancer is the type of cancer with the highest mortality rate in the world. Nowadays, there are no specific and sensitive diagnostic methods, which results in late diagnosis and, therefore, bad prognosis. For this reason, there is a growing interest in finding new biomarkers, among which exosomes stand out. They are a subgroup of extracellular vesicles of 30-150 nm, which present a specific cargo depending on the physiopathological state of the cell. Exosomes have been isolated from several body fluids. However, their isolation in tissue has only been described in brain. In this final degree project, we hypothesise exosomes are also retained in lung tissue.

Extracellular vesicles were sampled by precipitation with an artificial polymer from 4 patients with benign lesions and 6 with lung adenocarcinoma. Then, the EVs were characterized by Transmission Electronic Microscopy (TEM) and ELISA and compared with those isolated from blood plasma samples of the same patients. Finally, the EVs were quantified by Nanoparticle Tracking Assay (NTA), and their RNA was extracted.

The morphological and protein characterization results show that, effectively, exosomal isolation was successful. Concerning exosomal quantification, it was observed that patients with tumoral growth had a higher amount of lung parenchymal exosomes ($5,5 \cdot 10^8$ VE/ml) compared to those with other lesions ($2,5 \cdot 10^8$ VE/ml) ($p < 0.05$). Finally, RNA quantification analysis evidence the isolation of this kind of sample was also optimized.

The exposed results prove that, for the first time, the established protocol allows to obtain lung tissue exosomes. In addition, the differences in the exosome abundance in patients with adenocarcinoma indicate its possible role in lung cancer physiopathology. Ultimately, the success in the isolation of their RNA would allow the analysis of their genetic cargo for their future use as biomarkers.

2. Introducción

2.1. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se desarrolla cuando células localizadas en los pulmones crecen sin control. Estas células pueden adquirir la capacidad de invadir tejidos adyacentes, proceso conocido como infiltración, promoviendo el crecimiento local. Los pulmones se encuentran divididos en lóbulos (2 el pulmón izquierdo y 3 el derecho). En función de la localización del tumor, la diseminación linfática puede afectar principalmente a los ganglios del mediastino (zona situada entre los dos pulmones) cuando este se sitúa en la zona media inferior, mientras que cuando se localiza en el tercio superior, se afectan principalmente los ganglios supraclaviculares.

En España, se diagnostican alrededor de 29.632 nuevos casos, siendo el tercer tumor en frecuencia tanto en hombres como en mujeres¹. En cuanto a mortalidad, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Los factores principales que contribuyen a su desarrollo son el tabaco, factores genéticos, exposición a contaminantes medioambientales, tóxicos o carcinógenos, el sexo, la dieta, y ciertas infecciones bacterianas y víricas, como el VIH-1 y VPH².

El cáncer de pulmón se subdivide en dos grandes grupos. Por un lado, se definen aquellos ocasionados por células pequeñas o microcíticos, que representan en torno al 10-15% y se caracterizan por una alta agresividad, crecimiento rápido y mal pronóstico. Por otro lado, se encuentran los carcinomas no microcíticos que representan el 85-90% restante. Estos a su vez se pueden clasificar en diferentes subgrupos entre los que se encuentran adenocarcinoma, carcinoma escamoso y cáncer neuroendocrino. En este trabajo, nos centraremos en el adenocarcinoma, ya que representa en torno al 45% de los carcinomas de pulmón³. A pesar de no estar tan relacionado con el tabaco como otros, es el que más presente se encuentra entre los fumadores. El adenocarcinoma de pulmón se localiza principalmente en zonas más periféricas por lo que principalmente afecta a la pleura y la pared torácica.

Los métodos para diagnosticar esta patología consisten, en primer lugar, en valorar los síntomas que presenta el paciente, además de su historia clínica. En base a esta valoración inicial, se realizan una serie de pruebas, como puede ser un análisis de sangre y orina, una radiografía del tórax, un TAC, una citología de esputo y una broncoscopia. Sin embargo, estos métodos no son muy específicos y, en ocasiones, no permiten detectar la presencia del tumor. Además, algunos de ellos son invasivos⁴.

El tratamiento actual que se proporciona a los pacientes con cáncer de pulmón consiste, principalmente, en cirugía, radioterapia y quimioterapia. Además, se han desarrollado nuevos medicamentos de terapia dirigida, los cuales se están empleando para tratar el cáncer de pulmón no microcítico⁵. Sin embargo, solo una pequeña parte de pacientes mejora con estos tratamientos.

Esto se debe principalmente a que surgen resistencias al tratamiento y a la alta incidencia de metástasis⁶.

Debido a la falta de un método de diagnóstico sensible y específico, y a la falta de eficacia de los tratamientos actuales, existe un creciente interés por encontrar nuevos biomarcadores tanto diagnóstico como pronóstico. Encontrar biomarcadores diagnóstico específicos de cáncer de pulmón en sangre permitiría determinar de forma más rápida, eficaz y menos invasiva si el paciente padece la patología. Por su parte, los biomarcadores pronósticos permitirían saber con antelación cómo va a evolucionar el paciente, lo que haría posible personalizar el seguimiento y el tratamiento que se le va a realizar. Se ha visto que una posibilidad sería empelar las vesículas extracelulares como biomarcadores, en concreto los exosomas.

2.2. *Vesículas extracelulares*

Las vesículas extracelulares (VE) son un grupo heterogéneo de compartimentos membranosos que están rodeados por una bicapa lipídica y transportan en su interior diversas moléculas con función biológica⁷. La mayor parte de las células del organismo son capaces de secretar estas vesículas. De forma histórica, se pensaba que las vesículas extracelulares contenían material de desecho de la célula. Sin embargo, desde hace unos años se sabe que este proceso posee una gran importancia en los sistemas biológicos^{7,2}. La VE se pueden dividir según su tamaño y biogénesis en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos como se muestra en la Figura 1⁷.

En este trabajo nos centraremos en el grupo de menor tamaño, los exosomas. Estos presentan un tamaño entre 30 y 150 nm, y se pueden aislar de distintos fluidos corporales, como el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, secreciones de las vías aéreas, etc^{8,9,10}. Los exosomas proceden de vesículas intraluminales, las cuales se forman al madurar los endosomas multivesiculares. Al fusionarse el endosoma con la membrana plasmática, se produce la liberación de los exosomas el exterior de la célula. Los exosomas realizan un papel esencial en la comunicación celular, y participan tanto en procesos fisiológicos como patológicos⁷.

Estas vesículas están rodeadas por una bicapa de fosfolípidos, la cual contiene lípidos característicos de su tejido de origen. Los exosomas presentan niveles altos de colesterol, esfingomielina, ceramida y balsas lipídicas en su bicapa lipídica. La presencia de ciertos de estos lípidos tiene el objetivo de aumentar la rigidez de la membrana exosomal².

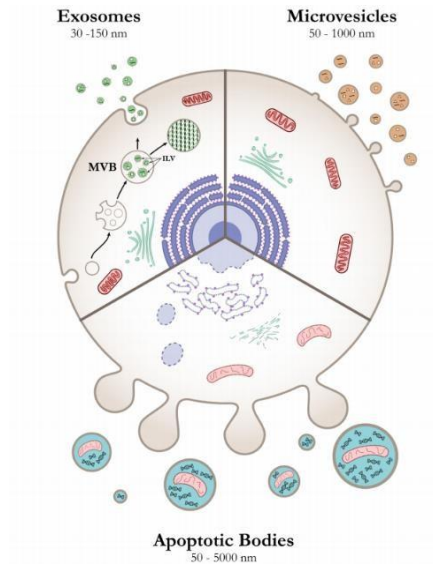


Figura 1. Representación de las tres clases de vesículas extracelulares producidas por la célula. Arriba a la izquierda se muestra la formación y liberación de los exosomas. Arriba a la derecha se observa la liberación de microvesículas. Debajo se observa la formación y liberación de cuerpos apoptóticos. En los tres casos se muestra el tamaño que presentan estas vesículas².

Además de lípidos, también presentan proteínas asociadas a balsas lipídicas, como proteínas con anclajes de glicofosfatidilinositol. Esto les permite adherirse y fusionarse con células circunvecinas o distantes, de forma que pueden transferir de manera horizontal una gran variedad de moléculas biológicas. Estas proteínas de membrana se pueden emplear como marcadores de los exosomas^{2,10}.

El cargamento que transportan es muy variado. Además de proteínas, también pueden presentar lípidos y ácidos nucleicos, como mRNA o miRNA. Este cargamento depende del estado fisiológico o patológico de la célula, además del estímulo que provoca su producción y liberación. El miRNA es esencial en la regulación post-transcripcional, por lo que un fallo en la regulación de su actividad daría lugar a diversas enfermedades⁸.

Una vez que han sido liberados al espacio extracelular, los exosomas viajan hasta la célula diana y entregan su contenido, dando lugar a una respuesta funcional y un cambio fenotípico, lo que afecta al estado fisiológico o patológico de la célula^{6,7}.

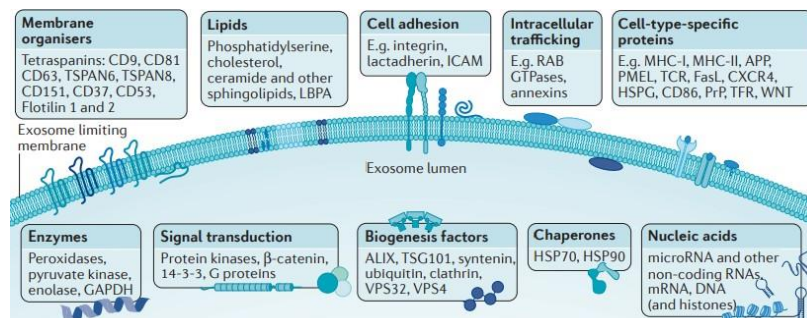


Figura 2. Representación de la variedad de cargamentos que pueden transportar los exosomas, tanto en su interior como en la membrana plasmática. En cada grupo se indican distintos ejemplos de moléculas que se ha visto que pueden presentar los exosomas⁷.

Hay estudios que han demostrado que el miRNA y las proteínas de las vesículas extracelulares podrían emplearse como biomarcadores del cáncer de pulmón, así como indicadores de su progresión^{6,9,11}. Esto se debe, por un lado, a su accesibilidad en los fluidos corporales (plasma, suero, orina, saliva, lavado bronqueoalveolar o esputo inducido) y a la especificidad que presenta el cargamento que transportan. Además, los exosomas reflejan el estado fisiológico y el microambiente de las células de las que proceden. Por último, son moléculas muy estables, debido a la bicapa lipídica que los rodea^{9,11}.

2.3. *Vesículas extracelulares y cáncer*

La cantidad de estudios sobre exosomas en cáncer de pulmón ha aumentado ampliamente en los últimos años. Una de las razones se debe a la capacidad que presentan de modificar el microambiente tumoral, promoviendo la metástasis, la angiogénesis, la transición epitelio-mesénquima y la tumorigénesis. Además, también modulan la respuesta inmune^{2,10}.

Los exosomas secretados por las células tumorales pueden influir en la actividad de las células receptoras mediante la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores. Por ejemplo, se ha visto que los exosomas que derivan de las células de cáncer de pulmón humanas A549 inducen la tumorigénesis¹³. Estos exosomas contienen miR-21 y miR-29a, los cuales actúan como agonistas paracrinos del receptor TLR-8. Su unión estimula la vía de NF- κ B, lo que facilita la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α e IL-6. Como consecuencia, esto puede inducir la transformación de las células receptoras, aumentando su proliferación y facilitando la migración a otros tejidos^{12,13}. Por otro lado, Gutkin et al. mostraron en su estudio que los exosomas secretados por las células tumorales pueden presentar hTERT mRNA, responsable de aumentar la actividad de la telomerasa. Este mRNA causa un crecimiento incontrolado de las células. Los exosomas transportan el hTERT mRNA hasta células no cancerígenas, donde induce la proliferación celular y detiene la senescencia, dando lugar a malignidad en estas^{2,17}.

Los exosomas pueden promover la angiogénesis, por un lado, transfiriendo proteínas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), IL-6, IL-8 y angiopoyetina. Por otra parte, también pueden estimular las células endoteliales vasculares a través de miRNAs¹². Los exosomas que contienen tetraspaninas en su membrana facilitan la angiogénesis. Por ejemplo, en su estudio, Cui et al. mostraron que las células de adenocarcinoma que sobreexpresan el inhibidor de metaloproteinasas-1 en tejido (TIMP-1) secretan una mayor cantidad de exosomas que presentan miR-210. Este miRNA, a través de la ruta dependiente de CD63/fosfatidilinositol 3 quinasa/AKT/HUF-1, estimula la angiogénesis in vitro¹⁴. Otro estudio indicó que el miR-21 exosomal puede activar a STAT3, aumentando así la

expresión de VEGF e induciendo la angiogénesis y transformación maligna de las células del epitelio bronquial humano^{18,20}.

Por último, estudios recientes mostraron que los exosomas están estrechamente asociados con la metástasis. Estas vesículas pueden transmitir mensajes para estimular la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales, induciendo así su migración a otros tejidos¹². Por ejemplo, los exosomas que derivan de linfocitos T activados contienen Fas ligando (FasL). Estos pueden aumentar la expresión de la metaloproteinasa 9, lo que activa la vía de Fas/FasL e intensifica la habilidad metastática de las células de cáncer de pulmón^{12,15}. Por otra parte, Zomer et al. determinaron que células tumorales menos malignas pueden captar los exosomas de aquellas con capacidad de invadir otros tejidos. Esto provoca que adquieran una mayor capacidad de migración y, por tanto, de generar metástasis¹⁶. Finalmente, también se ha demostrado que los exosomas que derivan de células de cáncer de pulmón en estado tardío o metastático pueden inducir la expresión de vimentina. Esta es una proteína de los filamentos intermedios cuya expresión está relacionada con el aumento de la metástasis. Esto se debe a que, al aumentar la expresión de esta proteína, se ve favorecida la transición epitelio-mesénquima^{18,19}.

2.4. Vesículas extracelulares de tejido sólido

A pesar del creciente interés en las vesículas extracelulares, todavía no se ha establecido una metodología estándar para aislar, identificar y cuantificar los exosomas presentes en los fluidos corporales, lo que hace que la interpretación de los resultados sea complicada. Diferentes técnicas se han intentado implementar en busca de este estándar. Sin embargo, todas ellas presentan una serie de limitaciones.

Los protocolos emplean frecuentemente ultracentrifugación, cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) y precipitación con un reactivo precipitante¹⁰. La ultracentrifugación es un método que requiere mucho tiempo para poder separar completamente los componentes de una mezcla. Muchas veces se necesita realizar el proceso varias veces para evitar que haya contaminación cruzada entre las distintas fracciones. Las ultracentrífugas también requieren un mantenimiento constante, lo que resulta costoso. Además, la fuerza centrífuga implica un desgaste de las moléculas, lo que supone un riesgo para el análisis²¹.

La SEC también presenta una serie de inconvenientes. Por un lado, el volumen de muestra que se puede unir a la columna debe ser menor o igual al 5% del volumen de la columna. Por otra parte, el rendimiento del proceso es bajo, por lo que la concentración de muestra que se obtiene es pequeña. Además, la fracción de recogida final que se obtiene es grande. Esto puede suponer un problema a la hora de separar correctamente el RNA, a no ser que se concentre posteriormente, lo cual implicaría un paso adicional²².

Otro método ampliamente utilizado para el aislamiento de los exosomas es la precipitación con kits comerciales, los cuales suelen emplear reactivos basados en polímeros artificiales que provocan la precipitación de estas partículas. Sin embargo, el precipitado resultante puede presentar impurezas, ya que estos reactivos no suelen ser selectivos para un solo analito. Por otro lado, se puede perder precipitado debido a la manipulación de la muestra. También se trata de un método lento, por lo que no resulta adecuado para trabajar con todos los tipos de muestras²³.

Una alternativa al aislamiento de exosomas en fluido sería obtenerlos directamente a partir de tejido, con el objetivo de evaluar de manera directa los exosomas retenidos en las zonas más limítrofes a las lesiones. Este campo apenas se ha explorado. Hasta la fecha solo existen dos estudios en los que se han logrado aislar con éxito exosomas de tejido, empleando en ambos casos como tejido de origen el tejido cerebral^{24,25}.

El aislamiento de exosomas a partir de parénquima pulmonar no se ha realizado hasta el momento, por lo que no existe un protocolo para ello. El estudio de exosomas de tejido en vez de circulantes se debe, por un lado, a que el tejido es el origen de la lesión, por lo que podría aportar una gran cantidad de información tanto a nivel fisiopatológico como en la búsqueda de nuevos biomarcadores. Por otro lado, el cáncer de pulmón es una enfermedad con alta tasa de recidiva, es decir, que tiende a volver a aparecer tras un periodo de tiempo. Así, el estudio de los exosomas de una parte sana del pulmón de estos pacientes permitiría conocer si existen alteraciones a nivel de comunicación celular. Por último, el estudio simultáneo de los exosomas de parénquima pulmonar y plasma circulante permitiría conocer qué relación existe entre los exosomas presentes en la circulación y en el pulmón.

3. Hipótesis y objetivos

La hipótesis principal de este trabajo fin de grado es que existen en vesículas extracelulares, concretamente exosomas, retenidos en el parénquima pulmonar. La validación de esta hipótesis abriría la puerta a nuevas preguntas de investigación en campo de las enfermedades respiratorias y más concretamente del cáncer de pulmón.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio consiste en establecer un protocolo para aislar y caracterizar los exosomas presentes en parénquima pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Recoger, procesar y almacenar muestras primarias de tejido pulmonar y sangre circulante.
- Aislar exosomas mediante la adaptación de un protocolo de precipitación con polímero artificial.
- Caracterizar los exosomas mediante ELISA (caracterización proteica) y microscopía electrónica de transmisión (caracterización morfológica).
- Cuantificar las muestras de exosomas y evaluar los cambios en la concentración debidos al estado patológico del paciente.
- Aislar el RNA total de los exosomas de parénquima pulmonar para determinar su potencial uso en posteriores estudios.

4. Materiales y métodos

4.1. Población de estudio

Los pacientes incluidos en este trabajo fueron reclutados de manera consecutiva por parte del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS). Estos pacientes acudían al Servicio para ser intervenidos ante la sospecha de cáncer de pulmón. De manera previa a la intervención, todos los sujetos incluidos fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado. Todos los protocolos de manipulación del paciente y de las muestras se realizaron de acuerdo a las regulaciones regionales, y el estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Aragón³².

4.2. Aislamiento de exosomas de parénquima pulmonar

4.2.1. Procesamiento de muestra primaria y homogeneización

El trozo de tejido fue recogido en un tubo estéril inmediatamente tras la intervención por el Servicio de Cirugía Torácica del HUMS. Este fragmento procedía de la zona más alejada de la lesión. Se tomó una imagen del trozo y se procedió a su corte en fragmentos más pequeños que facilitaron su conservación en tubos Eppendorf de 5ml, los cuales se preservaron a -80°C hasta su posterior uso.

Tras recoger un número suficiente de muestras para llevar a cabo el estudio, se procedió a realizar la homogeneización del tejido mediante digestión enzimática.

En primer lugar, se descongeló una de las alícuotas de tejido a temperatura ambiente y pesamos la muestra. Si la muestra presentaba mucha sangre, se realizó su lavado en PBS.

Se preparó el medio de digestión, en función del peso del fragmento de pulmón, que consta de medio DMEM, colagenasa, dispasa y DNasa. Este medio de digestión se añadió a una placa de Petri junto con el trozo de parénquima y se cortó en fragmentos lo más pequeños posible, de forma que a las enzimas tuviesen una mayor superficie de acción y, por lo tanto, realizasen la digestión de la forma más efectiva posible. La suspensión generada en esta primera etapa se traspasó a un tubo Falcon de 50 ml, y se incubó 2 horas en agitación a 37°C.

Pasado ese tiempo, se añadió el medio de neutralización para detener la acción de las enzimas. El medio de neutralización estaba formado por medio DMEM con suplemento B27, de manera que no contenía vesículas extracelulares. El volumen añadido fue igual al que teníamos en el tubo de homogeneización, y se mezcló por inversión. Para descartar fragmentos de parénquima que no se hubieran digerido por completo, sobre todo aquellos con un alto contenido de colágeno, se utilizó un tamiz celular de 100 micrómetros. La suspensión celular resultante se centrifugó a 2.000 g durante 10 minutos para eliminar las células y restos celulares y se criopreservó el sobrenadante en tubos de 2ml a -80°C.

4.2.2. Aislamiento de exosomas a partir del homogenizado de pulmón

Las alícuotas de homogeneizado se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 20 minutos, a 2.000 g y a 20°C, para eliminar posibles restos más grandes generados durante la congelación. Se tomaron 1250 µl del sobrenadante, se traspasaron a un Eppendorf y se volvió a centrifugar 20 minutos, a 10.000 g y a 20°C. De esta forma, se eliminaron todos los restos celulares que pudiera haber en la muestra.

Tras ello, 1 ml de sobrenadante se añadió a un nuevo tubo y se mezcló con el reactivo precipitante ExoQuick-TC (ExoQuick-TC EV Isolation Kit, System Biosciences). Como la densidad de este es distinta a la del homogenizado, al mezclarlos se observó la formación de una nebulosa. No existe evidencia en la literatura de la importancia de este paso, pero, tras varios aislamientos, se ha visto que es clave que se forme espacio para obtener una mayor cantidad de precipitado final de exosomas. También fue importante introducir las muestras en hielo rápidamente en cuanto se añadió el reactivo. Este se dejó actuar 24 horas a 4°C.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras 75 minutos, a 10.000 g y a 4°C. El sobrenadante fue eliminado por completo y se resuspendió el pellet (formado por los exosomas que han precipitado) en 200 µl de PBS filtrado. El PBS se filtró para eliminar cualquier partícula que pudiese tener, ya que, al ser una solución salina que ha estado tiempo en reposo, se pueden formar cristales. Tras su aislamiento, los exosomas se preservaron a -20°C hasta su análisis.

4.3. Aislamiento de exosomas de plasma sanguíneo

Además del tejido, previamente a la anestesia y la intervención, se extrajeron dos tubos de sangre (tubos Vacutainer con EDTA, BD). Estas muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos para la separación del plasma, el anillo de linfocitos y los eritrocitos. Una vez alícuotada cada fracción, se congelaron a -80 °C para su análisis futuro.

Con el objetivo de realizar el aislamiento de exosomas, una alícuota de plasma se descongeló y se centrifugó 5 minutos, a 2.000 g y a 20°C. Se descartó el pellet y se volvió a centrifugar, pero en esta ocasión 20 minutos, a 10.000 g y a 20°C, descartando de nuevo el pellet. Mediante estas centrifugaciones se eliminaron los posibles restos celulares que pudiera tener el plasma.

Tras ello, se añadieron 6 µl de trombina a 600 µl de plasma para eliminar los factores de coagulación, y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos, a 10.000 g y a 20°C, y se descartó el pellet. Para la precipitación de los exosomas, se añadieron 200 µl de buffer de precipitación (miRCURY Exosome Kits, Qiagen) a 500 µl de plasma y se mezcló durante 5 segundos utilizando el vortex. Al igual que en tejido pulmonar, este paso fue muy importante para obtener una buena cantidad de exosomas. Al mezclar ambas

soluciones, la nebulosa se debe formar despacio, aunque en el caso del plasma fue más sencillo porque la diferencia de densidad entre este y el buffer de precipitación era mayor. Una vez mezclado, se introdujo rápidamente en hielo y se incubó 1 hora a 4°C.

Pasado este tiempo, se centrifugó 5 minutos, a 500 g y a 20°C. El sobrenadante se eliminó, ya que en el pellet se encontraban los exosomas que habían precipitado. Se volvió a realizar otra centrifugación igual para eliminar por completo el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 270 µl de PBS filtrado.

4.4. Caracterización de exosomas

4.4.1. Marcadores proteicos mediante inmunoensayo, ELISA

Para comprobar que las vesículas extracelulares que se han aislado mediante los protocolos anteriores eran exosomas, se realizó un ELISA específico para detectarlos, llamado ExoElisa. En este se emplearon anticuerpos que reconocían específicamente la proteína CD63, una tetraspanina presente en la membrana de los exosomas.

En primer lugar, se midió la cantidad de proteína presente en las muestras mediante Nanodrop. Se calculó el volumen necesario en cada caso para tener 100 µg de proteína en cada pocillo. Posteriormente, se añadió Coating buffer hasta llegar a los 60 µl y, de estos, 50 µl de cada muestra se introdujeron en los pocillos.

Para comprobar que se ha realizado todo correctamente, se empleó también el estándar ExoELISA-ULTRA. Se trataba de proteína CD63 purificada. Se realizó una dilución 1:1000 en Coating buffer y se vorteoó. Esta dilución correspondía con el primer estándar. Se realizaron 7 diluciones seriadas (ver Tabla 2 y Figura 1 del anexo), de las cuales solo se añadió el estándar 2, 4 y 6 a la placa, además del blanco, que solo contiene Coating buffer. Las diluciones estándar podrían emplearse para realizar una recta de calibrado y determinar la cantidad de exosomas presentes en las muestras. Sin embargo, en este caso solo se empleó como método de evaluación proteica, ya que, para realizar el conteo de exosomas, se hizo uso de la técnica NTA. Al igual que para las muestras, se añadieron 50 µl de cada estándar a los pocillos.

Se cubrió la placa y se incubó 1 hora a 37°C para que los exosomas se fijasen al fondo del pocillo. Cada pocillo se lavó 3 veces durante 5 minutos en agitación con 100 µl de Wash Buffer 1X. Este se tuvo que preparar previamente a partir de Wash Buffer 20X.

Se realizó una dilución 1:100 del anticuerpo primario anti-CD63 en Blocking Buffer, y se adicionaron 50 µl a cada pocillo. La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Se volvió a lavar la placa como se ha descrito anteriormente.

En el caso del anticuerpo secundario, se realizó una dilución 1:5000 en Blocking Buffer, y se adicionaron 50 µl a cada pocillo. Se incubó la placa 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavó como en los pasos anteriores.

Finalmente, se añadieron 50 µl del reactivo TMB ELISA a cada pocillo y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Este reactivo era sustrato de la enzima conjugada con el anticuerpo secundario. El producto resultante de la reacción da color azul. Se añadieron 50 µl de Stop Buffer para parar la reacción y se leyó inmediatamente en un espectrofotómetro a 450 nm. Al añadir el Stop Buffer, la solución se volvió amarilla.

4.4.2. Cuantificación de exosomas mediante tecnología NTA

La tecnología NTA permite obtener la distribución del tamaño de las partículas en suspensiones líquidas. Un láser incide en la muestra, y al pasar por él las partículas, se dispersa la luz de tal forma que puede verse en un microscopio de 20 aumentos acoplado a una cámara de vídeo²⁶.

El tamaño y la cuantificación de las partículas se calculan en función del movimiento browniano de estas. Una partícula inmersa en un líquido presenta un movimiento aleatorio. Las moléculas que forman el líquido están sometidas a un movimiento térmico, el cual depende de la temperatura del medio. Cualquier partícula que sea lo suficientemente grande para ser observada al microscopio sufre constantes colisiones por parte de las moléculas que la rodean. Cada colisión altera su vector velocidad en una dirección y con un módulo aleatorios, según la posición y energía de la molécula que la golpea. El efecto neto es el movimiento errático de la partícula a través del fluido²⁷.

Para realizar el conteo de exosomas, se empleó el NANOSIGHT (Malvern Particle). De manera previa a inyectar la muestra, se lavaron los conductos y la cámara mediante la inyección en el aparato de 1 ml de agua y 1 ml de aire. La carga de la muestra se realizó con una dilución 1:1000 en una mezcla de PBS y EDTA 5mM. Fue necesario añadir EDTA para evitar que las partículas agregasen.

De dicha dilución se tomó 1 ml, se eliminaron las burbujas que pudiera haber en la jeringa y se inyectó en la máquina. Una vez cargada, se ejecutó el script del programa para grabar los vídeos de las partículas en movimiento.

Una vez obtenidos los vídeos, se comprobó que se habían realizado correctamente y que no presentaban ninguna anomalía. Se ajustó el brillo para tener una mayor sensibilidad, pero sin considerar el ruido de fondo como nanopartículas.

El programa dio color rojo a las nanopartículas y azul al ruido de fondo. Además, mediante una línea roja muestra el movimiento de cada partícula y, dependiendo de este y del brillo obtenido anteriormente, calculó su tamaño.

4.4.3. Visualización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión

Para visualizar y comprobar la presencia de los exosomas aislados a partir de parénquima pulmonar, se empleó microscopía electrónica de transmisión. El microscopio electrónico de transmisión (TEM) tiene una columna que irradia una muestra ultradelgada con un haz de electrones. Parte de estos electrones son transmitidos y otra parte son dispersados, y esto se emplea para formar una imagen. La imagen generada se proyecta en dos dimensiones sobre una pantalla fluorescente, y se obtiene finalmente a través de una cámara acoplada a un ordenador^{28,29}.

4.5. Extracción del RNA presente en los exosomas de tejido pulmonar

La extracción del RNA total de los exosomas aislados de parénquima pulmonar se llevó a cabo utilizando el kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced (QIAGEN).

En primer lugar, se añadieron 60 µl de buffer RLP a 200 µl de exosomas, y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 20 µl de buffer RPP y se incubaron otros 3 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se centrifugó 3 minutos, a 12.000 g y a temperatura ambiente. Se descartó el pellet, ya que el RNA se encontraba en el sobrenadante.

Se añadieron 250 µl de isopropanol a 250 µl de muestra y se pasó por el vórtex. Se transfirió todo a una columna RNAeasy UCP MinElute (RNeasy UCP Micro Kit, QIAGEN) y se centrifugó 15 segundos, a 8.000 g y a temperatura ambiente. En este caso se descartó el eluido, ya que el RNA se había quedado adherido a la columna.

Se adicionaron 700 µl de buffer RWT a la columna, se centrifugó 15 segundos, a 8.000 g y a temperatura ambiente, y se volvió a descartar el eluido. A continuación, se añadieron 500 µl de buffer RPE y se centrifugó como en el paso anterior, descartando el eluido. Se adicionaron 500 µl de etanol 80% y, en este caso, se centrifugó 2 minutos, a 8.000 g y a temperatura ambiente. Se descartaron el eluido y el tubo.

En un nuevo tubo colector de 2 ml, se colocó la columna y se centrifugó 5 minutos, a 10.000 g y a temperatura ambiente. Se volvió a descartar el eluido y el tubo. Estos cuatro últimos pasos permiten eliminar de la columna otras moléculas distintas al RNA y que podrían haber quedado adheridas.

Finalmente, para recuperar el RNA, se colocó la columna en un tubo colector de 1,5 ml y se añadieron 20 µl de agua libre de RNasas. Se incubó durante 1 minuto y se centrifugó otro minuto, a 10.000 g y a temperatura ambiente. En este caso, lo que se recogió fue el eluido (a -20°C).

5. Resultados y discusión

5.1. Sujetos de estudio

Los datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio se recogen en la Tabla 1 del apartado “Anexos”. Como se observa en ella, la distribución de sexos en nuestra muestra fue de 6 hombres y 4 mujeres, mientras que la edad media fue de 65,8 años. Estos datos son coherentes con los recogidos en estudios poblacionales que evalúan la incidencia del cáncer de pulmón en la población. Además, en este trabajo, como se observa en la columna de diagnóstico, fueron intervenidos por la presencia de adenocarcinoma. Como se ha descrito, es el tipo de cáncer más frecuente, con alrededor del 45 % de los casos.

5.2. Caracterización morfológica de las VE mediante microscopía electrónica de transmisión

En primer lugar, tras el homogeneizado y posterior aislamiento de las vesículas extracelulares, se llevó a cabo su caracterización mediante microscopía electrónica, con el objetivo de evaluar si nuestras muestras contenían estas vesículas. La presencia de VE se confirmó mediante su visualización en todas las muestras analizadas.

En la Figura 3 se muestran dos imágenes representativas de lo que se pudo observar en el conjunto global de muestras que se analizaron. Las vesículas visualizadas presentaron distintos tamaños, pero todas dentro del rango de tamaños asociado a los a exosomas, ya que se encontraban entre 50 y 150 nm^{8,9,10}. En la imagen de la izquierda se pudo visualizar una VE de un tamaño de alrededor de 150 nm, mientras que en la segunda imagen se observaron 3 VE, una de ellas mayor, con un tamaño de 120 nm, y dos más pequeñas de aproximadamente 50 nm.

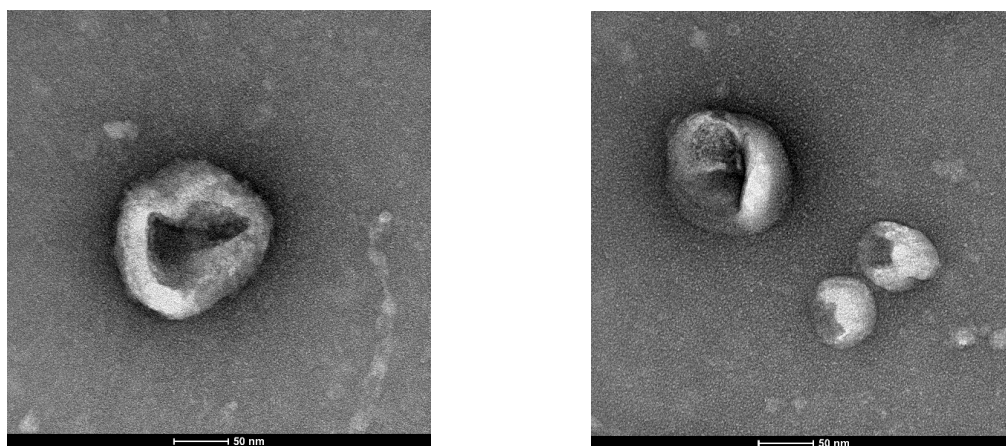


Figura 3. Exosomas aislados a partir de la muestra 20 de tejido pulmonar. Las vesículas fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Se empleó el microscopio Tecnai T20 (FEI Company). En ambas imágenes se pueden observar exosomas de distinto tamaño, ya que estos pueden presentar entre 30 y 150 nm.

En todas ellas se observó la disposición característica de forma de copa que se asocia con los exosomas. Estas vesículas presentaron una forma esférica, y adquirieron una mayor tinción en la

zona de la membrana. Esto fue debido a que la membrana presenta una mayor densidad electrónica. Además, se pudo observar la presencia de una región más oscura en el interior de la vesícula. Este efecto fue ocasionado por la presencia de pliegues en la membrana, que se producen al tratar las muestras para visualizarlas, debido al proceso de deshidratación extrema.

Por lo tanto, las imágenes tomadas mediante TEM corroboraron la presencia de exosomas en las muestras de parénquima pulmonar. Este protocolo permitió que la mayoría de estas vesículas se encontraran íntegras, de forma que el proceso permite aislarlas en un buen estado para posteriores análisis. Por último, las imágenes mostraron que la contaminación con otros tipos de vesículas o partículas era muy reducida, lo que indicó que el protocolo era específico para el aislamiento de este tipo de vesículas extracelulares.

5.3. Comprobación de la presencia de exosomas mediante ExoElisa

La visualización de las muestras en el microscopio electrónico permitió determinar la presencia de VE. Sin embargo, a pesar de observar que estas tenían un tamaño inferior a 200 nm, no era suficiente para definir las como exosomas. Para ello, fue necesario realizar la detección de una de sus proteínas de membrana, en este caso la tetraspanina CD63. En este experimento, se seleccionaron 4 muestras de VE obtenidas de parénquima pulmonar y otras 4 obtenidas de plasma de los mismos pacientes.

En primer lugar, siguiendo las recomendaciones del kit de ELISA (ExoELISA-ULTRA Complete Kit CD63 Detection, System Biosciences), se ajustó la concentración de todas las muestras con el objetivo de añadir a cada pocillo 100 µg de proteína. En nuestro experimento, al tratarse de muestras biológicas de un alto valor, se realizó un cálculo aproximado de la concentración de proteína mediante el uso de 2 microlitros de muestra en el Nanodrop. Este método se seleccionó con el fin de utilizar una alícuota muy pequeña de la muestra. A partir de la cantidad de proteína calculada mediante el Nanodrop (ver Tabla 3 de los anexos), se diluyó cada una de las muestras como se indica en el apartado 2.1.1 de “Materiales y métodos”. El factor de dilución utilizado en cada muestra fue importante ya que, al calcular la cantidad de exosomas, se debió tener en cuenta dicha dilución.

Con el objetivo de realizar una aproximación en la concentración de VE en nuestras muestras, se llevó a cabo una recta de calibrado empleando las diluciones estándar. La cantidad de exosomas presente en cada estándar estaba indicada en el protocolo del kit ExoElisa (ver Tabla 2 de los anexos). Debido a que el objetivo del ELISA era evaluar si las VE presentes en nuestras muestras eran o no exosomas, y no su cuantificación exacta, se incluyeron tan solo tres de los puntos de

estándar en la recta de calibrado. A partir de ellos, se obtuvo una regresión lineal que nos proporcionó una recta en la que interpolar los valores de absorbancia de las muestras.

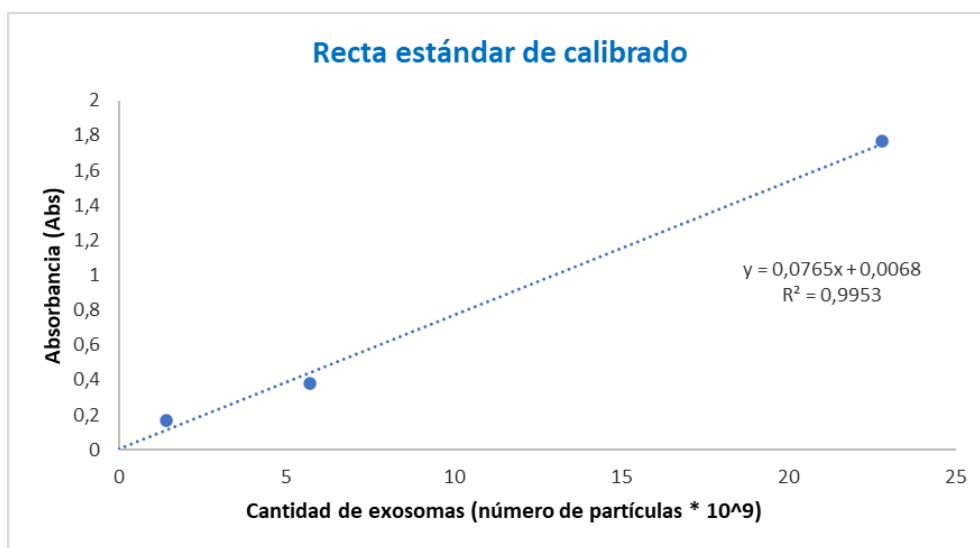


Figura 4. Recta de calibrado obtenida a partir de las absorbancias de los estándares 2, 4 y 6. La cantidad de exosomas presentes en cada estándar se encuentra indicada en el protocolo del kit (ver Tabla 1 de los anexos). El eje de abscisas muestra la cantidad de exosomas expresado en número de exosomas * 10⁹, mientras que el de ordenadas indica la absorbancia expresada en unidades de absorbancia. También se incluye la ecuación de la recta.

Tabla 1. Datos obtenidos a partir de la recta de calibrado. La primera columna indica la muestra analizada, mientras que la segunda incluye los resultados de absorbancia obtenidos mediante el ExoElisa. En la tercera columna se muestra la cantidad de exosomas calculada a partir de la ecuación de la recta de calibrado, una vez restada la absorbancia del blanco.

Muestra	Absorbancia	Número de exosomas
Blanco	0,046	
Estándar 6	0,166	2,08 * 10 ⁹
Estándar 4	0,378	4,85 * 10 ⁹
Estándar 2	1,765	2,29 * 10 ¹⁰
42 pulmón	0,144	1,79 * 10 ⁹
44 pulmón	0,140	1,74 * 10 ⁹
46 pulmón	0,127	1,57 * 10 ⁹
47 pulmón	0,105	1,28 * 10 ⁹
42 plasma	0,142	1,77 * 10 ⁹
44 plasma	0,143	1,78 * 10 ⁹
46 plasma	0,182	2,29 * 10 ⁹
47 plasma	0,162	2,03 * 10 ⁹

En primer lugar, al obtener la recta de calibrado se observó que el proceso manipulación de los estándares se había realizado correctamente ya que, pese a solo seleccionar tres puntos de referencia, la recta patrón proporcionaba un elevado valor de R², como se observa en la Figura 4.

Por ello, se dedujo que nos encontrábamos en una zona de regresión lineal entre la absorbancia y la concentración, por lo que nuestras muestras eran interpolables.

En cuanto a las muestras analizadas, en todas ellas se detectó la proteína CD63, por lo que las VE presentes en estas corresponden a exosomas. Como se puede observar en la Tabla 1, la cantidad de estas VE en los distintos pocillos es similar. Sin embargo, la cantidad de muestra añadida a los pocillos con plasma fue menor que la añadida a los de tejido pulmonar (10 μ l frente a 20-40 μ l). De esta forma, en plasma se ha aislado una mayor cantidad de VE que en tejido pulmonar.

Los valores obtenidos en plasma son similares a los que se muestran en la literatura, lo que indica que el proceso se ha realizado correctamente. En nuestro caso, la cantidad de VE aisladas de plasma oscila entre $1,77 \cdot 10^9$ y $2,29 \cdot 10^9$ partículas. Como estos estaban en 50 μ l, la concentración de exosomas en las muestras de plasma sería de $3,54 \cdot 10^{10}$ - $4,58 \cdot 10^{10}$ partículas/ml. Por su parte, en la literatura esta concentración se encuentra entre $1,41 \cdot 10^{10}$ - $2,10 \cdot 10^{11}$ partículas/ml^{30,31}. Sin embargo, el ELISA es un proceso semicuantitativo, por lo que los resultados obtenidos no son tan rigurosos como los que pueden proporcionar otros métodos cuantitativos. Por esta razón, esta técnica se empleó para comprobar la presencia de exosomas en las muestras y no para cuantificarlos. Para contar las VE se empleó la tecnología NTA, la cual sí que es cuantitativa.

En cuanto al parénquima pulmonar, aunque la cantidad de exosomas presente es menor que en plasma, la abundancia en estas muestras es algo mayor a la citada por Muraoka et al. para muestras cerebrales²⁵. Esto indica que se ha conseguido establecer un protocolo efectivo que permite aislar exosomas del parénquima pulmonar. Además, tras aplicar el aislamiento en varias muestras, se ha visto que es reproducible, ya que los valores de concentración obtenidos se encontraban en un mismo rango.

La realización del ExoELISA ha permitido comprobar que las VE aisladas y observadas al microscopio electrónico son, efectivamente, exosomas. De esta forma, se asegura que las partículas contadas mediante NTA sean este tipo de VE.

5.4. Cuantificación de exosomas mediante tecnología NTA

El último paso en la caracterización de las muestras fue su cuantificación. En este caso, se llevó a cabo mediante la tecnología de NTA utilizando el aparato Nanosight NS300.

Cada una de las muestras de pulmón fue grabada 5 veces, de forma que el programa analiza los vídeos y aporta un informe con la concentración de partículas presentes, además de otros parámetros.

Para mostrar los resultados, se va a establecer como ejemplo la muestra 42 de tejido pulmonar. En primer lugar, el programa creó dos gráficas. En la Figura 5 se muestra la concentración de nanopartículas en cada uno de los vídeos realizados para la muestra 42 (gráfica izquierda). A partir de estos resultados, calcula la concentración media de las partículas en función de su tamaño, que es lo que muestra la Figura 5 (gráfica derecha). De esta forma, en la muestra 42 tendríamos una concentración aproximada de $6 \cdot 10^6$ partículas de 107 nm/ml.

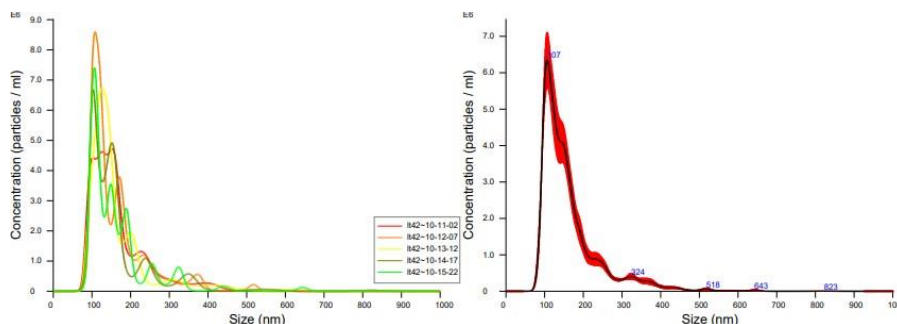


Figura 5. Gráficas aportadas por NANOSIGHT. La primera de ellas muestra la concentración de partículas en función del tamaño para cada uno de los vídeos, en este caso de la muestra 42 de tejido pulmonar. Los datos obtenidos para cada grabación se muestran en colores distintos. Por su parte, el segundo gráfico muestra la concentración media de partículas en la muestra 42 en función del tamaño. El grosor de la región marcada en rojo indica el error estándar de la media.

El informe recoge también detalles del programa, de la cámara de vídeo y del análisis que se ha llevado a cabo para eliminar el ruido de fondo. Además, también incluye los datos estadísticos acerca del tamaño de las partículas analizadas como se muestra en la Figura 6. En este caso, el valor de interés es la moda, ya que la distribución no es gaussiana. De esta forma, las nanopartículas presentes en la muestra de 42 presentan un tamaño de 106,7 nm. También proporciona la concentración exacta de partículas presentes ($5,49 \cdot 10^8$ partículas/ml).

Los resultados obtenidos de todas las muestras de parénquima pulmonar se muestran en la Tabla 4 de los anexos. Cuatro de ellas corresponden a pacientes que no presentaban cáncer de pulmón y el resto a pacientes con adenocarcinoma pulmonar

Stats: Merged Data		Stats: Mean +/- Standard Error	
Mean:	164.9 nm	Mean:	164.9 +/- 1.2 nm
Mode:	106.7 nm	Mode:	119.3 +/- 9.3 nm
SD:	82.0 nm	SD:	82.0 +/- 1.4 nm
D10:	99.0 nm	D10:	99.0 +/- 0.7 nm
D50:	140.5 nm	D50:	140.3 +/- 2.2 nm
D90:	263.8 nm	D90:	262.8 +/- 1.8 nm
		Concentration (Upgrade):	5.49e+08 +/- 1.99e+07 particles/ml
			62.1 +/- 2.8 particles/frame
			61.7 +/- 2.8 centres/frame

Figura 6. Datos proporcionados por NANOSIGHT acerca del tamaño de las partículas analizadas. En estos se muestra la media, moda y desviación estándar (SD). Además, también incluye los parámetros D10, D50 y D90. El parámetro D10 indica que el 10% de las partículas de la muestra presentan un tamaño menor a 99 nm. En el caso de D50 y D90, muestran que el 50 y 90% de las partículas, respectivamente, presentan un tamaño menor al indicado en cada caso (140,5 y 263,8 nm)¹⁵. En todos los casos se indica el error estándar cometido.

El informe proporciona también la concentración de nanopartículas en partículas por ml, partículas por toma de vídeo y centros por toma de vídeo.

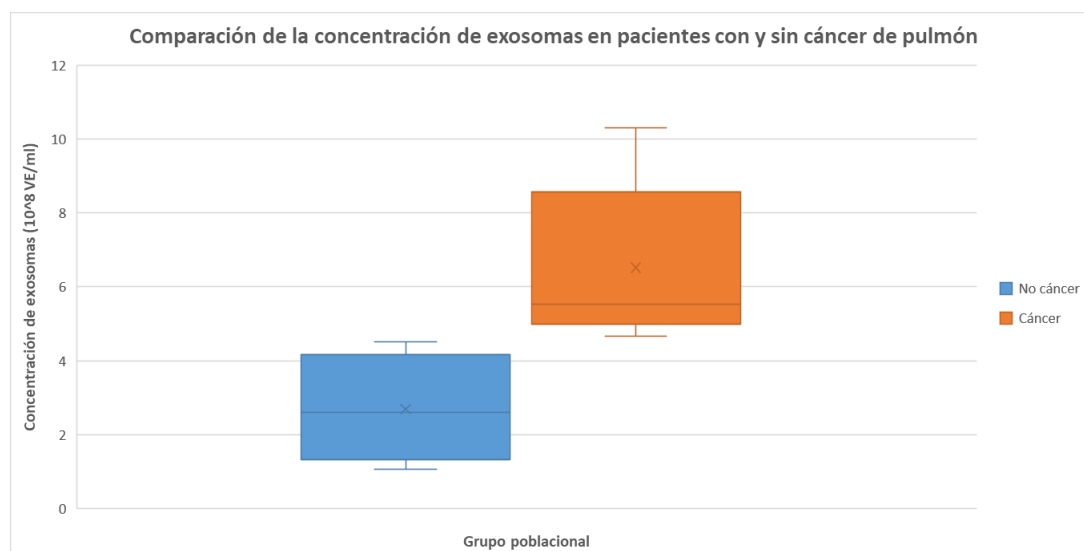


Figura 7. Comparación de la concentración de exosomas en las muestras de pacientes con cáncer de pulmón y pacientes sin cáncer. El eje de ordenadas muestra la concentración de VE expresada en 10^8 VE/ml, mientras que el de abscisas indica el grupo poblacional. Los datos correspondientes a los pacientes con cáncer de pulmón se encuentran en color naranja. Los de los pacientes sin cáncer están coloreados en azul.

En la Figura 7 se representan los datos recogidos en la Tabla 4 de los anexos. Como se observa, las muestras obtenidas a partir del parénquima pulmonar de pacientes con adenocarcinoma pulmonar mostraron una concentración significativamente mayor que aquellas derivadas de pacientes sin cáncer.

La concentración de exosomas recogida en la literatura para otros tipos de cáncer es similar a la obtenida en cáncer de pulmón. Por ejemplo, en varios estudios de cáncer de hígado obtuvieron una concentración de $3,3-4,7 * 10^{10}$ exosomas/ml^{33,34}, en cáncer de mama $1,5-1,8 * 10^{10}$ exosomas/ml^{35,36}, y en cáncer de colon $10 * 10^{10}$ exosomas/ml³⁶. En estos casos, los exosomas no fueron aislados de tejido, sino de distintos fluidos corporales. En el estudio realizado por *Muraoka et al.* a partir de tejido cerebral, la cantidad de VE aisladas ($1,45 * 10^{11}$ exosomas/ml)²⁵ también fue similar, aunque algo menor que en tejido pulmonar.

En todos estos estudios, la cantidad de exosomas presente en los pacientes control era significativamente menor a la obtenida de los pacientes enfermos. Esto demuestra que parte de esas VE pueden ser producidas a causa de las células tumorales para promover la patología. Así, el cargamento que presenten estas VE podría estar asociado con cáncer, por lo que esos exosomas se podrían emplear como biomarcadores diagnósticos.

La tecnología NTA permite determinar la concentración de exosomas presentes en las muestras de una forma más precisa que mediante un ELISA. Los resultados obtenidos con el kit ExoELISA corresponden a la cantidad de exosomas en cada pocillo, es decir, en 50 μ l.

En el caso de la muestra 42, la que se ha tomado como ejemplo, se calculó que había $1,70 * 10^9$ exosomas. Mediante el NTA se ha obtenido una concentración de $5,49 * 10^8 \pm 1,99 * 10^7$

exosomas/ml. Sin embargo, antes de cargar la muestra en el NANOSIGHT, hay que realizar una dilución 1:1000. De esta forma, la muestra 42 presenta $5,49 * 10^{11}$ exosomas/ml. Estas partículas se encontraban suspendidas en 200 μ l de PBS ($1,098 * 10^{11}$ exosomas), de forma que en 50 μ l hay $2,745 * 10^{10}$ exosomas. Para el resto de muestras, también se ha obtenido una concentración de exosomas del orden de 10^{11} en el caso de los pacientes con cáncer de pulmón, y del orden de 10^{10} en los que no poseen esta patología.

Como se puede observar, la cantidad de partículas calculada con NTA es de uno o dos órdenes de magnitud superior a la del ELISA. Así, aunque el ELISA es una técnica cuantitativa, el error cometido es mucho mayor que al emplear la tecnología NTA.

Esto podría deberse, por un lado, a que no todos los exosomas se fijan al pocillo, de forma que al lavar estamos eliminando parte de ellos. Además, también podría ocurrir que, según la posición por la que se adhieran las partículas al fondo de pocillo, la proteína CD63 quedara inaccesible. Así, el anticuerpo primario no podría unirse a ella, por lo que esos exosomas no serían detectados. Finalmente, algunos anticuerpos primarios podrían no llegar a unirse a CD63. Lo mismo podría ocurrir con los anticuerpos secundarios, que no llegaran a unirse a un anticuerpo primario. En ambos casos no se podrían detectar esas vesículas.

La concentración de exosomas determinada mediante la tecnología NTA demuestra la abundancia de estas vesículas en tejido pulmonar. Los resultados indican que el pulmón es un órgano que genera una gran cantidad de exosomas, lo que muestra la importancia del estudio de estas vesículas para emplearlas como biomarcadores. Además, los resultados también evidencian que el protocolo utilizado permite obtener una fuente importante de exosomas, lo que facilita su posterior análisis y estudio.

5.5. Secuenciación del miRNA presente en los exosomas de tejido pulmonar

El RNA aislado de los exosomas fue enviado al Servicio de Secuenciación del SBI en Palo Alto, EEUU. Las concentraciones de RNA obtenidas de cada muestra se muestran en la Tabla 2.

Como se puede observar en la Tabla 2, el aislamiento del RNA presente en los exosomas de las muestras se realizó correctamente, ya que se ha podido determinar la presencia de estos y su concentración en las muestras enviadas a SBI.

Sin embargo, al tratarse de un proceso que tarda un tiempo, los resultados de secuenciación no se encuentran todavía disponibles. Su evaluación y posterior validación de aquellos que se postulen

como candidatos, determinará el potencial de los miRNAs exosomales como biomarcadores diagnósticos del adenocarcinoma pulmonar.

Tabla 2. Concentración de RNA aislado de las muestras de plasma y parénquima pulmonar. En esta se muestra el código proporcionado por el Servicio de Secuenciación del SBI, el código empleado por el consumidor, y la concentración de RNA obtenida en ng/μl.

SBI ID	Customer ID	Concentración RNA (ng/μl)
105440-P45	Plasma 45	0,139
105440-P49	Plasma 49	0,121
105440-P56	Plasma 56	0,280
105440-P64	Plasma 64	0,146
105440-P42	Plasma 42	0,190
105440-P44	Plasma 44	0,225
105440-P46	Plasma 46	0,158
105440-P47	Plasma 47	0,145
105440-P53	Plasma 53	0,280
105440-P67	Plasma 67	0,410
105440-EV45	EV LT 45	4,85
105440-EV49	EV LT 49	2,52
105440-EV56	EV LT 56	2,29
105440-EV64	EV LT 64	2,54
105440-EV42	EV LT 42	8,74
105440-EV44	EV LT 44	2,58
105440-EV46	EV LT 46	6,30
105440-EV47	EV LT 47	2,09
105440-EV53	EV LT 53	3,58
105440-EV67	EV LT 67	2,76

5.6. Próximos abordamientos del estudio

Como se ha comentado anteriormente, este estudio pretende determinar si existen miRNAs exosomales que se expresan diferencialmente en pacientes con cáncer de pulmón con respecto a los que presentan otras patologías respiratorias. Si los resultados de su secuenciación demuestran este hecho, estos miRNA se podrían emplear como método de diagnóstico del cáncer de pulmón.

Además, dependiendo del estadio en el que se encuentre el paciente y de la evolución de la enfermedad, la expresión de los distintos miRNAs va cambiando. De esta forma, la secuenciación de estos miRNAs podría emplearse también para pronosticar la evolución del paciente.

Por otra parte, se compararon los resultados con los obtenidos en plasma de esos mismos pacientes. El comparar ambas VE no se ha realizado en ningún tipo de estudio, y resulta de interés porque el plasma es mucho más accesible que el tejido pulmonar. De esta forma, si la cantidad y el contenido de ambos exosomas fuera similar, se podrían aislar directamente del plasma.

6. Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo de fin de grado han permitido alcanzar una serie de conclusiones. En primer lugar, el tejido pulmonar presenta vesículas extracelulares retenidas en sus estructuras. Estas vesículas se pueden aislar mediante un protocolo de precipitación modificado y, además, su caracterización muestra que esas VE son exosomas.

Por otra parte, el parénquima pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón presenta una mayor concentración de exosomas. Esto podría ser clave en la patofisiología del cáncer y, por tanto, en la búsqueda de nuevos biomarcadores. Finalmente, los exosomas de parénquima pulmonar presentan en su cargamento RNA. Además, estos están en una cantidad suficiente para llevar a cabo estudios de secuenciación, los cuales son el primer paso a la hora de determinar nuevos biomarcadores de origen genético en estas vesículas.

The results presented in this final degree project allowed to reach some conclusions. Firstly, lung tissue contains extracellular vesicles retained among its structures. These vesicles can be isolated with a modified precipitation protocol. In addition, its characterization exhibits that these EV are exosomes.

Secondly, lung parenchyma from patients with lung cancer contains a higher concentration of exosomes. This fact could be key in cancer pathophysiology and, therefore, in the search of new biomarkers. Finally, exosomes from lung parenchyma present RNA in their cargo. In addition, their amount is sufficient to realize sequencing studies, which constitute the first step when determining new genetic origin biomarkers in these vesicles.

7. Referencias

1. Remon J. Las cifras del cáncer en España 2020 [Internet]. Sociedad Española Oncología Médica; 18 de diciembre de 2019; Available from: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-pulmon>
2. Mohan A, Agarwal S, Clauss M, Britt NS, Dhillon NK. Extracellular vesicles: Novel communicators in lung diseases. *Respiratory research* 2020; Vol. 21, p. 1-21.
3. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Todo sobre el Cáncer de Pulmón [Internet]. AECC. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon>
4. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Diagnóstico del cáncer de pulmón ¿Cómo detectarlo? [Internet]. AECC. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon/diagnostico>
5. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Tratamiento del Cáncer de Pulmón [Internet]. AECC. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon/secuelas-tratamientos-cancer-pulmon>
6. Fujita Y, Kosaka N, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. *Cell Press: Trends in Molecular Medicine* 2015; Vol. 21, p. 533-542.
7. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Natural Reviews: Molecular Cell Biology* 2018; Vol.19, p. 213–228.
8. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A, Cubero P, Forner M, Khalyfa A, Marin JM. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. *Scientific Reports* 2018. Vol. 8, p.1-11.
9. Pastor L, Vera E, Marin JM, Sanz-Rubio D. Extracellular vesicles from airway secretions: New insights in lung diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2021. Vol. 22 p. 1–21.
10. Kubo H. Extracellular Vesicles in Lung Disease. *Chest* 2018; Vol. 153, p. 210–216.
11. Kadota T, Yoshioka Y, Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung cancer—From bench to bedside. *Elsevier* 2017; Vol. 67, p. 39–47.
12. Liu S, Zhan Y, Luo J, Feng J, Lu J, Zheng H, Wen Q, Fan S. Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Elsevier* 2019; Vol. 111, p. 338–346.
13. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *PNAS USA* 2012; Vol. 109, p. 1–7.
14. Cui H, Seubert B, Stahl E, Dietz H, Reuning U, Moreno-Leon L, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. *Oncogene* 2015; Vol. 34, p. 3640-3650.
15. Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, et al. Activated T Cell Exosomes Promote Tumor Invasion via Fas Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* 2012; Vol. 188, p. 5954-5961.
16. Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schäfer R, Beerling E, et al. In vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* 2015; Vol. 161, p. 1046–1057.
17. Gutkin A, Uziel O, Beery E, Nordenberg J, Pinchasi M, Goldvaser H, et al. Tumor cells derived exosomes contain hTERT mRNA and transform nonmalignant fibroblasts into telomerase positive cells. Vol. 7, *Oncotarget*. 2016. p. 59173–59188.
18. Zhou L, Lv T, Zhang Q, Zhu Q, Zhan P, Zhu S, Zhang J, Song Y. The biology, function and clinical implications of exosomes in lung cancer. *Elsevier* 2017; Vol. 407, p. 84–92.
19. Rahman MA, Barger JF, Lovat F, Gao M, Otterson GA, Nana-Sinkam P. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget* 2016; Vol. 7, p. 54852–54866.

20. Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, et al. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. Elsevier 2015; Vol. 370, p. 125-135.
21. Mendes A. Ultracentrifugation Basics and Applications [Internet]. Conduct Science; 2 de Marzo de 2020. Available from: <https://conductscience.com/ultracentrifugation-basics-and-applications/>
22. Burgess RR. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. Elsevier 2018; Vol. 150, p. 81-85.
23. Harvey D. Precipitation Gravimetry [Internet]. Chemistry Libre Texts; 30 de Junio del 2021. Available from: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/08%3A_Gravimetric_Methods/8.02%3A_Precipitation_Gravimetry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/08%3A_Gravimetric_Methods/8.02%3A_Precipitation_Gravimetry)
24. Hurwitz SN, Sun L, Cole KY, Iii CRF, Olcese JM, Meckes DG. An optimized method for purification of whole brain-derived extracellular vesicles reveals insight into neurodegenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. HHS Public Access: J Neurosci Methods. 2018; Vol. 307, p. 210–220.
25. Muraoka S, Lin W, Chen M, Hersh SW, Emili A, Xia W, Ikezu T. Assessment of separation methods for extracellular vesicles from human and mouse brain tissues and human cerebrospinal fluids. Elsevier 2020; Vol. 177, p. 35–49.
26. Malvern Panalytical. Análisis de seguimiento de nanopartículas [Internet]. Malvern Panalytical. Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis>
27. Vélez Ibarrola R. Introducción al Movimiento Browniano. UNED. p. 1-32.
28. Servicios Técnicos de Investigación. Microscopía electrónica de transmisión [Internet]. Universidad de Alicante. Available from: <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-microscopia/microscopia-electronica-de-transmision.html>
29. López Sánchez LML. ¿Qué es el Microscopio Electrónico de Transmisión? [Internet]. Inecol. Available from: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1044-que-es-el-microscopio-electronico-de-transmision>
30. Zhang Z, Tang C, Zhao L, Xu L, Zhou W, Dong Z, et al. Aptamer-based fluorescence polarization assay for separation-free exosome quantification. Nanoscale 2019; Vol. 11, p. 10106-10113.
31. Liu Q, Xiang Y, Yuan S, Xie W, Li C, Hu Z, et al. Plasma exosome levels in non-small-cell lung cancer: Correlation with clinicopathological features and prognostic implications. IOS Press: Cancer Biomarkers 2018; Vol. 22(2), p. 267–274.
32. Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad Autónoma de Aragón (CEICA). Código ético del CEICA. CEICA 2015; Versión 1.
33. Wang C, Wang C, Jin D, Yu Y, Yang F, Zhang Y, Yao Q, Zhang GJ. AuNP-Amplified Surface Acoustic Wave Sensor for the Quantification of Exosomes. ACS Sensors 2020; Vol. 5, p. 362–369.
34. Yu Y, Li Y-T, Jin D, Yang F, Wu D, Xiao M-M, et al. Electrical and Label-Free Quantification of Exosomes with a Reduced Graphene Oxide Field Effect Transistor Biosensor. Analytical chemistry 2019; Vol. 91, p. 10679-10686.
35. Yadav S, Boriachek K, Islam N, Lobb R, Mçller A, et al. An Electrochemical Method for the Detection of Disease-Specific Exosomes. Chem Electro Chem 2016; Vol. 3, p. 1-6.
36. Boriachek K, Islam MN, Gopalan V, Lam AK, Nguyen N-T, Shiddiky MJA. Quantum dot-based sensitive detection of disease specific exosome in serum. Analyst 2017; Vol. 142, p. 2211-2219.