



**Universidad
Zaragoza**



Trabajo de Fin de Grado

Exosomas de la vía aérea: Nueva herramienta para el manejo del asma severo

Autora

Inés Clémence Nati Avenel

Directores

David Sanz Rubio

Elísabet Vera Solsona

Unidad de Investigación Traslacional – Instituto de investigación Sanitaria de Aragón

Hospital Universitario Miguel Servet

Grado en Biotecnología

Curso 2020-2021

Índice

1. Resumen – Abstract	1
2. Introducción	2
2.1 Asma	2
2.1.1 Sintomatología y epidemiología	2
2.1.2 Fenotipos asmáticos, diagnóstico y clasificación	3
2.1.3 Mecanismos moleculares del asma	3
2.1.4 Control de la enfermedad y tratamientos actuales	4
2.2 Vesículas extracelulares	5
2.2.1 Aspectos generales: Biogénesis, contenido y papel fisiológico	5
2.2.2 Aislamiento de vesículas extracelulares	6
2.3 Vesículas extracelulares de la vía aérea y su potencial	7
2.3.1 Vesículas extracelulares en el asma	7
2.3.2 Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares en el asma	8
3. Objetivos	9
4. Materiales y métodos	9
4.1 Pacientes	9
4.2 Obtención del esputo inducido	9
4.3 Procesamiento del esputo inducido	10
4.4 Calidad del esputo y clasificación fenotípica	11
4.4.1 Recuento celular y viabilidad	11
4.4.2 Recuento celular diferencial	11
4.5 Aislamiento de vesículas extracelulares	11
4.6 Caracterización y cuantificación de vesículas extracelulares	12
4.6.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	12
4.6.2 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	12
4.6.3 ExoELISA-ULTRA: Detección de CD63	13
5. Resultados y discusión	13
5.1 Población de estudio	13
5.2 Calidad del esputo y clasificación fenotípica	14
5.2.1 Recuento celular y viabilidad	14
5.2.2 Recuento celular diferencial	16
5.3 Caracterización y cuantificación de vesículas extracelulares	17
5.3.1 Análisis de la morfología de VEs por TEM.....	17
5.3.2 Análisis del tamaño y de la concentración de VEs por NTA.....	18
5.3.3 ExoELISA-ULTRA CD63.....	18
6. Conclusiones – Conclusions	21
7. Referencias	22
ANEXOS	26

1. Resumen

El asma afecta a más de 339 millones de personas en el mundo y se caracteriza por una inflamación crónica, una hiperrespuesta bronquial y una obstrucción de la vía aérea. Es una enfermedad compleja y multifactorial y todavía no se han determinado sus mecanismos moleculares con certeza. El asma no debería considerarse como una enfermedad única, sino como un conjunto de fenotipos y mecanismos patológicos distintos que comparten manifestaciones clínicas similares. Es necesario encontrar biomarcadores específicos del asma, para mejorar el conocimiento sobre los procesos moleculares de la enfermedad y encontrar nuevas dianas terapéuticas. Los exosomas son vesículas extracelulares membranosas liberadas por un gran número de tipos celulares y encontrados en todos los fluidos biológicos. Esas vesículas tienen un papel fisiológico en la comunicación intercelular, y participan en mecanismos patológicos en el asma y en otras enfermedades. Para el estudio del asma y del potencial terapéutico de los exosomas en esta enfermedad, interesa estudiar las vesículas extracelulares procedentes de la vía aérea, que hasta ahora solo se han estudiado en lavado broncoalveolar. En este trabajo se propone aislar exosomas de esputo inducido, una técnica menos invasiva que el lavado broncoalveolar. Tras el procesamiento de muestras de esputo inducido, se aislaron los exosomas con el kit comercial ExoQuick y se confirmó su presencia de tres maneras: con un ELISA dirigido a una tetraspanina de los exosomas (CD63), con Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) y con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Tras estos experimentos se pudo confirmar la presencia de exosomas en esputo inducido. Esas vesículas extracelulares en un fluido biológico fácil de obtener podrían ser la clave para la obtención de biomarcadores o el desarrollo de nuevas terapias en el asma, por ejemplo, basadas en miRNAs.

Abstract

Asthma affects more than 339 million people, its principal traits are chronic inflammation, bronchial hyperresponsiveness and airway obstruction. It is a complex and multifactorial disease, and its molecular mechanisms are not well known. It should not be thought of as a unique disease but as a group of phenotypes and pathological mechanisms sharing similar clinical traits. The discovery of specific biomarkers for asthma could help improve our knowledge of the molecular basis of the disease and the development of treatments. Exosomes are extracellular vesicles released by most cellular types and found in most biological fluids. They have a physiological role in intercellular communication as well as a role in asthma and other diseases. To study asthma and the therapeutic potential of exosomes in this disease, it is necessary to study exosomes from the airway, until now these studies were conducted in bronchioalveolar lavage fluid. The objective of this project is to isolate exosomes from induced sputum, a fluid from the airway obtained with a less invasive procedure than bronchioalveolar lavage fluid. After processing the induced sputum samples, we isolated its exosomes with a commercial kit (ExoQuick) and we confirmed the presence of the vesicles with three techniques: an ELISA to detect CD63, a marker of exosomes, Nanoparticle Tracking Analysis and Transmission Electron Microscopy. We were ultimately able to confirm the presence of exosomes in induced sputum. The presence of exosomes in an easily available biological fluid could be beneficial for the obtention of biomarkers and the development of new therapies against asthma, for example based in miRNAs.

2. Introducción

2.1 Asma

El asma, según la Organización Mundial de la Salud, es una de las principales enfermedades crónicas no transmisibles en el mundo, tanto para adultos como niños. En 2019 afectaba a 339 millones de personas, y causó 461.000 muertes (1). Se trata de un síndrome respiratorio crónico e inflamatorio caracterizado por una obstrucción de las vías aéreas y una hiperrespuesta bronquial, consistiendo en una broncoconstricción excesiva en respuesta a distintos estímulos (2,3).

2.1.1 Sintomatología y epidemiología

El asma, dada su naturaleza respiratoria crónica inflamatoria, tiene como síntomas más característicos tos, sibilancias, sentimiento de opresión en el pecho, y dificultad para respirar (4). Esos síntomas pueden tener intensidades variables en distintos momentos del día, y en gran parte de los casos, las exacerbaciones asmáticas se deben a un desencadenador, como ejercicio, contacto con alérgenos o infecciones respiratorias víricas (5).

La Global Initiative for Asthma (GINA) estima que esta enfermedad puede afectar hasta 18% de la población en algunos países (4). En los últimos años la prevalencia del asma en países desarrollados ha ido estabilizándose, y la mortalidad se ha reducido (2,6). Se observa la tendencia contraria en países en vía de desarrollo, con una mayor incidencia en niños y adolescentes, y una mayor tasa de mortalidad, debido a un mayor impacto de factores socioeconómicos (7,8). La GINA también estima que entre 3 y 10% de los asmáticos presentan asma severo, es decir asma no controlado y con una sintomatología grave a pesar de su tratamiento con altas dosis de corticosteroides inhalados y β 2-agonistas (4). Aunque la población de pacientes con asma severo es reducida, se les atribuye entre 50 y 60% de los costes de sanidad dedicados al asma, así como la mayor proporción de morbilidad y mortalidad asociadas con la enfermedad (9,10). Además de la gravedad de los síntomas físicos, se han descrito afectaciones psicológicas y sociales debilitantes en pacientes con asma severo (9).

La incidencia del asma es máxima para niños entre cinco y catorce años, y las tasas de mortalidad son mayores para asmáticos entre sesenta y más de ochenta años (2,11). Además, se han descrito variaciones debidas al sexo en la epidemiología de esta enfermedad: la prevalencia y gravedad del asma es mayor en niños de sexo masculino, pero se describen más complicaciones en mujeres adultas hasta cincuenta años. Esa variación podría explicarse por un papel de las hormonas sexuales femeninas en la etiología del asma, o por un potencial efecto protector de la testosterona frente a la enfermedad (8,12).

El asma tiene un carácter multifactorial, por lo que se han descrito diversos factores de riesgo tanto genéticos como ambientales y socioeconómicos (13). En cuanto a factores genéticos, ensayos de tipo Genome Wide Association (GWAS) describieron 18 regiones del genoma y más de 100 genes potencialmente implicados en la patología. No obstante, la mayor variación en la prevalencia parece ser debida a factores ambientales, ya que la frecuencia de la enfermedad es distinta entre personas de dotación genética similar viviendo en ambientes distintos, con un efecto claro del tiempo de residencia en el nuevo ambiente (14). Algunos de los factores ambientales asociados a la enfermedad son las infecciones víricas y uso de antibióticos en la infancia, exposición a endotoxinas, humo de tabaco o alérgenos, dieta, obesidad, contaminación, etc. (2,8,14).

2.1.2 Fenotipos asmáticos, diagnóstico y clasificación

El asma es un término general usado para describir un tipo de afectación respiratoria. No obstante, no se trata de una enfermedad uniforme sino muy heterogénea, con un conjunto de fenotipos y mecanismos patológicos distintos que comparten manifestaciones clínicas similares (10). Todavía no se han conseguido determinar con certeza los mecanismos fisiopatológicos que provocan la enfermedad (15). El estudio de la etiología del asma es complejo ya que distintos mecanismos patológicos pueden resultar en fenotipos similares, y los mismos mecanismos patológicos pueden resultar en manifestaciones distintas (8). El entendimiento de los endotipos del asma podría ser la clave para determinar la evolución de la enfermedad, su relación con los factores ambientales, así como para encontrar nuevas dianas terapéuticas específicas y eficaces para su tratamiento (16).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza con una examinación del paciente y de su historia clínica y familiar, tras una sospecha debida a síntomas de disnea, tos y sensación de opresión en el pecho, de intensidad variable a lo largo del día o desencadenada por alérgenos y otros factores (4,17). Tras la sospecha se pueden realizar varias pruebas, como espirometrías con y sin broncodilatadores para medir el volumen respiratorio forzado (FEV₁), seguimiento de la función pulmonar tras cuatro semanas de tratamiento antiinflamatorio, pruebas de provocación bronquial con ejercicio o pruebas de alergia (4,18). Todavía no se ha encontrado un patrón ideal para el diagnóstico del asma, las pruebas basadas en la sintomatología de la enfermedad conllevan un riesgo de diagnóstico erróneo acompañado por un tratamiento deficiente o excesivo (19). Además de las pruebas basadas en sintomatología, se usan parámetros como la fracción de óxido nítrico exhalado, y proporción de células inflamatorias en sangre periférica y fluidos de la vía aérea como el esputo inducido, para el diagnóstico del asma (10). Debido a las lagunas en las técnicas de diagnóstico del asma, se ve la necesidad de identificar biomarcadores no invasivos de la enfermedad para dirigir más eficientemente su diagnóstico y tratamiento.

La clasificación actual de los distintos subtipos de asma en la clínica se basa en características fenotípicas, como la presencia de células del sistema inmune en la vía aérea, y no en función del mecanismo funcional afectado en la enfermedad (20). Los cuatro fenotipos asmáticos actuales son los siguientes: eosinofílico, también conocido como asma alérgico (eosinófilos \geq 3%, neutrófilos $<$ 76%), neutrofílico (eosinófilos $<$ 3%, neutrófilos \geq 76%), paucigranulocítico, o asma no alérgico (eosinófilos $<$ 3%; neutrófilos $<$ 76%) y mixto granulocítico (eosinófilos \geq 3%; neutrófilos \geq 76%) (4,21).

2.1.3 Mecanismos moleculares del asma

El asma se caracteriza por tres mecanismos patológicos principales: respuesta inmune e inflamación, remodelado de la vía aérea, e hiperrespuesta bronquial (22).

El subtipo más común en esta enfermedad es el asma alérgico eosinofílico, caracterizado por una respuesta mediada por linfocitos Th2 CD4⁺ (23). Estos linfocitos se activan tras la presentación de antígenos no reconocidos como extraños por pacientes no asmáticos, mediante células presentadoras de antígeno de la vía aérea (24). Tras su activación, secretan las citoquinas proinflamatorias IL-4, IL-5 e IL-13, que llevan a la producción de IgE, una inmunoglobulina característica de la alergia (23,25). Las elevadas concentraciones de citoquinas llevan a la maduración y reclutamiento de los eosinófilos a la vía aérea, que a su vez liberan TGF- β (23). En cuanto al asma no alérgico, también llamado asma no Th2, los mecanismos de la enfermedad no son tan claros; podrían estar ligados a comorbilidades como obesidad y su estrés oxidativo asociado, infecciones, patologías del músculo liso y uso de tabaco (26).

Los pacientes con asma no alérgico suelen tener formas más graves de la enfermedad (23). Los mecanismos del asma neutrofílico siguen siendo mayoritariamente desconocidos, aunque podría estar mediado por la activación de la ruta de inflamación NLRP3-IL1 β y de células linfoides innatas de tipo 3 (27).

El remodelado de la vía aérea está directamente ligado a su inflamación crónica: el daño oxidativo producido conduce a la apoptosis de las células epiteliales bronquiales y a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, como el TGF- β , por otras células de la vía aérea (23,28). Estas moléculas llevan a la proliferación celular, y por lo tanto al engrosamiento de la pared de la vía aérea y su estrechamiento tras la contracción de su músculo liso (22). La hiperrespuesta bronquial consiste en una broncoconstricción excesiva en respuesta a estímulos físicos y químicos inhalados, aunque todavía se desconoce qué mecanismos moleculares son responsables de este proceso (3).

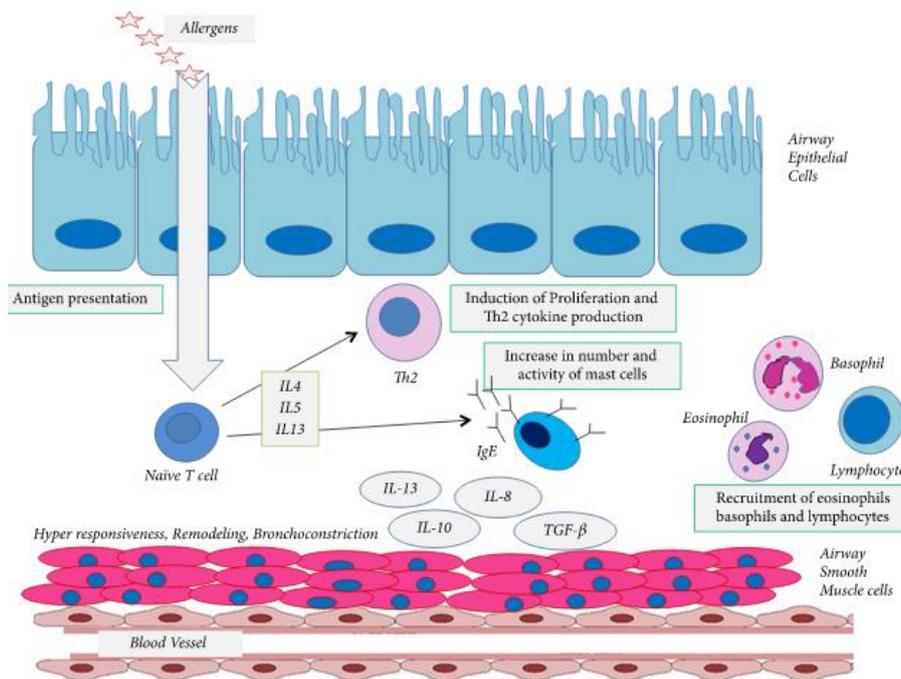


Figura 1. Mecanismo fisiopatológico del asma Th2. Mortaz, E. et al, 2018 (29)

2.1.4 Control de la enfermedad y tratamientos actuales

El control de la enfermedad se basa tanto en el control de los síntomas como del riesgo de padecer efectos adversos en el futuro. Este último parámetro se determina con la evaluación de la función pulmonar del paciente al principio del tratamiento, tras 3-6 meses de tratamiento y de manera periódica durante su seguimiento a largo plazo, así como con la identificación de los factores desencadenantes de exacerbaciones asmáticas (4). El seguimiento de la enfermedad se hace mediante unos cuestionarios estandarizados, el Asthma Control Test (ACT) y el Asthma Control Questionnaire (ACQ), que asignan una nota reflejando la eficiencia de control de los síntomas (30). El ACT consiste en cinco preguntas, cuatro de ellas relacionadas con la sintomatología, y una con el uso de medicación de rescate (**Anexo I**). En función de las respuestas se asigna una puntuación de 5 a 25: entre 20-25 para asma bien controlado, y 5-15 para asma mal controlado (4).

Los tratamientos actuales del asma se basan en el alivio de los síntomas. La terapia consiste en corticosteroides inhalados (ICS), debido a su acción antiinflamatoria, y β_2 -agonistas inhalados de larga duración (LABA). Además, se recomienda identificar y eliminar los desencadenantes de

exacerbaciones alérgicas, aunque no se consigue siempre, por ejemplo, en el caso del polen por su abundancia en el entorno. En casos de asma severo, estas terapias básicas no son suficientes para controlar la enfermedad, por lo que se recomiendan otros tratamientos, como antagonistas del sistema muscarínico de acción prolongada (LAMA) que actúan a nivel del sistema nervioso parasimpático para relajar el tono muscular de las vías respiratorias. También se recomiendan tratamientos biológicos anti IgE como el anticuerpo monoclonal Omalizumab en asma severo alérgico, anti IL5 o bien dirigidos a otras citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria (18,31). Además, se ha demostrado la capacidad moduladora de la eritromicina, un antibiótico con propiedades antiinflamatorias, frente a la hiperrespuesta bronquial (32).

Aunque se dispone de algunos tratamientos, no suelen ser suficientes para el tratamiento de casos de asma severo (10). Además, los ICS son beneficiosos para pacientes con asma Th2 más leve, pero no son eficaces para el tratamiento de casos severos o de asma no Th2, y pueden provocar numerosos efectos secundarios (cataratas, afectaciones del metabolismo, pérdida de densidad ósea...) (33,34). Por lo tanto, interesa desarrollar tratamientos basados en los mecanismos moleculares de la enfermedad y mejorar los sistemas de liberación de fármacos en la vía aérea para evitar potenciales efectos secundarios.

2.2 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VEs) son una familia heterogénea de vesículas formadas por una doble capa de membrana plasmática. Se diferencian en tres subcategorías, microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos, en función de su tamaño, biogénesis, mecanismo de liberación, composición y función (35,36).

2.2.1 Aspectos generales: Biogénesis, contenido y papel fisiológico

Los exosomas son vesículas esféricas de 30-150 nm formadas por una bicapa lipídica, se liberan por la mayoría de los tipos celulares y se han aislado a partir varios fluidos corporales como saliva, orina, líquidos de lavado nasal y bronquioalveolar, leche materna, plasma, suero y fluido seminal (36–38).

La principal diferencia entre los exosomas y el resto de las vesículas extracelulares se debe a su proceso de biogénesis. Las microvesículas y los cuerpos apoptóticos se liberan directamente de la membrana plasmática de células vivas o muertas, respectivamente (37). Su tamaño también es superior al de los exosomas, las microvesículas tienen un diámetro de 100-1000 nm, y los cuerpos apoptóticos de 1000-5000 nm (39). Los exosomas se originan del sistema endosomal. Se forman un conjunto de vesículas intraluminales en los endosomas, y van acumulando componentes en su interior a lo largo de la maduración de los endosomas desde el estado temprano al estado tardío (40). Las vesículas contenidas en los endosomas tardíos reciben el nombre de cuerpos multivesiculares, pueden fusionarse con la membrana plasmática para liberar los exosomas al medio exterior, o fusionarse con lisosomas si su contenido tiene que ser degradado (36). La biogénesis de los exosomas presenta dos pasos claves: la reorganización de la membrana endosomal mediada por las tetraspaninas CD9 y CD63, y el llenado, transporte y secreción de las vesículas por acción de proteínas del tipo ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required For Transport) (36,41).

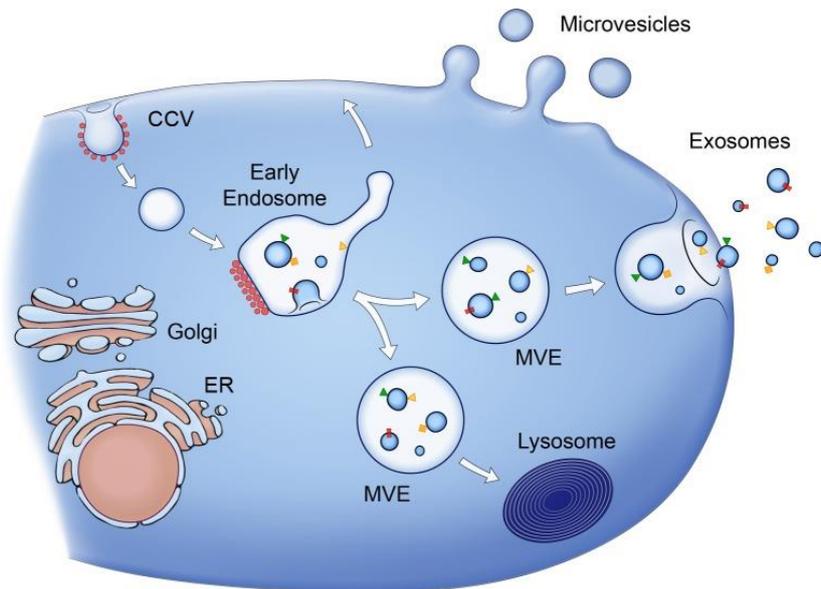


Figura 2. Biogénesis de los exosomas. *Raposo G, Stoorvogel W., 2013 (40)*

Los exosomas contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, su composición puede variar en función de las células que los libera y de su estadio fisiológico. Podemos destacar proteínas asociadas a los ESCRTs, y otras proteínas implicadas en la biogénesis de los exosomas (CD9 y CD63), en la presentación de antígeno (MHC-I y MHC-II) o en la transducción de señal (EGFR). En cuanto a la composición en lípidos, suele ser similar a la de la membrana de procedencia, pero con un enriquecimiento en colesterol, esfingomielina, ceramidas, glicerofosfoserina y fosfatidilserina. Aunque se han descrito exosomas albergando DNA genómico y mitocondrial, son minoritarios; los ácidos nucleicos más característicos de estas vesículas son RNAs pequeños de alrededor de 200 nucleótidos, como miRNAs, rRNAs, tRNAs y mRNAs fragmentados (36) Los miRNAs exosomales son particularmente interesantes debido a su capacidad de modular la expresión génica de las células dianas (37).

El papel fisiológico de las VEs está relacionado con la comunicación intercelular. Las VEs llevan su contenido a determinadas células del organismo, y son capaces de alterar el comportamiento de la célula receptora, de manera local o más alejada (36,40). Los exosomas son presentes en la mayoría de los fluidos biológicos estudiados, la inclusión de sus componentes en una bicapa lipídica podría ser una manera de protegerlos de enzimas (RNAsas) presentes en estos ámbitos, y de llevar a las VEs a células dianas específica (38). Los exosomas también pueden tener un papel en determinados procesos patológicos, por ejemplo, en cáncer o en asma (37).

2.2.2 Aislamiento de vesículas extracelulares

El aislamiento de las VEs se puede hacer por cinco tipos de técnicas: métodos basados en ultracentrifugación, en el tamaño de las vesículas, en captura por inmunofinidad, en precipitación de las vesículas y métodos de microfluídica (42).

Los métodos basados en ultracentrifugaciones son los más usados, consisten en unas centrifugaciones previas a baja velocidad para eliminar las células y microvesículas, seguida por 1-2 horas de centrifugación a 100.000 g. Esos métodos proporcionan una fracción enriquecida en exosomas pero no exenta de microvesículas ya que se trata de una separación por tamaño, y estos dos tipos de VEs

pueden tener tamaños solapantes (37). El mismo problema en la separación de los distintos tipos de VEs se describe para técnicas de centrifugación con gradientes de densidad (35).

Existen numerosos kits comerciales basados en la separación de exosomas por su tamaño, por el paso de la muestra a través de nanomembranas y ultrafiltración o por cromatografías de exclusión por tamaño (42). Los métodos de captura por inmunoafinidad se basan en la presencia de proteínas específicas en la superficie de las VEs, por ejemplo, la tetraspanina CD63 en exosomas humanos. Esas técnicas se basan sobre todo en ELISAs, y tienen la ventaja de poder separar poblaciones específicas de VEs. No obstante, no suelen ser eficientes en fluidos biológicos complejos si no se ha realizado un enriquecimiento previo en VEs (35).

Los métodos basados en precipitación usan polímeros como el PEG o proteínas como las lectinas, que se unen a las VEs y llevan a su precipitación. Esas técnicas son rápidas y eficientes, pero conllevan también la precipitación de agregados proteicos que podrían estar presentes en la muestra, por lo que se recomienda un paso previo de eliminación de las proteínas (35).

Por último, se están desarrollando técnicas de aislamiento de exosomas por microfluídica que permitirían una separación de esas vesículas en función de sus propiedades físicas y bioquímicas de manera simultánea (42). Esas técnicas son rápidas y eficientes y requieren una cantidad de muestra muy limitada, entre 10 y 100 μL , pero son más complejas y más costosas, y todavía no se ha conseguido su uso a escala clínica (35,42).

La elección de la técnica de aislamiento se realiza en función de las características de la muestra de partida y del fin para el que se requieran los exosomas, por lo que no existe una metodología estandarizada (43)

2.3 Vesículas extracelulares de la vía aérea y su potencial

2.3.1 Vesículas extracelulares en el asma

Los exosomas pueden tener un papel proinflamatorio y participar así en el mecanismo fisiopatológico del asma. Las células epiteliales bronquiales, los macrófagos, las células endoteliales, dendríticas y linfocitos T y B presentes en la vía aérea son capaces de liberar exosomas con distintas funciones, sobre todo relacionadas con la homeostasis del tejido y la regulación de la respuesta inmune (44).

En cuanto al papel de las VEs en inmunidad e inflamación, la presencia de las proteínas MHC-I y MHC-II en las VEs, debida a su liberación por células presentadoras de antígenos, le podrían dar un papel proinflamatorio en la respuesta frente a patógenos o alérgenos (38,45). Además, MHC-II y otras moléculas coestimuladoras presentes en la membrana de las VEs pueden llevar a la activación y proliferación de linfocitos Th2 CD4+ y la liberación de citoquinas proinflamatorias características de unos subtipos de asma. Se ha demostrado que la capacidad inmunomoduladora de las VEs está disminuida en asmáticos, y que la inflamación crónica y broncoconstricción características de la enfermedad resultan en una mayor liberación de exosomas con capacidad proinflamatoria por las células bronquiales epiteliales (46). Además, las ceramidas y esfingolípidos presentes en las VEs tienen una cierta capacidad proinflamatoria. Por último, los exosomas procedentes de eosinófilos de la vía aérea tienen la capacidad de modificar el comportamiento de las células bronquiales, aumentando su tasa de apoptosis y reduciendo su capacidad para reparar lesiones celulares (44).

Los exosomas de la vía aérea de asmáticos presentan un cargo en miRNA alterado, comparándolo con no asmáticos (47). Algunos miRNAs claves en la fisiopatología del asma son miR-21, miR146a y miR-155, al tener un papel en la regulación de los sistemas inmunes innato y adaptativo. Se ha determinado que su expresión, en conjunto con 21 otros miRNAs, era alterada en VEs procedentes de la vía aérea de pacientes con asma severo (29). Esa expresión diferencial de miRNAs podría ser una de las claves para entender la fisiopatología de la enfermedad, y encontrar nuevas dianas terapéuticas (44).

2.3.2 Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares en el asma

Los exosomas procedentes de la vía aérea de pacientes asmáticos tienen un patrón de proteínas marcadoras de superficie, lípidos y miRNAs distintos a los de personas sanas, por lo que se podrían usar esas vesículas como biomarcadores para la enfermedad. El uso de biomarcadores de exosomas podría ayudar a entender la enfermedad, clasificar los subtipos de asma de manera más eficiente, en función de mecanismos moleculares, y por lo tanto mejorar las perspectivas de tratamiento (46,48).

Además, las VEs tienen un gran potencial como sistemas de transporte de fármacos (44). Hasta ahora los métodos preferidos para la liberación de fármacos en el organismo son nanopartículas poliméricas y liposomas. Estos transportadores presentan varios inconvenientes: son poco estables, inmunogénicos y pueden ser tóxicos. Los exosomas son una buena alternativa ya que son más estables, poco inmunogénicos, no tumorigénicos, y son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y transportar pequeñas moléculas, enzimas, proteínas y ácidos nucleicos (48).

Por último, los principales inconvenientes de las terapias basadas en miRNAs son la inespecificidad en su administración y su degradación antes de llegar a la célula diana (49). Visto que tienen una multitud de dianas en el organismo y son capaces de modular la expresión genética, estos tratamientos pueden dar efectos secundarios si no se administran de manera específica al tejido que se quiere tratar, en este caso la vía aérea. Los exosomas pueden ser una herramienta útil en la terapia del asma con miRNAs al encapsular esos ácidos nucleicos, impidiendo su degradación prematura y dirigiéndolos a un determinado tejido (47).

La mayoría de los estudios sobre exosomas se han llevado a cabo en plasma y suero (50). No obstante, para el estudio del asma y de otras patologías de la vía aérea, interesa determinar el estado de las células bronquiales, con el estudio de VEs procedentes de la vía aérea. Hasta ahora la gran mayoría de los estudios de biomarcadores de asma en exosomas se han realizado con fluido de lavado bronquioalveolar (BALF), una técnica invasiva (46,51). Se ha llevado a cabo un único estudio de exosomas en esputo inducido (EI), una técnica menos invasiva que el BALF (52). El esputo inducido podría convertirse en un método de elección para el estudio de biomarcadores del asma, si se consigue la optimización del aislamiento de VEs en este fluido.

3. Objetivos

En este trabajo de fin de grado nos planteamos la hipótesis de que las vesículas extracelulares pueden ser aisladas a partir de fluidos de la vía aérea, como el esputo inducido. Estas vesículas podrían contribuir al conocimiento de la fisiopatología del asma, así como mejorar el manejo de la enfermedad.

Para contribuir a la confirmación de esta hipótesis, en este trabajo nuestro objetivo fue optimizar el aislamiento de VE en un fluido biológico poco estudiado, el esputo inducido de pacientes asmáticos. Para alcanzar este objetivo primario, nos planteamos los siguientes objetivos secundarios:

- Procesamiento primario de muestras de EI.
- Evaluación de la calidad de las muestras del EI y clasificación fenotípica en función del recuento diferencial.
- Aislamiento de las vesículas extracelulares presentes en muestras de EI mediante un kit comercial (ExoQuick®)
- Caracterización cualitativa y cuantitativa de la presencia de vesículas extracelulares en el esputo por tres métodos: Microscopía electrónica de transmisión (TEM), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) y ELISA.

4. Materiales y métodos

4.1 Pacientes

Los pacientes incluidos en este trabajo fueron reclutados de manera consecutiva a través de la consulta monográfica de asma grave del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS). De manera previa, 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 Aragón (CEICA, PI20/630 #02/2021).

4.2 Obtención de esputo inducido (EI)

La inducción de esputo es un técnica sencilla, rápida y poco invasiva (53). A pesar de ello, antes de llevar a cabo la inducción, fue necesario efectuar una espirometría para determinar la capacidad pulmonar del paciente, ya que el suero salino usado durante el proceso puede inducir broncoconstricción (54). Esta parte del proceso, correspondiente a la obtención de la muestra primaria y manejo del paciente, fue llevada a cabo por parte de un enfermero del grupo, siguiendo las guías de buenas prácticas clínicas. Tras administrar dos inhalaciones del broncodilatador Ventolin (Salbutamol, un agonista de los receptores β_2 -adrenérgicos), se esperaron unos diez minutos y se volvió a realizar una espirometría (55). Tras este punto, se comenzó la fase de inducción.

La inducción consistió en la inhalación de suero salino hipertónico al 3% durante siete minutos, tras los cuales se llevó a cabo una maniobra de tos forzada, y se recogió el esputo inducido en un bote estéril (56). Por último, se volvió a realizar una espirometría, para comprobar que la capacidad pulmonar del paciente era adecuada.

4.3 Procesamiento del esputo inducido

El procesamiento del esputo inducido se puede hacer con la totalidad de la muestra, o separando las fases mucoides con una mayor densidad (54). En este caso se eligió aislar únicamente el moco ya que resulta en una menor contaminación por células escamosas procedentes de la vía aérea superior (54,57).

Una vez obtenido el esputo inducido, se trasladó el contenido del bote estéril a una placa de Petri en la cual se separaron las fases de mayor densidad y solidez con unas pinzas estériles. Esas fases más densas, que se encuentran señaladas con flechas rojas en la Figura 3, corresponden a moco procedente de la vía aérea inferior (58). Se recogieron alícuotas de entre 0.05 y 0.1 g de esas fracciones más espesas en tres tubos eppendorf de 1.5 mL previamente tarados.



Figura 3: Espudo inducido, fases más densas señaladas con flechas rojas

Para licuar y homogeneizar el esputo, se disolvieron las glicoproteínas del moco con Sputolysin® Reagent (Calbiochem®, Merck Millipore), una disolución de Dithiothreitol (DTT) a 9.68 mg/ml (56). El volumen de disolución de DTT se calculó multiplicando por 4 el peso de EI recogido en las alícuotas. Según la densidad del moco se varía la proporción de DTT, usando una dilución 1:10 en agua destilada filtrada para esputo inducido poco denso, y 1:5 o 1:2 si es muy denso.

Tras la adición del volumen de DTT necesario a los tapones mucoides, se vortearon las alícuotas durante 15 segundos y se incubaron con agitación en el balancín durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción de digestión añadiendo al tubo un volumen de PBS filtrado idéntico al volumen de DTT usado previamente.

La alícuota en la cual se recogió la menor cantidad de EI se etiquetó con el nombre del paciente y su número de historia clínica para su posterior análisis por el Servicio de Microbiología y Parasitología del HUMS. El análisis microbiológico permite descartar la presencia de agentes infecciosos en la vía aérea de los pacientes.

Las dos alícuotas restantes se filtraron con una punta de pipeta de 1000 µL en la cual se introdujo previamente un filtro de nylon de 44 µm, para eliminar agregados mucoides no digeridos durante la incubación con DTT. No se usaron filtros de jeringas ya que se obturan fácilmente con restos mucoides. El filtro de nylon introducido en la punta de pipeta nos permitió filtrar la solución ejerciendo una presión positiva. Antes de continuar con el protocolo, se separó una alícuota de 15 µL tras filtrar para llevar a cabo un recuento de viabilidad celular (**apartado 4.3.1**).

Las dos alícuotas filtradas se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos, para separar las células. Se retiró el sobrenadante de estas dos alícuotas y se congelaron a -80°C para el posterior aislamiento de las vesículas extracelulares (**apartado 4.4**).

Ambos pellets se resuspendieron con 70 μL de PBS filtrado, el de mayor peso inicial se congeló a -80°C , y el de menor peso se tiñó para llevar a cabo el recuento celular diferencial (**apartado 4.3.2**).

4.4 Calidad del esputo y clasificación fenotípica

4.4.1 Recuento celular y viabilidad

Para realizar el recuento de viabilidad, se mezclaron 15 μL de solución de EI tras su digestión y filtración, con 15 μL de Azul Trypan 0.4%. Se cargaron unos microlitros de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se observaron al microscopio Axiostar Plus (ZEISS®) con 10 aumentos.

Se contaron tanto el número total de células bronquiales viables y no viables, como de células escamosas. La proporción de células bronquiales viables y no viables nos permitió determinar la calidad del esputo (56). Además, la proporción de células escamosas indica si el esputo proviene de las vías aéreas superiores o inferiores. Las muestras con una proporción de células escamosas mayor al 20% se desecharon ya que provienen de la vía aérea superior (54,59).

4.4.2. Recuento celular diferencial

El recuento celular diferencial de células en muestras de EI se utiliza como parámetro para el diagnóstico de fenotipos asmáticos. Los cuatro fenotipos son los siguientes: eosinofílico (eosinófilos $\geq 3\%$, neutrófilos $< 76\%$), neutrofílico (eosinófilos $< 3\%$, neutrófilos $\geq 76\%$), paucigranulocítico (eosinófilos $< 3\%$; neutrófilos $< 76\%$) y mixto granulocítico (eosinófilos $\geq 3\%$; neutrófilos $\geq 76\%$) (21,53,60).

El pellet de células con el menor peso inicial se resuspendió en 70 μL de PBS filtrado. Dos alícuotas de 15 μL se extendieron sobre portaobjetos y se secaron en un hornillo. Una vez secos, se sometieron a una tinción de panóptico rápido (PanReac AppliChem, ITW Reagents), un método de tinción diferencial que permite distinguir los distintos tipos de células sanguíneas. Se sumergieron los portaobjetos en cada uno de los 3 reactivos (Cristal Violeta en Metanol, Eosina, Azur B), 5 veces durante 1 segundo, y después en agua para aclarar (61). Se secaron los portaobjetos en el hornillo, y se añadió una gota de pegamento y un cubre a la preparación. Tras 24 horas de secado, se pudo observar la preparación al microscopio.

4.5 Aislamiento de vesículas extracelulares

Para llevar a cabo el aislamiento de las vesículas extracelulares en las muestras procesadas de EI, se usó el kit comercial ExoQuick-TC® de System Biosciences (SBI).

Primero se descongelaron las muestras de EI procesadas y congeladas a -80°C . Una vez descongeladas se sometieron a una centrifugación a 500 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se descartó el pellet, ya que podría contener restos celulares, y se centrifugaron 700 μL de sobrenadante a 10.000 g y a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se volvió a descartar el pellet y se tomaron 500 μL de sobrenadante de cada alícuota, para continuar con la extracción de vesículas extracelulares.

Cada muestra proviene de un esputo inducido distinto, por lo que el volumen de muestra obtenido también varía. Se determinó la cantidad de sobrenadante a recoger en función de la muestra con un

menor volumen inicial, de manera que el aislamiento de los exosomas se pueda hacer en el mismo volumen para todas las alícuotas.

Se añadieron 200 μL de reactivo ExoQuick-TC, un polímero que induce la precipitación de vesículas extracelulares, a los 500 μL de sobrenadante, para conseguir una proporción final de 1:5. Este paso del proceso es crítico, se recomienda añadir el reactivo lentamente para promover la formación de núcleos de precipitación en la mezcla y asegurar el buen rendimiento del proceso de aislamiento. Se incubó la mezcla en hielo y a 4°C durante toda la noche para favorecer la precipitación de exosomas.

Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 10.000 g y 4°C durante una hora, y se desechó el sobrenadante, ya que los exosomas precipitados se encuentran en el pellet. Se volvió a centrifugar el pellet a 10.000 g y 4°C durante 5 minutos, para eliminar todo el líquido residual, dado que podría interferir con las posteriores caracterizaciones y aplicaciones de los exosomas.

Por último, se resuspendió el pellet de exosomas en 150 μL de PBS previamente filtrado, y se congelaron las muestras a -20°C.

4.6 Caracterización y cuantificación de vesículas extracelulares

La caracterización de las VE aisladas se realizó con tres técnicas para observar su morfología, determinar su concentración y su tamaño, y confirmar la presencia de exosomas con el marcador CD63.

4.6.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con esa técnica de microscopia electrónica, se pretendió observar la morfología y el tamaño de las vesículas extracelulares aisladas. En este caso no se usó como una técnica cuantitativa para determinar la abundancia de exosomas. Fue llevada a cabo por el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), siguiendo el procedimiento descrito por Lässer et al (62).

Se determinó la concentración de proteína y se añadieron aproximadamente 10 μg de exosomas en PBS en la red usada para preparar las muestras de TEM. Se dejó incubar durante 30 a 60 minutos, tras los cuales se lavó la red tres veces con PBS. Los exosomas fueron fijados con 2% de paraformaldehído durante 10 minutos, tras los cuales se realizaron tres otros lavados. Se volvieron a fijar con una gota de glutaraldehído al 2.5% durante 10 minutos, y se lavaron con agua desionizada. Por último, se tñieron las preparaciones con acetato de uranilo al 2% durante 15 minutos. Se finalizó la preparación de las muestras añadiéndoles unas gotas de metilcelulosa al 0.13% y acetato de uranilo al 0.4% durante 10 minutos. Tras el secado de las muestras, fueron visualizadas con el microscopio electrónico Tecnai T20 (FEI Company) del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA).

4.6.2 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

La técnica de NTA se basa en los fenómenos de movimiento Browniano y de dispersión de la luz de un láser al incidir sobre VEs, para determinar la distribución del tamaño de esas vesículas en una suspensión líquida. Nos permitió determinar el tamaño de las vesículas extracelulares de manera precisa al proporcionar la media, la moda y la desviación estándar de la medición, así como la abundancia de vesículas en la muestra (63).

Para llevar a cabo la técnica, se descongelaron las muestras de EI guardadas a -20°C y se diluyeron en una proporción 1:100 con una mezcla de PBS y EDTA a 5 mM para prevenir la agregación de las

vesículas extracelulares. Antes de cargar la muestra, se usó una jeringa de 1 mL para pasar 1 mL de agua seguida por un 1 mL de aire por la maquina NanoSight NS300 de Malvern Panalytical. Tras este primer paso, se cargó la muestra en la cámara de medición de manera que no queden burbujas en la zona de medida. En este momento se ejecutó el script de lectura del programa, y se grabaron cinco videos de un minuto durante las cuales el láser Blue405 incidió sobre la zona de medición en la cual las vesículas se desplazaban debido a la presión ejercida por la jeringa. En función del desplazamiento observado, de la dispersión de la luz por las nanopartículas al incidir con el láser y del fenómeno de movimiento Browniano, se calculó el número de partículas, así como su tamaño.

4.6.3 ExoELISA-ULTRA: Detección de CD63

Para confirmar que las vesículas aisladas son exosomas, se realizó un ELISA con el kit comercial ExoELISA-ULTRA CD63 de System Biosciences. El marcador CD63 corresponde a una tetraspanina específica de la membrana de los exosomas (64). El ELISA también puede ser una técnica cuantitativa, aunque no será tan precisa como la NTA.

Antes de realizar el ELISA, se prepararon unas disoluciones a partir del estándar y del Coating Buffer incluidos en el kit para construir una recta patrón, con las siguientes concentraciones de exosomas por mL: 0, $1,4 \cdot 10^9$, $5,7 \cdot 10^9$, $2,28 \cdot 10^{10}$.

Se descongelaron las alícuotas guardadas a -20°C y se determinó la cantidad de proteína en cada una de ellas por Nanodrop. Aunque no es una técnica con alta precisión, se eligió el Nanodrop ya que da una estimación de la carga proteica en un volumen muy reducido de líquido, y nos interesaba conservar la máxima cantidad posible de muestra.

Debido a que la cantidad de proteína en las muestras de esputo inducido no fue muy elevada, se aplicaron 50 μL de cada una de las alícuotas, sin diluirlas, a pocillos de la placa para ELISA. Se hizo lo mismo con las diluciones seriadas del patrón, y se dejó incubar una hora a 37°C y sin agitación, para que se puedan fijar las vesículas a la placa.

Tras la incubación se lavó la placa 3 veces durante 5 minutos con 100 μL de Wash Buffer 1x y con agitación. Se añadió a cada pocillo 50 μL de anticuerpo primario anti-CD63 comercial diluido en una proporción 1:100 con Blocking buffer, y se dejó incubar durante una hora, a temperatura ambiente con agitación. Tras otros tres lavados, se añadió a cada pocillo 50 μL de anticuerpo secundario HRP de cabra anti-conejo diluido en una proporción 1:5000 con Blocking Buffer. Se incubó una hora a temperatura ambiente y con agitación.

Finalmente, se volvió a lavar la placa tres veces con 100 μL de Wash Buffer 1x, y se añadieron 50 μL del reactivo Super-sensitive TMB ELISA. Se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente con agitación, antes de parar la reacción con 50 μL de Stop Buffer y leer la placa con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

5. Resultados y discusión

5.1 Población de estudio

En este trabajo, se incluyeron un total de 15 pacientes con el objetivo de determinar la presencia de exosomas en muestras procedentes de esputo inducido. En la Tabla 1 se recogen los principales datos antropométricos de algunos de los pacientes incluidos.

Tabla 1. Sexo, edad e IMC de 11 de los pacientes incluidos en el estudio

MUESTRA	SEXO	EDAD	IMC
1	Mujer	65	30.76
2	Hombre	53	32.49
3	Mujer	43	22.27
4	Mujer	20	20.98
5	Hombre	55	26.64
6	Hombre	67	27.76
7	Hombre	55	30.67
8	Mujer	30	27.05
9	Mujer	41	25.16
10	Mujer	61	37.65
11	Hombre	55	27.68

La edad media del grupo de pacientes es de 49,5 años y su IMC medio de 28,10, lo que corresponde a un sobrepeso. Como se ha mencionado anteriormente, la obesidad es un factor de riesgo para el asma, y se ha descrito una relación entre el riesgo de padecer asma y un IMC mayor a 28 (8,65). Se estima que los datos antropométricos de los pacientes incluidos se encuentran dentro de la normalidad de las poblaciones asmáticas.

5.2 Calidad del esputo y clasificación fenotípica

5.2.1 Recuento celular y viabilidad

Las muestras de EI de los quince pacientes descritos se estudiaron para determinar la viabilidad de la muestra, así como su procedencia, por el recuento de células epiteliales. En la Figura 4 se pueden observar imágenes de microscopía con los distintos tipos de células representativas de muestras de EI.

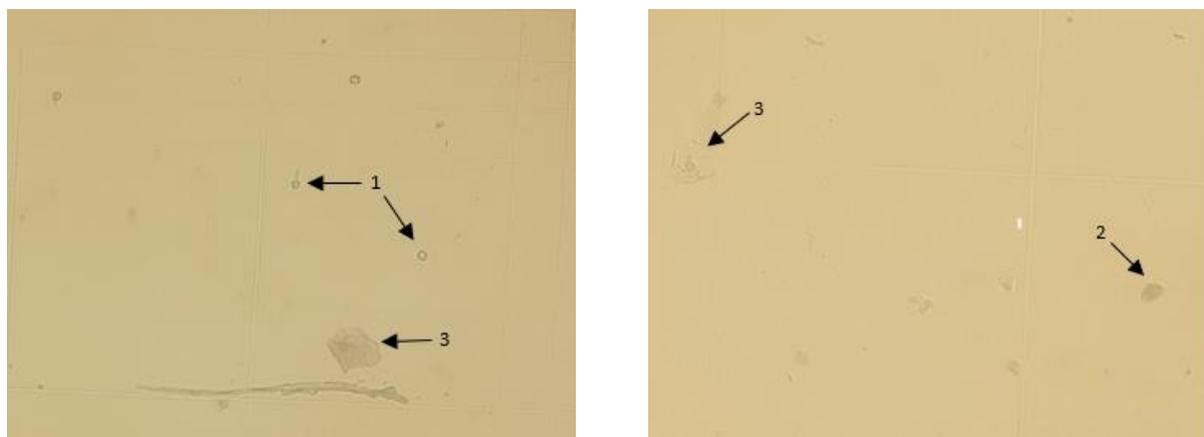


Figura 4. Imágenes de microscopía, recuento celular de una muestra de EI. Se señalan los tres tipos de células: células bronquiales viables (1) y no viables (2), y células escamosas (3).

Se recogieron datos de recuento celular total, así como abundancia de células epiteliales y bronquiales viables y no viables en las quince muestras de EI. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2. En la Tabla 3 se recogen las notas de la prueba ACT para algunos de los pacientes seguidos

Tabla 2. Estudio de viabilidad celular, recuento celular total y porcentaje de células escamosas en EI

MUESTRA	% CELULAS VIABLES	% CELULAS VIABLES	% CELULAS ESCAMOSAS	RECUESTO CELULAR TOTAL (CEL/ML)
1	86,3	9,0	4,7	1,01.10 ⁶
2	49,6	14,5	35,9	0,87.10 ⁶
3	88,9	8,7	2,4	2,61.10 ⁶
4	94,3	4,3	1,4	2,64.10 ⁶
5	88,2	9,1	2,7	1,98.10 ⁶
6	82,4	16,0	1,6	1,52.10 ⁶
7	84,4	13,4	2,2	1,57.10 ⁶
8	81,7	15,5	2,8	1,61.10 ⁶
9	73,6	24,1	2,3	1,12.10 ⁶
10	77,9	17,7	4,4	0,71.10 ⁶
11	90,0	6,7	3,3	2,83.10 ⁶
12	92,3	7,0	0,7	1,45.10 ⁶
13	77,9	18,9	3,2	3,13.10 ⁶
14	91,7	7,7	0,6	1,43.10 ⁶
15	90,9	7,8	1,3	1,53.10 ⁶

Tabla 3. Nota en el Asthma Control Test (ACT) de algunos de los pacientes seguidos en el estudio

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SCORE ACT	19	22	18	23	25	25	20	17	7	9

El esputo inducido refleja directamente el estado de la vía aérea inferior, por lo tanto, resulta interesante determinar la viabilidad de sus células. En la Tabla 1 se puede observar que los valores de recuento celular de las quince muestras se encuentran en un rango de entre 0,71.10⁶ y 3,13.10⁶ células viables por mL. Estos datos son conformes a otros obtenidos en estudios similares (66).

Podemos observar que los porcentajes de células viables son altos, excepto en la muestra 2, alcanzando un máximo en la muestra 4 con un 94.3% de células viables. Los mecanismos de la enfermedad resultan en un daño oxidativo en las células del epitelio de la vía aérea, y se ha demostrado que las células bronquiales de asmáticos son más propensas a sufrir apoptosis tras un daño oxidativo, por lo que nos esperaríamos datos de viabilidad celular más bajos (28). No obstante, los pacientes seguidos en este estudio presentan asma severo, pero reciben un tratamiento biológico, y la enfermedad está generalmente bien controlada, como atestian los resultados del Asthma Control Test (ACT) recogidos en la Tabla 3. Se estima que la enfermedad está bien controlada cuando la nota del ACT se encuentra entre 20 y 25, y mal controlada entre 5 y 15 (4). Por lo tanto, en esos pacientes se limitan eficientemente las exacerbaciones asmáticas, llevando a un mejor estado de su vía aérea inferior, y a una mayor viabilidad celular en su esputo inducido.

Además de darnos una idea del estado de la vía aérea inferior del paciente, el conteo de células en esputo inducido nos permite determinar la calidad de la muestra, es decir si procede de la vía aérea inferior o superior. Para determinar este parámetro, se debe tener en cuenta el porcentaje de células escamosas presentes en la muestra, si su proporción es mayor al 20% el esputo procede de la vía aérea

superior (54,59). En la muestra 2, la proporción de células escamosas alcanza un 35.9%, esta muestra tuvo que desecharse al proceder de la vía aérea superior. El resto de las muestras procedían de la vía aérea inferior por lo que se pudo llevar a cabo el aislamiento de vesículas extracelulares.

5.2.2 Recuento celular diferencial

Además de la valoración de la calidad del EI, se llevó a cabo el recuento diferencial de once de las muestras para definir su perfil fenotípico. En la Tabla 4 se recogen los datos de recuento diferencial de células del esputo inducido obtenidos a partir de estas muestras.

Tabla 4. Recuento diferencial de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos en once muestras de esputo inducido

MUESTRA	% LINFOCITOS	% MACROFAGOS	% EOSINOFILOS	% NEUTROFILOS	PERFIL FENOTIPICO
1	0	16.2	0.5	83.3	Neutrofílico
2	0	55.6	9.0	31.9	Eosinofílico
3	0	8.5	10.4	81.1	Mixto granulocítico
4	0	69.6	0	30.4	Paucigranulocítico
5	0	37.1	54.1	8.8	Eosinofílico
6	0	50.9	1.8	47.3	Paucigranulocítico
7	0	54.0	0	45.1	Paucigranulocítico
8	0	55.9	8.7	32.3	Eosinofílico
9	0	23.7	7.2	68.4	Eosinofílico
10	1.3	16.6	1.3	78.3	Neutrofílico
11	0	68.2	4.0	15.6	Eosinofílico

El recuento diferencial de células en muestras de EI se usa como un parámetro diagnóstico para clasificar los distintos tipos de asma, eosinofílico, neutrofílico, paucigranulocítico y mixto granulocítico, según los parámetros descritos en el apartado 4.3.2 (53,60).

En función de estos parámetros, podemos afirmar que las muestras 1 y 10 corresponden a un fenotipo neutrofílico, ya que los eosinófilos representan menos de 3% de las células (0.5% y 1.3% respectivamente), y los neutrófilos más del 76% (83.3% y 78.3% respectivamente). Tres muestras, 4, 6 y 7 presentan un fenotipo paucigranulocítico claro, con porcentajes de eosinófilos menores al 3% (0%, 1.3%, 0%) y de neutrófilos menores al 76% (30.4%, 47.3%, 45.1%). Cinco muestras, 2, 5, 8, 9 y 11 pertenecen al fenotipo eosinofílico, con más de 3% de eosinófilos (9%, 54.1%, 8.7%, 7.2% y 4%) pero menos de 76% de neutrófilos (31.9%, 8.8%, 32.3%, 68.4% y 15.6%). Por último, la muestra 3 presenta un fenotipo inflamatorio mixto granulocítico, al tener una proporción de más de 3% de eosinófilos (10.4%) y más de 76% de neutrófilos (81.1%).

En la Figura 5 se representan las proporciones de los fenotipos asmáticos en el muestreo. En la clínica, el fenotipo más frecuente es el eosinofílico, ya que lo presentan entre 32 y 40% de los asmáticos (67). Esa proporción es similar a la obtenida en el muestreo estudiado, con un 46% de fenotipos eosinofílicos.

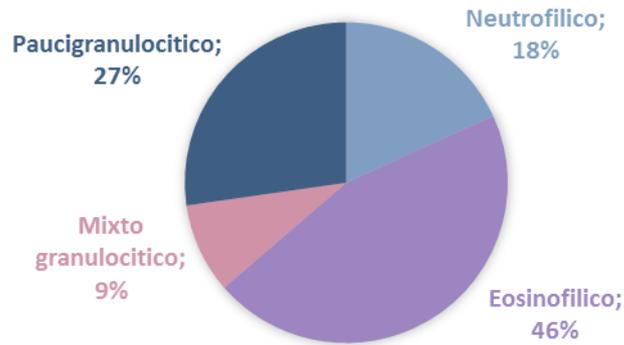


Figura 5. Distribución de los fenotipos asmáticos en 11 muestras de El

5.3 Caracterización y cuantificación de vesículas extracelulares

5.3.1 Análisis de la morfología de VEs por TEM

Tras el aislamiento de los exosomas, se procedió a su caracterización. En primer lugar, se llevó a cabo su caracterización morfológica mediante la visualización de las muestras preparadas de exosomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes obtenidas se pueden observar en la Figura 6.

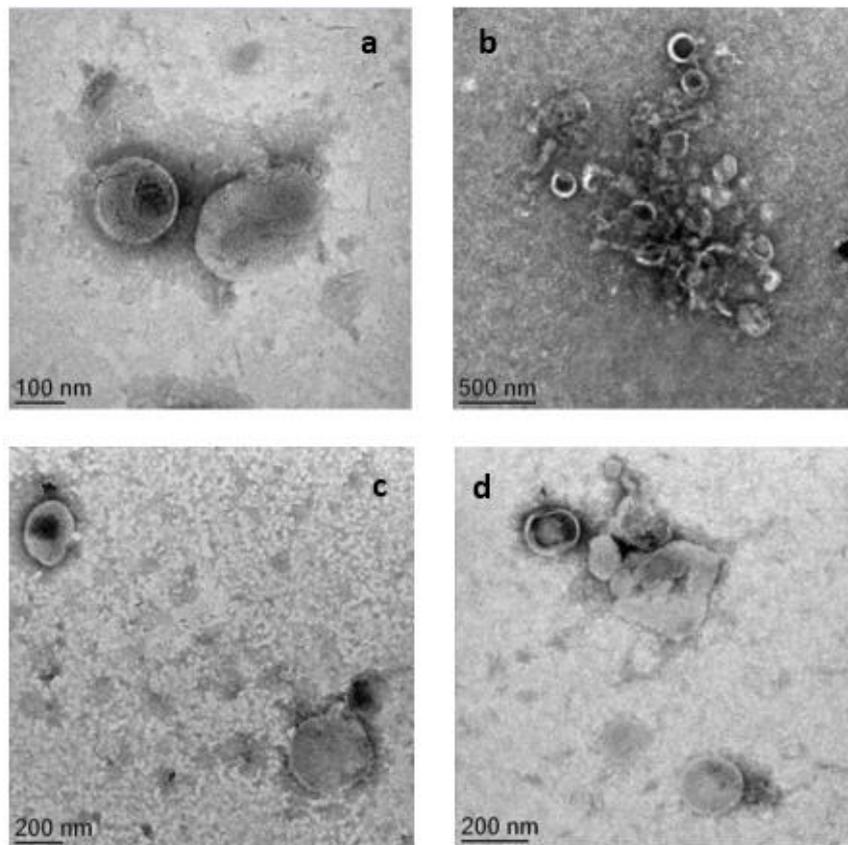


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de vesículas extracelulares aisladas de muestras de esputo inducido de asmáticos

Estas imágenes de microscopía electrónica de transmisión nos permiten estudiar la morfología de las vesículas, así como estimar su tamaño. En este caso podemos observar una multitud de vesículas circulares, separadas, como en las Figuras 6a, 6c y 6d, o bien formando agrupaciones, como en la Figura 6b. Además de ser circulares, estas vesículas presentan una forma de copa, que se observa

claramente en las Figuras 6b y 6d, con los bordes más claros y el centro más oscuro. Esta morfología particular se debe probablemente a la preparación de las muestras para observarlas en TEM, ya que consiste en una deshidratación extrema, que podría llevar al colapso de las vesículas. Las VEs observadas con técnicas de criomicroscopía electrónica, en la cual no se sufre este proceso de deshidratación, conservan su forma esférica (42).

En cuanto al tamaño de las vesículas, se estima que tienen un diámetro cercano a 100-200 nm, lo que concuerda con los resultados del único estudio realizado con exosomas en esputo inducido (52). En este caso no determinamos de manera precisa la concentración de VEs con TEM ya que sería más costoso y menos riguroso que con otras técnicas, como el NTA (68). No obstante, la TEM nos permite afirmar que las muestras procesadas de EI contienen vesículas extracelulares.

5.3.2 Análisis del tamaño y de la concentración de VEs por NTA

Se analizaron las muestras por NTA con el procedimiento descrito en el apartado 4.6.2, para determinar con precisión el tamaño y la concentración de las VEs. Los informes obtenidos para dos de las muestras se recogen en los **Anexos II y III**.

La NTA nos permite determinar la distribución de tamaños de las partículas, en función de la difracción que producen en la luz emitida por un láser (63). Los tamaños de las VEs no siguen una distribución Gaussiana, por lo que nos interesa conocer la moda de la muestra. En este caso los valores de moda obtenidos para las muestras son de 123.6 ± 6.6 nm (**Anexo II**) y 127.2 ± 6.4 nm (**Anexo III**), lo que concuerda con el tamaño teórico de exosomas, entre 30 y 150 nm, y con las medidas obtenidas por TEM (36). Además, los resultados obtenidos son similares a los descritos por Sánchez-Vidaurre et al (52).

La NTA nos permite también determinar la concentración de vesículas por mL de manera precisa. En las dos muestras analizadas se alcanzan concentraciones de $3,18 \cdot 10^8 \pm 8,91 \cdot 10^6$ vesículas/mL (**Anexo II**) y $4,51 \cdot 10^8 \pm 2,42 \cdot 10^8$ vesículas/mL (**Anexo III**). Esos valores son inferiores a los obtenidos por Sánchez-Vidaurre et al en su análisis de exosomas de EI (52). No obstante, cabe destacar que se usaron técnicas distintas para el aislamiento de VEs, en nuestro caso fue una precipitación con ExoQuick, y una ultracentrifugación en el estudio de Sánchez-Vidaurre et al, lo que puede explicar la variación en los resultados. Además, las concentraciones de vesículas obtenidas en muestras de EI son muy inferiores a las obtenidas por NTA en muestras de plasma: 10^8 - 10^9 VEs/mL en el EI y 10^{11} - 10^{12} VEs/mL en el plasma (69). Esa diferencia se debe a que el EI es un fluido biológico mucho menos concentrado que otros, como el plasma, tanto en proteínas como en VEs.

Con ese análisis, se confirma la presencia de VEs en EI en un rango similar al obtenido en otro estudio. Por lo tanto, se puede pretender hacer un estudio más extenso de este fluido biológico y sus VEs con NTA en el futuro, al ser una técnica precisa y reproducible.

5.3.3 ExoELISA - ULTRA CD63

La principal ventaja del ELISA anti-CD63 frente a TEM y NTA es que nos permite detectar únicamente los exosomas, ya que la tetraspanina CD63 es específica de este tipo de VEs (64). Antes de realizar el ELISA anti-CD63 se midieron las concentraciones de proteínas de las cuatro muestras con Nanodrop. Los resultados se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones en proteínas determinadas con Nanodrop en cuatro muestras de VEs procedentes de EI

MUESTRA	CONCENTRACIÓN PROTEICA EN MG/ML
1	0,449
3	0,322
4	1,057
5	0,212

Como se ha explicado anteriormente, el EI es un fluido poco concentrado, esas concentraciones bajas de proteínas son características de este tipo de muestras. No obstante, el kit comercial usado para realizar el ELISA anti-CD63 recomienda aplicar 100 µg de proteína en cada pocillo de la placa. Debido a la baja concentración de las muestras de EI no fue posible, y se aplicaron 50 µL de cada muestra, para llegar a una concentración final de 22.45 µg para la muestra 1, 16.1 µg para la 3, y 52.85 µg y 10.6 µg para 4 y 5 respectivamente.

Usamos una disolución stock con una determinada concentración de exosomas por mL para construir una recta de calibrado, y poder cuantificar la abundancia de exosomas en las cuatro muestras. La recta de calibrado, así como las absorbancias de las distintas disoluciones de exosomas usados se recogen en la Figura 7 y la Tabla 6.

Tabla 6. Datos de abundancia de exosomas y absorbancias a 450 nm usados para construir la recta de calibrado

PUNTO	ABUNDANCIA DE EXOSOMAS	ABSORBANCIA A 450 NM
0	0	-
1	$1,4 \cdot 10^9$	0.166
2	$5,7 \cdot 10^9$	0.378
3	$2,28 \cdot 10^{10}$	1.765

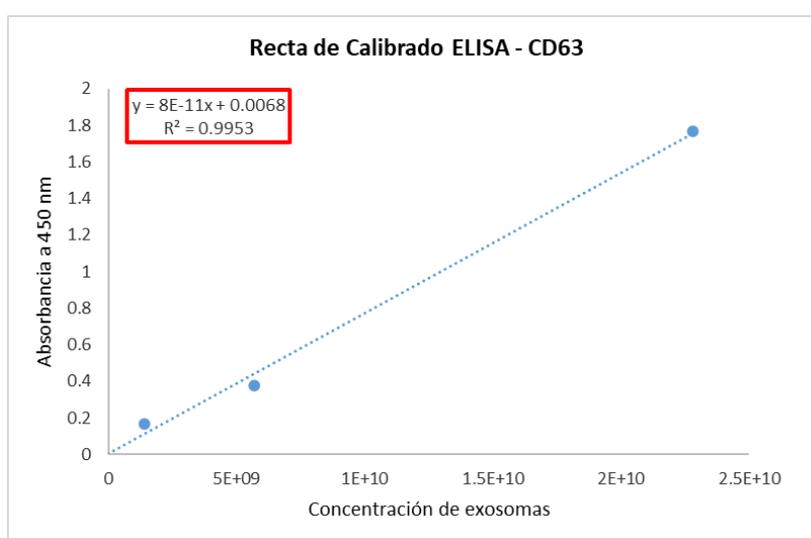


Figura 7. Recta de calibrado del ensayo ELISA de detección de CD63 para la cuantificación de exosomas

Al construir la recta de calibrado se desechó el punto 0 ya que al pasar del punto sin exosomas a un punto con $1,4 \cdot 10^9$ exosomas/mL se necesitaría usar una escala exponencial.

Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras de EI, así como la abundancia de exosomas calculada a partir de los datos de la recta de calibrado se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Absorbancia a 450 nm y cuantificación de exosomas mediante ELISA anti-CD63 en cuatro muestras de EI

MUESTRA	ABSORBANCIA A 450 NM	CONCENTRACIÓN DE EXOSOMAS
1	0.089	1,0275.10 ⁹
3	0.103	1,2025.10 ⁹
4	0.125	1.4775.10 ⁹
5	0.095	1,1025.10 ⁹

Las abundancias de exosomas obtenidas con el ensayo ExoELISA anti-CD63 en las cuatro muestras de EI son similares al rango obtenido en NTA y en el estudio de Sánchez-Vidaurre et al (52). Además, como hemos mencionado anteriormente, la ventaja de esta técnica se basa en que se detectan únicamente exosomas, y no otros tipos de vesículas, como microvesículas o cuerpos apoptóticos, ya que no presentan el marcador CD63 en su membrana. No obstante, hay que tener en cuenta que las cantidades de muestras aplicadas en los pocillos en el principio del ensayo no eran las indicadas en las instrucciones del kit comercial, y no eran iguales entre las muestras. Por lo tanto, las cuantificaciones obtenidas no se deben considerar como muy precisas. Este ensayo nos ha servido sobre todo para afirmar que gran parte de las VEs aisladas en las muestras de EI son exosomas, y no microvesículas o cuerpos apoptóticos, y no para determinar de manera rigurosa la abundancia de exosomas en las muestras.

Los ensayos realizados en este proyecto nos han permitido determinar la presencia de exosomas, y de vesículas extracelulares en general en muestras de EI de pacientes asmáticos. En un futuro, se deberán hacer estudios de RNA-seq para determinar la carga de miRNAs de esos exosomas, y compararlos con muestras de EI de personas sanas, para poder encontrar biomarcadores del asma, inferir qué miRNAs están alterados, y posiblemente llegar a un mejor conocimiento de la enfermedad y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

6. Conclusiones

Las conclusiones que se pudieron extraer tras la realización de este trabajo son las siguientes:

- El estudio de muestras de esputo inducido permite determinar el estado de la vía aérea inferior, así como el fenotipo asmático del paciente.
- Se pueden aislar vesículas extracelulares de muestras de esputo inducido.
- Las vesículas extracelulares aisladas son principalmente exosomas, como lo confirman técnicas de análisis como TEM, NTA y ELISA anti-CD63.
- Tras el establecimiento de un protocolo para el aislamiento y caracterización de VEs en EI, se puede evaluar la carga de estos exosomas para la búsqueda de nuevos biomarcadores del asma.

Conclusions

The following conclusions could be drawn from the completion of this project:

- The study of induced sputum from asthmatic patients can be used to determine the state of the inferior airway as well as the inflammatory phenotype of the patient.
- Extracellular vesicles can be isolated from induced sputum samples.
- The isolated extracellular vesicles are predominantly exosomes, as was confirmed by the following techniques: TEM, NTA and ELISA anti CD63.
- The implementation of a protocol for the isolation and characterization of VEs in EI is a preliminary step for the evaluation of their cargo and the search for new biomarkers in asthma.

7. Referencias

1. World Health Organization. Asthma [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
2. Mattiuzzi C, Lippi G. Worldwide asthma epidemiology: insights from the Global Health Data Exchange database. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020 Jan 1;10(1):75–80.
3. Borak J, Lefkowitz RY. Bronchial hyperresponsiveness. Vol. 66, *Occupational Medicine.* 2016.
4. Global Initiative for Asthma (GINA)-. 2021 GINA Main Report [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://ginasthma.org/gina-reports/>
5. Lemanske RF, Busse WW. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).
6. Innes Asher M, García-Marcos L, Pearce NE, Strachan DP. Trends in worldwide asthma prevalence. *Eur Respir J.* 2020 Dec 1;56(6).
7. Al-Hajjaj M. Bronchial asthma in developing countries: A major social and economic burden. Vol. 3, *Annals of Thoracic Medicine.* 2008.
8. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of asthma in children and adults. Vol. 7, *Frontiers in Pediatrics.* Frontiers Media S.A.; 2019.
9. Apps LD, Chantrell S, Majd S, Eglinton E, Singh SJ, Murphy AC, et al. Patient Perceptions of Living with Severe Asthma: Challenges to Effective Management. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019 Nov 1;7(8):2613-2621.e1.
10. Lang DM. Severe asthma: Epidemiology, burden of illness, and heterogeneity. *Allergy Asthma Proc.* 2015 Nov 1;36(6):418–24.
11. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392(10159).
12. Shah R, Newcomb DC. Sex Bias in Asthma Prevalence and Pathogenesis. Vol. 9, *Frontiers in immunology.* NLM (Medline); 2018. p. 2997.
13. Toskala E, Kennedy DW. Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015 Sep 1;5:S11–6.
14. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: Epidemiology, etiology and risk factors. Vol. 181, *CMAJ.* Canadian Medical Association; 2009.
15. Gans MD, Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes. Vol. 36, *Paediatric Respiratory Reviews.* W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 118–27.
16. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Feb;127(2):355–60.
17. Saglani S, Menzie-Gow AN. Approaches to asthma diagnosis in children and adults. Vol. 7, *Frontiers in Pediatrics.* Frontiers Media S.A.; 2019.
18. Lommatzsch M, Virchow JC. Severe asthma: Definition, diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(50).

19. Danvers L, Lo DKH, Gaillard EA. The role of objective tests to support a diagnosis of asthma in children. Vol. 33, Paediatric Respiratory Reviews. 2020.
20. Brusselle G, Bracke K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11.
21. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: Predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med.* 2013;13(1).
22. King GG, James A, Harkness L, Wark PAB. Pathophysiology of severe asthma: We've only just started. Vol. 23, *Respirology.* Blackwell Publishing; 2018. p. 262–71.
23. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. Vol. 131, *Clinical Science.* 2017.
24. Upham JW, Xi Y. Dendritic Cells in Human Lung Disease: Recent Advances. Vol. 151, *Chest.* 2017.
25. Rael EL, Lockey RF. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. Vol. 4, *World Allergy Organization Journal.* 2011.
26. Wenzel SE. Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes: Type-2 immunity and beyond. Vol. 55, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2016.
27. Seys SF, Lokwani R, Simpson JL, Bullens DMA. New insights in neutrophilic asthma. Vol. 25, *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 2019.
28. Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, Richter A, Buchanan D, Wilson SJ, et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(2).
29. Mortaz E, Alipoor SD, Varahram M, Jamaati H, Garssen J, Mumby SE, et al. Exosomes in severe asthma: Update in their roles and potential in therapy. Vol. 2018, *BioMed Research International.* Hindawi Limited; 2018.
30. Jia CE, Zhang HP, Lv Y, Liang R, Jiang YQ, Powell H, et al. The asthma control test and asthma control questionnaire for assessing asthma control: Systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3).
31. Sattler C, Garcia G, Humbert M. Novel targets of omalizumab in asthma. Vol. 23, *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 2017.
32. Miyatake H, Taki F, Taniguchi H, Suzuki R, Takagi K, Satake T. Erythromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Chest.* 1991;99(3).
33. Hanania NA, Chapman KR, Kesten S. Adverse effects of inhaled corticosteroids. Vol. 98, *The American Journal of Medicine.* 1995.
34. Dunican EM, Fahy J V. Asthma and corticosteroids: time for a more precise approach to treatment. Vol. 49, *The European respiratory journal.* 2017.
35. Doyle L, Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019;8(7).
36. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. Vol. 36, *Cellular and Molecular Neurobiology.* 2016.

37. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Vol. 75, Cellular and Molecular Life Sciences. 2018.
38. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Vol. 4, Journal of Extracellular Vesicles. 2015.
39. Ståhl A, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. Vol. 34, Pediatric Nephrology. 2019.
40. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. Vol. 200, Journal of Cell Biology. 2013.
41. Colombo M, Moita C, Van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. J Cell Sci. 2013;126(24).
42. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. Vol. 7, Theranostics. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 789–804.
43. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Vizio D Di, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. Vol. 3, Journal of Extracellular Vesicles. 2014.
44. Nagano T, Katsurada M, Dokuni R, Hazama D, Kiri T, Umezawa K, et al. Crucial Role of Extracellular Vesicles in Bronchial Asthma. Int J Mol Sci. 2019 May 27;20(10).
45. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. Extracellular vesicles: New players in lung immunity. Vol. 58, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2018.
46. Pastor L, Vera E, Marin JM, Sanz-Rubio D. Extracellular vesicles from airway secretions: New insights in lung diseases. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. 2021.
47. Van Den Berge M, Tasena H. Role of microRNAs and exosomes in asthma. Vol. 25, Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2019.
48. Cañas JA, Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, del Pozo V. Exosomes: A new approach to asthma pathology. Vol. 495, Clinica Chimica Acta. 2019.
49. Rupaimoole R, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK. MicroRNA therapeutics: Principles, expectations, and challenges. Vol. 30, Chinese Journal of Cancer. 2011.
50. Boriachek K, Islam MN, Möller A, Salomon C, Nguyen NT, Hossain MSA, et al. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. Vol. 14, Small. 2018.
51. Sobiecka M, Kus J, Demkow U, Filewska M, Jozwik A, Radwan-Rohrenscheff P, et al. Induced sputum in patients with interstitial lung disease: A non-invasive surrogate for certain parameters in bronchoalveolar lavage fluid. J Physiol Pharmacol. 2008;59(SUPPL. 6).
52. Sánchez-Vidaurre S, Eldh M, Larssen P, Daham K, Martinez-Bravo MJ, Dahlén SE, et al. RNA-containing exosomes in induced sputum of asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol. 2017;140(5).
53. Davies AR, Hancox RJ. Induced sputum in asthma: Diagnostic and therapeutic implications. Vol. 19, Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2013.

54. Guiot J, Demarche S, Henket M, Paulus V, Graff S, Schleich F, et al. Methodology for sputum induction and laboratory processing. *J Vis Exp*. 2017 Dec 17;2017(130).
55. Cullum VA, Farmer JB, Jack D, Levy GP. Salbutamol: a new, selective beta-adrenoceptive receptor stimulant. *Br J Pharmacol*. 1969;35(1).
56. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir Med*. 2003;97(8).
57. Gershman NH, Wong HH, Liu JT, Mahlmeister MJ, Fahy J V. Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 1996;9(12).
58. Weiszhar Z, Horvath I. Induced sputum analysis: Step by step. *Breathe*. 2013;9(4).
59. Ward R, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(2).
60. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006;11(1).
61. Kit para Tinción Rápida en Hematología (Panóptico Rápido) para diagnóstico clínico - ITW Reagents [Internet]. [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/kit-para-tincion-rapida-en-hematologia-panoptico-rapido-para-diagnostico-clinico/254807>
62. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012;(59).
63. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2011 Dec;7(6):780–8.
64. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 2014;5(SEP).
65. Guerra S, Sherrill DL, Bobadilla A, Martinez FD, Barbee RA. The relation of body mass index to asthma, chronic bronchitis, and emphysema. *Chest*. 2002;122(4):1256–63.
66. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992;47(1).
67. Mubarak B, Shakoor H, Masood F. Eosinophilic Asthma. In: *Asthma - Biological Evidences*. IntechOpen; 2019.
68. Akers JC, Ramakrishnan V, Nolan JP, Duggan E, Fu CC, Hochberg FH, et al. Comparative analysis of technologies for quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF). *PLoS One*. 2016;11(2).
69. Serrano-Pertierra E, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Oliva P, Villafani J, Navarro A, et al. Characterization of plasma-derived extracellular vesicles isolated by different methods: A comparison study. *Bioengineering*. 2019;6(1).
70. Tageldin MA, Wagih K, Maher O. Study the pattern of bronchial asthma among outpatients clinic at Sohag and Akhmeem Chest Hospitals. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2015;64(2).

ANEXOS

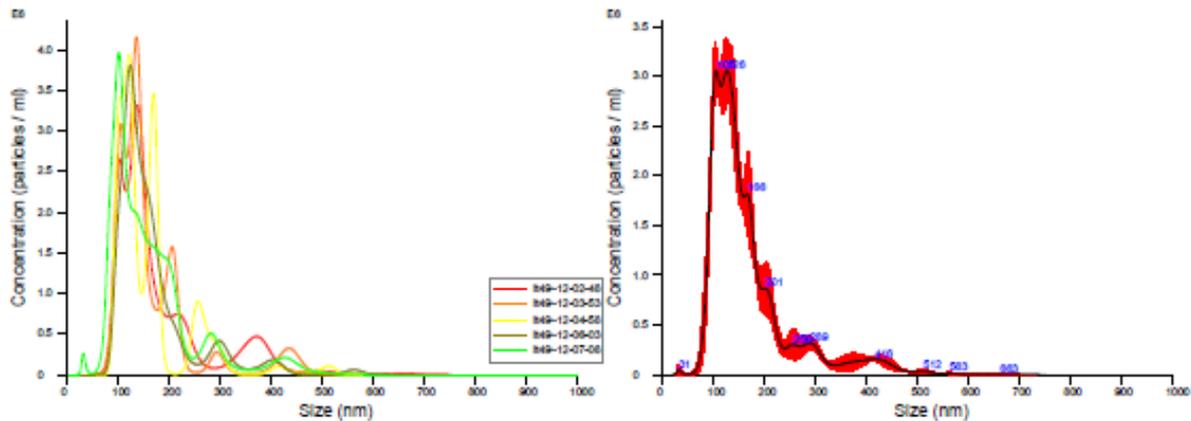
Anexo I: Asthma Control Test (ACT)

1. In the past 4 weeks, how much of the time did your asthma keep you from getting as much done at work, school or at home?	All of the time	1	Most of the time	2	Some of the time	3	A little of the time	4	None of the time	5	SCORE
											<input type="text"/>
2. During the past 4 weeks, how often have you had shortness of breath?	More than once a day	1	Once a day	2	3 to 6 times a week	3	Once or twice a week	4	Not at all	5	<input type="text"/>
3. During the past 4 weeks, how often did your asthma symptoms (wheezing, coughing, shortness of breath, chest tightness or pain) wake you up at night or earlier than usual in the morning?	4 or more nights a week	1	2 or 3 nights a week	2	Once a week	3	Once or twice	4	Not at all	5	<input type="text"/>
4. During the past 4 weeks, how often have you used your rescue inhaler or nebulizer medication (such as albuterol)?	3 or more times per day	1	1 or 2 times per day	2	2 or 3 times per week	3	Once a week or less	4	Not at all	5	<input type="text"/>
5. How would you rate your asthma control during the past 4 weeks?	Not controlled at all	1	Poorly controlled	2	Somewhat controlled	3	Well controlled	4	Completely controlled	5	<input type="text"/>

Figura A-1: Preguntas del Asthma Control Test. Tageldin et al, 2015.(70)

NANOSIGHT

It49 2021-04-09 12-02-04



FTLA Concentration / Size graph for Experiment:
It49 2021-04-09 12-02-04

Averaged FTLA Concentration / Size for Experiment:
It49 2021-04-09 12-02-04
Error bars indicate + / -1 standard error of the mean

Results

Stats: Merged Data

Mean: 166.6 nm
 Mode: 125.7 nm
 SD: 83.3 nm
 D10: 97.9 nm
 D50: 140.4 nm
 D90: 278.8 nm

Stats: Mean +/- Standard Error

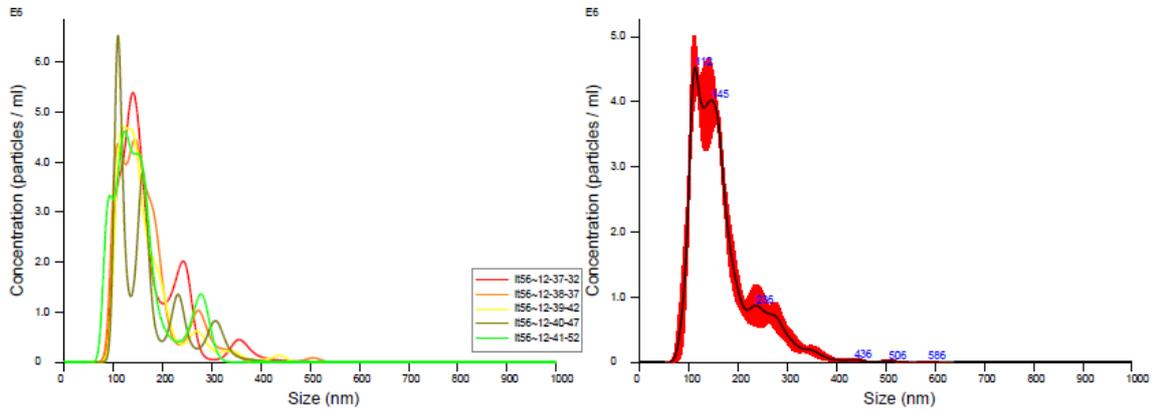
Mean: 166.7 +/- 3.3 nm
 Mode: 123.6 +/- 6.6 nm
 SD: 82.8 +/- 3.2 nm
 D10: 98.6 +/- 2.8 nm
 D50: 139.9 +/- 1.6 nm
 D90: 280.6 +/- 10.7 nm
 Concentration (Upgrade): 3.13e+08 +/- 8.91e+06 particles/ml
 26.2 +/- 1.0 particles/frame
 28.5 +/- 1.9 centres/frame

Concentration measurements may require some caution due to noise
 See summary file for more info

Figura 2-A: Informes obtenido después del análisis de una muestra con NTA. Datos de Moda del tamaño y abundancia de VEs por mL señalados con cuadros rojos

NANOSIGHT

It56 2021-04-09 12-36-29



FTLA Concentration / Size graph for Experiment:
It56 2021-04-09 12-36-29

Averaged FTLA Concentration / Size for Experiment:
It56 2021-04-09 12-36-29
Error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

Results

Stats: Merged Data

Mean:	165.4 nm
Mode:	111.8 nm
SD:	64.0 nm
D10:	104.7 nm
D50:	148.6 nm
D90:	260.5 nm

Stats: Mean +/- Standard Error

Mean:	165.6 +/- 3.2 nm
Mode:	127.2 +/- 6.4 nm
SD:	63.8 +/- 2.0 nm
D10:	104.5 +/- 3.0 nm
D50:	148.8 +/- 2.2 nm
D90:	264.3 +/- 6.0 nm
Concentration (Upgrade):	4.51e+08 +/- 2.42e+07 particles/ml
	26.9 +/- 1.0 particles/frame
	31.5 +/- 1.0 centres/frame

Concentration measurements may require some caution due to noise
See summary file for more info

Figura 3-A: Informes obtenido después del análisis de una muestra con NTA. Datos de Moda del tamaño y abundancia de VEs por mL señalados con cuadros rojos