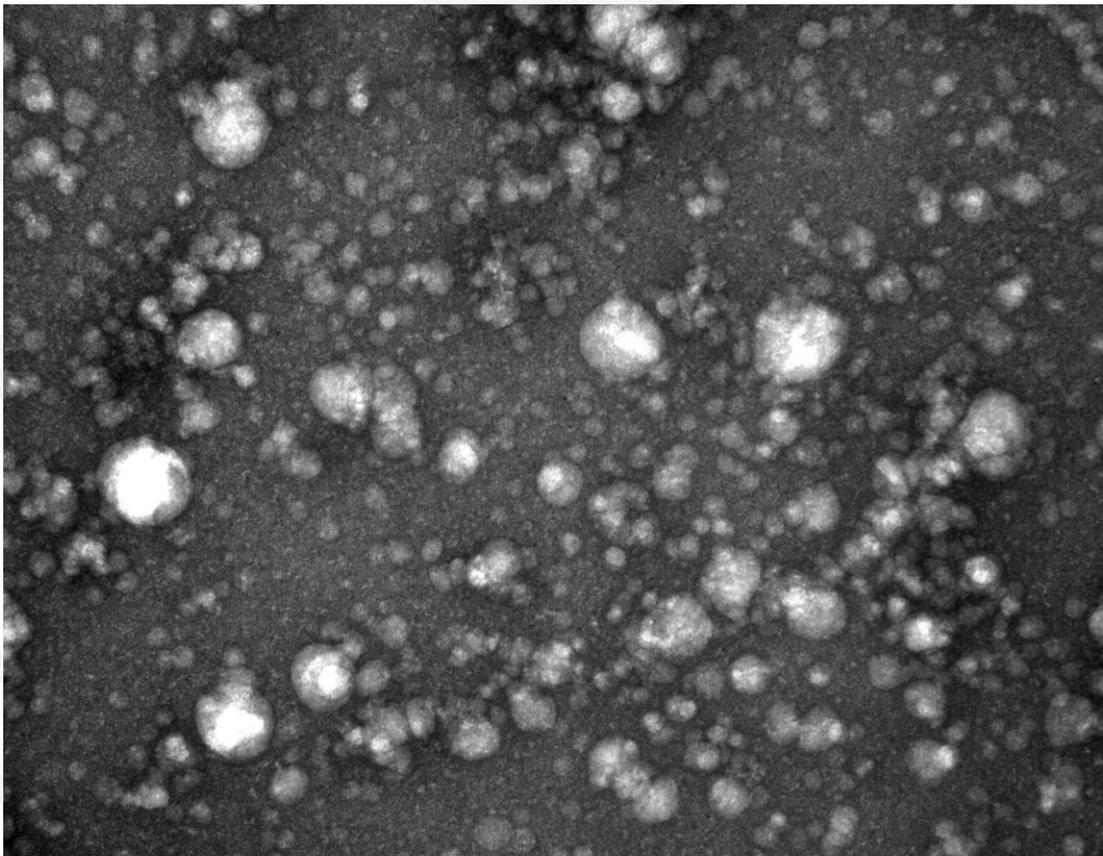


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN
PROTEICA DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES**



LORETO PÉREZ RIESGO

Departamento de Morfología y Biología celular/
Universidad de Oviedo

Julio/2015



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Resumen

Las microvesículas son pequeñas estructuras liberadas por las células al medio extracelular en respuesta a mediadores inflamatorios, activación celular y apoptosis. Estas vesículas son de gran interés debido a su posible papel como biomarcadores en diversas patologías. Estudios previos demuestran que las MVs se encuentran incrementadas en sangre en pacientes con esclerosis múltiple y que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad. Para determinar los posibles mecanismos responsables de dicho efecto es necesario conocer su composición. En base a esto, el objetivo de este trabajo es optimizar un método de aislamiento y realizar la caracterización proteica de las MVs de pacientes con esclerosis múltiple mediante técnicas proteómicas. Se han comparado dos protocolos de aislamiento, la ultracentrifugación y un kit comercial de precipitación de exosomas con el fin de esclarecer cuál resulta más eficaz. Además, se ha llevado a cabo un estudio de la integridad, diámetro y concentración de las vesículas aisladas por ambos métodos mediante microscopía electrónica, DLS y Nanosight. Se ha observado que el kit comercial resulta más eficiente en cuanto al número de vesículas precipitadas por volumen inicial de muestra que el método de ultracentrifugación. El uso de este método implica una precipitación ácida de proteínas previa a la electroforesis, no descrita en el protocolo comercial. Además el proceso de digestión de la proteinasa K resulta insuficiente para eliminar la contaminación de proteínas solubles, a pesar de haber incrementado su tiempo de incubación. En conclusión, para llevar a cabo un estudio proteómico, el método de aislamiento más efectivo en cuanto a pureza de la muestra, sería una ultracentrifugación. Dado que el kit comercial es más eficiente en cuanto a número de vesículas aisladas sería conveniente combinar este método con métodos adicionales de purificación con el fin de obtener una muestra óptima para el estudio proteómico.

Abstract

Microvesicles (MVs) are small structures released into the extracellular medium by the cells in response to inflammatory mediators, cell activation and apoptosis. These vesicles are so interesting due to their potential role as biomarkers in different pathologies. Previous studies show that MVs are increased in blood in patients with multiple sclerosis (MS) and may contribute to the progression of the disease. To determine the possible mechanisms responsible for this effect is necessary to characterize its composition. Based on this, the objective of this study is to optimize a method of MVs isolation from MS patients to determine their protein composition using proteomic techniques. We compared two isolation protocols, ultracentrifugation and a commercial kit of exosomes precipitation in order to clarify which is the most effective. In addition, a study of integrity, diameter and concentration of vesicles isolated by both methods was carried out using electron microscopy, DLS and NanoSight. It has been observed that the commercial kit is more efficient than the ultracentrifugation method, in terms of the number of vesicles precipitated by initial sample volume. This method implies an acidic protein precipitation, prior to electrophoresis, which is not described in the commercial protocol. Furthermore the process of proteinase K digestion is insufficient to remove contaminating soluble proteins, despite their increased incubation time. In conclusion, to perform a proteomic study, the most effective isolating method to get the highest purity of the sample would be ultracentrifugation. Since commercial kit is more efficient in terms of the number of isolated vesicles, this method should be combined with additional purification methods in order to obtain an optimal sample for the proteomic study.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. MICROVESÍCULAS COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD Y SU PAPEL EN LA PROGRESIÓN DE LAS MISMAS.....	1
1.2. ¿QUÉ ES LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE?	3
1.3. ANTECEDENTES: MICROVESÍCULAS EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	4
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. MATERIALES.....	6
3.2. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	6
3.3. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS	6
3.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO Y CONCENTRACIÓN DE LAS MVs	7
3.5. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA).....	7
3.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA.....	7
3.7. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	7
3.8. WESTERN BLOT	8
3.9. DIGESTIÓN TRÍPTICA EN GEL Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	8
4. RESULTADOS	9
4.1. PURIFICACIÓN DE EXOSOMAS DE PLASMA HUMANO	9
4.2. CARACTERIZACIÓN DE DIÁMETRO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS VESÍCULAS	11
4.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA	15
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	21
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMOS DE FORMACIÓN Y LIBERACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE MVs DE MEMBRANA.....	2
FIGURA 2. COMPARACIÓN DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12%.....	10
FIGURA 3. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE MVs AISLADAS MEDIANTE EL KIT COMERCIAL: EFECTO DE LA DIGESTIÓN CON PROTEINASA K.....	11
FIGURA 4. IMÁGENES DE MVs OBSERVADAS A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) ..	12
FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR DLS.	13
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR NANOSIGHT.....	14
FIGURA 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA PARA LA DIGESTIÓN DEL GEL	16
FIGURA 8. WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN MVs.....	17

1. Introducción

1.1. Microvesículas como biomarcadores de enfermedad y su papel en la progresión de las mismas

Las microvesículas (MVs) son pequeñas estructuras de entre 0,1 y 1,5 μm de diámetro conformadas por una bicapa lipídica y liberadas al medio extracelular por diferentes tipos celulares. Las MVs pueden ser detectadas en diferentes fluidos biológicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, saliva, líquido sinovial, etc), siendo las MVs más abundantes en plasma las que provienen de las plaquetas (64%) y de las células endoteliales (17%), seguidas de los granulocitos y eritrocitos (12% y 7% respectivamente) [1].

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la composición de las MVs [2,3,4]. Estos estudios revelaron la presencia de fosfolípidos, como fosfatidilcolina, esfingomiélin y fosfatidiletanolamida en la membrana de estas MV. En su superficie además presentan proteínas de la membrana celular de la célula parental, lo que permite su identificación. Están presentes moléculas de adhesión celular como selectinas e integrinas y moléculas de la respuesta inmune como HLA y receptores de citoquinas entre otras. Además, las MVs portan en su interior ARN mensajero (mARN), microARN (miARN) y proteínas citoplasmáticas [2].

La clasificación de las MVs se basa en la determinación del tamaño de las mismas, la velocidad a la que sedimentan, su biogénesis (figura 1) y su composición proteica. They y colaboradores [5] establecieron la siguiente clasificación según el tamaño y proceso de formación:

- Los exosomas, son aquellos derivados de endosomas multivesiculares o cuerpos multivesiculares (MVE) que tras la fusión de su membrana con la membrana celular (exocitosis) se liberan al compartimento extracelular. Su principal característica es su pequeño tamaño. Su diámetro varía de 50 a 100 nm, [6] y pueden ser aislados mediante ultracentrifugación a 100000g.
- Las vesículas mayores de 100nm de tamaño, secretadas tras su formación a partir de las membranas plasmáticas se han denominado de diversas maneras: microvesículas, micropartículas, exovesículas o ectosomas. Sedimentan por centrifugación a 10000g y característicamente se unen a la anexina V (AnxV).
- Los cuerpos apoptóticos, mayores de 1,5 μm , son formados en la etapa tardía de la apoptosis celular a partir de la fragmentación de la membrana plasmática. Pueden aislarse mediante centrifugación a 1200g, 10000g o 100000g, debido a su heterogeneidad en morfología y tamaño.

Sin embargo, la tendencia actual es denominar al conjunto de vesículas (tanto exosomas como micropartículas) como “microvesículas extracelulares”, nombre que utilizaremos para referirnos a ellas a lo largo del presente trabajo.

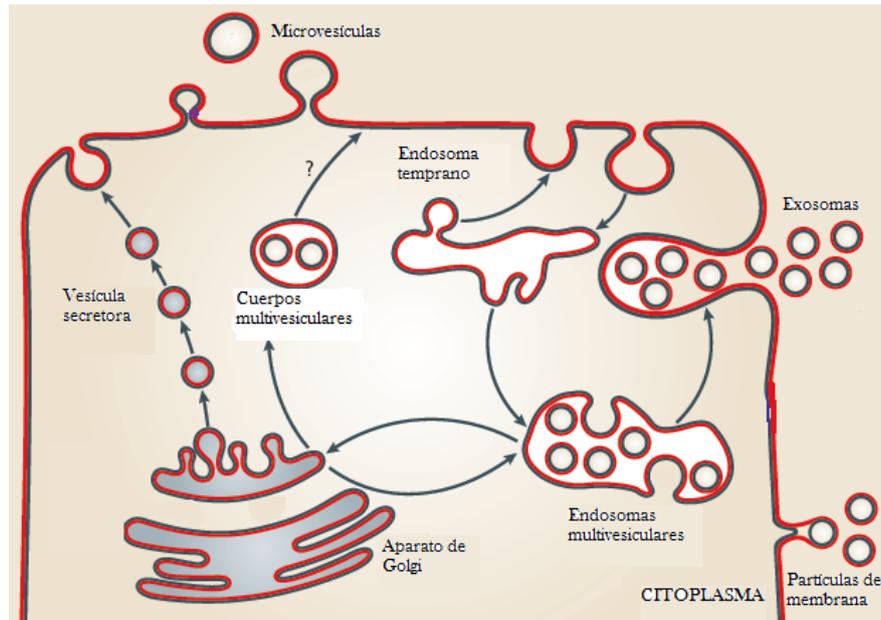


Figura 1. Mecanismos de formación y liberación de los distintos tipos de MVs de membrana. Fuente: Modificado de Thery et al [5]

Entre otras funciones, las MVs están implicadas en la activación, inhibición y diferenciación celular, la inducción de la apoptosis, la diferenciación de monocitos, la presentación antigénica a las células T, y la estimulación de la actividad reguladora de células CD4⁺ [2]. Estas y otras propiedades hacen que las MVs se hayan propuesto como buenos indicadores del estado de inflamación y como biomarcadores de diversas enfermedades [7]. Además se ha visto que las MVs juegan un papel muy importante en la comunicación intercelular [7,8], siendo los siguientes mecanismos los más estudiados [9]:

- De manera yuxtacrina, mediante la acción directa de proteínas de membrana de las MVs sobre receptores de la célula diana desencadenado en ésta vías de señalización activadas por dichos receptores.
- La MVs pueden fusionarse con la membrana de la célula diana. Con este mecanismo, los componentes de la membrana de la MV son transferidos a la membrana de la célula diana, y el contenido de la microvesícula, entre los que se encuentran proteínas, ARN mensajero y microARN es vertido al interior de la célula diana.
- Las proteínas de membrana de las MVs pueden ser cortadas por proteasas. Los fragmentos resultantes pueden actuar como ligandos para receptores de la superficie de la célula diana.
- Por último, las MVs pueden ser internalizadas mediante un proceso de fagocitosis.

Esta característica apoya el posible interés de las MVs no sólo como biomarcadores de distintas patologías, sino por su posible implicación en la progresión de las mismas.

De hecho en los últimos años se han publicado múltiples evidencias acerca de la participación de dichas MVs en procesos patogénicos. Éstos incluyen; enfermedades cardiacas o patologías vasculares como la cardiopatía isquémica [10], la trombosis [11], o el ictus, factores de riesgo cardiovascular como la diabetes mellitus [12] o la hipertensión arterial, enfermedades infecciosas como el VIH [13], enfermedades hematológicas, hipertensión pulmonar, pre-eclampsia durante el embarazo, enfermedades con un componente inmune como artritis reumatoide [14], lupus eritematoso [14], el síndrome de Sjögren o la Esclerosis Múltiple, y en el cáncer [15] entre otras. Todo ello nos permite reforzar la idea de la importancia de las MV en la comunicación intercelular, lo que nos ayuda a comprender mejor las enfermedades en las que están presentes, establecer marcadores diagnósticos o pronósticos, tener un seguimiento de la enfermedad y encontrar posibles dianas terapéuticas.

Este trabajo en particular se centra en la caracterización de las MVs circulantes en sangre de pacientes que sufren esclerosis múltiple.

1.2. ¿Qué es la Esclerosis Múltiple?

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central consistente en la aparición de lesiones desmielinizantes, neurodegenerativas y crónicas. De forma típica, la EM suele debutar en adultos jóvenes, preferentemente mujeres, de entre 20 y 40 años de edad, causando secuelas que generan un gran impacto en el individuo y en la sociedad constituyendo la segunda causa de discapacidad de origen neurológico. Los estudios epidemiológicos realizados en España nos sitúan como una región de prevalencia media, siendo los afectados en torno a 41-79 pacientes de cada 100.000 habitantes [16].

Esta enfermedad suele presentar un curso en brotes (exacerbación de los síntomas neurológicos), forma conocida como remitente-recidivante (EMRR). Muchos de estos pacientes, durante el curso de su enfermedad, presentarán un perfil evolutivo, con un aumento progresivo de la discapacidad (forma secundaria progresiva) y aproximadamente un 15% de los pacientes presentarán una acumulación progresiva de la discapacidad desde el inicio (forma primaria progresiva).

Se desconocen las causas que la producen aunque se sabe a ciencia cierta que hay diversos mecanismos autoinmunes involucrados y se acepta que en el desarrollo de la enfermedad participan factores ambientales, genéticos y epigenéticos. Hoy en día se acepta que se debe a un proceso inflamatorio mediado por células del sistema inmunológico [17]. Los linfocitos T autorreactivos, atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y actúan contra antígenos de la mielina, causando la desmielinización del axón. Esto causa una neurodegeneración que provoca la aparición de los síntomas clínicos, que en estados avanzados deja en segundo término la inflamación.

Se ha propuesto que agentes infecciosos o patógenos puedan ser factores de riesgo para desarrollar una EM, como pueden ser una infección previa por el virus de Epstein Barr (VEB) [18], la *Chlamydia pneumoniae* [19], el herpes virus humano tipo 6 (VHH-6) y el retrovirus endógeno humano (HERV) [20]. Como factores ambientales involucrados con la EM se han identificado: la exposición a la luz solar, el metabolismo de la vitamina D y el hábito tabáquico [21]. En cuanto a los factores genéticos, los casos de agregados familiares y los estudios epidemiológicos en gemelos monocigotos y en pacientes próximos demuestran claramente un componente hereditario en la EM, sin un patrón de herencia claro. Estudios de GWAS (genome-wide association Study) en pacientes de EM y en controles, han permitido encontrar SNPs (*single nucleotide polymorphism*) que parecen indicar la presencia de más de 20 genes relacionados con la enfermedad [22].

1.3. Antecedentes: Microvesículas en la esclerosis múltiple

En los últimos años diferentes grupos han explorado el papel de las MVs en la EM. Minagar y colaboradores [23] describieron por primera vez un incremento de las MVs de origen endotelial en la EMRR. Posteriormente Sheremata y colaboradores [24] han demostrado una reducción de dichas MVs en respuesta al tratamiento con interferón beta. Además estudios in vitro con vesículas aisladas de células endoteliales evidenciaron su efecto favoreciendo la migración de monocitos [25]. Más recientemente se ha descrito que MVs aisladas de pacientes con EM promueven un incremento de la permeabilidad de la barrera endotelial en comparación con las aisladas de individuos sanos, lo que sugiere un posible papel activo de estas vesículas en la progresión de la EM [26].

La caracterización de la composición proteica de las MVs puede aportar información sobre el papel que desempeñan en el proceso autoinmune e inflamatorio y por tanto abrir nuevas vías de estudio poder comprender los mecanismos involucrados en la progresión de la enfermedad.

2. **Objetivos**

El objetivo general de este trabajo es optimizar un protocolo de aislamiento de MVs para la posterior caracterización de su composición proteica.

Para ello el presente trabajo plantea los siguientes objetivos:

1. Comparar las características de tamaño y pureza de las MVs obtenidas mediante el aislamiento con el kit comercial “total exosome isolation reagent” de Invitrogen y la técnica de ultracentrifugación.
2. Explorar la posibilidad de mejorar el protocolo de aislamiento de microvesículas mediante el kit comercial
3. Realizar posteriormente la caracterización de la composición proteica de dichas microvesículas mediante técnicas proteómicas.

3. Material y métodos

3.1. Materiales

Los anticuerpos policlonales de conejo anti caveolina-1 (IgG1), anti-integrina-alfa4 (IgG1) y anti-CD63 (IgG1) y los anticuerpos monoclonales de ratón anti-ICAM-1 (IgG1), anti-actina (IgG1) y anti-Rac (IgG1) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-Anexina-2 de fue adquirido a BD y los anticuerpos secundarios generados en cabra conjugados con HRP y dirigidos contra ratón y conejo se obtuvieron de Dako. La membrana de PVDF y las películas Hyperfilm™ fueron adquiridas a GE Healthcare Limited (Japón). El kit de aislamiento de exosomas “Total exosome isolation reagent” fue de Invitrogen (Life Technologies). La tripsina fue proporcionada por Promega. El DTT, procede de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), La acrilamida, los marcadores de peso molecular para electroforesis en SDS-PAGE y productos químicos generales fueron adquiridos a Fisher Scientific.

3.2. Recogida y procesamiento de las muestras

La sangre venosa se recogió en tubos Vacutainer de citrato sódico con una aguja de 21G. Las muestras de plasma de pacientes y controles se centrifugaron a 1550g, 30 minutos a temperatura ambiente, en los primeros 30 min post-extracción. Posteriormente se realizó una centrifugación del sobrenadante obtenido a 3200g durante 30 min para eliminar restos celulares y plaquetas (PFP). El PFP fue alicuotado y conservado a -80 ° C hasta su uso.

3.3. Aislamiento de exosomas

Alícuotas de PFP se centrifugaron a 10.000g durante 20 min para proceder al aislamiento de los exosomas por dos técnicas: ultra-centrifugación y aglutinación y precipitación a baja velocidad. En el caso de la ultracentrifugación, se centrifuga la muestra diluida en PBS a 100.000 g y a 4°C durante 2 hr en una ultracentrífuga (Optima™ L-90K). Se descarta el sobrenadante obtenido, el sedimento se resuspende en PBS y se realiza una segunda centrifugación con los mismos parámetros para minimizar la contaminación de proteínas solubles. Los exosomas son resuspendidos en PBS y congelados a -80°C hasta su análisis.

En el caso del aislamiento por centrifugación a baja velocidad se empleó el kit comercial “total exosome isolation reagent” (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para minimizar la contaminación de proteínas solubles se probaron diferentes condiciones de digestión con proteinasa K (10 y 20 min a 37°C y 10 min a 50°C) o preincubación con proteína A/G sefarosa durante 2h a 4°C para retener las inmunoglobulinas presentes en la muestra. Finalmente el precipitado de exosomas fue resuspendido en PBS.

3.4. Determinación del tamaño y concentración de las MVs

Microscopía Electrónica de Transmisión

Para llevar a cabo la preparación de la muestra se colocó una rejilla de cobre con película de carbono, sobre la una gota de suspensión de exosomas durante 1 minuto. A continuación se realizaron 3 lavados consecutivos con agua destilada (miliQ) y el secado de la rejilla en papel de filtro. La muestra contrastada con tinción negativa en acetato de uranilo al 2% durante 1 minuto a temperatura ambiente y secada en estufa sin posteriores lavados. Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011 EX operando a 80Kv. Las imágenes obtenidas con la cámara del microscopio fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS4.0.

Análisis mediante Dynamic Light Scattering (DLS)

Se obtuvo una estimación del diámetro de las vesículas presentes en la muestras mediante medida de la dispersión dinámica de luz (DLS) en muestras diluidas en PBS en una Zetasizer (Malvern).

Cuantificación de exosomas y determinación de diámetro mediante Nanosight LM10

Las muestras a caracterizar mediante análisis de seguimiento de nano partículas (Nanoparticle tracking analysis, NTA), fueron diluidas en HEPES a una dilución 1:1000 y medidas con el instrumento NanoSight LM10 (Malvern) con el fin de obtener la distribución del tamaño y la medición de la concentración de partículas en suspensión líquida.

3.5. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Para observar definidas las bandas de proteínas en la electroforesis se realizó una precipitación de proteínas con ácido tricloroacético. Tras una incubación de la muestra con TCA durante 30 min a 4°C, se centrifuga a la misma temperatura a 15000g durante 15 min. El sedimento obtenido se lava en acetona fría y se centrifuga de nuevo durante 5 min. El precipitado de proteína se redisuelve finalmente en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS) para su análisis posterior.

3.6. Determinación de la concentración de proteínas por BCA

La cuantificación de proteína total se realiza mediante el ensayo BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce™), siguiendo las instrucciones del proveedor (Thermo Scientific).

3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras se diluyeron en PBS o tampón de lisis y se hirvieron durante 5 minutos a 95°C en presencia de un agente reductor, tampón Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoetanol, 0.002% bromofenol, concentración final). Las proteínas se

separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), del 10% o 12% según la finalidad. Los geles fueron fijados y teñidos con azul Coomassie (Blue Safe, BioRad).

3.8. Western Blot

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, en un sistema de transferencia húmeda. Las membranas se bloquearon con una solución de leche en polvo al 5% en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl), 0,05% Tween 20 (T-TBS) durante 1 hora. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de interés 16 hr a 4°C seguido de secundarios 1hr a temperatura ambiente. Las proteínas de interés fueron visualizadas mediante una reacción de quimioluminiscencia con el kit de detección ECL (Amersham).

3.9. Digestión triptica en gel y espectrometría de masas

Los exosomas obtenidos por las distintas técnicas fueron separados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Los geles fueron fijados y teñidos con azul Coomassie (Blue Safe BioRad) compatibles con la espectrometría de masas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las calles fueron cortadas en 11 bandas, lavadas en 50% acetonitrilo durante 5 min tres veces y una vez con 100% acetonitrilo para su deshidratación. Las bandas fueron secadas por centrifugación en vacío (Speed Vac). Los puentes disulfuro de las proteínas se redujeron por incubación con 10mM DTT a 50°C durante 45min, fueron modificadas por alquilación con 50mM iodoacetamida (IAM) 1hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras realizar lavados con 50% acetonitrilo y secar las bandas por centrifugación en vacío fueron sometidas a digestión con tripsina (Promega).

Los péptidos eluidos se analizaron mediante nano LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Q-Trap (Applied Biosystems) acoplado a un nano-HPLC (nanoLC Ultimate, LC Packing, Dionex). Los péptidos identificados fueron analizados con el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science Ltd. V2.4.01) bajo la taxonomía Homo sapiens, seleccionando tripsina como enzima para la digestión. La tolerancia de masa de fragmento fue fijada a $\pm 0,3$ u.m.a (unidad de masa atómica). Se consideraron los péptidos con una puntuación tal que el grado de identidad u homología resulta significativo ($p > 0,05$).

4. **Resultados**

4.1. **Purificación de exosomas de plasma humano**

El aislamiento de los exosomas de fluidos biológicos presenta gran dificultad técnica pues la fracción de exosomas puede incluir otras vesículas membranosas como pueden ser vesículas procedentes de membrana plasmática o cuerpos apoptóticos e incluso proteínas solubles. Por este motivo, y especialmente aquellos que se quieran emplear en estudios proteómicos y ensayos funcionales requieren una rigurosa purificación.

En el presente trabajo los exosomas fueron aislados a partir de muestras de plasma de controles sanos y pacientes con EM por dos técnicas diferentes: ultracentrifugación a 100000g, 2 hr o aglutinación y subsiguiente precipitación a baja velocidad (10000g) mediante el kit comercial “total exosome isolation reagent” (Invitrogen).

Análisis inicial mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con Coomassie

En primer lugar nos propusimos determinar cuál de los dos procedimientos es el óptimo para estudiar la composición proteica de las vesículas. El aislamiento por aglutinación incluye un paso de digestión de proteínas solubles con proteinasa K, que podría suponer a priori una ventaja frente al método de ultracentrifugación.

Se procedió al aislamiento de vesículas por ambos métodos. Las vesículas aisladas fueron lisadas en tampón de lisis y la concentración de proteína determinada por BCA. Diez microgramos de cada muestra: PFP, sobrenadante del aislamiento del Kit, y lisado de proteínas de exosomas fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con Coomassie, observándose un cambio en la movilidad electroforética de las proteínas tras el empleo del reactivo del kit que impedía su correcta visualización (no mostrado). Por ello se decidió incorporar un paso de precipitación ácida de proteínas con ácido tricloroacético. De modo paralelo se analizó el perfil de proteínas presente en 10 µg de lisado de exosomas obtenidos mediante ultracentrifugación de la misma muestra (figura 2).

Como se observa en la figura en el caso de vesículas aisladas por aglutinación las bandas mayoritarias a 25, 50 y 75 KDa (posiblemente inmunoglobulinas y albúmina) son más abundantes que en la muestra obtenida por ultracentrifugación, lo que sugiere que el paso de digestión con proteinasa K es insuficiente para la eliminación de proteínas solubles en esta preparación.

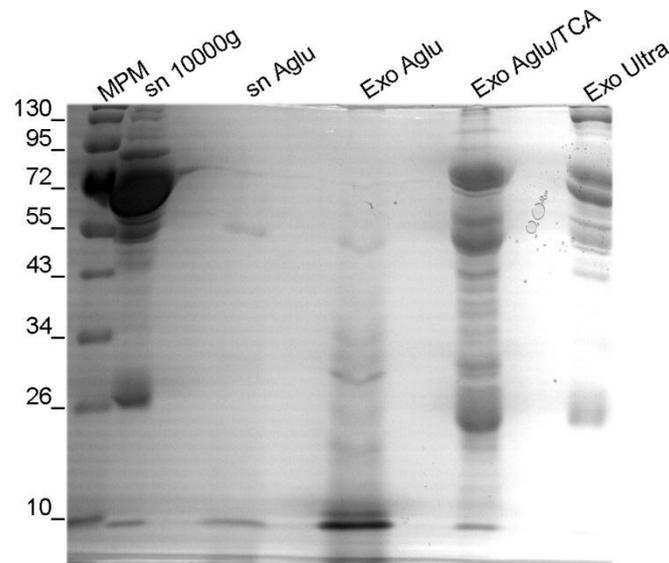


Figura 2. Comparación de patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida al 12%. Diez μg de proteína de MVs aisladas en las condiciones indicadas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12% y las proteínas visualizadas por tinción con Coomassie (sn 10000g: sobrenadante obtenido tras centrifugación inicial a 10000g; sn Aglu: sobrenadante final del kit comercial; Exo Aglu: lisado de exosomas aislados por aglutinación; Exo Aglu/TCA: lisado de exosomas aislados por aglutinación con posterior precipitación con TCA; Exo Ultra: lisado de exosomas aislados por ultracentrifugación. Los marcadores de peso molecular en kDa se muestran a la izquierda de la figura.

Dado que el objetivo final de este trabajo es la optimización del protocolo de aislamiento para el análisis proteómico de los exosomas decidimos probar dos aproximaciones: intentar mejorar la eficiencia de la digestión con proteinasa K y eliminar las inmunoglobulinas mediante preincubación con proteína A/G sefarosa.

El protocolo de la casa comercial propone una digestión con proteinasa K durante 10 minutos a 37°C. Optamos por comparar dicha condición con una digestión a la misma temperatura pero durante 20 min, así como elevando la temperatura a 50°C, condición habitual cuando se persigue la digestión total de proteínas en una muestra (figura 3). La digestión a 50°C durante 10 min resultó en un importante descenso del contenido de proteína total de la muestra, determinado por BCA pero sin diferencias en el patrón de bandas en comparación con la condición de 37°C 10 min. En cambio el incremento del tiempo de digestión conllevó un incremento en la intensidad relativa de las bandas de alto peso molecular respecto a las bandas de 25, 50 y 75KDa. Dado que perseguimos principalmente la digestión, al menos parcial, de las proteínas de estas bandas, asumiendo que son las correspondientes a las proteínas solubles mayoritarias (cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas y albúmina), esta condición supondría una mejoría respecto al protocolo original. No podemos descartar que parte de esta señal se corresponda a estas proteínas unidas a la superficie de las vesículas y que, por tanto, no sea posible lograr su eliminación de la muestras de MVs.

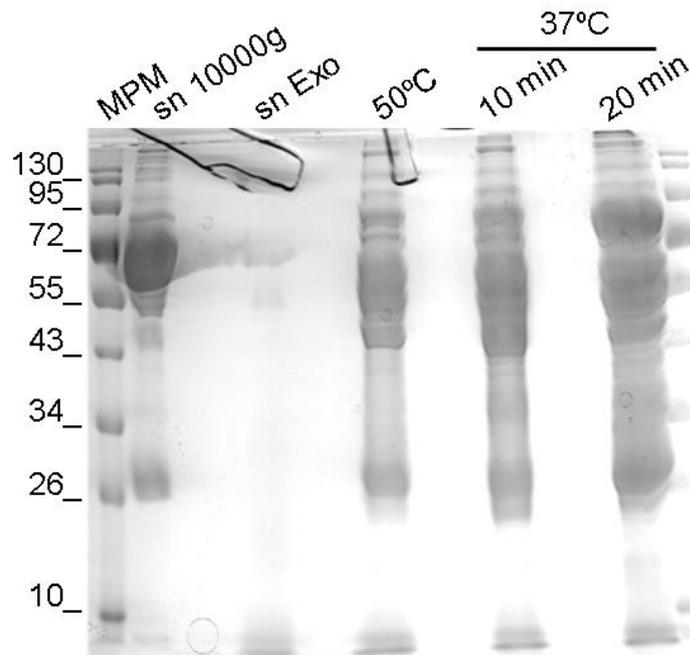


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de MVs aisladas mediante el kit comercial: efecto de la digestión con proteinasa K. Diez μ g de proteína de sobrenadante obtenido tras centrifugación inicial a 10000g (sn 10000g), sobrenadante final del kit comercial (sn Exo) así como lisado de exosomas obtenidos a tres condiciones de incubación de la proteinasa K; (50°C, 10 min), (37°C, 10 min) y (37°C, 20 min) fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y las proteínas visualizadas por tinción con Coomassie. Las posiciones de las masas moleculares estándar (MPM) en kDa se muestran a la izquierda de la figura.

En cuanto a la preincubación con proteína A/G sefarosa para retener las inmunoglobulinas presentes en la muestra no se observaron diferencias significativas en el patrón de proteínas en las condiciones testadas (no mostrado).

En base a estos resultados decidimos continuar nuestro estudio comparando la condición de ultracentrifugación con el aislamiento con el kit comercial modificando la digestión (37°C, 20 min) y sin pre-aclarado con proteína A/G sefarosa.

4.2. Caracterización de diámetro y determinación de la concentración de las vesículas

Dado que hemos variado las condiciones de digestión de las muestras decidimos comprobar la integridad de los exosomas aislados así como medir su concentración para poder determinar la eficiencia de los métodos de aislamiento empleados. El estudio de la integridad, concentración y diámetro se llevó a cabo mediante microscopía electrónica, DLS y Nanosight.

1. Microscopía Electrónica de Transmisión

Los exosomas aislados mediante ultracentrifugación (ULTRA) o aglutinación (AGL) fueron procesados según se ha descrito en el apartado de métodos y las imágenes fueron adquiridas de

un microscopio electrónico de Transmisión. Como se observa en la figura 4, las vesículas son de un tamaño aproximado de 50-100 nm con vesículas más heterogéneas y de un tamaño mayor en el caso del aislamiento por ultracentrifugación.

Cabe destacar que partiendo de volúmenes iguales de plasma de controles sanos (Ct) y pacientes (MS) y con un protocolo similar se observa una concentración mayor de vesículas en el caso de las muestras obtenidas en pacientes. Además, cuando las vesículas son aisladas por aglutinación se observa un fondo más limpio indicando posiblemente una menor contaminación de proteínas solubles en la muestra.

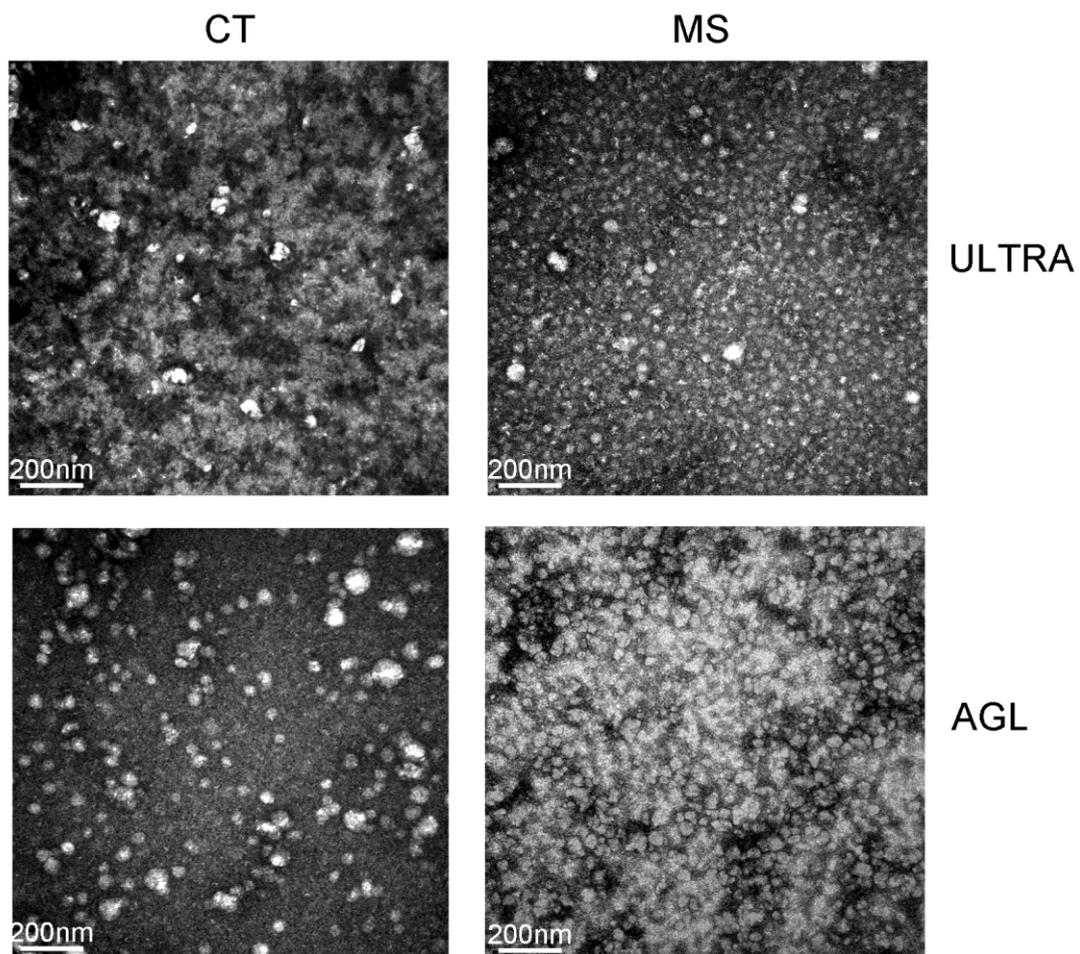


Figura 4. *Imágenes de MVs observadas a microscopía electrónica de transmisión (MET). MVs de pacientes con esclerosis múltiple (MS) y controles sanos (CT) observados a MET tras su aislamiento mediante ultracentrifugación (ULTRA) y aglutinación (AGL).*

Basándonos en las imágenes obtenidas concluimos que las vesículas aisladas mediante aglutinación son más homogéneas.

2. Dynamic Light Scattering (DLS)

El DLS proporciona información acerca de la distribución de tamaños de las vesículas calculando el índice de dispersión (PDI) y el diámetro medio de las mismas. No aporta

información acerca de la concentración pero sí indica el pico mayoritario de la muestra, lo que proporciona una aproximación de la población más abundante de MVs. También podemos obtener una idea de la calidad de la medida. Las muestras fueron diluidas en PBS y los resultados obtenidos se recogen en la tabla 1:

Método de aislamiento	Parámetro	Control	Paciente
Ultracentrifugación	Diámetro (Promedio)	368,6 nm	711,5 nm
	Índice de dispersión	0,373	0,476
Aglutinación	Diámetro (Promedio)	63,11nm	51,08nm
	Índice de dispersión	0,242	0,228

Tabla 1: Resultados del análisis de MVs mediante DLS

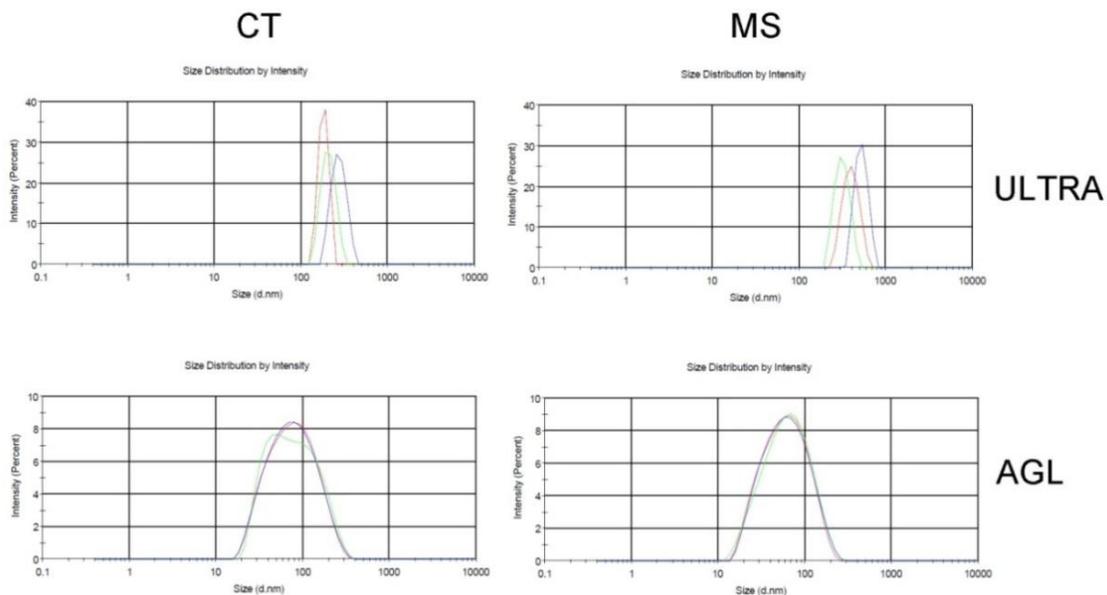


Figura 5. Distribución de tamaños por DLS. Caracterización por DLS de la distribución de tamaño y diámetro medio de exosomas de controles sanos (CT) y pacientes con EM (MS) aislados por ultracentrifugación (ULTRA) y aglutinación (AGL).

Como se muestra en la tabla 1 y la figura 5, en el caso de las muestras aisladas por aglutinación la muestra del paciente (MS) presentaba una dispersión de 0,228 y un diámetro medio de 51,08nm mientras que la muestra del control sano (Ct) mostraba una dispersión de 0,242 y unos exosomas de 63,11 nm de diámetro medio. En las muestras aisladas por ultracentrifugación el paciente presentaba un diámetro medio de 711,5 nm, casi el doble que el control sano, 368,6nm. La dispersión de la muestra fue de 0,476 en el caso del paciente y de 0,373 en el caso del control, ambas elevadas y consideradas indicativas de una muestra heterogénea y por tanto de

baja calidad. Estos datos concuerdan con las observaciones en la caracterización por MET, que mostraban una población heterogénea de vesículas en el caso de las aisladas mediante ultracentrifugación.

3. Nanosight LM10

El Nanosight LM10 de Malvern utiliza la tecnología de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) con el fin de obtener una distribución de tamaño y una medición de la concentración de partículas en suspensión líquida.

Se realizó una dilución 1:1000 en HEPES de las muestras de exomas aislados por ultracentrifugación y aglutinación y se sometieron a análisis por dicho equipo (figura 6).

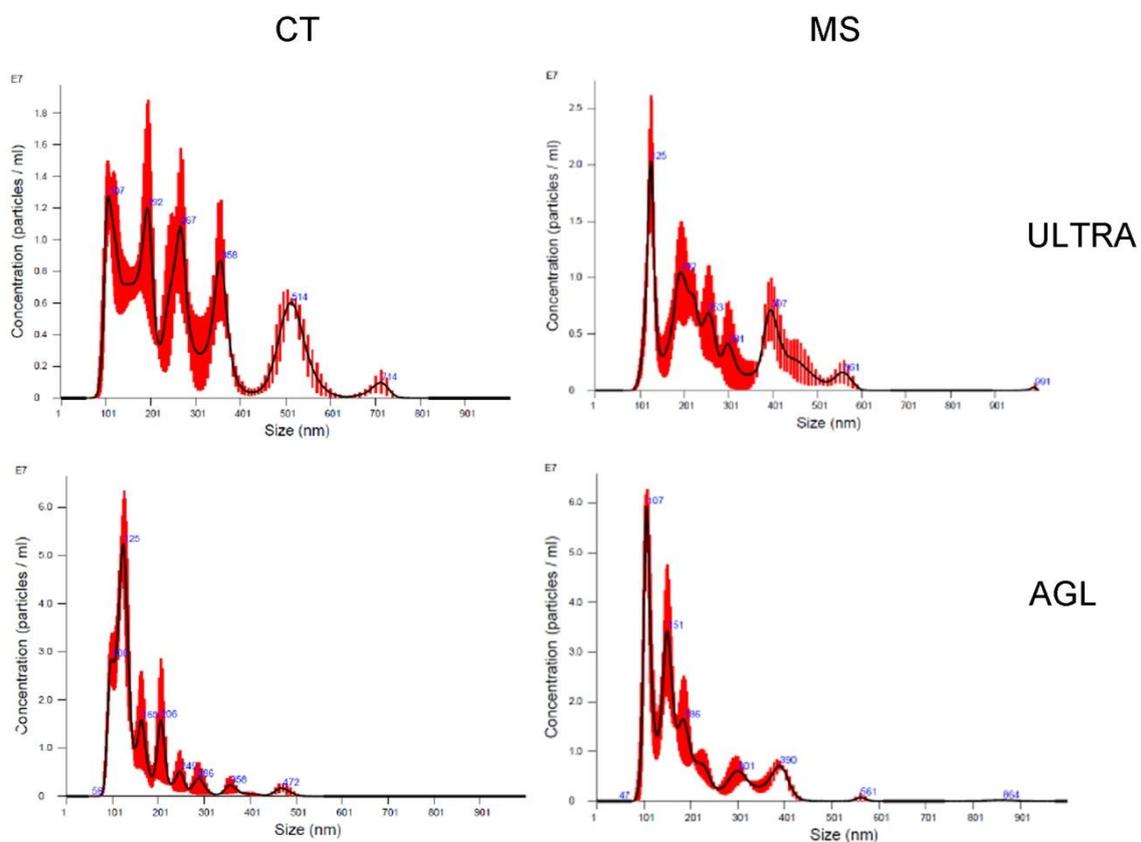


Figura 6. Distribución de tamaños por Nanosight. Caracterización mediante Nanosight LM10 de la distribución de tamaño y diámetro medio de exomas determinados por ultracentrifugación (ULTRA), y aglutinación (AGL), en las muestras de controles sanos (CT) y pacientes de EM (MS).

Mediante esta técnica de nuevo se observa una población con diámetros menores en el caso de las vesículas aisladas mediante aglutinación frente a las obtenidas por ultracentrifugación. Además se obtuvieron concentraciones mayores para las muestras aisladas mediante el kit comercial en comparación con el método de ultracentrifugación (Ct: $6.45 \times 10^{12} \pm 5.87 \times 10^7$ vs. $6.98 \times 10^{11} \pm 5.92 \times 10^7$ partículas/ml; MS: $6.70 \times 10^{12} \pm 3.06 \times 10^7$ vs. $5.76 \times 10^{11} \pm 3.59 \times 10^7$

partículas/ml). Además la dilución de las muestras en H₂O permitió observar que si bien la concentración no variaba de manera significativa ($6.45 \times 10^{12} \pm 5.87 \times 10^7$ en HEPES vs. $5.20 \times 10^{12} \pm 3.38 \times 10^7$ partículas/ml en H₂O) el diámetro aumentaba en el caso de las muestras diluidas en agua, probablemente por fenómenos de ósmosis (figura suplementaria 1, Anexo).

Por tanto podemos concluir que el método de aglutinación permite el aislamiento más eficiente de vesículas que son además de un tamaño más homogéneo, frente al método de ultracentrifugación, no pudiendo descartar que esta diferencia responda a fenómenos de fusión de vesículas durante el proceso de centrifugación a alta velocidad. Además estas vesículas no son completamente inertes y varían su volumen en presencia de medios hipotónicos, aunque dichas condiciones no parecen afectar a la posible fusión de vesículas, ya comentada.

4.3. Análisis de la composición proteica

Además de una morfología característica, se piensa que los exosomas tienen algo único en su composición proteica y lipídica que les proporciona rasgos adicionales para su identificación [26].

La descripción del proteoma nos permite adquirir una imagen de todas las proteínas expresadas en un momento dado en diversas condiciones fisiológicas o patológicas, constituyendo una herramienta fundamental a la hora de identificar nuevos biomarcadores. Los espectrómetros de masas permiten analizar la composición de diferentes elementos químicos separando los núcleos por su relación masa-carga. A menudo están acoplados con sistemas cromatográficos de gases o líquidos los cuales permiten la separación e identificación de los componentes de mezclas complejas.

Por ello, se procedió finalmente a realizar el análisis proteómico de los exosomas aislados tanto por ultracentrifugación como por el protocolo modificado del kit comercial (digestión de 20 min a 37°C).

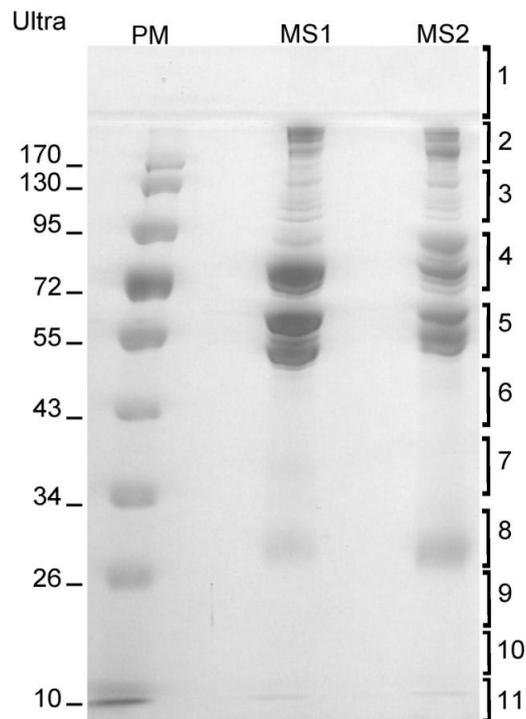


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la digestión del Gel. 150 μ g de lisado de exosomas de dos muestras (MS1 y MS2) aisladas mediante ultracentrifugación (Ultra), se analizaron por electroforesis en 10% de poliacrilamida para la digestión trípica. Cada calle fue cortada en 11 bandas indicadas mediante corchetes en el margen derecho del gel. Las posiciones de las masas moleculares estándar en kDa (PM) se muestran a la izquierda de la figura. De modo similar se procedió con muestras aisladas mediante el kit comercial

El análisis proteómico permitió la identificación de proteínas principalmente solubles (inmunoglobulinas, albúmina, proteínas del complemento) aunque también, en algunos casos, proteínas citoplasmáticas, aunque en ningún caso se consiguió la identificación de proteínas de membranas como las tetraspaninas (CD9, CD81 o CD63), comúnmente utilizadas como marcadores exosomales. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra como tabla en el apartado de Anexos. En cambio la presencia de CD63 y otras proteínas presentes en la membrana de las MVs, como la integrina alfa-4 e ICAM-1 fueron detectadas mediante Western Blot en 10 μ g las mismas muestras (figura 8), lo que nos indica que si bien el aislamiento es eficiente las señales detectadas en la espectrometría de masas para proteínas mayoritarias impide la detección de otras proteínas de interés.

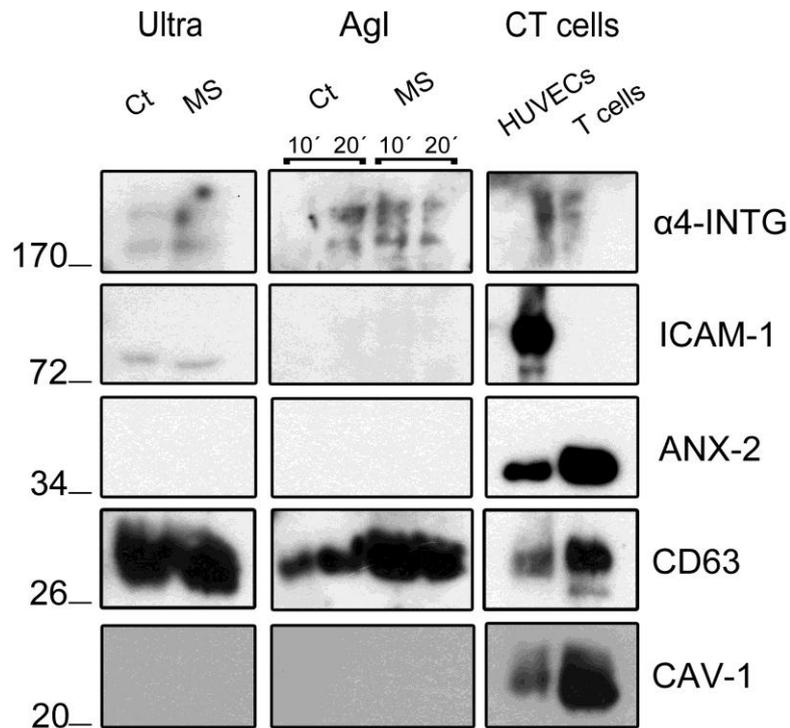


Figura 8. Western blot de proteínas de membrana en MVs. 10 μ g de lisado exosomal de controles sanos (Ct) y pacientes de esclerosis múltiple (MS) obtenidos por ultracentrifugación (Ultra) y aglutinación (Agl) con incubación de la proteinasa K durante 10 (10') y 20 minutos (20'), así como lisados celulares de HUVECs (células endoteliales de vena umbilical humana) y linfocitos T (T cells) como controles positivos (CT cells), fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot para la detección de las proteínas indicadas. α 4-Integrina (α 4-INTG), ICAM-1, anexina-2 (ANX-2), CD63 y Caveolina-1 (CAV-1). Las posiciones de las masas moleculares estándar (en kDa) se muestran a la izquierda de la figura.

5. Discusión

En los últimos años se ha desarrollado un gran interés por las microvesículas (micropartículas y exosomas), liberadas al medio extracelular en respuesta a mediadores inflamatorios, activación celular y apoptosis, debido a su valor como biomarcadores en diversas patologías [10-15]. Además, su posible implicación en la progresión de enfermedades como la esclerosis múltiple o la aterosclerosis entre otras ha promovido numerosos trabajos, por su posible interés como dianas terapéuticas [7,8].

En el caso concreto de la EM se ha descrito que los niveles de MVs de origen plaquetario se encuentran incrementados en sangre de pacientes con EM [26,27]. MVs de origen endotelial también se encuentran incrementadas en pacientes durante la exacerbación de los síntomas neurológicos [27]. Más recientemente se ha descrito un efecto diferencial de las MVs aisladas de pacientes y de controles sanos en cuanto a la permeabilidad de la barrera endotelial [26]. Resulta de gran interés estudiar su composición, tanto de proteínas como de ácidos nucleicos, para entender el mecanismo responsable de las diferencias y por consiguiente su implicación en la progresión de la enfermedad.

Existen diversos métodos de aislamiento de MVs descritos en diferentes fuentes bibliográficas [28]. El método de aislamiento tradicional es la ultracentrifugación, un procedimiento que a pesar de procesar un bajo número de muestras, consume un largo tiempo y requiere un equipo costoso, no siempre disponible. Recientemente y debido al gran interés que ha suscitado el campo, distintas compañías han desarrollado métodos alternativos comercializando kits basados en aditivos capaces de modificar la velocidad de sedimentación de las MVs. Sin embargo, la mayor parte de ellos están enfocados principalmente a la cuantificación posterior mediante inmunoensayos (ELISA) o al aislamiento de miARNs. Las aplicaciones proteómicas no se encuentran tan desarrolladas en este campo.

Puesto que el objetivo de este trabajo es llevar a cabo la caracterización proteica de las MVs, se han comparado dos protocolos diferentes con el fin de determinar qué método de aislamiento resulta más eficaz. Los métodos utilizados han sido ultracentrifugación y precipitación a baja velocidad mediante el kit comercial “reactivo de aislamiento total de exosomas” (Invitrogen). Tras un análisis inicial mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de las muestras de MVs aisladas de plasma por ambos métodos, los resultados indican que el aditivo del kit comercial modifica la movilidad electroforética de las proteínas por lo que es necesario añadir un paso de precipitación de las mismas antes de la separación electroforética, paso que no estaba indicado en el protocolo proporcionado por la casa comercial.

El preaclaramiento de la muestra, realizado con proteína A/G sefarosa, no ha permitido la eliminación efectiva de las inmunoglobulinas presentes en la muestra, al menos en las condiciones testadas. Esto puede ser debido a una ineficiente unión de las inmunoglobulinas, presentes en el plasma o a la temperatura y tiempo de incubación probados, inmunoglobulinas presentes en una elevada concentración en la muestra (600-1.800 mg/100 mL en el caso de las IgG).

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que la digestión de la proteinasa K a 37°C durante 20 minutos es más efectiva que la recomendada por el fabricante. Sin embargo, esta digestión es parcial y el análisis de los datos obtenidos tras la digestión trípica en gel y el análisis de los péptidos por nanoLC-MS/MS no permite una caracterización del proteoma de las MVs, obteniéndose mayoritariamente la identificación de proteínas solubles presentes en plasma. La confirmación de la integridad de las MVs mediante MET, de un tamaño en el rango esperado mediante DLS y la determinación de su concentración por NTA así como y la confirmación de la presencia de un marcador exosomal, CD63, mediante western blot el alícuotas de las mismas muestras procesadas para el análisis mediante nanoLC-MS/MS indica que dichas proteínas solubles son las mayoritarias y efectivamente enmascaran las señales de proteínas propias de las MVs, que por tanto no son identificadas y no a un deterioro de las MVs durante el proceso de ultracentrifugación o a una digestión parcial en el caso del empleo del kit. Hemos de tener en cuenta que, dado que se procesan para esta técnicas 150 µg de lisado de MVs, la contaminación de la muestra con proteínas solubles implicaría que estaríamos sobrevalorando la cantidad de muestra real de MVs. Aun así no podemos descartar que parte de esta aparente contaminación de proteínas solubles sea en realidad señal de proteínas solubles unidas a la superficie de las MVs.

Sería posible abordar la optimización de este método mediante la combinación de varios procesos de preaclaramiento consecutivos, o incluso realizando este proceso tras la el aislamiento de las MVs mediante el empleo del kit, punto del protocolo en el que la concentración de las inmunoglobulinas será inferior. En cualquier caso se ha de tener en cuenta el posible uso de electroforesis en dos dimensiones para el análisis de las muestras. Así, separando en una primera dimensión por punto isoeléctrico y una segunda dimensión por peso molecular se obtendría un patrón de puntos, cada uno de los cuales correspondería a una única proteína, cuya digestión trípica permitiría una identificación inequívoca de la proteína pero incrementando de manera importante la complejidad del procesamiento.

Los resultados obtenidos durante la caracterización del tamaño, integridad y la determinación de la concentración de MVs por diferentes técnicas han aportado datos adicionales de interés. Por una parte los datos obtenidos por DLS y Nanosight para las muestras aisladas por ultracentrifugación indican que se obtienen muestras más heterogénea, con una distribución de tamaños que abarca un rango más amplio (mayor dispersión en el caso del DLS) y que podría indicar la presencia de vesículas de mayor tamaño (por ejemplo cuerpos apoptóticos) o incluso que tenga lugar la fusión de vesículas durante el procesamiento. En cambio, la muestra es más homogénea, y con un diámetro medio de partículas similar a los descritos en la bibliografía en el caso de las muestras aisladas mediante el kit comercial. Esto debe de ser tenido en función del uso final de las MVs aisladas (proteómica, análisis de microARNs, estudios funcionales, etc.)

Por otra parte es importante tener en cuenta el efecto del medio de dilución de las MVs tras su aislamiento puesto que hemos observado un incremento importante en el diámetro medio de las MVs cuando estas son resuspendidas en agua, frente a un medio isotónico como PBS o HEPES. Es preciso indicar esto pues curiosamente la casa que comercializa el equipo Nanosight recomienda realizar las medidas tras la dilución de la muestra en agua. Es posible que, dado que la aplicación principal de este equipo es la medida de concentraciones –principalmente de micro- o nanoesferas de materiales inertes- no se hayan tenido en cuenta posibles fenómenos osmóticos factibles cuando se trabaja con vesículas de membrana en medios hipotónicos.

Otro dato de interés obtenido durante nuestros estudios se refiere a la estabilidad de las MVs puesto que medidas realizadas por Nanosight en muestras conservadas hasta una semana a 4°C arrojaron datos similares.

6. Conclusiones

- 1) El kit comercial resulta más eficiente que el método de ultracentrifugación en cuanto al número de vesículas precipitadas por volumen inicial de muestra.
- 2) El uso del kit comercial requiere una precipitación ácida de proteínas con TCA previa a la electroforesis, no descrita en el protocolo comercial.
- 3) El proceso de digestión de la proteinasa K resulta insuficiente para eliminar la contaminación de proteínas solubles, incluso tras incrementar el tiempo de incubación.
- 4) Para llevar a cabo un estudio proteómico, el método de aislamiento más efectivo en cuanto a pureza de la muestra sería la ultracentrifugación., pero debido a la baja eficiencia parece más adecuado combinar el aislamiento mediante el kit comercial con técnicas de purificación adicionales.

7. Referencias bibliográficas

- 1) Berckmans, R.J. et al., (2001) “Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation” en *Thromb Haemost* [en línea], 85,4, (639-646), April 2001, Schattauer GmbH, disponible en: http://www.researchgate.net/profile/Fred_Romijn/publication/11994768_Cell-derived_microparticles_circulate_in_healthy_humans_and_support_low_grade_thrombin_generation/links/5506a4bc0cf2d60c0e6d2f74.pdf [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 2) Vlassov, A.V. et al., (2012) “Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials” en *Biochimica et Biophysica Acta* [en línea], 1820:7, July 2012, United States, Elsevier B.V., disponible en: <http://www.journals.elsevier.com/bba-general-subjects/most-cited-articles/> [Accedido el 18 de Junio de 2015]
- 3) Van der pol, E. et al., (2012) “Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles” en *Pharmacological Reviews* [en línea], 64,3, February 2012, Mark P. Mattson, disponible en: <http://pharmrev.aspetjournals.org./content/64/3/676.full.pdf> [Accedido el 8 de Julio de 2015]
- 4) Théry, C., Zitvogel, L. y Amigorena, S. (2012) “Exosomes: composition, biogénesis and function” en *Nature Reviews Immunology* [en línea], 2 (569-579), August 2002, disponible en: <http://www.nature.com/nri/journal/v2/n8/full/nri855.html> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 5) Théry, C, Ostrowski, M, Segura, E. (2009) “Membrane vesicles as conveyors of immune responses” en *Nature Revivs Immunology* [en línea], 9,8 (581-93), August 2009, disponible en: <http://www.nature.com/nri/journal/v9/n8/full/nri2567.html> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 6) Théry, C. (2011) “Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications” en *F1000 Biology Reports* [en línea], 3,15, July 2011, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155154/pdf/biolrep-03-15.pdf> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 7) Samir, E.L. et al., (2013) “Extracelular vesicles: biology and emergint therapeutic opportunities” en *Nature Reviews Drug Discovery* [en línea], 12,(347-357), May 2013, Macmillan, disponible en: <http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n5/full/nrd3978.html> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]

- 8) Valadi, H. et al., (2007) “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic Exchange between cells” en *Nature cell biology* [en línea], 9,6, (654,680), June 2007, Nature Publishing Group, disponible en: <http://www.nature.com/ncb/journal/v9/n6/pdf/ncb1596.pdf> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 9) Mathivanan, S. et al., (2012) “ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids” en *Nucleic Acids Research* [en línea], 40, January 2012, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245025/?report=classic> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 10) Cui, Y. et al., (2013) “Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein” en *Mol Biol Rep* [en línea], 40,11, (6437-42), 2013 Nov, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078095> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 11) Ardoin, S.P., Shanahan, J.C. y Pisetsky, D.S. (2007) “The Role of Microparticles in Inflammation and Thrombosis” en *Scandinavian Journal of Immunology* [en línea], 66, 2, (159–165), August 2007, Journal compilation, disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3083.2007.01984.x/epdf> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 12) Nomura, S. et al., (1993) “Detection of platelet-derived microparticles in patients with diabetes” en *Am J Hematol* [en línea], 44,3,(213) Nov 1993, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032632> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 13) López, M. et al., (2012) “Endothelial dysfunction in HIV infection--the role of circulating endothelial cells, microparticles, endothelial progenitor cells and macrophages” en *AIDS Rev* [en línea], 14,4, (223-30) Oct 2012 , disponible en [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 14) Dye J.R, Ullal A.J y Pisetsky D.S., (2013) “The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus” en *Scandinavian Journal of Immunology* [en línea],78, 2,(140-8), Aug 2013, U.S.A, U.S.Government, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672591> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 15) Muralidharan-Chari, V. et al., (2010) “Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression” en *Journal of Cell Science* [en línea], 15, 123, (1603-11), May 2010, disponible en: <http://jcs.biologists.org/content/123/10/1603.full.pdf> [Accedido el 8 de Julio de 2015]

- 16) Mallada-Frechin, J. et al. (2000) “The prevalence of multiple sclerosis in the Alcoi Health district” en *Rev Neurology* [en línea], 12,16,30 (1131-4), Jun 2000 disponible en: <http://www.revneurolog.com/sec/resumen.php?i=i&id=2000269#> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 17) Ferguson, B. et al., (1997) “Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions” en *Brain* [en línea], 120, (393–399), 1997, Oxford University Press, disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.318.1431&rep=rep1&type=pdf> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 18) Santiago, O. et al., (2010) “Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production” en *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [en línea], 29,7, (857-66), Jul 2000, disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00589489/document> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 19) Sriram, S. et al., (2005), “Detection of chlamydial bodies and antigens in the central nervous system of patients with multiple sclerosis” en *J Infect Dis* [en línea], 1,192,(1219-28) Oct 2005, disponible en: <http://jid.oxfordjournals.org/content/192/7/1219.full.pdf+html> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 20) Christensen, T. et al., (2000) “Molecular characterization of HERV-H variants associated with multiple sclerosis” en *Acta Neurol Scand* [en línea], 101,4, (229-238), April 2000, disponible en: [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 21) Salzer J, et al., (2013) “Smoking as a risk factor for multiple sclerosis” en *Multiple Sclerosis* [en línea], 19,8, (1022-7), Jul 2013, disponible en: <http://msj.sagepub.com/content/early/2012/12/20/1352458512470862.abstract> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 22) Ramagopalan, S.V. and Dymont, D.A., (2011) “What is Next for the Genetics of Multiple Sclerosis?” en *Autoimmune Dis* [en línea], 20,1, 2011 disponible en: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000369> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 23) Minagar, A. et al., (2001), “Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis” en *Neurology* [en línea], 56,10 (1319-1324),May 2001, disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11376181> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 24) Sheremata, W.A. et al., (2006) “Interferon-beta1a reduces plasma CD31+endothelial microparticles (CD31+EMP) in multiple sclerosis” en *Journal of Neuroinflammation* [en línea],3,23,September 2006, BioMed Central, disponible en: <http://www.jneuroinflammation.com/content/pdf/1742-2094-3-23.pdf> [Accedido el día 8 de Julio]

- 25) Horstman, J.W. et al., (2004) “Measuring circulating cell-derived microparticles” en *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [en línea], 2, (1842-1851) 2004, disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2004.00942.x/pdf> [Accedido el día 8 de Julio de 2015]
- 26) Marcos-Ramiro, B. et al., (2014) “Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function” en *BMC Neuroscience* [en línea], 15:110, 2014, BioMed Central, disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/15/110> [Accedido el 18 de Junio de 2015]
- 27) Sheremata, W.A. et al., (2008) “Evidence of platelet activation in multiple sclerosis” en *Journal of Neuroinflammation* [en línea], 5, 27, June 2008, Biomed Central, disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1742-2094-5-27.pdf> [Accedido el día 8 de Julio]
- 28) Álvarez, M.L et al., (2012) “Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers” en *Kidney International* [en línea], 82: 1024-1032, November 2012, International Society of Nephrology., disponible en: <http://www.nature.com/ki/index.html> [Accedido el 18 de Junio de 2015]

Anexos:

Figura suplementaria: Efecto del medio de dilución en la distribución de tamaños de las MVs. Distribución de tamaños de MVs de una muestra control determinados mediante NTA (izquierda) y por DLS (derecha) diluidos en H₂O (paneles superiores) o HEPES (paneles inferiores).

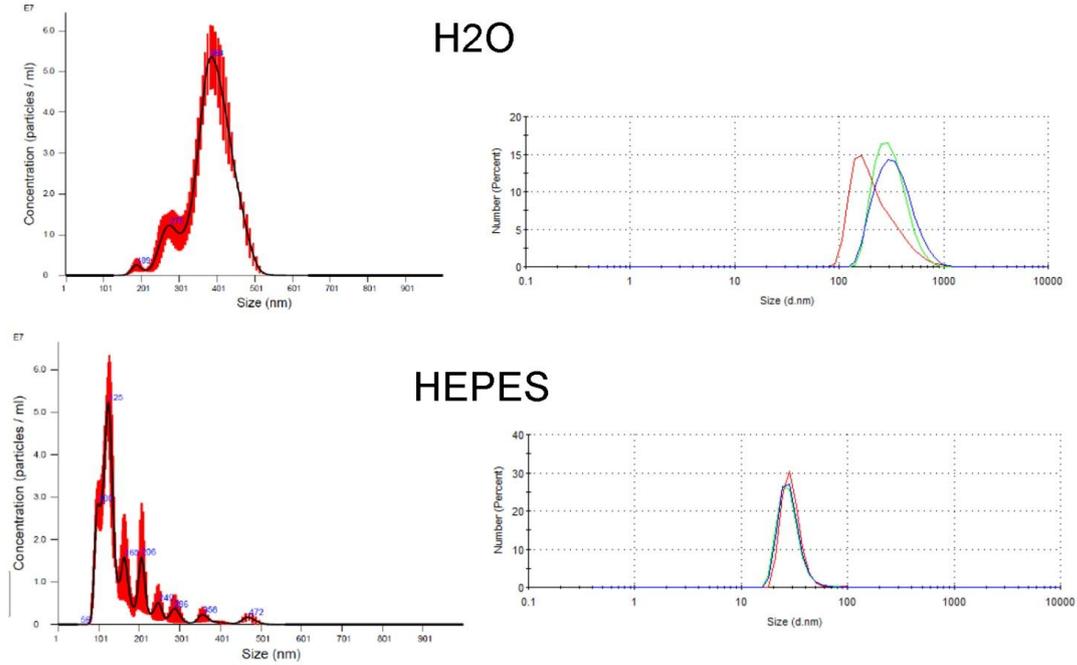


Tabla suplementaria: Ejemplo del listado de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en una muestra de lisado de exosomas aislados por ultracentrifugación.

Código de la Proteína	Nombre completo de la proteína	Masa teórica	Score	Nº de péptidos	% de Proteína
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	163188	2215	69	52
ALBU_HUMAN	Serum albumin	69321	846	27	46
AMBP_HUMAN	Protein AMBP	38974	59	3	17
AP2B1_HUMAN	AP-2 complex subunit beta	104486	26	4	1
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	305	7	28
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	43947	64	1	6
ARL8A_HUMAN	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	21402	37	2	6
C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B	26704	91	1	5
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	80067	62	2	3
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent	76635	60	1	1
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	66989	131	3	6
CBLN4_HUMAN	Cerebellin-4	21794	29	2	6
CDC16_HUMAN	Cell division cycle protein 16 homolog	71609	24	3	4
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122128	98	4	8
CFAH_HUMAN	Complement factor H	139005	112	7	8
CLUS_HUMAN	Clusterin	52461	50	1	2
CO3_HUMAN	Complement C3	187030	613	22	19
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	192664	224	7	5
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	192631	189	5	7
CO5_HUMAN	Complement C5	188186	546	23	21
CO8G_HUMAN	Complement component C8 gamma chain	22264	99	3	23
ERI2_HUMAN	ERI1 exoribonuclease 2	77351	18	4	4
EST3_HUMAN	Carboxylesterase 3	62242	29	1	5
F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	75461	41	2	3

Código de la Proteína	Nombre completo de la proteína	Masa teórica	Score	Nº de péptidos	% de Proteína
FCN2_HUMAN	Ficolin-2	33980	85	3	15
FCN3_HUMAN	Ficolin-3	32882	122	6	24
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	94914	915	36	30
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	55892	1096	39	61
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	51479	412	16	51
FINC_HUMAN	Fibronectin	262460	1758	60	31
GELS_HUMAN	Gelsolin	85644	87	2	3
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	15988	83	3	24
HPT_HUMAN	Haptoglobin	45177	93	7	12
HPTR_HUMAN	Haptoglobin-related protein	39005	112	7	19
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	59541	24	1	3
HV305_HUMAN	Ig heavy chain V-III region BRO	13218	96	1	15
HV310_HUMAN	Ig heavy chain V-III region	13557	50	1	13
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	37631	139	3	9
IGHA2_HUMAN	Ig alpha-2 chain C region	36503	100	3	9
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36083	337	13	34
IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain	35878	68	13	11
IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C	41260	151	13	16
IGHG4_HUMAN	Ig gamma-4 chain C region	35918	83	2	7
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	49276	203	7	21
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	18087	58	1	9
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11602	373	11	80
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	23049	137	6	22
IMPA2_HUMAN	Inositol monophosphatase 2	31301	22	1	4
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	101326	120	3	4

Código de la Proteína	Nombre completo de la proteína	Masa teórica	Score	Nº de péptidos	% de Proteína
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	106397	111	4	7
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103293	84	2	3
KV201_HUMAN	Ig kappa chain V-II region Cum	12668	63	1	11
KV307_HUMAN	Ig kappa chain V-III region GOL	11823	206	3	48
KV402_HUMAN	Ig kappa chain V-IV region Len	12632	154	4	23
LAC1_HUMAN	Ig lambda-1 chain C regions	11341	199	9	74
LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	11287	152	6	46
M3K6_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	142506	18	1	0
MED1_HUMAN	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	168373	24	2	1
MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein	43030	117	7	26
NR2E3_HUMAN	Photoreceptor-specific nuclear receptor	44663	33	1	3
PAIP1_HUMAN	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	53491	18	1	1
PLMN_HUMAN	Plasminogen	90510	221	7	13
POLH_HUMAN	DNA polymerase eta	78364	30	3	1
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	22995	47	1	8
RNAS1_HUMAN	Ribonuclease pancreatic	17633	25	2	20
S2538_HUMAN	Solute carrier family 25 member 38	33544	26	3	5
SPB1_HUMAN	pre-rRNA processing protein FTSJ3	96499	21	1	2
THRB_HUMAN	Prothrombin	69992	59	3	7
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	77014	232	9	18
TTHY_HUMAN	Transthyretin	15877	130	3	38
VTNC_HUMAN	Vitronectin	54271	49	1	3
VWF_HUMAN	Von Willebrand factor	309058	333	11	6
YETS2_HUMAN	YEATS domain-containing protein 2	150688	28	1	1
YETS4_HUMAN	YEATS domain-containing protein 4	26483	32	1	3