



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Determinación del contenido metálico de los exosomas en
cultivos celulares de epitelio pigmentario de la retina
mediante espectrometría de masas elemental

Jaime Martínez García
Oviedo, Julio, 2021

Tabla de contenido

Lista de acrónimos	i
1. Introducción.....	1
1.1. Degeneración macular asociada a la edad: aspectos generales	1
1.2. Anatomía del ojo y estructura de la retina	2
1.3. Epitelio pigmentario de la retina	3
1.4. Dishomeostasis metálica en DMAE.....	5
1.5. Cultivos celulares de RPE.....	6
1.6. Secreción celular y vesículas extracelulares de RPE.....	7
1.7. Técnicas de purificación de EVs	9
1.7.1. Técnicas de purificación basadas en centrifugación	9
1.7.2. Técnicas de purificación basadas en precipitación cuantitativa	10
1.8. Caracterización de exosomas	10
1.8.1. Caracterización por dispersión de radiación	10
1.8.2. Caracterización por microscopía electrónica.....	11
1.9. Análisis elemental del contenido de exosomas	12
2. Objetivos	13
3. Instrumentación empleada	14
3.1. Microscopio óptico invertido	14
3.2. Centrífuga y ultracentrífuga	15
3.3. Equipo de análisis por DLS	16
3.4. Microscopio electrónico de transmisión	17
3.5. ICP-MS.....	19
4. Procedimientos experimentales	22
4.1. Establecimiento y caracterización del modelo <i>in vitro</i> de RPE	22
4.2. Purificación de exosomas	23
4.2.1. Centrifugación diferencial.....	23
4.2.2. Precipitación cuantitativa	24
4.3. Caracterización de exosomas	25
4.3.1. DLS.....	25
4.3.2. TEM.....	25
4.4. Análisis elemental por ICP-MS	26
5. Resultados y discusión	28
5.1. Establecimiento de los cultivos celulares de HRPE-SV40. Puesta a punto para la producción de exosomas	28
5.2. Purificación de exosomas y optimización del protocolo	29

5.2.1. Evaluación del protocolo de purificación de exosomas por centrifugación diferencial	29
5.2.2. Evaluación del rendimiento de purificación de exosomas con el volumen del medio de producción.....	33
5.2.3. Optimización del protocolo experimental de purificación de exosomas por centrifugación diferencial	34
5.2.4. Comparación de los protocolos de purificación de exosomas por centrifugación diferencial y precipitación cuantitativa.....	38
5.3. Análisis multielemental de Fe, Cu y Zn en exosomas mediante espectrometría de masas elemental	41
6. Conclusiones.....	46
7. Referencias	47

Lista de acrónimos

- AFM → Microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscopy*).
- DMAE → Degeneración Macular Asociada a la Edad.
- dgUC → Centrifugación por gradiente de densidad.
- diffUC → Centrifugación diferencial.
- DLS → Análisis por dispersión dinámica de radiación (*Dynamic Light Scattering*).
- EVs → Vesículas extracelulares (*Extracellular Vesicles*).
- Exdep-FBS → Suero fetal bovino libre de exosomas (*Exosome depleted-FBS*).
- FBS → Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*).
- HRPE-SV40 → Línea celular de epitelio pigmentario de la retina humano inmortalizada mediante transfección con el virus SV40.
- ICP-MS → Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.
- ILV → Vesículas intraluminales (*IntraLuminal Vesicles*).
- MVB → Cuerpo multivesicular (*MultiVesicular Body*).
- NTA → Análisis de monitorización de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*).
- PBS → Tampón fosfato salino.
- POS → Segmentos externos de los fotorreceptores (*Photoreceptor Outer Segments*).
- PR → Fotorreceptores (*PhotoReceptors*).
- QPrec → Precipitación cuantitativa.
- RCF → Fuerza centrífuga relativa (*Relative Centrifugal Force*).
- ROS → Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).
- RPE → Epitelio pigmentario de la retina (*Retinal Pigment Epithelium*).
- SEM → Microscopía electrónica de barrido (*Scan Electron Microscopy*).

TEM → Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*).

TRA → Análisis resuelto en el tiempo (*Time-Resolved Analysis*).

TRIS → tampón de tris(hidroximetil)aminometano salino.

1. Introducción

1.1. Degeneración macular asociada a la edad: aspectos generales

La Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) es una enfermedad ocular neurodegenerativa que supone la primera causa de ceguera irreversible en el mundo desarrollado y la tercera a nivel mundial [1]. El avance de esta enfermedad está asociado a un deterioro progresivo de las células neurosensoriales de la mácula, la zona central de la retina, que culmina con la pérdida de visión central. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de cómo sería la visión de un paciente con DMAE. Durante este deterioro se observa una degeneración gradual del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y los fotorreceptores (PR), y la consecuente formación de depósitos focales de lípidos y proteínas bajo el RPE, conocidos como drusas. Si la enfermedad progresa, ésta puede evolucionar a dos fenotipos patológicos, la forma seca, en la que la pérdida del RPE y los fotorreceptores origina áreas de atrofia focal sobre la región macular, y la forma húmeda, en la que se observa la proliferación de vasos sanguíneos aberrantes [2].

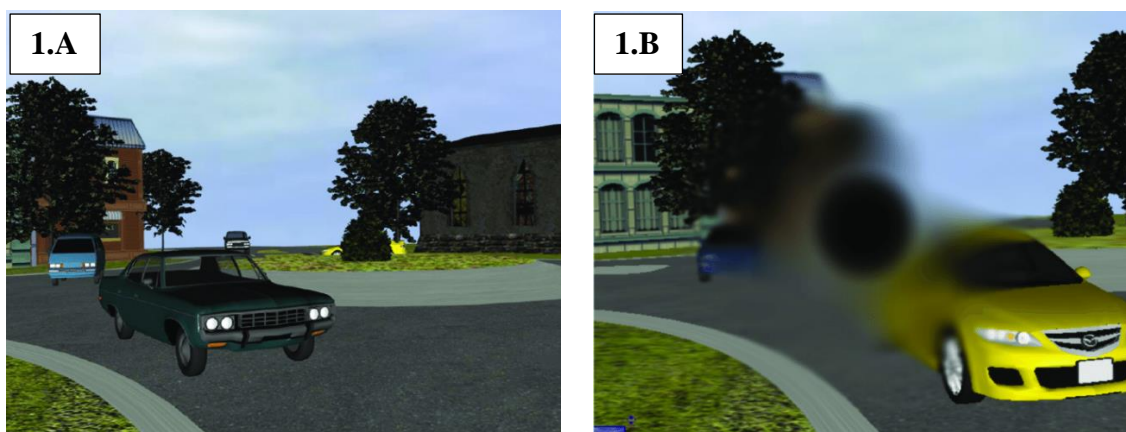


Figura 1. Simulación de los efectos de la DMAE en la visión. Las imágenes ilustran cómo vería un peatón cruzando una rotonda sin DMAE (A) y con DMAE avanzada (B). Imágenes extraídas del trabajo de H. Wu et al., 2018 [3].

El principal factor de riesgo de la DMAE es la edad, se estima que el sector de la población más afectado es el de personas mayores de 60 años, aumentando la prevalencia y el grado de progresión de la enfermedad en edades avanzadas. También existen otros factores que influyen de forma directa en el desarrollo de esta enfermedad, como el tabaco, la dieta o la predisposición genética. Los expertos estiman que en 2040 el número de personas que puede padecer esta enfermedad aumentará hasta los 288 millones, una cifra bastante preocupante comparada con las cifras actuales de 196

millones de personas afectadas [4]. Actualmente no existe una terapia efectiva que permita revertir los efectos de la DMAE, las únicas alternativas disponibles para combatir la enfermedad son tratamientos que permiten ralentizar su progresión. Entre estos tratamientos, los más comunes son la suplementación de Zn, vitaminas y antioxidantes para ralentizar la progresión de la DMAE seca, y la administración de factores anti-angiogénicos para ralentizar la progresión de la DMAE húmeda. Sin embargo, estos tratamientos no son muy eficaces a la larga y pueden llevar asociado un coste elevado [5].

Todo esto genera un problema social que hay que tener en cuenta, ya que, aunque un número muy reducido de este grupo de personas llegue a desarrollar DMAE hasta el punto de pérdida de visión, sólo existen terapias de eficacia media que permiten disminuir la velocidad de progreso de la DMAE, lo que deja a millones de pacientes sin una posible alternativa para revertir las consecuencias de la enfermedad. Además, este problema también lleva asociado un problema económico, se estima que el coste médico anual asociado al tratamiento de pacientes con DMAE ronda los 500 millones de dólares al año en EEUU y las 150 millones de libras en Reino Unido [1]. Así, la investigación sobre la DMAE ha crecido mucho en los últimos años, en busca de una terapia efectiva que permita frenar o revertir sus efectos, y en busca de un biomarcador que permita realizar diagnósticos tempranos.

1.2. Anatomía del ojo y estructura de la retina

El ojo es el órgano sensorial que se encarga del sentido de la visión, y para ello presenta diferentes estructuras que en conjunto, y junto con el cerebro, son capaces de captar y procesar los estímulos externos de luz recibidos para enviar impulsos nerviosos hasta la corteza occipital y obtener una imagen visual. Como se muestra en la Figura 2, a grandes rasgos, el ojo se puede estructurar en tres capas principales que, de más externa a más interna, son [6]:

- El **soporte estructural** del ojo, la parte más externa de éste y formada por la córnea en la parte anterior y la esclerótica en la parte posterior.
- La **úvea**, encargada de aportar nutrientes a las diferentes estructuras oculares, y formada por el cuerpo ciliar y el iris en la parte anterior y el coroides en la parte posterior.

- La **retina**, encargada de transformar los estímulos de luz recibidos en impulsos nerviosos y localizada en la parte posterior del ojo, está formada por la retina neurosensorial y el RPE.

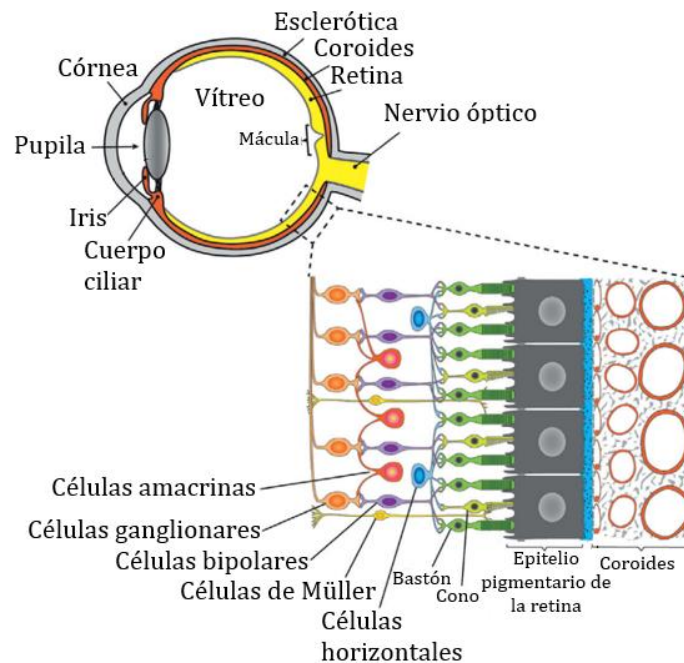


Figura 2. Anatomía general de un ojo humano y específica de la retina y el coroides. Imagen modificada del trabajo de Cáceres, P. S. et al., 2020 [7].

De todas las estructuras del ojo, la más afectada en la DMAE es la retina, concretamente las capas más internas de ésta, donde se encuentran los PR y el RPE. Los PR son las células encargadas de transformar los estímulos de luz externos en impulsos nerviosos. La parte más sensible de la retina y la que está encargada de la mayor parte de la visión es la parte central, conocida como mácula, y de hecho es la región de la retina más afectada por la DMAE. El coroides es el encargado de aportar los nutrientes y de drenar la región macular de la retina, y es una estructura que también se ve afectada por la enfermedad [8]. El RPE es la parte más externa de la retina y es la estructura que primero se ve afectada por la DMAE, por lo que es una estructura que en principio tiene mucha relevancia en el estudio de esta enfermedad.

1.3. Epitelio pigmentario de la retina

Comúnmente, los estudios de investigación sobre la DMAE involucran células de RPE. Las células RPE son unas células hexagonales fuertemente unidas entre sí formando una monocapa epitelial muy compacta en el ojo. Un aspecto característico de estas células es

que están polarizadas, es decir, tienen diferentes estructuras en el lado apical y en el lado basolateral, y por tanto, diferentes funciones. Por el lado apical, las células RPE tienen unas microvellosidades que se intercalan con los PR y protegen sus segmentos externos (POS). El dominio basolateral se caracteriza por tener una estructura celular convencional fuertemente adherida a la membrana de Bruch, una estructura fibrosa que actúa como barrera hematorretiniana [9]. La estructura típica de una célula RPE se puede observar en la Figura 3.

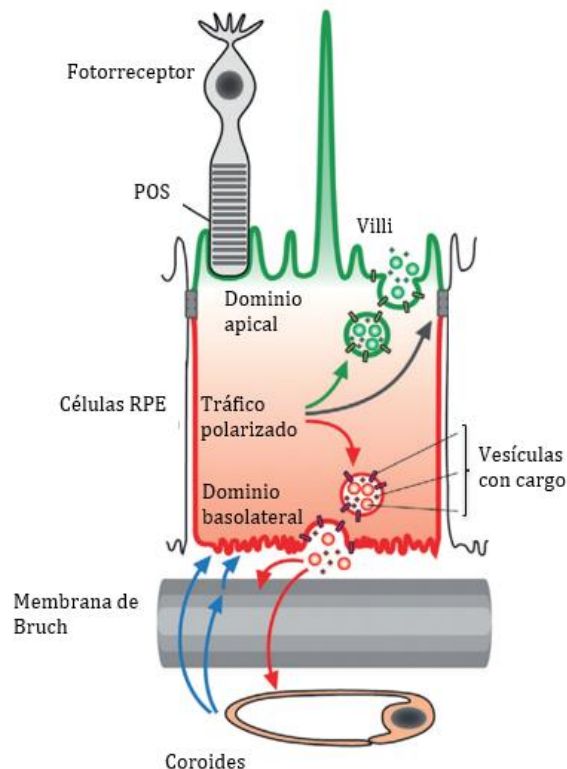


Figura 3. Esquema detallado de una célula del epitelio pigmentario de la retina, indicando todas las partes importantes. Imagen modificada del trabajo de Cáceres, P. S. et al., 2020 [7].

El hecho de que tanto la formación de drusas como de vasos sanguíneos aberrantes se produzca en zonas adyacentes al RPE no es algo casual. Las células RPE desempeñan un gran número de funciones metabólicas, de manera que en su interior ocurren un gran número de procesos moleculares que suponen una elevada formación de desechos, un consumo de energía continuo y una comunicación intercelular constante. Todos estos procesos ocurren manteniendo un complejísimo equilibrio dinámico conocido como homeostasis celular [10], gracias al cual los niveles de todos los metabolitos se mantienen estables y los procesos se llevan a cabo en la extensión adecuada. Sin embargo, en el momento en que esta homeostasis se rompe o se desequilibra, los

procesos biológicos dejan de producirse con normalidad y aparecen problemas asociados.

1.4. Dishomeostasis metálica en DMAE

Uno de los procesos que afecta más a la ruptura de la homeostasis en células RPE es el estrés oxidativo. Estas células están continuamente expuestas a condiciones agresivas, como la exposición a la radiación o la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citosol celular, que pueden desencadenar estrés oxidativo si las defensas antioxidantes fallan. Así, muchas de las enfermedades degenerativas comienzan a desarrollarse por el aumento de la actividad oxidante y el asociado estrés oxidativo, que induce el mal plegamiento de proteínas, la ruptura de moléculas de ADN y finalmente la apoptosis celular [11].

Concretamente, en estudios de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson se han registrado cambios en los niveles de ciertos metales en pacientes con dichas patologías respecto a pacientes control, lo que sería un indicativo de que se produce una dishomeostasis metálica [12]. Este proceso podría darse en DMAE, al ser una enfermedad neurodegenerativa con características similares, pero no se han realizado estudios de este tipo o al menos hay muy poca bibliografía al respecto. Así, enfocar el estudio de DMAE en determinar los niveles de metales en células de RPE puede ser un punto muy interesante en la búsqueda de comprender mejor los mecanismos de desarrollo de esta enfermedad. Desde un punto de vista fisiológico, diversos metales tienen un papel importante en el metabolismo de estas células:

- Los niveles de los **metales mayoritarios (Na, K, Mg o Ca)**, elementos químicos que participan activamente en el metabolismo celular, pueden verse afectados o estar implicados en la degeneración progresiva del RPE, por lo que puede ser interesante determinar su contenido.
- El **Zn** es uno de los metales más relevantes en el contexto del metabolismo celular, ya que además de estar presente en el centro activo de muchas enzimas óxido-reductasas que sirven como barrera antioxidante frente al estrés oxidativo (como la superóxido dismutasa) [13], es un componente importante en la acción antioxidante de sistemas como las metalotioneínas [14]. Del mismo modo, el **Cu** desempeña un papel similar al Zn en el metabolismo ocular.

- Una acumulación de **Fe** en el RPE puede suponer un efecto nocivo o incluso tóxico, ya que puede inducir estrés oxidativo al oxidarse espontáneamente la especie Fe^{2+} a Fe^{3+} [15].
- Algunos estudios muestran una posible relación entre la presencia de **metales exógenos** como Cd o Pb, que pueden provenir de la contaminación ambiental y la actividad industrial, y el desarrollo de esta enfermedad [16].

Aunque se pueden estudiar los niveles de cualquiera de estos metales, el interés principal de este estudio se centrará, inicialmente, en la determinación de los niveles de Fe, Cu y Zn en células de RPE, debido a su papel en el metabolismo de la retina y su posible implicación en el desarrollo de la DMAE [17].

1.5. Cultivos celulares de RPE

El empleo de modelos celulares *in vitro* de RPE contribuye a comprender la etiología de la DMAE y los eventos moleculares y celulares implicados, más aún cuando estas células son las primeras en experimentar una degeneración progresiva y consecuente formación de agregados extracelulares. Principalmente existen dos tipos de cultivo celular de RPE [18]:

- **Cultivo primario**, establecido a partir de un tejido de retina de un donante humano o animal *post mortem*. Estos cultivos permiten hacer estudios más fiables sobre el comportamiento de las células, ya que se supone que las respuestas generadas en las células de estos tipos de cultivos reflejan de forma muy similar las respuestas que podrían tener en un organismo vivo. Sin embargo, el tiempo en el que estas células mantienen su integridad es muy reducido, por lo que se tienen que establecer continuamente cultivos celulares nuevos a partir de nuevos tejidos, lo que hace que trabajar con cultivos primarios sea una actividad que lleve asociada más tiempo de preparación y más costes.
- **Líneas celulares**, establecidas a partir de cultivos primarios inmortalizados mediante procesos de ingeniería genética. Este tipo de cultivo celular permite un manejo experimental más simple, poseen elevada reproducibilidad y el tiempo de vida útil de las células es mucho mayor, al ser éstas teóricamente inmortales. Sin embargo, al modificar su genoma en el proceso de inmortalización, los resultados pueden no ser un reflejo directo del comportamiento de las células en

un organismo vivo, y sólo se pueden tomar como una referencia genérica de comportamiento.

En la práctica se trabaja con ambos cultivos, pero en la mayoría de artículos que se pueden encontrar en la bibliografía relativos a la DMAE se emplean, en una primera aproximación, líneas celulares RPE, debido a las ventajas que supone su uso.

1.6. Secreción celular y vesículas extracelulares de RPE

La secreción celular es una parte muy importante del metabolismo, en la que las células, a través de la formación de vesículas extracelulares (EVs), gestionan los desechos formados en la actividad metabólica y establecen una señalización paracrina. Se ha obtenido evidencia en estudios realizados sobre otras enfermedades como el cáncer, de un aumento de la actividad secretora de las células que padecen la enfermedad, liberando una mayor cantidad de EVs, y también modificando su contenido, con el objetivo de comunicar a células vecinas la situación que están padeciendo [19].

Las EVs son un tipo de vesículas lipídicas secretadas por la mayoría de células del organismo al medio extracelular y presentes en todos los fluidos biológicos. Existen diferentes tipos de EVs, pero no existe una clasificación clara en la bibliografía, por lo que no están bien definidos los límites entre unas EVs y otras. Esto supone un problema a la hora de aislar, purificar y caracterizar EVs de medios biológicos, ya que se pueden obtener fracciones de EVs muy heterogéneas, y por tanto difícilmente identificables, mediante una única metodología analítica de purificación [20]. Tradicionalmente se consideran tres tipos de EVs según su mecanismo de formación y su tamaño [21]:

- **Cuerpos apoptóticos**, vesículas con tamaños muy variados entre los 50 nm y los 5 µm, aunque tienden a tener tamaños grandes dentro de este rango. Se liberan en células apoptóticas y se forman a grandes rasgos por la fragmentación del citosol de la célula en diferentes partes, dando lugar a vesículas que contienen desde lisados moleculares hasta orgánulos intactos.
- **Microvesículas**, vesículas de tamaño entre 150 nm y 1 µm. Se forman por la invaginación directa de la membrana plasmática de la célula cuando en zonas concretas del citosol se acumulan moléculas de interés. Sus funciones principales son la secreción de desechos y mediación de la comunicación célula-célula.

- **Exosomas**, vesículas de tamaño entre 30 y 150 nm. Se forman en el citosol de las células por la agrupación de vesículas intraluminales (ILV) de tamaño similar en un único compartimento conocido como cuerpo multivesicular (MVB). La secreción de exosomas se produce por la fusión del MVB con la membrana plasmática de la célula, liberando los ILV que una vez en la matriz extracelular se considerarían ya exosomas. Sus funciones principales son la secreción de desechos y mediación de la comunicación célula-célula al igual que las microvesículas, pero además se encargan del transporte y reciclaje intracelular.

En la Figura 4 se pueden observar de forma esquemática los procesos de formación de las EVs mencionadas previamente. Las EVs que median la comunicación célula-célula son las microvesículas y los exosomas, de manera que debido a la poca relevancia que tienen los cuerpos apoptóticos en el contexto de la DMAE, éstos se excluyen del concepto “vesícula extracelular” en el presente estudio.

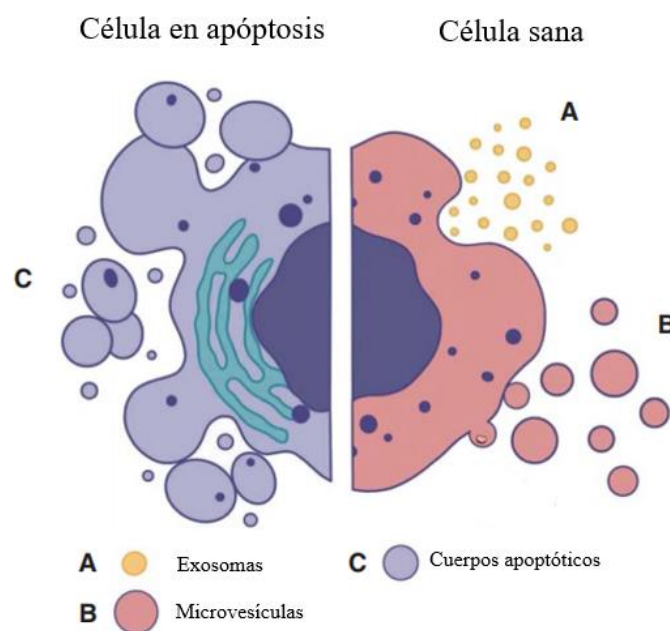


Figura 4. Ilustración esquemática de los procesos de formación de las diferentes EVs en una célula, en estado de apoptosis a la izquierda y sana a la derecha. Imagen modificada del trabajo de Gebara, N. et al., 2020 [22].

La evidencia experimental muestra que tanto exosomas como microvesículas presentan un contenido intraluminal bastante similar, compuesto principalmente por proteínas y ácidos nucleicos [23]. Además, varios estudios han observado una composición de las drusas que se forman en el desarrollo de DMAE similar al contenido típico de EVs liberados por células RPE [24], lo que indica que la secreción celular puede ser un

factor clave en el estudio de esta enfermedad, y que alguno de los compuestos secretados por estos EVs puede servir de biomarcador. Teniendo esto presente, y relacionándolo con la posible dishomeostasis metálica que se puede producir en células RPE con DMAE, un estudio de los niveles de Fe, Cu y Zn de las EVs y, en concreto, de los exosomas secretados por células de RPE en cultivo puede aportar información útil sobre los procesos de desarrollo de la enfermedad.

1.7. Técnicas de purificación de EVs

Para poder analizar las EVs liberadas por células RPE, primero hay que aislar éstas de los medios de cultivo. Existen muchas técnicas capaces de separar EVs en general y exosomas en particular de fluidos biológicos o de un medio de cultivo celular, pero no se considera que exista una técnica superior respecto a las demás en cuanto a prestaciones de purificación, todas ellas tienen una serie de ventajas e inconvenientes, y de hecho muchas se complementan para obtener fracciones de EVs más puras [25, 26]. Las técnicas que más se emplean en la purificación de exosomas de medios de cultivo, por su sencillez instrumental y el bajo coste de la purificación, son las técnicas basadas en centrifugación y en precipitación cuantitativa.

1.7.1. Técnicas de purificación basadas en centrifugación

Existen principalmente dos técnicas de purificación de exosomas basadas en centrifugación: centrifugación diferencial (diffUC) y centrifugación por gradiente de densidad (dgUC). El fundamento de la purificación por diffUC es la aplicación de fuerzas de centrifugación relativas (RCF) sucesivas y crecientes a la muestra de estudio, en este caso el medio de cultivo, para forzar la sedimentación de los exosomas (habiendo sedimentado previamente componentes más pesados de la muestra como células muertas u otras EVs de mayor tamaño). Los protocolos de diffUC disponibles en la bibliografía para purificar exosomas de medios biológicos son muy variados, pero en todos ellos se requiere alcanzar RCF de como mínimo 100.000xg para conseguir sedimentar los exosomas de la muestra. La dgUC es una técnica similar, pero emplea un medio con un gradiente de densidad, normalmente de sacarosa o iodixanol, de manera que en vez de sedimentarse los exosomas en el fondo del recipiente como ocurre en diffUC, éstos quedarán suspendidos en un punto en concreto del gradiente de densidad del medio.

Estas dos técnicas son las técnicas de purificación de exosomas más empleadas, al no requerir ningún reactivo comercial ni instrumentación especial, pero resultan muy laboriosas y la fracción de EVs obtenida no es pura de exosomas, suele contener agregados de proteínas y vesículas de tamaños muy diversos. Este aspecto se mejora empleando dgUC, ya que las impurezas que pueden cosedimentar con los exosomas en diffUC se separan en el gradiente por diferencias de densidad.

1.7.2. Técnicas de purificación basadas en precipitación cuantitativa

La purificación por precipitación cuantitativa (QPrec) es relativamente sencilla; consiste en añadir a la muestra de estudio una disolución capaz de forzar la precipitación selectiva y cuantitativa de exosomas y aislar finalmente el precipitado formado por centrifugación. La principal ventaja de esta técnica es la sencillez de manejo, estas disoluciones se venden comercialmente y el protocolo a seguir lo proporciona el proveedor. Sin embargo, la fracción de EVs obtenida será también impura, ya que coprecipitará con el agente capaz de precipitar las EVs, que normalmente suele ser un material de tipo polimérico, además de que estas disoluciones comerciales suelen ser caras.

1.8. Caracterización de exosomas

Otro de los aspectos más importantes previo al análisis del contenido metálico de los exosomas es la caracterización de los exosomas purificados. Esta parte está mucho más estandarizada, y en la bibliografía se suelen emplear técnicas que permiten el análisis del tamaño de las partículas por dispersión de radiación y técnicas de imagen basadas en microscopía electrónica.

1.8.1. Caracterización por dispersión de radiación

La caracterización por dispersión dinámica de radiación (DLS) permite determinar la población de tamaños de partículas presentes en una muestra determinada, y en concreto se ha demostrado su utilidad para la determinación de los tamaños de partícula de EVs en general, y de exosomas, en particular. A grandes rasgos, esta técnica determina el diámetro hidrodinámico de partículas suspendidas en disolución en función de la dispersión de la radiación procedente de un láser. Con esta técnica se pueden analizar poblaciones de tamaños de partículas de entre 1 nm y 10 μm , de manera que permite caracterizar una muestra que contiene exosomas. Sin embargo, esta técnica sólo es útil

para determinar poblaciones de tamaños de partículas suspendidas en disolución cuando las muestras analizadas son monodispersas, es decir, cuando hay poca variedad de tamaños de partícula. En el caso de que se analicen muestras polidispersas, la presencia de partículas más grandes puede enmascarar la presencia de las más pequeñas, resultando en una única población de tamaños que no sería representativa de toda la muestra [27]. Así, esta técnica es útil para determinar el tamaño de exosomas presentes en muestras siempre y cuando ésta no sea muy polidispersa.

Existe otra técnica similar, el análisis de monitorización de nanopartículas (NTA), que permite hacer un análisis parecido a DLS pero discriminando con mayor resolución poblaciones grandes y pequeñas, y permitiendo hacer una cuantificación directa del número de partículas, pero requiere volúmenes mayores de muestra y los resultados obtenidos para partículas menores de 50 nm son poco fiables [28].

1.8.2. Caracterización por microscopía electrónica

La técnica de visualización que tiene la resolución necesaria como para obtener imágenes de los exosomas purificados (dimensiones de unos pocos nanómetros) de las muestras de interés es la microscopía electrónica. Así, la técnica de imagen más empleada en estos casos es la microscopía electrónica de transmisión (TEM), que permite registrar una imagen de la disolución que contiene los exosomas para visualizar la morfología y el tamaño de estas partículas. Además, se puede evaluar la homogeneidad de la muestra, permitiendo detectar la presencia de impurezas como agregados proteicos o EVs de tamaño mayor. Otras técnicas que se podrían emplear para abordar este problema son la microscopía electrónica de barrido (SEM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM).

Uno de los aspectos a tener en cuenta a la hora de analizar exosomas por TEM es la preparación de las muestras. Los exosomas no se pueden visualizar directamente por TEM, y hay que realizar una tinción previa. La tinción puede ser positiva, si el agente de contraste interacciona con las estructuras que se quieren visualizar, o negativa, si el agente de contraste cubre la muestra sin interactuar específicamente con ningún elemento presente en ella. En la visualización de exosomas se suele emplear tinción negativa, utilizando compuestos que contienen metales pesados y que no penetran en el exosoma pero que sí lo cubre. De esta manera, al interactuar los electrones con la muestra se reconstruye la forma y el tamaño de éstos. Los agentes de tinción negativa

más usados para la caracterización de exosomas son el acetato de uranilo y el ácido fosfotúngstico [29].

1.9. Análisis elemental del contenido de exosomas

Una de las mejores técnicas de análisis elemental disponible en la actualidad para determinar el contenido metálico en muestras con EVs es la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Esta técnica permite atomizar, volatilizar e ionizar los elementos presentes en una muestra gracias a las altas energías que se alcanzan en la fuente de ionización de tipo ICP. Además, permite realizar análisis multielementales cualitativos y cuantitativos con unas sensibilidades del orden de hasta los ng L^{-1} .

2. Objetivos

El presente Trabajo Fin de Máster (TFM) se enmarca dentro del Proyecto Nacional titulado: “*Estudio de la metalostasis en enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento empleando nuevas estrategias analíticas*” (Ref. PID2019-107838RB-100) en el que se establece una colaboración entre el grupo de investigación de Espectrometría y Electroquímica BioNanoAnalíticas (E2BNA) del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo y el Instituto Universitario Fernández Vega – Fundación de Investigación Oftalmológica.

El objetivo principal del TFM aborda el estudio del contenido de Fe, Cu y Zn de exosomas secretados por una línea celular de RPE. Este objetivo general se abordará siguiendo varios objetivos más específicos:

- Establecer un modelo *in vitro* de células de RPE que simule el epitelio pigmentario de la retina, y caracterizarlo mediante técnicas de imagen.
- Establecer condiciones de cultivo idóneas para la secreción y recolección de exosomas.
- Elaborar un protocolo de purificación de exosomas del medio de cultivo que permita obtener una fracción exosómica lo más pura posible, empleando principalmente centrifugación diferencial y precipitación cuantitativa de exosomas.
- Caracterizar la fracción exosómica obtenida en la purificación para confirmar la presencia o ausencia de éstos en las muestras, empleando DLS y TEM.
- Cuantificar los niveles de Fe, Cu y Zn presentes en los exosomas producidos por células RPE mediante análisis por ICP-MS.

3. Instrumentación empleada

Para los estudios experimentales realizados en este trabajo, se ha empleado instrumentación del grupo de investigación E2BNA del Departamento de Química Física y Analítica, del grupo de investigación de Emulsiones y Fenómenos Interfaciales (GEFI) del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, del Departamento de Biología Molecular, de la Unidad de Masas de los Servicios Científico Técnico (SCTs) de la Universidad de Oviedo, y de la Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO). A continuación, se describen los equipos empleados:

- Microscopio óptico invertido LEICA DM IL LED (Leica Microsystems; FIO).
- Centrífuga 5810R (Eppendorf; FIO).
- Ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter; Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Oviedo).
- Equipo DLS Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical; grupo de investigación GEFI de la Universidad de Oviedo).
- Microscopio electrónico de transmisión JEM-2000 (JEOL; SCTs de la Universidad de Oviedo).
- Microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (JEOL; SCTs de la Universidad de Oviedo).
- Espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo ICP-MS 7900 (Agilent Technologies Inc.; SCTs de la Universidad de Oviedo).

3.1. Microscopio óptico invertido

El microscopio óptico invertido permite tomar imágenes directamente de las células de RPE en cultivo. Esto permite evaluar la propagación y confluencia de las células a medida que avanza el experimento, y monitorizar su estado en todo momento. La configuración invertida del microscopio, es decir, el hecho de que la fuente de luz se encuentre por encima de la muestra y no por debajo, permite visualizar las células RPE directamente.

El microscopio empleado en este estudio (LEICA DM IL LED) está compuesto por un sistema óptico convencional, formado por la fuente de luz, un condensador que permite concentrar el haz de luz, un diafragma que regula la cantidad de luz que atraviesa la

muestra, y una serie de lentes oculares entre las que se encuentra la lente objetivo. Además, el microscopio incorpora un sistema mecánico que sirve de soporte para todo el sistema óptico. Este modelo de microscopio también se puede acoplar a un software informático que permite tomar imágenes digitales de las muestras, en este caso el software de adquisición de imágenes Leica LAS EZ. Las partes principales del microscopio óptico invertido empleado se observan en la Figura 5.



Figura 5. Microscopio óptico LEICA DM IL LED, indicando sus partes más importantes. Imagen modificada del manual del instrumento [30]

3.2. Centrífuga y ultracentrífuga

La centrífuga empleada (5810R, Eppendorf) consiste en un tambor que incorpora un soporte para alojar el rotor de trabajo acoplado a un sistema de refrigeración que permite realizar centrifugaciones termostalizadas. El rotor de trabajo en este caso es un rotor de ángulo fijo modelo F-34-6-38 (Eppendorf), con capacidad de centrifugar de forma simultánea seis muestras de 85 mL directamente, o de 50 mL o 15 mL si se emplean los adaptadores adecuados, y que permite alcanzar RCF de hasta 18.000xg.

La ultracentrífuga empleada (Optima L-90 K) consiste en un tambor de mayor tamaño que el de la centrífuga 5810R, que incorpora un soporte para el rotor de trabajo, un sistema de vacío para realizar la centrifugación a presión reducida, y un sistema de refrigeración que también permite hacer centrifugaciones termostalizadas. El rotor empleado en las ultracentrifugaciones es un rotor basculante modelo SW 40 Ti (Beckman Coulter), con una capacidad para centrifugar seis muestras de 14 mL de forma simultánea, y que es capaz de alcanzar RCF de hasta 285.000xg; fuerzas muy

superiores a las que se pueden alcanzar con una centrífuga convencional. Este rotor a su vez requiere el uso de tubos especiales, tubos de ultracentrífuga de polipropileno de dimensiones 14x95 mm (Beckman Coulter).

3.3. Equipo de análisis por DLS

Un equipo de análisis por DLS es muy similar a cualquier espectrofotómetro, ya que presenta componentes similares como una fuente de radiación, un compartimento para las muestras, un detector de radiación, etc. Un componente característico de estos equipos es el correlacionador, la parte del instrumento que permite transformar las variaciones temporales de intensidad de radiación dispersada registradas en población de tamaños de partícula presentes en la muestra. El equipo de DLS empleado en este trabajo (Zetasizer Nano ZS) incorpora los siguientes elementos, y en la Figura 6 se puede observar un esquema de la organización de estos componentes en el propio instrumento:

- La **fuente de radiación**, que permite excitar las partículas y generar la dispersión en la que se basan las medidas. En concreto, este equipo incorpora un láser rojo que emite a una longitud de onda de 632,8 nm.
- Un **atenuador** de radiación, un dispositivo que permite modular la intensidad de la radiación láser en función de cuánto dispersen las partículas de la muestra la radiación incidente.
- Un **compartimento para alojar las muestras** a analizar. Las muestras se introducen en suspensión o disolución en una cubeta similar a las empleadas en medidas de absorbancia por espectrofotometría VIS-UV.
- Un **detector** que recibe la radiación dispersada por parte de la muestra y es un detector típico de espectrofotometría. En el equipo de trabajo, el detector se encuentra a 175° respecto a la celda de medida.
- Un **correlacionador**, que permite registrar las fluctuaciones de intensidad con el tiempo y así determinar la velocidad de variación de la intensidad, que posteriormente se asocia a un tamaño de partícula determinado.
- Un **sistema informático** que permite procesar la información generada en la medida y aportar una población de tamaños.

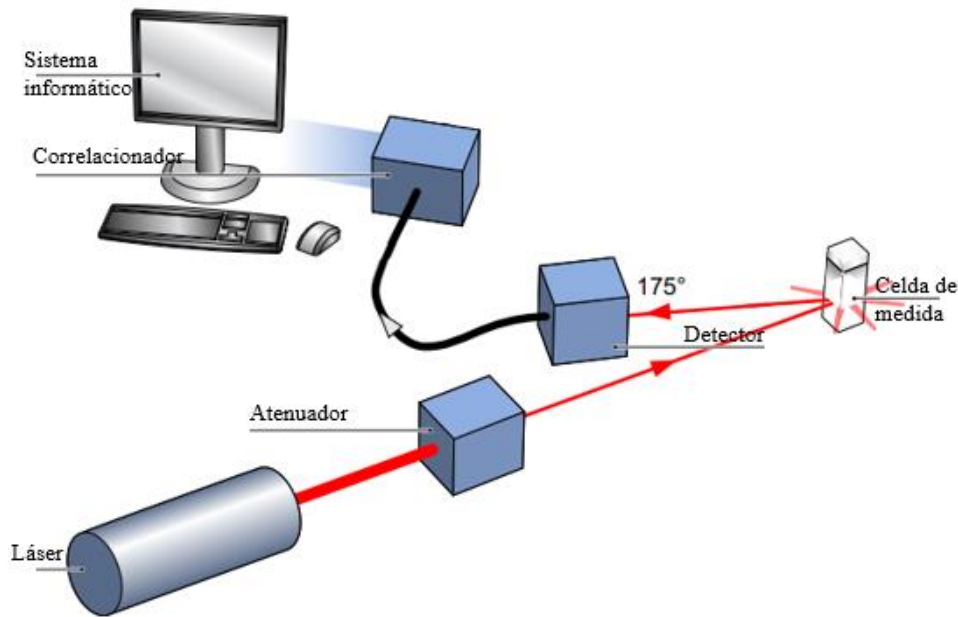


Figura 6. Esquema de los componentes de un equipo básico de análisis por DLS. Imagen modificada del manual del instrumento [31]

3.4. Microscopio electrónico de transmisión

En este trabajo se emplearon dos modelos distintos de microscopio electrónico de transmisión, ambos de la marca JEOL (modelos JEM-1011 y JEM-2000). En general, estos dos equipos presentan los mismos componentes (Figura 7) [32]:

- Un **generador del haz de electrones**, compuesto por un filamento generalmente de W acoplado a un cable que permite aplicar voltajes altos. En el modelo JEM-1011, el voltaje máximo permitido es de 100 kV, mientras que en el modelo JEM-2000, el voltaje máximo permitido es de 120 kV. Esta diferencia afectaría en la resolución máxima que pueden tener los microscopios, pero ambos tienen suficiente resolución como para tomar imágenes de buena calidad de exosomas.
- Un **sistema de lentes de aceleración y condensación** que permiten acelerar los electrones hasta que éstos adquieran la energía cinética deseada para atravesar la muestra, y permiten concentrar el haz de electrones y evitar que se disperse en el espacio. Estas lentes suelen ser metálicas, normalmente de Cu, y generan este efecto en el haz de electrones por la aplicación de diferentes voltajes eléctricos.
- El **soporte de la muestra**, consiste en una cámara que sirve de interfase entre la presión atmosférica del exterior del equipo y el alto vacío del interior del equipo. En este caso, la muestra se coloca sobre una rejilla de Cu recubierta de una

lámina de C transparente a los electrones, y esta rejilla se coloca en una vara metálica con un soporte en uno de sus extremos, de manera que esta vara se introduce en la precámara y, una vez la muestra está adecuadamente colocada, se reduce el vacío de la cámara progresivamente hasta alcanzar el alto vacío del cañón de electrones.

- Un **sistema de lentes de amplificación y objetivo**, que permite recoger el haz de electrones transmitido y/o dispersado a través de la muestra y amplificarlo para posteriormente generar la imagen de interés. De nuevo, estas lentes suelen ser metálicas y permiten modular el haz de electrones por la aplicación de voltajes eléctricos.
- Un **sistema de generación de la imagen**, un dispositivo que permite transformar el haz de electrones incidente en una imagen correspondiente con la muestra. El sistema de generación de la imagen que incorporan los microscopios JEM-1011 y JEM-2000 es una pantalla fluorescente, para generar una primera imagen que se puede observar directamente con un binocular que incorpora el propio instrumento, y una cámara CCD, para generar la imagen digital que se observa en el sistema informático.
- Un **sistema de refrigeración**.
- Un **sistema de generación de alto vacío**, que consiste en una bomba turbomolecular que permite generar presiones muy reducidas en el cañón de electrones, necesarias para evitar que el haz de electrones que permite generar la imagen se desvíe por colisiones con moléculas de gas residual.

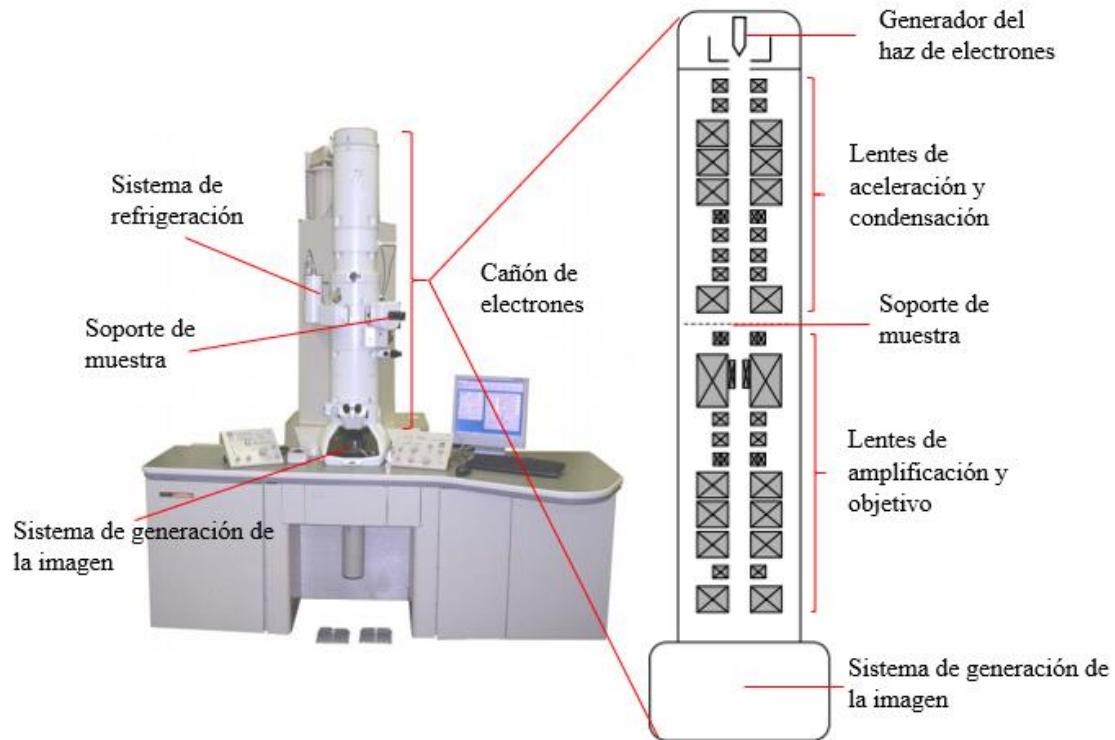


Figura 7. Esquema ilustrativo de las partes de un microscopio electrónico de transmisión. En la imagen se ilustra el microscopio JEOL JEM-2100, modelo muy similar a los microscopios empleados en el presente trabajo. Imagen modificada del manual del instrumento [33].

3.5. ICP-MS

Un equipo ICP-MS genérico tiene una serie de componentes comunes, entre los cuales se encuentra el sistema de introducción de muestra, el sistema de nebulización, el plasma de acoplamiento inductivo, la interfase de extracción, el conjunto de lentes de focalización de iones, el analizador de masas y el detector. En este trabajo se emplea el equipo ICP-MS Agilent modelo 7900, que se puede observar de forma esquematizada en la Figura 8, y que presenta las siguientes características [34]:

- En vez de emplear la bomba peristáltica que incorpora el propio equipo como sistema de introducción de muestra, se empleó un **sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)** que permite trabajar con volúmenes de muestra muy pequeños, algo que interesa en este estudio debido a la limitada cantidad de muestra disponible. Se acopla una válvula de seis vías a la bomba peristáltica del equipo, de manera que se establece una corriente continua de disolvente que entra al plasma ICP y se introduce un volumen de muestra determinado (que en este caso es de 5 μL) únicamente cuando la válvula está en posición de inyección.

- El **sistema de nebulización** consiste en un nebulizador neumático concéntrico de cuarzo tipo Meinhard acoplado a una cámara de nebulización refrigerada, para favorecer en conjunto la formación de un aerosol de gotas pequeñas de la disolución de muestra, fácilmente volatilizables y que no ponen en riesgo la integridad del plasma.
- El **plasma ICP**. La antorcha que permite formar el plasma consiste en tres conductos concéntricos de cuarzo rodeados en el extremo terminal de una bobina de radiofrecuencias de Cu, y por los cuales pasan diferentes flujos de Ar de elevada pureza.
- La **interfase de extracción** permite reducir la presión del sistema desde la presión atmosférica a la que se encuentra el plasma hasta el alto vacío al que se encuentra el analizador de masas. Esta interfase consiste en dos piezas metálicas con forma cónica conocidas como cono *sampler* y cono *skimmer* que incorporan un agujero de diámetro micrométrico (*sampler* ~ 1 mm, *skimmer* ~ 450 μm) en la punta a través de los cuales se transmiten los iones generados en el plasma.
- Un **sistema de lentes** electromagnéticas que se encuentran sometidas a unos potenciales determinados, de manera que fotones y especies neutras (elementos que se encuentran en el haz iónico y que contribuirían a aumentar el ruido de fondo) se eliminan del haz de iones, reduciendo así el ruido instrumental.
- Una **celda de colisión**, situada entre la antorcha y el analizador de masas, y empleada para eliminar o reducir la presencia de especies poliatómicas que puedan interferir en la medida. Se basa en un n-polo presurizado con un gas de colisión (He o H₂), de manera que las moléculas de este gas chocan con las especies poliatómicas que se forman en el plasma e inducen su disociación.
- El **analizador de masas**, que en este equipo es un cuadrupolo. El cuadrupolo es un dispositivo que consiste en cuatro varas metálicas dispuestas paralelamente dos a dos formando un prisma de base cuadrada, y conectadas entre sí dos a dos de forma alterna. El paso de los iones a través de este analizador se puede controlar modulando la intensidad de corriente que pasa a través de las varas metálicas, ya que los iones adquieren trayectorias estables que les permiten atravesar el cuadrupolo únicamente a un rango de intensidades de corriente muy corto, intensidades que son proporcionales al valor de m/z de estos iones.
- El **detector**, que recoge los iones que llegan del analizador de masas y permite generar un espectro de masas elemental junto con el sistema informático. El

detector empleado en el equipo Agilent 7900 es un multiplicador de electrones secundarios, un dispositivo que genera un chorro de electrones, es decir, una corriente eléctrica intensa, por cada impacto que recibe de un ion procedente del analizador de masas. Este tipo de detectores permite trabajar en modo digital, registrando la intensidad de cada ion en el espectro como cuentas por segundo, o en modo analógico, registrando la intensidad de cada ion como corriente eléctrica registrada en el detector.

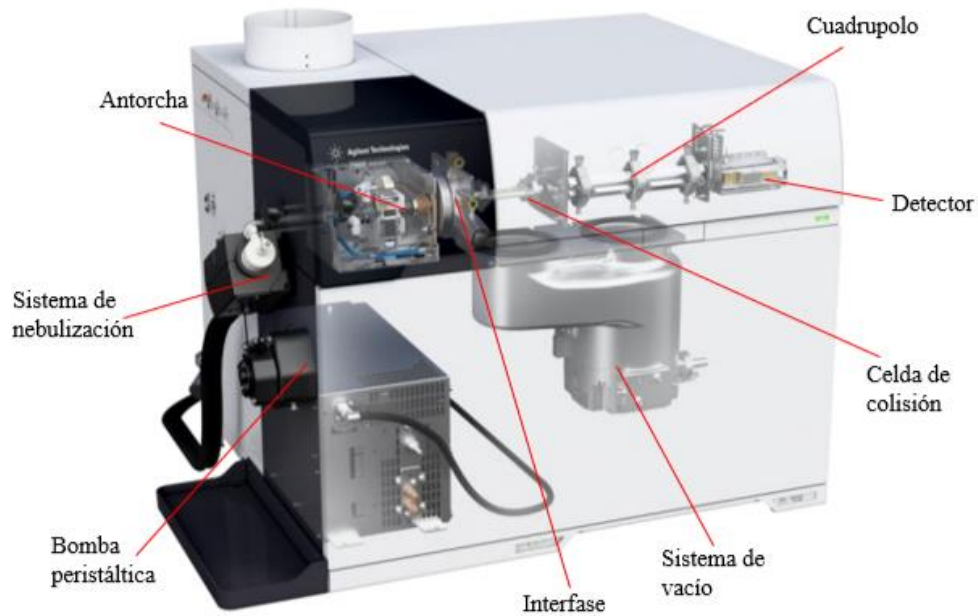


Figura 8. Ilustración del instrumento ICP-MS Agilent 7900 y sus componentes. Imagen modificada del manual del instrumento [35].

4. Procedimientos experimentales

4.1. Establecimiento y caracterización del modelo *in vitro* de RPE

En este TFM se ha utilizado una línea celular de RPE humano establecida a partir de un cultivo primario de células epiteliales de la retina procedentes del ojo de un donante *post mortem*, inmortalizadas mediante transfección con el virus SV40 y denominadas HRPE-SV40. Las células inmortalizadas se siembran en *flasks* de diferente superficie para su proliferación en presencia de medio DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific.) suplementado con FBS (Thermo Fisher Scientific.) al 10% (v/v) y una mezcla 1:1 de penicilina:streptomicina (Fisher Scientific.) al 1% (v/v). Una vez se alcanza la confluencia o grado de desarrollo celular deseado para realizar los experimentos de interés, el medio de proliferación se sustituye por medio de producción, que consiste en medio DMEM/F12 con las mismas características pero al cual se le añaden otros suplementos sustitutos del FBS en el cultivo. Este cambio permite eliminar contaminación de EVs de la muestra, ya que el FBS empleado en la preparación del medio de cultivo contiene de forma natural exosomas. En este trabajo se evalúan dos suplementos libres de exosomas diferentes:

- **Exosome depleted-FBS** (Thermo Fisher Scientific.) (exdep-FBS), una disolución comercial de FBS a la cual se le han eliminado previamente $\geq 95\%$ de los exosomas.
- **B-27TM** (Thermo Fisher Scientific.), un suplemento que se emplea en cultivos celulares de células neuronales y que está libre de exosomas.

Así, la composición de medio DMEM/F12 se mantiene exactamente igual, y se cambia el 10% de FBS por 10% de exdep-FBS o bien por 2% de B-27TM. Una vez se añade el medio de producción a las células de HRPE-SV40 en cultivo, éste se mantiene durante 72 h y cada fracción se almacena independientemente. Las células se mantienen en todo momento en un incubador (Forma direct Heat CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C, en oscuridad y con un 5% de CO₂, y su manipulación se realiza en una cabina de flujo laminar

4.2. Purificación de exosomas

Uno de los puntos principales de este TFM es la elaboración de un protocolo de purificación de exosomas óptimo que permita aislar los exosomas presentes en un medio de cultivo del resto de componentes del medio. Por un lado, se pretende purificar los exosomas por diffUC, y para ello se parte de un protocolo previamente publicado por Théry, C. *et al.*, 2006 [36] con el que se han obtenido buenos resultados en otros trabajos como el realizado por Biasutto, L. *et al.*, 2013 [37] o Klingeborn, M. *et al.*, 2017 [38]. Además, con el objetivo de optimizar este protocolo para obtener fracciones de EVs de células HRPE-SV40 más puras en exosomas, se añaden pasos adicionales al protocolo de centrifugación, apoyados por los trabajos de Atienzar, S. *et al.*, 2016 y 2018 [39, 40].

Además de evaluar la purificación por diffUC, se pretende evaluar un protocolo de purificación por QPrec, empleando para ello una disolución comercial conocida como ExoQuick-TC (System Biosciences). En este caso, se sigue el protocolo de purificación que indica la casa comercial. Tanto el protocolo de purificación por diffUC como el protocolo de purificación por QPrec se describen a continuación, y están referidos a la muestra de estudio que en este caso son los medios de producción obtenidos de las células HRPE-SV40 en cultivo.

4.2.1. Centrifugación diferencial

El protocolo de purificación por diffUC se basa en someter al medio de producción recogido de los cultivos de células HRPE-SV40 tras 72 h a sucesivas y crecientes RCF. De manera resumida, el protocolo de purificación seguido por diffUC en el presente TFM se describe a continuación:

- 1) Someter al medio de producción a 300xg durante 10 min; para eliminar células muertas.
- 2) Descartar el “pellet” formado en el paso anterior y someter al sobrenadante a 2000xg durante 20 min; para eliminar restos celulares de gran tamaño.
- 3) Descartar el “pellet” formado y someter al sobrenadante a 10.000xg durante 30 min; para eliminar restos celulares de pequeño tamaño.
- 4) Descartar el “pellet” y someter al sobrenadante a 40.000xg durante 30 min; para eliminar EVs de gran tamaño.

- 5) Descartar el “pellet” y someter al sobrenadante a 100.000xg durante 1h 10 min; para sedimentar exosomas.
- 6) Resuspender el “pellet” formado en tampón fosfato salino (PBS) y someter al resuspendido a 100.000xg durante 1h 10 min; para lavar la fracción exosómica purificada.
- 7) Resuspender el “pellet” en 100 μ L de PBS y filtrar con un filtro de jeringa de 0,22 μ m de tamaño de poro; para eliminar EVs de tamaño mayor a 220 nm.

El protocolo original de purificación por diffUC extraído del trabajo de Théry, C. et al., 2006 [36] contempla los pasos 1, 2, 3, 5 y 6 anteriormente indicados. Los pasos 4 y 7 del protocolo son los pasos adicionales propuestos en la optimización de dicho protocolo. Los tres primeros pasos de centrifugación se pueden realizar en la centrífuga 5810R (Sección 3.2.), mientras que los últimos pasos de centrifugación se deben realizar en la ultracentrífuga Optima L-90K (Sección 3.2). El “pellet” resuspendido en 100 μ L de PBS se puede emplear directamente para su caracterización o se puede almacenar a 4 °C hasta posteriores análisis.

Cuando se trabaja con una ultracentrífuga hay que prestar especial atención en la preparación de las muestras, para evitar problemas de distribución desequilibrada de cargas. Los tubos de ultracentrífuga se deben llenar hasta arriba y deben tener la misma masa dos a dos en al menos las dos primeras cifras decimales, es decir, con un error máximo de $\pm 0,001$ g. En el caso de que no sea posible llenar los tubos con la propia muestra, se emplea PBS.

4.2.2. Precipitación cuantitativa

Antes de proceder con la purificación por QPrec, se centrifugan los medios de producción a 3000xg durante 15 min para eliminar células muertas. Una vez acondicionado el medio de producción, se añade la disolución de precipitación ExoQuick-TC de manera que haya una proporción 1 mL/5mL o 2 mL/10 mL de ExoQuick-TC/medio de producción. Se homogeneiza bien la mezcla volteando el recipiente que la contiene y se deja incubar a 4 °C como mínimo durante 12 h, asegurando que los recipientes se mantienen erguidos durante este paso y no están tumbados. Una vez pasado el tiempo de incubación, el resultante se centrifuga a 1500xg durante 30 min para forzar la sedimentación de los exosomas, y se recoge el

sobrenadante. El sobrenadante se recentrifuga a 1500xg durante 5 min para asegurar que no quedan exosomas, y los “pellets” formados se resuspenden en una única fracción de 100 μ L de PBS. De nuevo, las fracciones exosómicas aisladas se pueden analizar directamente o se pueden almacenar a 4 °C.

4.3. Caracterización de exosomas

4.3.1. DLS

La caracterización de las fracciones exosómicas por DLS se realiza sin preparación de la muestra. Para ello, se emplea una cubeta de plástico adaptada al equipo, la cual se llena hasta la altura adecuada (entre 100 y 150 μ L de muestra es suficiente), y se proceden a las medidas. Además de estar bien lavada con agua destilada, la cubeta tiene que estar libre de partículas de polvo, y para ello se pasa una corriente de aire a presión por la cubeta antes de las medidas.

Para las medidas por DLS hay que fijar previo al análisis el índice de refracción de la partícula (entre 0,28 y 0,32 para el caso de los exosomas), la temperatura de medida (4 °C, para evitar la degradación de los exosomas), y el tiempo de acondicionamiento de la muestra previo a las medidas (3 min). Una vez fijados estos parámetros, el instrumento ajusta la apertura del atenuador, y se define el número de réplicas que se van a realizar por cada medida independiente (generalmente, entre 12 y 17 réplicas). Para cada muestra, el equipo DLS aporta tres poblaciones de tamaños de partícula independientes, resultantes del promedio de estas réplicas.

4.3.2. TEM

Para poder obtener imágenes por TEM de los exosomas presentes en las muestras de interés, éstas tienen que ser procesadas. Para ello, se colocan 20 μ L de la muestra sobre la rejilla de soporte, y se deja reposar al aire durante 20 min. El exceso se seca, y sobre la misma rejilla se añaden 50 μ L de una disolución acuosa de ácido fosfotúngstico al 2% (p/v) y se deja reposar al aire durante 1 min, para teñir las vesículas presentes en la muestra y permitir que se puedan tomar imágenes de éstas por microscopía TEM. Una vez transcurrido este tiempo, se seca el exceso durante 10 minutos y la muestra estaría lista para el análisis.

4.4. Análisis elemental por ICP-MS

Una vez se han purificado los exosomas de los medios de producción y se han caracterizado las muestras por DLS y TEM, la porción del medio sobrante podría ser analizada por ICP-MS para determinar el contenido de Fe, Cu y Zn en los exosomas. Para la determinación de estos metales, se ha llevado a cabo un calibrado externo (con patrón interno) con disoluciones patrón de concentración conocida y un sistema de introducción de la muestra FIA que incorpora un bucle de inyección de 5 μL . En este caso, el elemento que actuará como patrón interno es Ga, y en todas las disoluciones de medida se adicionará en una concentración final de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Antes de proceder a analizar los patrones del calibrado y las fracciones exosómicas purificadas, es imprescindible optimizar parámetros instrumentales del ICP-MS. Para ello, se introduce en el equipo por autoaspiración una disolución multielemental de Li, Y, Ce y Tl en concentración 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, con el objetivo de asegurar la máxima sensibilidad en las medidas, así como para controlar la formación de óxidos y especies doblemente cargadas. Los parámetros experimentales óptimos adoptados en los análisis mediante ICP-MS, además de los parámetros de adquisición de datos, se reflejan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros optimizados en el análisis por ICP-MS para los patrones del calibrado y las muestras que contienen exosomas.

Potencia de RF / W	1550
Flujo de gas plasmógeno / L min^{-1}	15,0
Flujo de gas auxiliar / L min^{-1}	0,90
Flujo de gas de colisión (He) / mL min^{-1}	4,5
Isótopos monitorizados	$^{56,57}\text{Fe}$, $^{63,65}\text{Cu}$, $^{64,66}\text{Zn}$, ^{69}Ga
Modo de medida	Time Resolved Analysis (TRA)
Flujo de disolución portadora / mL min^{-1}	0,32
Tiempo de integración / s	0,05

El calibrado se construye preparando un blanco y seis patrones con un rango de concentraciones desde los 25 hasta los 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu y Zn, y desde los 100 hasta los 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fe, en HNO_3 al 1%. Los niveles de los metales de estudio en los patrones son elevados respecto a niveles con los que se suele trabajar en un análisis por

ICP-MS, pero antes de introducirse en el instrumento los patrones se diluyen con la disolución portadora del sistema FIA, que es HNO₃ al 1% en agua MilliQ, por lo que la concentración de los metales disminuye considerablemente. Por otro lado, las muestras no se analizan directamente, sino que se prepara una disolución muestra con patrón interno mezclando 19 µL de la muestra con 1 µL de una disolución de Ga 600 µg L⁻¹ en HNO₃ al 20% (v/v). Para preparar todas estas disoluciones, se disponen de disoluciones patrón comerciales de Fe, Cu, Zn y Ga de 1000 mg L⁻¹, además de HNO₃ ultrapuro (Trace Metals Grade) al 67-69% y agua MilliQ.

5. Resultados y discusión

5.1. Establecimiento de los cultivos celulares de HRPE-SV40. Puesta a punto para la producción de exosomas

Siempre que se establece un modelo de cultivo, se siguen los pasos indicados en la Sección 4.1. El seguimiento y caracterización morfológica del modelo *in vitro* de células HRPE-SV40 se realiza adquiriendo imágenes de las células con el microscopio invertido. Se toman fotos de las células en el momento en que se cambia el medio de cultivo a medio de producción y, posteriormente, en el momento en que se recoge el medio de producción tras el tiempo de incubación. La situación ideal, al menos a priori, en cuanto al cultivo celular para cambiar el medio de cultivo a medio de producción sería la reflejada en la Figura 9.A. Como se puede observar, las células tienen una morfología alargada, y se observan algunos huecos, de manera que este cultivo de células no está completamente proliferado, y todavía se puede alcanzar un mayor grado de confluencia. Cuando las células presentan este aspecto, se estima que presentan un 70-80% de confluencia.

Aunque esta sea la situación a priori ideal de producción de exosomas en cuanto al modelo *in vitro*, a lo largo de este estudio se han evaluado otras situaciones, como la superconfluencia, reflejada en la Figura 9.B. La superconfluencia, o >90% de confluencia, se caracteriza por un número elevado de células muy juntas, ocupando todo el espacio del *flask* de cultivo. Esta situación puede ser interesante, ya que en principio cuanto mayor número de células se incuben en medio de producción más exosomas se

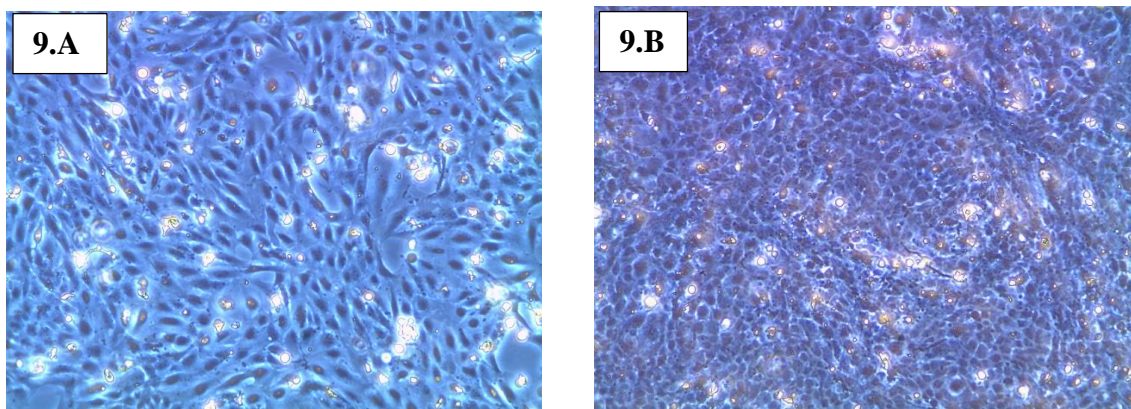


Figura 9. Células HRPE-SV40 en fase 16 en un 70-80% de confluencia (A) y en fase 14 en un >90% de confluencia (B). Imágenes tomadas con el microscopio Leica DM IL LED el 10.05.21

generarán. Sin embargo, las situaciones de superconfluencia pueden inducir la senescencia de las células, y por tanto reducir el tiempo de trabajo efectivo con ellas, por lo que podría ser una situación perjudicial.

5.2. Purificación de exosomas y optimización del protocolo

5.2.1. Evaluación del protocolo de purificación de exosomas por centrifugación diferencial

El primer experimento de purificación de exosomas se realiza con el objetivo de evaluar la validez práctica del protocolo de purificación por diffUC (Sección 4.2.1.) en cultivos celulares de células HRPE-SV40. Las células de HRPE-SV40 se sembraron en seis *flasks* T25 (superficie de 25 cm²), tres incubados con suplemento exdep-FBS y otros tres con suplemento B-27TM. Las células se dejaron desarrollar hasta una confluencia de 70-80%, recogándose tras 72 h los medios de cultivo combinados: una fracción de 15 mL de medio con exdep-FBS y otra fracción de 15 mL de medio con B-27TM. Como se emplean paralelamente los dos suplementos sustitutos del FBS, con este experimento también se pretende evaluar posibles diferencias en la proliferación celular debidas a la presencia de suplementos diferentes en el medio de producción.

Una vez pasado el tiempo de incubación, los medios correspondientes se recogieron y se sometieron al protocolo de purificación por diffUC. Además, también se purificó siguiendo este protocolo un control negativo para cada suplemento, que consiste en 15 mL de medio de producción que no ha sido incubado con células HRPE-SV40, para evaluar la presencia o ausencia de exosomas en el medio de producción que pudiesen contaminar las muestras. Las fracciones exosómicas purificadas y resuspendidas en PBS se caracterizaron por DLS, para determinar las poblaciones de tamaños de vesículas presentes en las muestras analizadas.

De manera paralela a este experimento, se establece un experimento idéntico, pero con la única diferencia de que los medios de producción recogidos tras el incubado con las células HRPE-SV40 se almacenan durante una semana a 4 °C antes de someterlos a la purificación. Con este experimento lo que se pretende es evaluar si el almacenamiento en frío de las muestras induce la degradación de los exosomas presentes en éstas, o si bien no afecta en nada a su integridad. Aunque la situación ideal hubiese sido que todos los *flasks* T25 tuviesen las células HRPE-SV40 con una confluencia homogénea del 70-80%, se trabajó con dos confluencias distintas. En concreto, de los seis *flasks* de trabajo,

dos se encontraban en un estado de superconfluencia, mientras que otro de ellos se encontraba en un estado de poca confluencia, y el resto con una confluencia del 70-80%. Estas diferencias de confluencia introducirían una nueva variable a la hora de estudiar la producción de exosomas, pero no es uno de los objetivos buscados en este experimento. A la hora de recoger los medios de producción, las distintas fracciones se juntan de manera que se normalice lo máximo posible el número aproximado de exosomas por muestra.

Una vez pasado el tiempo de incubación y el tiempo de almacenado, las muestras se sometieron a la pertinente purificación por diffUC y las fracciones exosómicas obtenidas se caracterizaron también por DLS. Los resultados experimentales (los espectros % número partícula vs. tamaño) obtenidos por DLS para estas muestras se encuentran en la Sección A1.1. del Anexo del TFM. Respecto a estas muestras, se observa tanto en las células incubadas con exdep-FBS como en las células incubadas con B-27TM una población de tamaños de vesículas de entre 100-300 nm (en la Figura 10 se refleja un espectro de DLS que ilustra estos datos; para más detalle, consultar Sección A1.1 del Anexo).

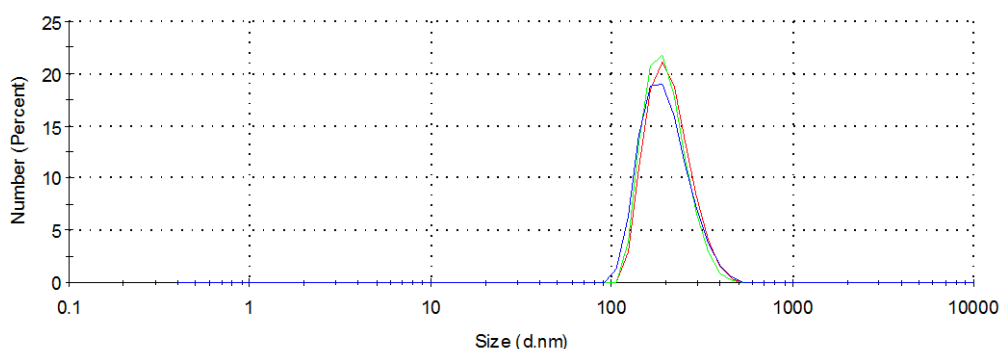


Figura 10. Espectro obtenido en el análisis por DLS de la fracción exosómica purificada por diffUC del medio de producción suplementado con B-27TM incubado con células HRPE-SV40, y caracterizado directamente después de la purificación.

En la bibliografía disponible se han encontrado poblaciones de vesículas purificadas de medios de cultivo procedentes de la incubación con células ARPE-19, una línea celular de RPE muy similar a HRPE-SV40, en condiciones similares a las de este trabajo de diferentes tamaños, pero lo común es encontrar poblaciones en torno a 10-100 nm para exosomas, como se han obtenido en el trabajo de Lyu, T. S. *et al.*, 2021 [41] o en el estudio de Palmieri, V. *et al.*, 2014 [42]. Así, en las muestras analizadas en este experimento se obtiene un tamaño de EVs superior al que se esperaba. Esto puede dar una idea de que, o bien las muestras no contienen exosomas o están poco concentradas

en exosomas, o bien hay una variedad grande de vesículas en cuanto a tamaño, de manera que la presencia de vesículas grandes enmascara la presencia de vesículas pequeñas y por tanto impide identificar la presencia de exosomas por DLS. Estos resultados también pueden indicar que hay agregados de proteínas o de exosomas en la muestra, ya que la agregación de estas partículas es algo que se ha observado que ocurre cuando se sigue un protocolo de purificación de exosomas por diffUC.

Por otro lado, se obtuvieron resultados por DLS parecidos en cuanto a población de tamaños para las muestras analizadas tras la purificación y las almacenadas a 4 °C (Sección A1.1 del Anexo), hecho que a priori permite determinar que el paso de almacenado en frío de las muestras no compromete la estabilidad de los exosomas presentes. Por último, en los controles negativos analizados se observan poblaciones de partículas por debajo de los 10 nm (Sección A1.1. del Anexo), dato que indica que los controles no contienen exosomas endógenos o bien los contienen en muy poca cantidad.

Para obtener más información acerca de la presencia de exosomas en las muestras estudiadas, y poder determinar a qué se deben los resultados obtenidos por DLS, estas muestras fueron analizadas por TEM. Como a priori se observa un comportamiento muy similar en todos los aspectos del protocolo experimental usando tanto exdep-FBS como B-27TM, únicamente se analizan las muestras suplementadas con exdep-FBS por TEM, y se asume que su comportamiento se puede extrapolar a la suplementación con B-27TM. Los resultados obtenidos del análisis por TEM para las muestras suplementadas con exdep-FBS se pueden observar en la Figura 11. Los resultados que se pueden esperar por TEM de muestras que contienen exosomas sometidas a tinción negativa son imágenes de partículas de tamaños en torno a los 30-100 nm, con forma esferoide u ovalada, y con el borde más oscuro que la parte interna, aspecto que indicaría que estas partículas tienen estructura membranosa (descrito en la bibliografía como forma de taza) [43].

Teniendo esto presente, y a partir de las imágenes obtenidas en el análisis de las muestras, se confirma la presencia de exosomas en los medios de producción, y la ausencia de exosomas en el control negativo. En las imágenes de TEM que se muestran en las Figuras 11.A y 11.B se observan estos cuerpos con forma esférica y naturaleza membranosa y con un diámetro en torno a los 30 nm, aunque también se aprecian vesículas de mayor tamaño. Así, los resultados obtenidos previamente en el análisis por DLS de estas muestras se pueden justificar por la presencia de EVs de mayor tamaño, y

no por la ausencia de exosomas en la muestra o por la formación de agregados de éstos. Por otro lado, la presencia de estas estructuras membranosas en la Figura 11.B confirma que el almacenamiento del medio de producción a 4 °C, al menos durante 1 semana, no compromete la estructura de los exosomas.

En la Figura 11.C no se observan estructuras membranosas de este tipo, sino que se observan manchas de diámetro superior a los 500 nm que pueden ser generadas por interacciones inespecíficas de elementos del medio de cultivo con el agente de tinción, lo que confirma que el medio de producción no contiene una cantidad suficientemente grande de exosomas como para contaminar las muestras. Otro aspecto que se puede destacar de estas imágenes es que la Figura 11.B presenta un mayor número de exosomas que la Figura 11.A. Esto puede deberse a las diferencias de confluencia que presentaban las células de las que se extrajo el medio de producción que se almacenó a 4 °C.

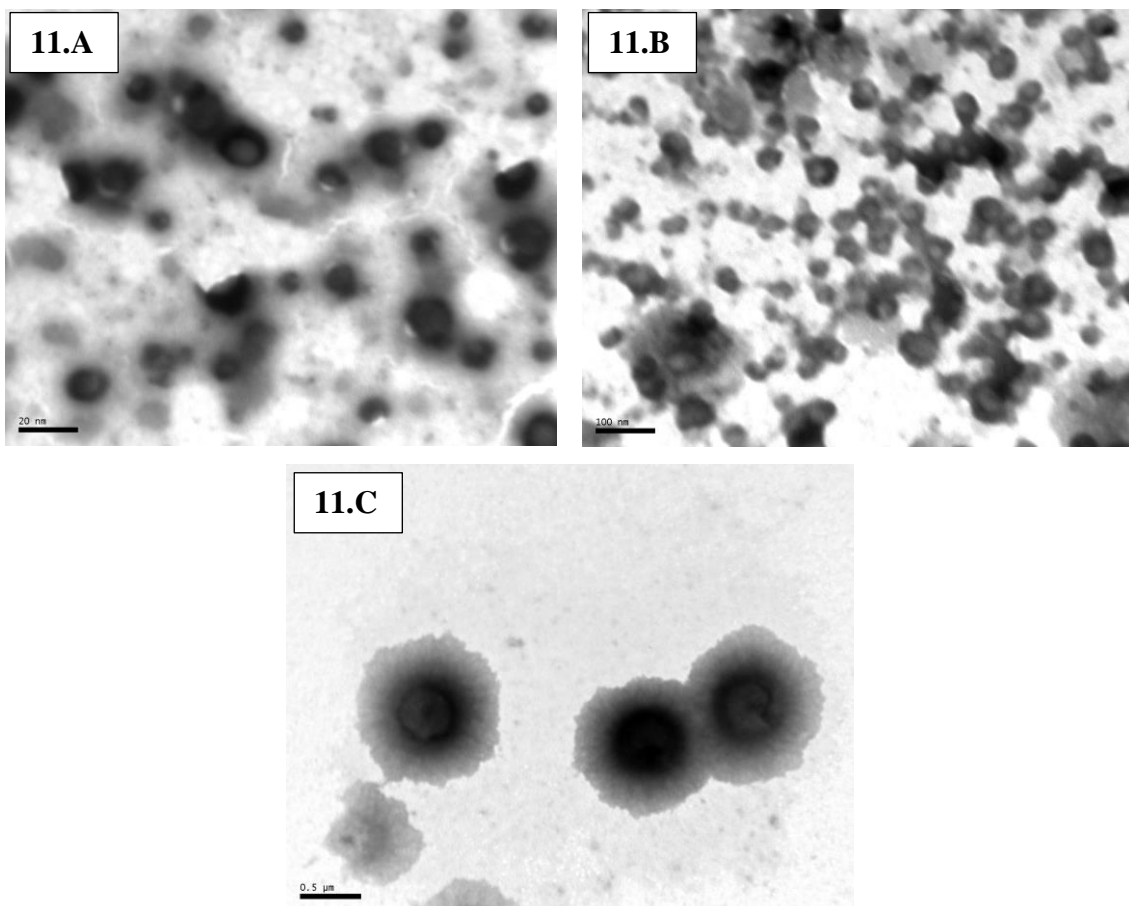


Figura 11. Imágenes obtenidas en el análisis por microscopía TEM de las fracciones exosómicas purificadas de medios de producción suplementados con exdep-FBS e incubados con cultivos celulares de HRPE-SV40: fracción exosómica fresca (A), con una escala de 20 nm; fracción exosómica almacenada en frío (B), con una escala de 100 nm; control negativo (C), con una escala de 0,5 μm. Imágenes tomadas con el microscopio JEOL JEM-2000 el 17.05.21.

5.2.2. Evaluación del rendimiento de purificación de exosomas con el volumen del medio de producción

Una vez confirmada la presencia de exosomas en las muestras sometidas a purificación por diffUC, los siguientes experimentos fueron diseñados con el objetivo de optimizar el protocolo de purificación para obtener una fracción exosómica más pura. Uno de los primeros aspectos que se pretende evaluar es, si al aumentar el volumen de medio de producción inicial a purificar, así como el número de células HRPE-SV40 en cultivo, se aumenta la concentración de exosomas. Si se aumenta lo suficiente la población de exosomas, quizás se podrían registrar poblaciones de tamaños de partícula por DLS acordes con los tamaños característicos de exosomas, o bien puede que se siga manteniendo el enmascaramiento de los exosomas por vesículas de mayor tamaño. La evaluación de diferentes volúmenes iniciales de medio de producción es una medida indirecta de la eficacia de detección de exosomas por DLS en función de la concentración de partículas, ya que en principio cuanto mayor sea el *flask* de cultivo empleado (y por tanto, mayor sea el volumen de medio de producción recogido), mayor número de células activas habrá en el estado de 70-80% de confluencia y por tanto mayor actividad secretora habrá.

El planteamiento del experimento consiste en sembrar células HRPE-SV40 en *flasks* de diferente superficie, dejar que proliferen las células hasta la confluencia deseada e incubar los medios de producción con las células durante el tiempo previamente indicado. En concreto, se utilizan *flasks* T25, T75, y T150 (superficies de 25, 75 y 150 cm², respectivamente), y se siembran tres réplicas de cada *flask*, de manera que al final se trabaja con volúmenes de 15, 45 y 75 mL de medio, respectivamente. Así, en este experimento se caracterizarán tres fracciones exosómicas resuspendidas en PBS, una para cada volumen de medio evaluado. Además, se caracterizará una cuarta muestra, un control positivo que en principio contiene exosomas y que consiste en 15 mL de medio de cultivo con un 40% de FBS normal. Teniendo presentes los resultados obtenidos en el experimento anterior, a la vista de que el uso del suplemento B-27TM no introduce diferencias en ningún punto del protocolo experimental respecto al uso del suplemento exdep-FBS, en adelante sólo se evaluaron medios de producción suplementados con exdep-FBS.

Una vez pasado el periodo de incubación y realizada la purificación por diffUC de exosomas de los medios de producción recogidos, las fracciones exosómicas obtenidas se caracterizan por DLS. Los resultados experimentales obtenidos (los espectros) están recogidos en la Sección A1.2. del Anexo. Para todas las muestras analizadas, se obtuvieron poblaciones de partículas de tamaños entre 100-300 nm, demasiado grandes como para confirmar la presencia de exosomas en la muestra. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos en el experimento reflejado en la Sección 5.2.1., en el cual se confirmó que la ausencia de una población de tamaños de partícula menor a 100 nm se debía al enmascaramiento de los exosomas por la presencia de EVs más grandes en la muestra. Se confirma por tanto que el problema de detección de exosomas por DLS no es la concentración de éstos en la muestra, sino la presencia de EVs de mayor tamaño que los exosomas. Así, se introduce la necesidad de optimizar el protocolo de purificación de exosomas por diffUC, con el objetivo de discriminar mejor los exosomas del resto de EVs de mayor tamaño, y así poder confirmar su presencia en un análisis por DLS.

Otro aspecto que se observa del análisis por DLS es que al caracterizar las poblaciones de tamaños de partícula en el control positivo, se observan tamaños por debajo de 10 nm, resultados parecidos a los que se obtuvieron en el control negativo analizado en la Sección 5.2.1., en el cual se confirmó por TEM que no había exosomas. Así, se puede determinar también que el medio de cultivo con un 40% de FBS normal no sirve como control positivo, bien porque el protocolo de purificación de exosomas no es capaz de aislar de forma eficiente los exosomas de este medio, o bien porque no contiene una cantidad de exosomas apreciable por DLS. Se puede tener en cuenta para futuros experimentos evaluar FBS normal puro como control positivo, muestra en la cual en principio habría una concentración elevada de exosomas.

5.2.3. Optimización del protocolo experimental de purificación de exosomas por centrifugación diferencial

Posteriormente, se diseñó un nuevo experimento con el objetivo de evaluar la eficacia de purificación de exosomas por diffUC añadiendo pasos adicionales al protocolo de aislamiento, en busca de obtener una fracción exosómica más pura. Las modificaciones del protocolo que se evaluaron en este experimento se reflejan en la Sección 4.2.1.,

concretamente los pasos 4 y 7 del protocolo; la centrifugación a 40.000xg y el filtrado de la muestra por un filtro de jeringa de 0,22 μm de tamaño de poro.

Para evaluar si el paso adicional de filtrado mejora los resultados de caracterización de las muestras por DLS, las fracciones exosómicas purificadas en el experimento anterior (Sección 5.2.2.) se filtraron, y las disoluciones resultantes se caracterizaron por DLS, obteniendo los resultados reflejados en la Sección A1.3. del Anexo. Los resultados obtenidos reflejan la eficacia del filtrado en cuanto a discriminación de los exosomas respecto de EVs de gran tamaño, al observarse en las tres muestras poblaciones de tamaños de partícula menores respecto a las muestras sin filtrar. Sin embargo, aun teniendo en cuenta el paso adicional de filtrado, en las fracciones exosómicas purificadas tanto de los 15 mL de medio como de los 75 mL de medio, se han registrado poblaciones en torno a los 70-200 nm. En este rango de tamaños se podrían incluir exosomas, pero al ser un rango intermedio entre exosomas y EVs de mayor tamaño dificultaría la confirmación de exosomas en estas muestras.

En la fracción exosómica purificada de los 45 mL de medio, se registran poblaciones de tamaños que sí se pueden relacionar directamente con la presencia de exosomas en la muestra, tamaños entre 20-50 nm (Figura 12; para más detalle, consultar sección A1.3. del Anexo). Este resultado es un indicativo de la importancia de la concentración de exosomas en la muestra a la hora de caracterizar las fracciones exosómicas por DLS.

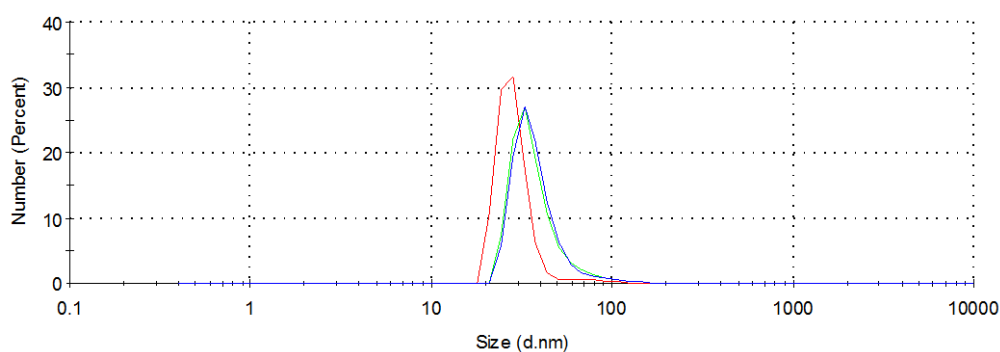


Figura 12. Espectro obtenido en el análisis por DLS de la fracción exosómica purificada por diffUC y filtrada, de 45 mL de medio de producción suplementado con exdep-FBS e incubado con células HRPE-SV40.

Trabajando con un volumen de 15 mL y una confluencia del 70-80% de las células HRPE-SV40, parece que no se genera la cantidad suficiente de exosomas como para que se detecten poblaciones de tamaños de partícula por DLS que se puedan asociar directamente a la presencia de exosomas. Sin embargo, con un volumen de 45 mL de medio y condiciones similares de cultivo sí que se genera la cantidad de exosomas

adecuada. Así, se puede determinar que como mínimo se debe trabajar con 45 mL de medio de producción inicial para tener una cantidad de exosomas suficiente para confirmar su presencia por DLS. El paso final de filtrado de las muestras debe tenerse también en cuenta, para mejorar la pureza de la fracción exosómica en la muestra. Este mismo experimento se podría repetir evaluando volúmenes intermedios entre 15 y 45 mL, para determinar si con algunos de estos volúmenes ya se detectaría la presencia de exosomas por DLS, es decir, la muestra estaría lo suficientemente concentrada en exosomas.

Teniendo esta premisa presente, se esperaría que en la muestra purificada de los 75 mL de medio también se observase una población de exosomas similar a la observada en la muestra purificada de los 45 mL de medio, ya que el volumen de medio es mayor, por tanto el número de células que se emplearon fue mayor. Sin embargo, los resultados experimentales no muestran esta tendencia. Este hecho podría explicarse por diferencias en la actividad secretora celular de las células HRPE-SV40 cultivadas en *flasks* T150 respecto a las células cultivadas en *flasks* T75, ya que en todo momento se siguieron las mismas condiciones de incubación de medios, y purificación y caracterización de exosomas para los dos cultivos celulares.

Para evaluar la eficacia de eliminación de EVs grandes en el paso de centrifugación adicional a 40.000xg, se siembran células HRPE-SV40 en tres nuevos *flasks* T75, de los cuales se recogerá una fracción de medio de producción tras la incubación de los cultivos celulares. De esta única fracción de 45 mL de medio, la mitad será sometida a una purificación por diffUC siguiendo el protocolo sin modificar, mientras que la otra mitad será sometida a la misma purificación teniendo en cuenta el paso adicional a 40.000xg. Al tratarse de medios que se obtienen bajo las mismas condiciones, los resultados obtenidos permitirán comparar la eficacia real de este paso de centrifugación. Sin embargo, como se ha observado, emplear volúmenes más pequeños que 45 mL puede introducir dificultades a la hora de identificar exosomas por DLS. Tras proceder a la purificación de los exosomas de estos medios de producción mediante este nuevo protocolo de diffUC, las fracciones exosómicas se caracterizan por DLS, obteniendo los resultados reflejados en la sección A1.3. del Anexo.

Tanto para las muestras purificadas con el protocolo modificado, como para las muestras purificadas con el protocolo sin modificar, uno de los picos registrados se obtiene con una población de tamaños menor a 100 nm (Figura 13; para más detalle,

consultar sección A1.3. del Anexo), indicativo de que la muestra contendría exosomas. Esto podría dar una idea de la baja eficacia de discriminación de exosomas de EVs grandes del paso adicional a 40.000xg respecto al filtrado de la muestra posterior a su purificación, ya que solo uno de los picos registrados corresponde con la población de tamaños deseada. Sin embargo, teniendo en cuenta que esta población, que en principio correspondería a exosomas, también se registra en la muestra purificada por el protocolo sin modificar, el paso adicional a 40.000xg por sí solo no tendría ninguna utilidad, porque ya empleando el protocolo sin modificar se permiten detectar los exosomas por DLS.

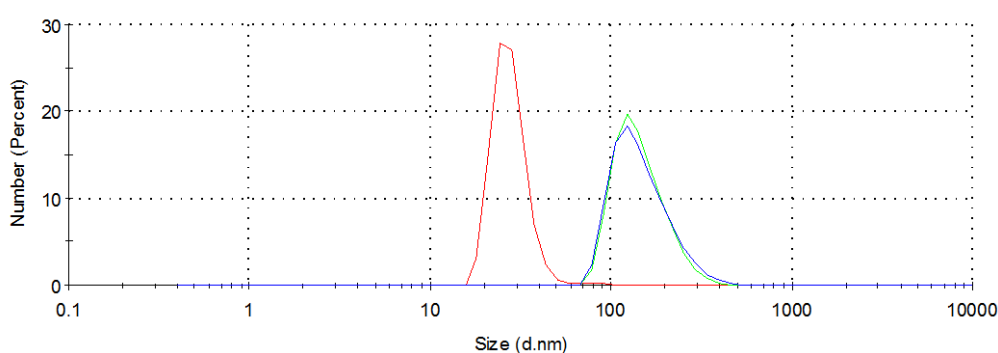


Ilustración 13. Espectro obtenido en el análisis por DLS de la fracción exosómica purificada por diffUC modificado, de 45 mL de medio de producción suplementado con exdep-FBS e incubado con células HRPE-SV40.

Adicionalmente, las dos muestras se pasan por un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro, permitiendo evaluar así la eficacia del protocolo de purificación añadiendo los dos pasos adicionales. Al filtrar las muestras, como era de esperar los tamaños de partícula se redujeron en todos los casos. En la muestra purificada por el protocolo sin modificar, la población a 30-90 nm desaparece, y únicamente se registran poblaciones de tamaños de partícula de 50-200 nm (Sección A1.3. del Anexo). En la muestra purificada por el protocolo modificado, la población que correspondería a exosomas se reduce de tamaño, y aparece una población a 10-30 nm, quizá un poco pequeña pero que se podría seguir considerando población de exosomas. Sin embargo, las poblaciones del resto de picos se siguen manteniendo en los 70-200 nm (Sección A1.3. del Anexo).

Este resultado también puede verse influenciado por la cantidad de volumen inicial de partida, menor que en otros experimentos, lo que reafirmaría la conclusión obtenida de que el volumen de medio inicial ideal para registrar poblaciones de exosomas por DLS en muestras purificadas por diffUC sería de 45 mL. Además, quedaría pendiente evaluar

en futuros experimentos la adición del paso adicional a 40.000xg y del filtrado al protocolo de diffUC en la purificación de volúmenes iniciales de medio de 45 mL.

5.2.4. Comparación de los protocolos de purificación de exosomas por centrifugación diferencial y precipitación cuantitativa

Finalmente, en un último experimento referido a la purificación de exosomas de medios de cultivo se llevó a cabo la comparación del protocolo optimizado de diffUC para las células HRPE-SV40 con un protocolo de purificación por QPrec. Además de hacer esta comparación, para estudiar más en profundidad la influencia del grado de desarrollo de las células en la producción de exosomas, se trabajará con células en un 70-80% de confluencia y en un estado de superconfluencia, Los resultados obtenidos permitirían determinar si realmente la superconfluencia es beneficiosa en cuanto a la secreción celular, o si por el contrario no influye o es perjudicial.

El planteamiento del experimento se realiza teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Se siembran seis *flasks* T75, tres destinados para la purificación de exosomas por diffUC y otros tres destinados para la purificación por QPrec. Con las mismas células se recogen diferentes fracciones de medio de producción, unas fracciones incubadas en estado de 70-80% de confluencia, y otras fracciones incubadas en estado de superconfluencia. Así, finalmente se tendrán cuatro fracciones de medio diferentes, teniendo en cuenta los dos protocolos de purificación aplicados para cada grado de desarrollo celular estudiado.

Los resultados obtenidos de la caracterización por DLS de las fracciones exosómicas purificadas, reflejados en la Sección A1.4. del Anexo, permiten extraer varias conclusiones. Por un lado, las fracciones exosómicas purificadas por diffUC tanto en 70-80% de confluencia como en superconfluencia no presentan una concentración apreciable de exosomas por DLS, ya que se han registrado tamaños de partícula de 70-200 nm. Este resultado no corresponde con el que se esperaría obtener, ya que en el experimento de evaluación de nuevos pasos en el protocolo de purificación por diffUC (Sección 5.2.3.) ya se habían obtenido poblaciones de tamaños de partícula que se podían asociar a exosomas, realizando el experimento en condiciones muy similares a las de este experimento. De nuevo, este resultado sólo se puede deber a diferencias en la actividad secretora celular y por tanto a la variabilidad biológica inherente.

Por otro lado, el “pellet” resuspendido obtenido de la purificación por QPrec, tanto para las células en 70-80% de confluencia como para las células superconfluentes, da poblaciones de tamaños de partícula de 1000 nm y superiores (Figura 14; para más detalle, consultar Sección A1.4. del Anexo), algo esperable debido a la presencia en el “pellet” de las moléculas que fuerzan la precipitación de los exosomas y que pueden tener este tamaño.

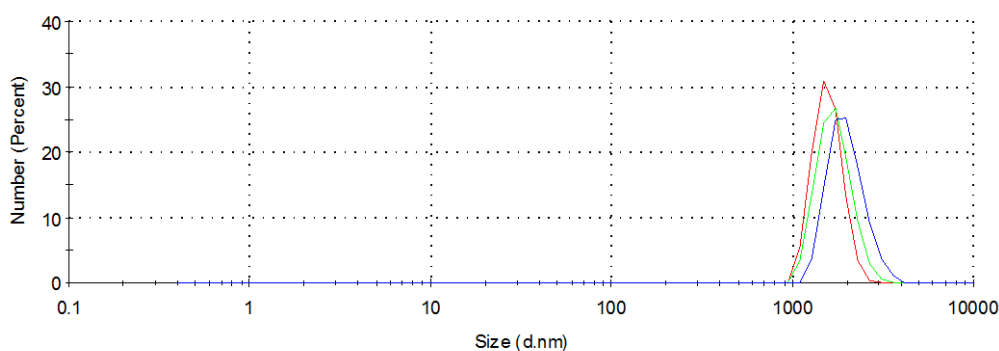


Figura 14. Espectro obtenido en el análisis por DLS de la fracción exosómica sin filtrar purificada por QPrec, de 45 mL de medio de producción suplementado con exdep-FBS e incubado con células HRPE-SV40.

Al filtrar estas muestras con un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro, se registran poblaciones de tamaño de partícula de 20-80 nm en la muestra procedente de células con 70-80% de confluencia, y de 100-300 nm en la muestra procedente de células en superconfluencia. En ambos casos se observa un descenso apreciable del tamaño de partícula registrado, pero particularmente en la muestra procedente de células con 70-80% de confluencia se registran tamaños de partícula que se podrían asociar directamente a la presencia de exosomas en esta muestra. Con este resultado se resalta la eficacia superior de purificación de exosomas de medios de cultivo por QPrec comparado con diffUC, ya que mediante este protocolo de purificación se identifican exosomas empleando 10 mL de medio, mientras que por el protocolo de diffUC (en el cual se parten de 45 mL de medio) no se identifican exosomas en la muestra. Queda pendiente confirmar si esta eficacia es debida a un mayor rendimiento de purificación de EVs, o una mejor discriminación de exosomas respecto a EVs grandes, aspecto que se podría confirmar analizando estas muestras por TEM.

Las imágenes tomadas de las muestras en un análisis por TEM se reflejan en la Figura 15. Lo primero que destaca de estas imágenes es que las vesículas que se aprecian en todas ellas tienen un aspecto diferente al típico que mostraría una vesícula por TEM sometida a tinción negativa. En este caso, se pueden observar partículas con forma

esférica, pero con un color negro en toda su estructura, en vez de bordes negros e interior grisáceo. Este cambio de apariencia se asemeja más a lo que se observaría si se hubiese empleado una tinción positiva en el procesamiento de las muestras, y podría ser un indicativo de que en algún momento del protocolo de procesamiento el agente de tinción ha penetrado en los exosomas en vez de cubrirlos. Esto puede ocurrir si se dejan secar excesivamente los exosomas, o porque éstos debían haberse fijado antes de realizar el procesamiento de la muestra [29].

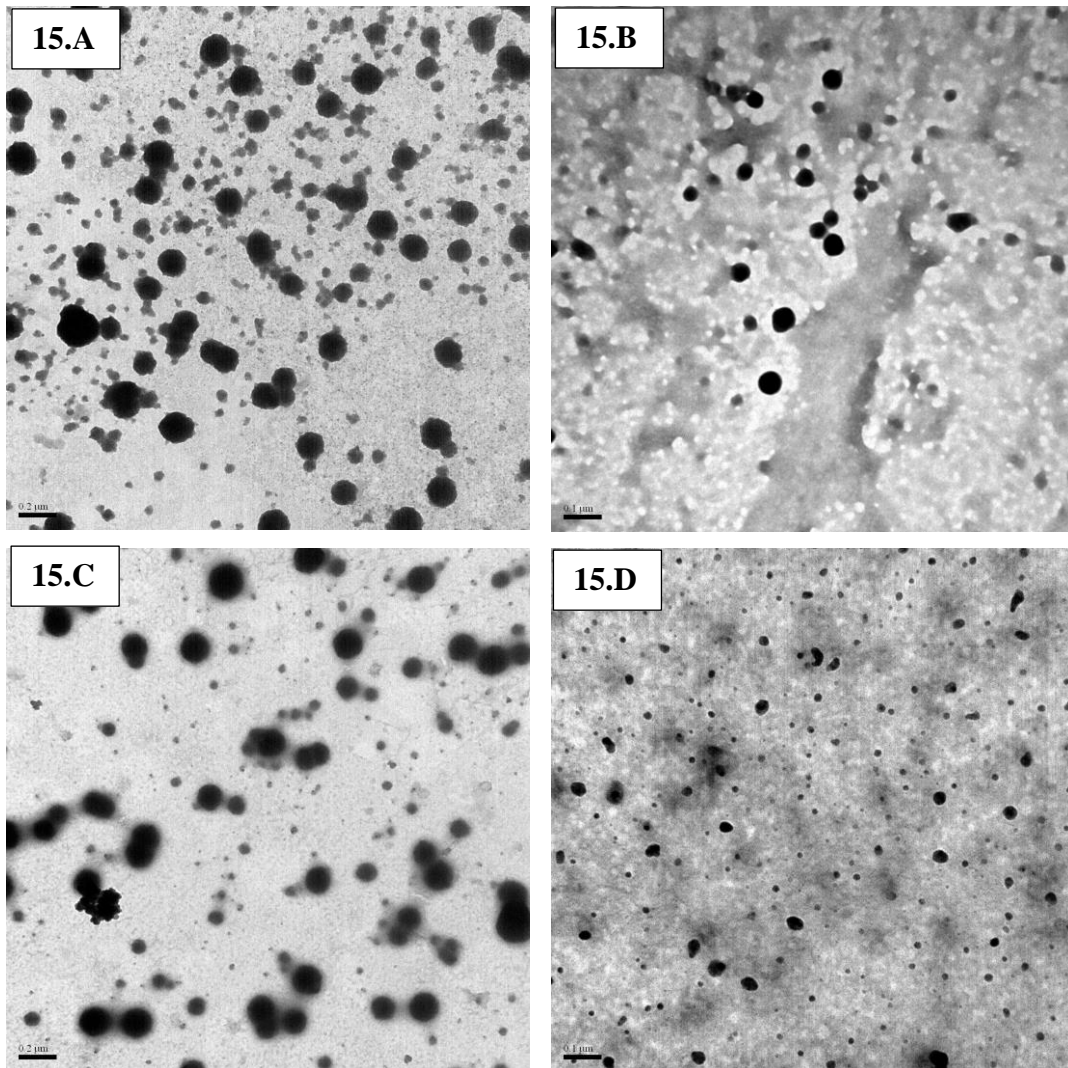


Figura 15. Imágenes obtenidas en el análisis por microscopía TEM de las fracciones exosómicas purificadas de medios de producción suplementados con exdep-FBS e incubados con cultivos celulares de HRPE-SV40: fracción exosómica purificada por diffUC con un 70-80% de confluencia (A) y con superconfluencia (C), con una escala de 0,2 µm; fracción exosómica purificada por QPrec con un 70-80% de confluencia (B) y con superconfluencia (D), con una escala de 100 nm. Imágenes tomadas con el microscopio JEOL JEM-1011 el 16.06.21.

Más allá del cambio de apariencia, se observa un número mayor de vesículas en las muestras purificadas por diffUC frente a las muestras purificadas por QPrec, algo que se esperaba a priori ya que el volumen inicial de medio purificado por diffUC fue de 45

mL, mientras que el de QPrec fue 10 mL. Además, las muestras purificadas por diffUC muestran una mayor variedad de tamaños de vesícula, desde los 20 hasta los 200 nm, mientras que en las muestras purificadas por QPrec sólo se observan vesículas menores de 100 nm, hecho que permite confirmar que la eficacia de purificación de exosomas por QPrec respecto a diffUC es debida a la mejor discriminación de exosomas de las EVs de gran tamaño. Estos resultados también permiten explicar las observaciones obtenidas en la caracterización del tamaño de partícula, ya que se confirma que en las muestras purificadas por diffUC no se registran poblaciones de tamaños de exosomas por DLS debido a la presencia de EVs más grandes aun partiendo de un volumen de medio inicial mayor. Por último, un aspecto que se observa también es que el número de vesículas se reduce en las muestras superconfluentes respecto a las muestras con una confluencia del 70-80%, de manera que se podría determinar que el estado de superconfluencia es más perjudicial que beneficioso en cuanto a secreción celular se refiere.

5.3. Análisis multielemental de Fe, Cu y Zn en exosomas mediante espectrometría de masas elemental

A continuación, se incluye una tabla resumen (Tabla 2) de los experimentos detallados en la Sección 5.2. y los resultados obtenidos. Como se puede observar, obtener una fracción de EVs rica en exosomas es una tarea bastante complicada, de manera que es difícil determinar qué muestras tienen los criterios necesarios como para ser analizadas por ICP-MS para asegurar que se determina el contenido metálico de los exosomas secretados por las células HRPE-SV40, y no se analiza el contenido metálico de EVs en general. Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos por DLS y TEM para la caracterización de todas las muestras ensayadas, se ha observado una heterogeneidad en los tamaños de las vesículas, por lo que no se puede asegurar el análisis exclusivo de exosomas, sino EVs que contienen exosomas.

Tabla 2. Resumen de los experimentos realizados en la sección 5.2. del presente TFM

Experimento (sección TFM)	Flask	Confluencia	Suplemento	Réplicas	Vol. medio producción / mL	Purificación	Tamaños DLS / nm	Tamaños TEM / nm
(5.1.1.) Fresco	T25	70-80%	exdep-FBS B-27 TM	3	15	diffUC	100-300	30-100 -
(5.1.1.) a 4 °C	T25	70-80%	exdep-FBS B-27 TM	3	15	diffUC	100-300	30-150 -
(5.1.1.) Control negativo	-	-	exdep-FBS B-27 TM	-	15	diffUC	4-10	No exosomas
(5.2.2.)	T25 T75 T150	70-80%	exdep-FBS	3	15 45 75	diffUC	100-300	-
(5.2.2.) Control positivo	-	-	FBS	-	15	diffUC	3-10	-
(5.2.3.) Filtrado	T25 T75 T150	70-80%	exdep-FBS	3	15 45 75	diffUC + Filtrado	70-200 20-50 70-200	- 30-50 -
(5.2.3.) 40.000xg	T75	70-80%	exdep-FBS	1,5	22,5	22.5 mL diffUC 22.5 mL diffUC + 40.000 xg	10-30 50-200 20-50 70-300	- -
(5.2.3.) 40.000xg + Filtrado	T75	70-80%	exdep-FBS	1,5	22,5	22.5 mL diffUC + Filtrado 22.5 mL diffUC + 40.000 xg + Filtrado	50-300 30-100 80-300	- -
(5.2.4.) diffUC	T75	70-80% >90%	exdep-FBS	3 3	45 45	diffUC optimizado	70-200 70-200	30-200
(5.2.4.) QPrec	T75	70-80% >90% 70-80% >90%	exdep-FBS	3	45	QPrec QPrec + Filtrado	>1000 20-70 100-300	- 20-100

La muestra que a priori presenta una mayor relevancia para ser analizada por ICP-MS es la muestra obtenida en el experimento de la Sección 5.2.3. procedente de 45 mL de medio. Para confirmar la presencia de exosomas en dicha muestra, se toman imágenes por TEM (Figura 16). Esta imagen concuerda con lo que se esperaría de muestras que contienen exosomas y que han sido sometidas a tinción negativa, observándose partículas con estructura membranosa más oscuras en los bordes que en el interior, y con tamaños acordes al tamaño esperado de exosomas, por debajo de 100 nm. Así, estos resultados respaldan los hallazgos obtenidos por DLS para la muestra, y se determina que la muestra cumple los requisitos como para determinar el contenido metálico de exosomas liberados por las células HRPE-SV40 en cultivo.

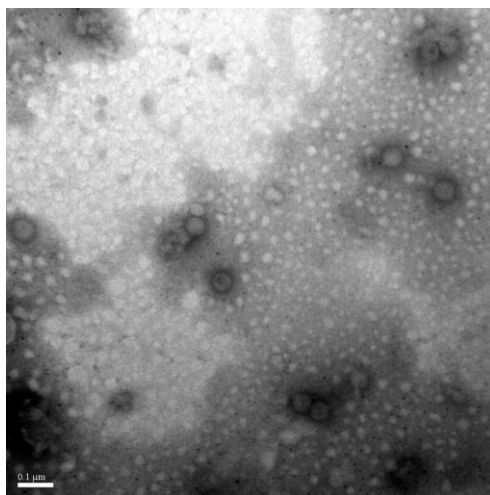


Figura 16. Imagen obtenida en el análisis por microscopía TEM de la fracción exosómica obtenida de una purificación por diffUC de 45 mL de medio de producción incubado en células HRPE-SV40 con un 70-80% de confluencia. Imagen tomada con el microscopio JEOL JEM-1011 el 16.06.21.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas por ICP-MS para Fe, Cu y Zn tras el análisis de las disoluciones patrón, obtenidas como el cociente de las señales del elemento de estudio y el patrón interno frente a la concentración del elemento en la disolución, se muestran a continuación. Además, se refleja el coeficiente de correlación lineal y el límite de detección del método para cada isótopo monitorizado, calculado como tres veces la desviación estándar de la ordenada partido de la pendiente.

$$\begin{aligned}
 \text{Fe} \left\{ \begin{array}{l}
 56: \frac{^{56}\text{Fe}^+}{^{69}\text{Ga}^+} = (0,062 \pm 0,003)[^{56}\text{Fe}] \mu\text{g L}^{-1} + (6 \pm 2), R^2 = 0,9925, \text{LOD} = 221 \mu\text{g L}^{-1} \\
 57: \frac{^{57}\text{Fe}^+}{^{69}\text{Ga}^+} = (0,00158 \pm 0,00007)[^{57}\text{Fe}] \mu\text{g L}^{-1} + (0,12 \pm 0,06), R^2 = 0,9941, \text{LOD} = 195 \mu\text{g L}^{-1}
 \end{array} \right. \\
 \\
 \text{Cu} \left\{ \begin{array}{l}
 63: \frac{^{63}\text{Cu}^+}{^{69}\text{Ga}^+} = (0,0877 \pm 0,0009)[^{63}\text{Cu}] \mu\text{g L}^{-1} + (0,01 \pm 0,3), R^2 = 0,9996, \text{LOD} = 20 \mu\text{g L}^{-1} \\
 65: \frac{^{65}\text{Cu}^+}{^{69}\text{Ga}^+} = (0,0442 \pm 0,0006)[^{65}\text{Cu}] \mu\text{g L}^{-1} - (0,03 \pm 0,2), R^2 = 0,9994, \text{LOD} = 25 \mu\text{g L}^{-1}
 \end{array} \right. \\
 \\
 \text{Zn} \left\{ \begin{array}{l}
 64: \frac{^{64}\text{Zn}^+}{^{69}\text{Ga}^+} = (0,0193 \pm 0,0003)[^{64}\text{Zn}] \mu\text{g L}^{-1} + (0,20 \pm 0,09), R^2 = 0,9993, \text{LOD} = 26 \mu\text{g L}^{-1} \\
 66: \frac{^{66}\text{Zn}^+}{^{69}\text{Ga}^+} = (0,0123 \pm 0,0001)[^{66}\text{Zn}] \mu\text{g L}^{-1} + (0,02 \pm 0,04), R^2 = 0,9997, \text{LOD} = 16 \mu\text{g L}^{-1}
 \end{array} \right.
 \end{aligned}$$

Con estos modelos lineales realizados a partir de los datos del calibrado, se pueden obtener las concentraciones de los metales de estudio en la muestra analizada. Se puede apreciar que los límites de detección son altos respecto a lo que se esperaría de un análisis de metales traza por espectrometría ICP-MS, sobre todo para Fe. Este hecho puede atribuirse al sistema FIA empleado para introducir la muestra en el ICP-MS. Además de analizar la muestra, se analiza un blanco consistente únicamente en PBS, y

tratado de forma idéntica a la muestra. En la Figura 17 se recoge el FIAGrama registrado (intensidad vs. tiempo) para ^{69}Ga en el análisis de la muestra como ejemplo ilustrativo del resto de isótopos monitorizados.

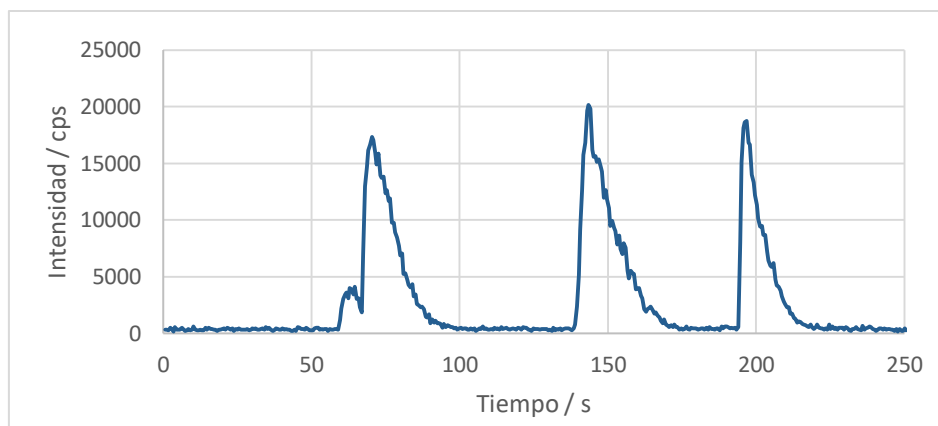


Figura 17. FIAGrama experimental (intensidad vs. tiempo) de ^{69}Ga registrado en el análisis de la muestra que contiene exosomas analizada por FIA-ICP-MS.

Tras el análisis por ICP-MS de la muestra, los niveles experimentales de los metales encontrados en los exosomas analizados fueron de 238 y 167 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fe y Zn, respectivamente, con una precisión (expresada como desviación estándar relativa (RSD)) del 6%, e indetectables para Cu. Debe destacarse que el contenido metálico del fondo, es decir, del PBS fue bastante elevado, debido a su elevado contenido en sales que pueden contener impurezas de Fe, Cu o Zn. En futuros experimentos se llevará a cabo la preparación de PBS tomando las precauciones adecuadas para un análisis de metales traza, o se empleará otra disolución reguladora con menor contenido en sales como el tampón de tris(hidroximetil)aminometano salino (TRIS), así como se reducirá el contenido metálico mediante su purificación a través de una columna quelante específica.

Otro aspecto que se observa es que la fracción exosómica no contiene niveles apreciables de Cu, ya que la cantidad de Cu detectada en la muestra y en el PBS presenta niveles similares, pudiendo deberse a que ese elemento se encuentra en niveles inferiores al límite de detección o bien que la contribución de la disolución de PBS es elevada. En cuanto a Fe y Zn, se detectan niveles apreciables de ambos metales, y se observa que la muestra está más concentrada en Fe que en Zn. Estos hallazgos contribuyen a resaltar el importante papel de estos dos metales en el metabolismo celular del RPE, debiendo evaluarse en estudios futuros su posible implicación en la DMAE. Por último, un aspecto que se puede destacar de estos datos es que el análisis de

la muestra presenta una buena precisión para todos los metales, en torno al 6%, pero peor respecto a lo que se podría esperar de un análisis de metales traza por ICP-MS. De nuevo, este hecho puede atribuirse al sistema FIA.

6. Conclusiones

A partir de los resultados experimentales obtenidos en este Trabajo Fin de Máster, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El modelo *in vitro* de células HRPE-SV40 ha proporcionado resultados diferentes en la purificación y caracterización de exosomas bajo condiciones de cultivo similares, indicando gran variabilidad biológica y consecuente irreproducibilidad.
2. Se ha confirmado la presencia de exosomas en medios de cultivo de células HRPE-SV40 purificados mediante centrifugación diferencial y mediante precipitación cuantitativa.
3. El protocolo de purificación de exosomas de medios de cultivo por centrifugación diferencial necesita ser optimizado de nuevo para obtener una fracción de vesículas más rica en exosomas.
4. La purificación de exosomas de medios de cultivo por precipitación cuantitativa presenta una mayor eficacia de discriminación de exosomas de otras vesículas extracelulares de mayor tamaño que la purificación de exosomas por centrifugación diferencial.
5. La obtención de una fracción de vesículas extracelulares rica en exosomas es crucial para detectar éstos por DLS, ya que esta técnica presenta la desventaja de que en muestras polidispersas las partículas de mayor tamaño tienen más peso en las medidas, y por tanto los exosomas, al ser partículas de tamaños menores a 100 nm, pueden quedar fácilmente enmascaradas.
6. La caracterización por TEM de los exosomas permite identificar éstos de una forma mucho más inequívoca que el DLS, ya que se eliminan los problemas de enmascaramiento. Sin embargo, hay que optimizar el protocolo de preparación de muestra, para evitar interacciones indeseadas entre el agente de tinción y las vesículas (se puede modificar la apariencia de los exosomas).
7. Se han observado niveles apreciables de Fe y Zn en exosomas secretados por las células HRPE-SV40, mientras que no se han observado niveles apreciables de Cu. Además, se han observado niveles demasiado elevados de estos metales en el PBS, resultando en fondos muy altos, aspecto que habría que optimizar.

7. Referencias

1. Storey, P. P. et al., Age-Related Macular degeneration, Handbook of Nutrition, Diet and the Eye, Academic Press, 2019, pp. 31-46.
2. Bhutto, I. et al., Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex, Molecular Aspects of Medicine, 2012, Vol. 33, No. 4, pp. 295-317.
3. Wu, H. et al., Using virtual reality to assess the street crossing behavior of pedestrians with simulated macular degeneration at a roundabout, Frontiers in ICT, 2018, Vol 5, Art. 27.
4. Williams, B. M. et al., Drusen and macular degeneration, Computational Retinal Image Analysis, Academic Press, 2019, pp. 245-272.
5. Al-Zamil, W. M. et al., Recent developments in age-related macular degeneration: a review, Clinical Interventions in Aging, 2017, Vol. 12, pp. 1313-1330.
6. Kels, B. D. et al., Human ocular anatomy, Clinics in Dermatology, 2015, Vol. 33, pp. 140-146.
7. Cáceres, P. S. et al., Retinal pigment epithelium polarity in health and blinding diseases, Current Opinion in Cell Biology, 2020, Vol 62, pp. 37-45.
8. Hoon, M. et al., Functional architecture of the retina: Development and disease, Progress in Retinal and Eye Research, 2014, Vol. 42, pp. 44-84.
9. Thumann, G. et al., Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium, Retina (Fifth Edition), 2013, Vol. 1, pp. 401-414.
10. Modell, H. et al., A physiologist's view of homeostasis, Advances in Physiology Education, 2015, Vol. 39, No. 4, pp. 259-266.
11. Sies, H., On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development, Current Opinion in Toxicology, 2018, Vol 7, pp. 122-126.
12. Myhre, O. et al., Metal Dyshomeostasis and Inflammation in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Possible Impact fo Environmental Exposures, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013, Vol. 2013, Art. 726954.10
13. Nicholson, B. P. et al., Zinc deficiency and the eye, Handbook of Nutrition, Diet and the Eye, Academic Press, 2014, pp. 371-376.
14. Rodríguez, S. et al., The Zinc-Metallothionein Redox System Reduces Oxidative Stress in Retinal Pigment Epithelial Cells, Nutrients, 2018, Vol. 10, No. 12. Art. 1874.
15. Dunaief, D. et al., Iron-Induced Retinal Damage, Handbook of Nutritio, Diet and the Eye, Academic Press, 2014, pp. 619-626.
16. Wu, E. W. et al., Environmental cadmium and lead exposures and age-related macular degeneration in US adults: the National Health and Nutrition Examination Survey 2005 to 2008, Environmental Research, 2014, Vol. 133, pp. 178-184.
17. Ugarte, M. et al., Iron, zinc, and copper in retinal physiology and disease, Survey of Ophthalmology, 2013, Vol 58, 585-609.
18. Freudenrich, T. M. et al., Mammalian cell culture models, An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, Academic Press, 2020, pp. 463-475.
19. Liu, J. et al., Roles of Exosomes in Ocular Diseases, International Journal of Nanomedicine, 2020, Vol 15, pp. 10519-10538.

20. Théry, C. et al., Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, Vol. 7, No. 1, Art. 1535750.
21. Doyle, L. M. et al., Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis, *Cells*, 2019, Vol 8, N7, Art. 727.
22. Gebara, N. et al., Extracellular Vesicles, Apoptotic Bodies and Mitochondria: Stem Cell Bioproducts for Organ Regeneration, *Current Transplantation Reports*, 2020, Vol. 7, pp. 105-113.
23. Meldolesi, J., Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication, *Current Biology*, 2018, Vol 28, pp. 435-444.
24. Buschini, E. et al., Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina, *Progress in Neurobiology*, 2011, Vol 95, pp. 14-25.
25. Witwer, K. W. et al., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, Vol. 2, No. 1, Art. 20360.
26. Stam, J. et al., Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods, *Journal of Chromatography B*, 2021, Vol 1169, Art. 122604.
27. Szatanek, R. et al., The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization, *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, Vol. 18, No. 6, Art. 1153.
28. Filipe, V. et al., Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates, *Pharmaceutical Research*, 2010, Vol. 27, No. 5, pp. 796-810.
29. Franken, L. E. et al., Transmission Electron Microscopy as a Tool for the Characterization of Soft Materials: Application and Interpretation, *Advanced Science*, 2017, Vol. 4, Art. 1600476.
30. Leica Microsystems, Ficha técnica del microscopio óptico invertido Leica DM IL LED, 2019, Consultado el 09/06/2021 en <https://leica-microsystems.com>
31. Malvern Panalytical, Ficha técnica de la serie de equipos Zetasizer Nano, 2013, Consultado el 10/06/2021 en <https://malvernpanalytical.com>
32. David B. W. & C. Barry C., *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, 2009, Springer Science.
33. JEOL, Ficha técnica del microscopio electrónico de transmisión JEM-2000, 2004, Consultado el 17/06/2021 en <https://www.aphys.kth.se>
34. Wilschefski, S. C. et al., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects, *The Clinical Biochemist Reviews*, 2019, Vol 40., No. 3, pp. 115-133.
35. Agilent Technologies, Ficha técnica del instrumento ICP-MS Agilent 7900, 2020, Consultado el 21/06/2021 en <https://agilent.com>
36. Théry, C. et al., Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids, *Current Protocols in Cell Biology* (2006), 3.22.1-3.22.29.
37. Biasutto, L. et al., Retinal pigment epithelium (RPE) exosomes contain signaling phosphoproteins affected by oxidative stress, *Experimental cell research* (2013), Vol. 319, pp. 2113-2123.

38. Klingeborn, M. et al., Directional Exosome Proteomes Reflect Polarity-Specific Functions in Retinal Pigment Epithelium Monolayers, *Scientific Reports*, 2017, Vol. 7, Art. 4901.
39. Atienzar, S. et al., Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2016, Vol. 20, No. 8, pp. 1457-1466.
40. Atienzar, S. et al., Role of retinal pigment epithelium-derived exosomes and autophagy in new blood vessel formation, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, Vol. 22, No. 11, pp. 5244-5256.
41. Lyu, T. S. et al., The characterization of exosomes from fibrosarcoma cell and the useful usage of Dynamic Light Scattering (DLS) for their evaluation, *PLoS ONE*, 2021, Vol. 16, Art. 0231944.
42. Palmieri, V. et al., Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool, *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, Vol. 16, Art. 2583.
43. Kuo, W. P. & Shidong J., *Imaging of Extracellular Vesicles, Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*, 2017, Springer Science, pp. 221-232.

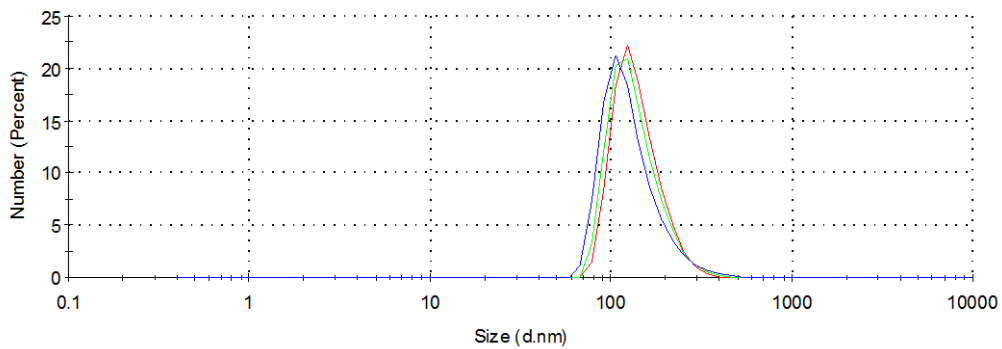
Anexo

A1. Resultados experimentales obtenidos por DLS.

A continuación, se reflejan los resultados obtenidos por DLS. Para cada muestra analizada, se registran tres réplicas diferentes, lo que se expresa como “Pico 1”, “Pico 2”, etc. En la tabla adyacente a cada gráfico, se muestra el tamaño promedio de cada réplica y su desviación estándar asociada.

A1.1. Experimento 5.2.1.

- Medio de producción suplementado con exdep-FBS purificado directamente por diffUC.

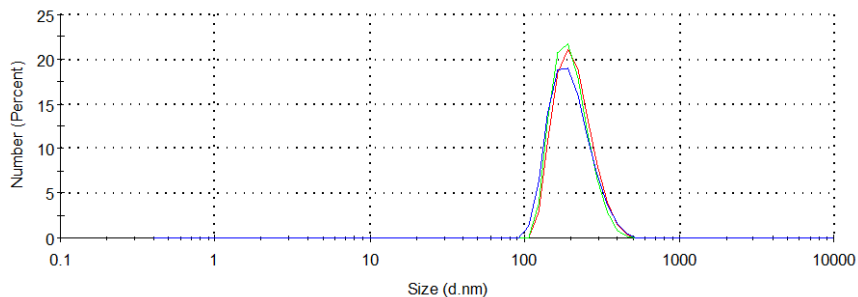


Pico 1 (Rojo): 141 ± 42 nm

Pico 2 (Verde): 136 ± 43 nm

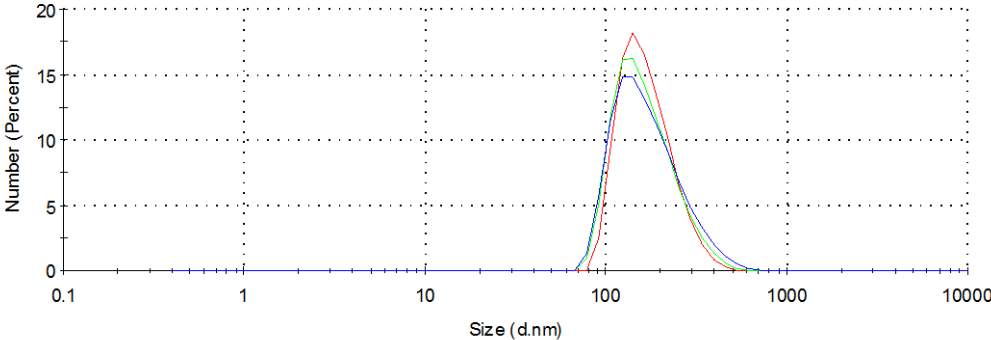
Pico 3 (Azul): 128 ± 44 nm

- Medio de producción suplementado con B-27TM purificado directamente por diffUC.



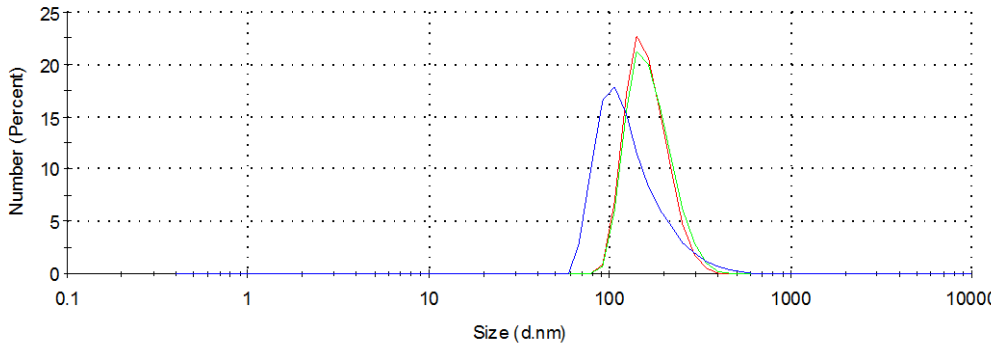
Pico 1 (Rojo): 211 ± 58 nm
Pico 2 (Verde): 200 ± 52 nm
Pico 3 (Azul): 202 ± 61 nm

- Medio de producción suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC y almacenado a 4 °C durante una semana.



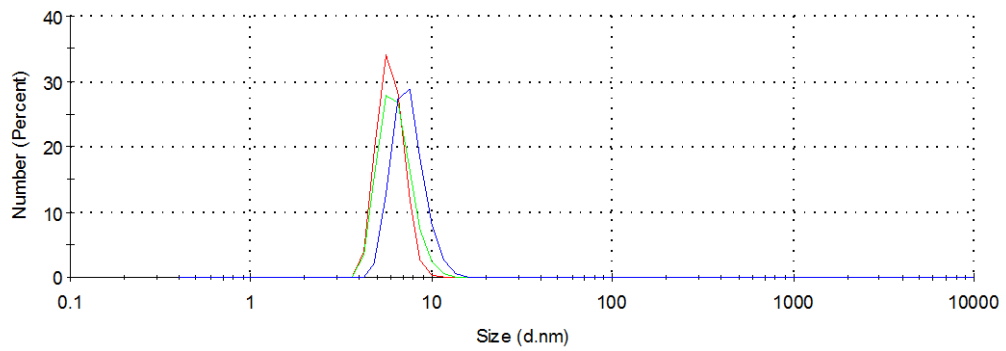
Pico 1 (Rojo): 170 ± 56 nm
Pico 2 (Verde): 170 ± 65 nm
Pico 3 (Azul): 177 ± 76 nm

- Medio de producción suplementado con B-27TM purificado por diffUC y almacenado a 4 °C durante una semana.



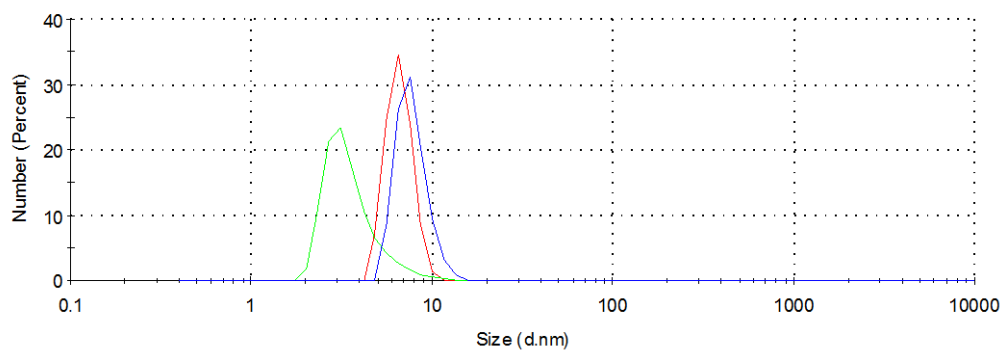
Pico 1 (Rojo): 164 ± 43 nm
Pico 2 (Verde): 171 ± 49 nm
Pico 3 (Azul): 132 ± 55 nm

- Control negativo suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC.



Pico 1 (Rojo): 6 ± 1 nm
Pico 2 (Verde): 6 ± 2 nm
Pico 3 (Azul): 7 ± 3 nm

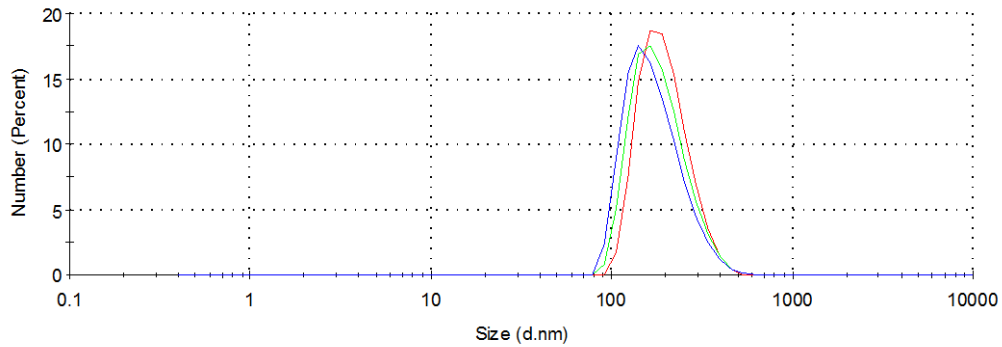
- Control negativo suplementado con B-27TM purificado por diffUC.



Pico 1 (Rojo): 7 ± 2 nm
Pico 2 (Verde): 4 ± 2 nm
Pico 3 (Azul): 8 ± 2 nm

A1.2. Experimento 5.2.2.

- Medio de producción procedente de *flasks* T25 (15 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC.

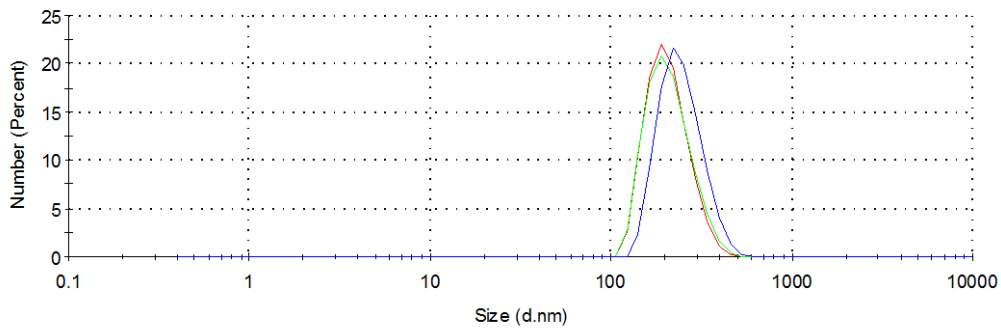


Pico 1 (Rojo): 199 ± 61 nm

Pico 2 (Verde): 188 ± 63 nm

Pico 3 (Azul): 176 ± 63 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T75 (45 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC.

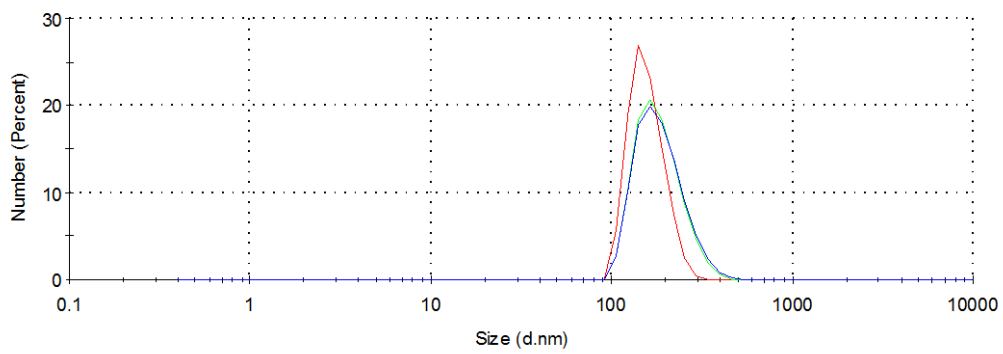


Pico 1 (Rojo): 210 ± 56 nm

Pico 2 (Verde): 212 ± 59 nm

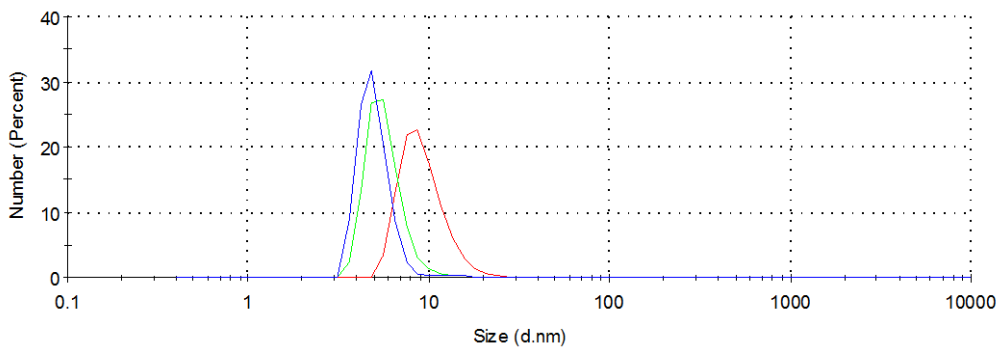
Pico 3 (Azul): 247 ± 66 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T150 (75 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC.



Pico 1 (Rojo): 15 ± 34 nm
Pico 2 (Verde): 184 ± 52 nm
Pico 3 (Azul): 186 ± 54 nm

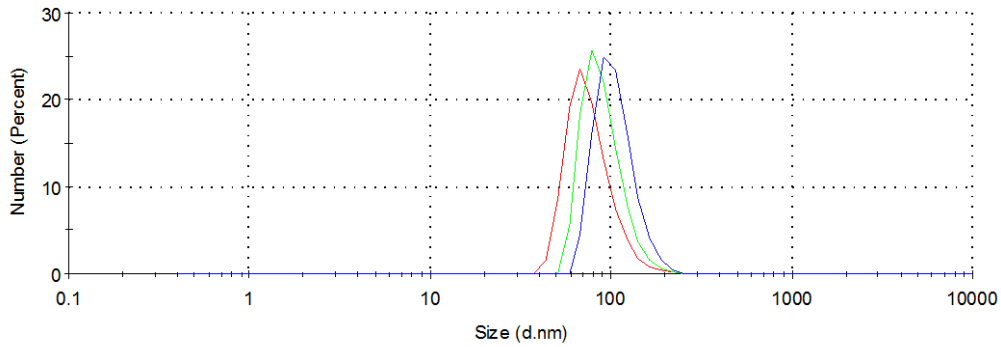
- Control positivo (DMEM/F12 con 40% FBS) purificado por diffUC.



Pico 1 (Rojo): 9 ± 3 nm
Pico 2 (Verde): 6 ± 2 nm
Pico 3 (Azul): 5 ± 1 nm

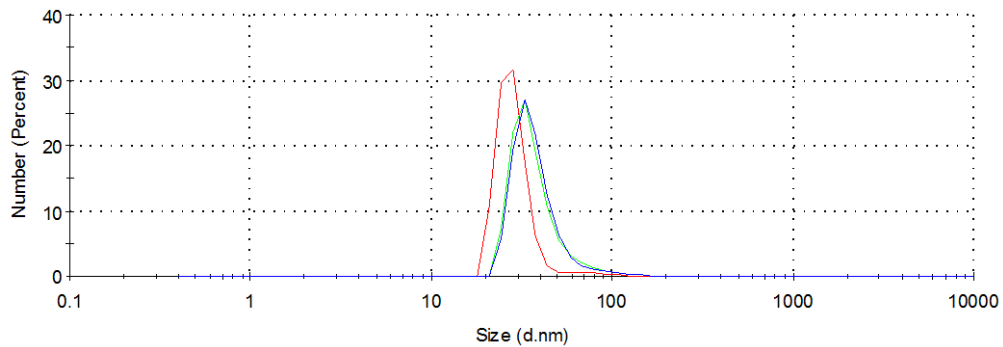
A1.3. Experimento 5.2.3.

- Medio de producción procedente de *flasks* T25 (15 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC y filtrado.



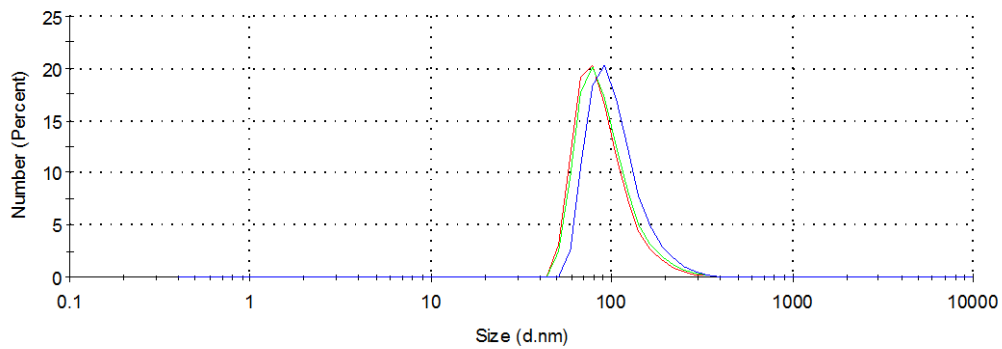
Pico 1 (Rojo): 76 ± 21 nm
Pico 2 (Verde): 90 ± 23 nm
Pico 3 (Azul): 106 ± 26 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T75 (45 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC y filtrado.



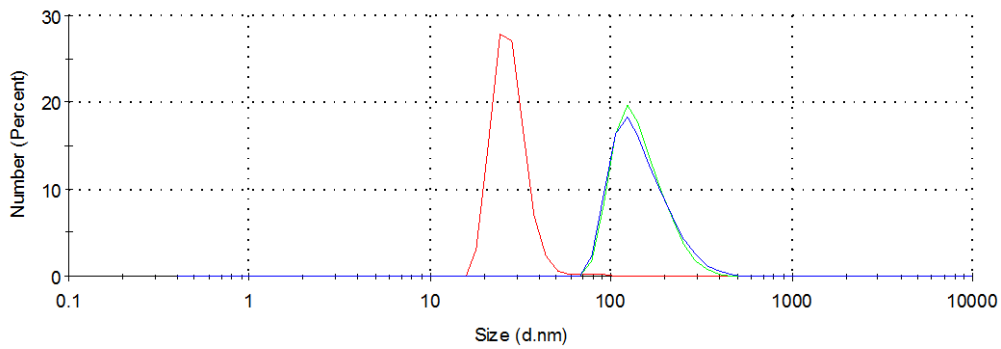
Pico 1 (Rojo): 28 ± 5 nm
Pico 2 (Verde): 36 ± 11 nm
Pico 3 (Azul): 37 ± 10 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T150 (75 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC y filtrado.



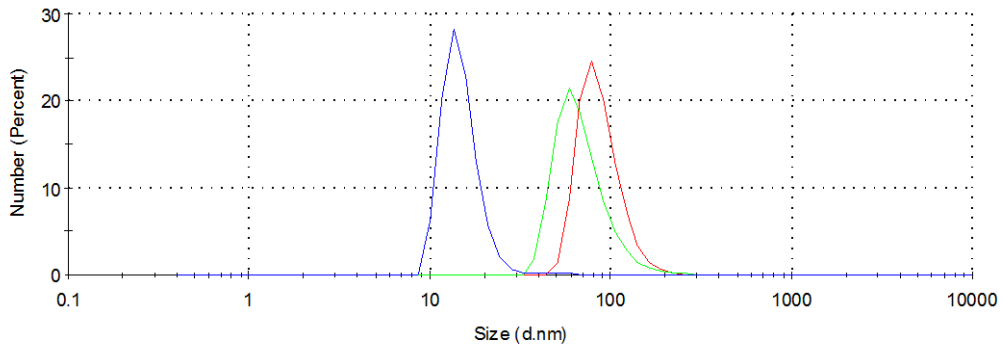
Pico 1 (Rojo): 89 ± 29 nm
Pico 2 (Verde): 93 ± 33 nm
Pico 3 (Azul): 105 ± 34 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T75 (22,5 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC modificado.



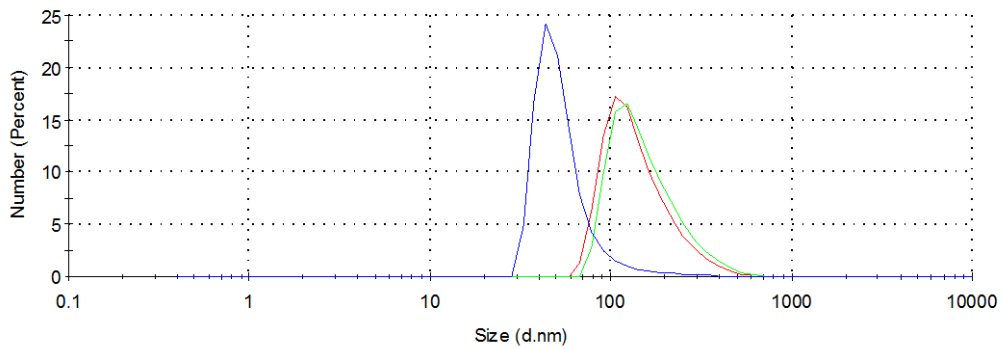
Pico 1 (Rojo): 27 ± 6 nm
Pico 2 (Verde): 146 ± 47 nm
Pico 3 (Azul): 150 ± 54 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T75 (22,5 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC modificado y filtrado.



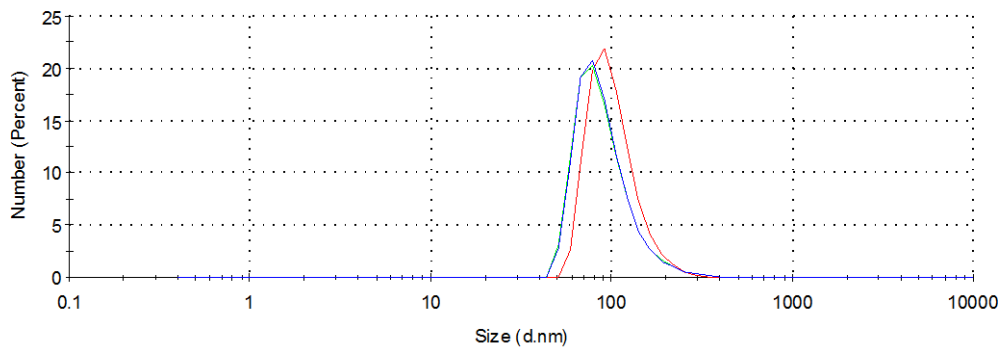
Pico 1 (Rojo): 87 ± 23 nm
Pico 2 (Verde): 68 ± 21 nm
Pico 3 (Azul): 15 ± 4 nm

- Medio de producción procedente de *flasks* T75 (22,5 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC.



Pico 1 (Rojo): 142 ± 58 nm
Pico 2 (Verde): 157 ± 67 nm
Pico 3 (Azul): 51 ± 53 nm

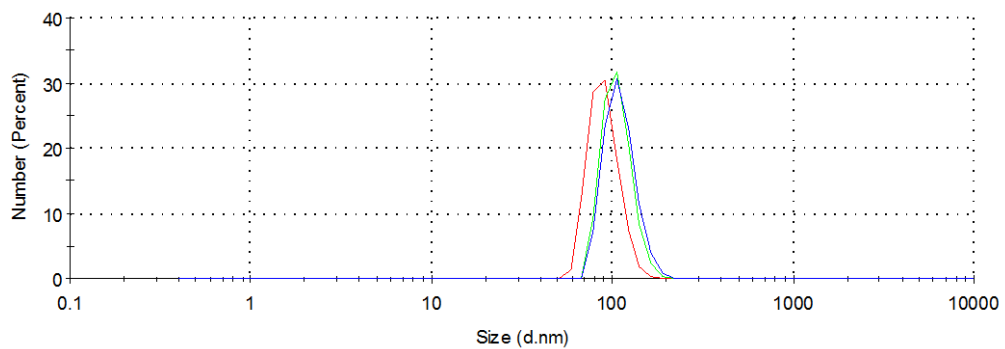
- Medio de producción procedente de *flasks* T75 (22,5 mL) suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC y filtrado.



Pico 1 (Rojo): 102 ± 31 nm
Pico 2 (Verde): 89 ± 29 nm
Pico 3 (Azul): 89 ± 29 nm

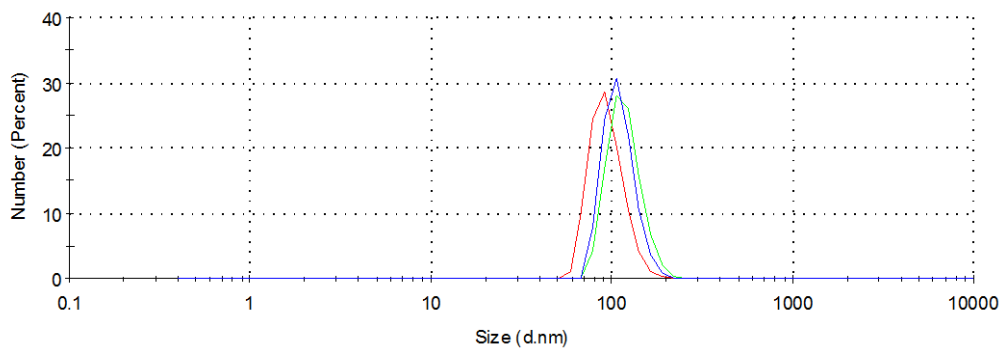
A1.4. Experimento 5.2.4.

- Medio de producción incubado con células en confluencia del 70-80% suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC optimizado.



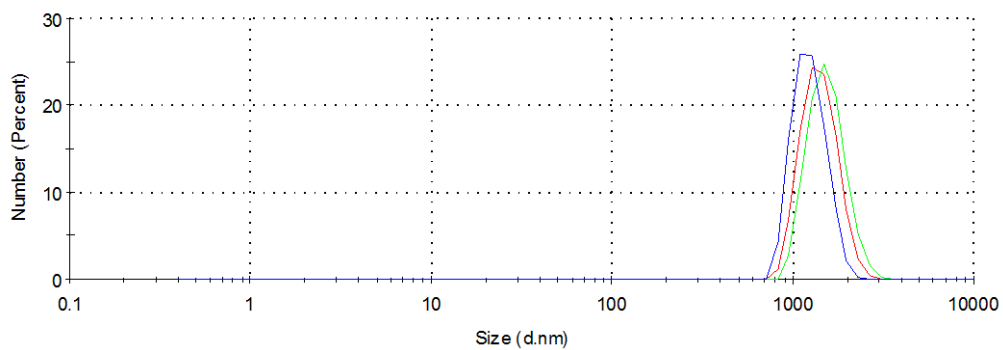
Pico 1 (Rojo): 90 ± 18 nm
Pico 2 (Verde): 107 ± 20 nm
Pico 3 (Azul): 111 ± 22 nm

- Medio de producción incubado con células en superconfluencia suplementado con exdep-FBS purificado por diffUC optimizado.



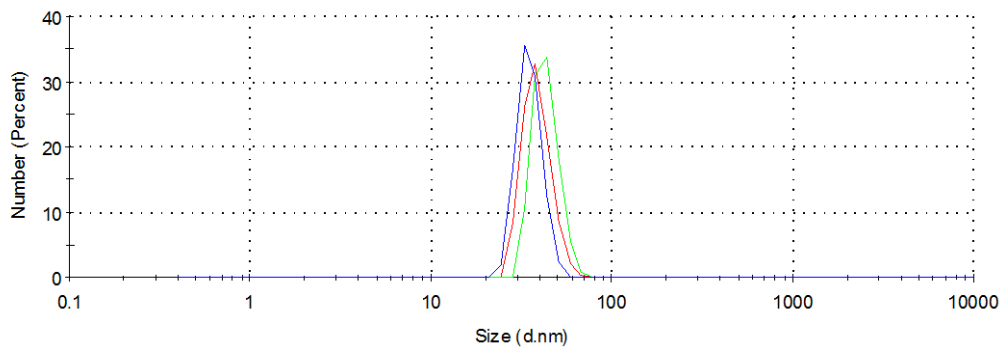
Pico 1 (Rojo): 95 ± 21 nm
Pico 2 (Verde): 118 ± 36 nm
Pico 3 (Azul): 110 ± 22 nm

- Medio de producción incubado con células en confluencia del 70-80% suplementado con exdep-FBS purificado por QPrec sin filtrar.



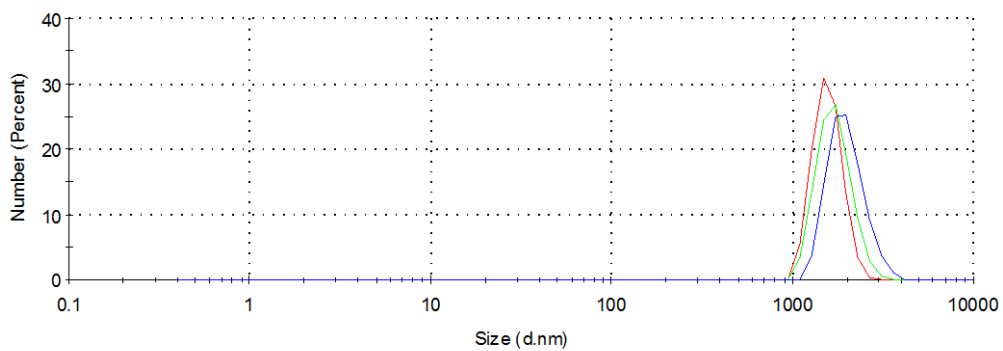
Pico 1 (Rojo): 1428 ± 323 nm
Pico 2 (Verde): 1563 ± 363 nm
Pico 3 (Azul): 1251 ± 262 nm

- Medio de producción incubado con células en confluencia del 70-80% suplementado con exdep-FBS purificado por QPrec filtrado.



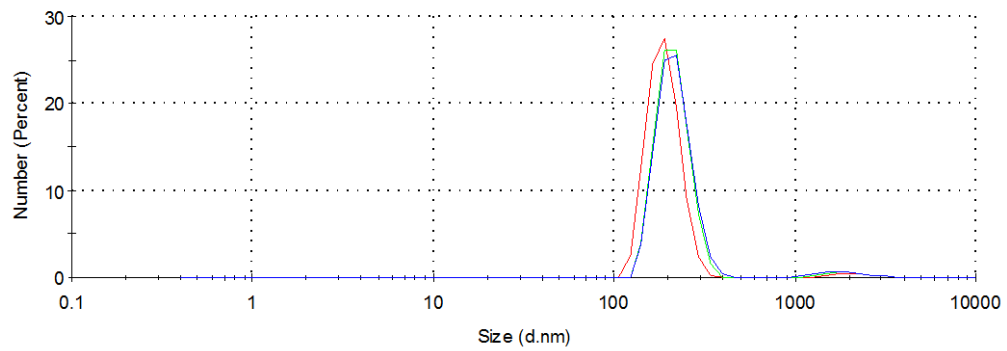
Pico 1 (Rojo): 39 ± 7 nm
Pico 2 (Verde): 43 ± 8 nm
Pico 3 (Azul): 35 ± 6 nm

- Medio de producción incubado con células en superconfluencia suplementado con exdep-FBS purificado por QPrec sin filtrar.



Pico 1 (Rojo): 1581 ± 286 nm
Pico 2 (Verde): 1722 ± 365 nm
Pico 3 (Azul): 1996 ± 455 nm

- Medio de producción incubado con células en superconfluencia suplementado con exdep-FBS purificado por QPrec filtrado.



Pico 1 (Rojo): 190 ± 39 nm
Pico 2 (Verde): 214 ± 43 nm
Pico 3 (Azul): 217 ± 46 nm