



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

***CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS DE LA  
LECHE HUMANA: EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN***

Presentado por:  
**D<sup>a</sup>. Alexandra Mansilla Roux**

**Curso Académico 2023/2024**



Universidad de  
Oviedo

MCAB  
Trabajo de Fin de Máster  
Alexandra Mansilla Roux



## **AGRADECIMIENTOS**

Doy las gracias a Marisa por introducirme en el fascinante mundo de los exosomas, por todo lo que he aprendido y por la confianza que ha depositado en mí y en mis capacidades.

Doy las gracias a Claudia por acompañarme durante este proceso, por todo lo que me ha enseñado, por todos los momentos que hemos vivido a lo largo de estos meses pero sobre todo por la paciencia y la amabilidad que ha tenido conmigo siempre.

Doy las gracias a Sara por sus valiosos consejos y explicaciones, por estar siempre dispuesta a ofrecernos su ayuda y por el apoyo recibido durante todo este tiempo.

Doy las gracias al resto de los compañeros del GEAB por su gran acogida, por haber podido compartir mi cocina con ellos y por la simpatía que me han demostrado.

Doy las gracias a mis amigas por habernos visto crecer durante tantos años y convertirnos en las personas que somos a día de hoy, sin vosotras nada hubiera sido lo mismo.

Doy las gracias a mi familia por creer siempre en mí, incluso en los momentos en los que ni yo misma creía y por animarme a seguir siempre adelante sin importar las dificultades.

Por último, doy las gracias a mi abuelo por transmitirme desde bien pequeña su pasión por la química, se lo increíblemente orgulloso que estaría de mí si supiera hasta dónde he llegado.



## ÍNDICE

<b>TABLA DE ACRÓNIMOS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
1.1.- La leche materna: un superalimento	10
1.2.- Composición de la leche humana	11
1.3.- Vesículas extracelulares	13
1.3.1.- Microvesículas y cuerpos apoptóticos	13
1.3.2.- Exosomas	13
1.4.- Bancos de leche	15
1.5.- Efecto de la pasteurización en los componentes nutricionales de la leche	16
1.6.- Técnicas para el aislamiento de los exosomas	16
1.6.1.- Ultracentrifugación diferencial (DUC)	17
1.6.2.- Ultracentrifugación con gradiente de densidad (DG-UC)	18
1.6.3.- Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)	18
1.6.4.- Ultrafiltración	19
1.6.5.- Precipitación	20
1.6.6.- Ensayos de inmunoafinidad	20
1.7.- Técnicas para la caracterización de los exosomas	22
1.7.1.- Caracterización morfológica	22
Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	22
Dispersión dinámica de la luz (DLS)	22
Análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA)	23
1.7.2.- Determinación del contenido proteico total	23
1.7.3.- Caracterización de la pureza	23
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	23
Citometría de flujo	24





<b>2.- OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3.- MATERIALES Y REACTIVOS</b>	<b>25</b>
<b>4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>28</b>
4.1.- Obtención de las muestras de leche	28
4.2.- Obtención del suero lácteo	29
4.3.- Aislamiento de los exosomas	30
4.4.- Preconcentración de los exosomas	30
4.5.- Ensayo del BCA	31
4.6.- Análisis mediante HPLC-SEC	31
4.7.- Análisis mediante citometría de flujo	32
4.8.- Análisis mediante TEM	33
4.9.- Análisis mediante DLS	33
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
5.1.- Reproducibilidad de los métodos de aislamiento	34
5.1.1.- Kit EVs SEC-7012	34
5.1.2.- Kit EVs SEC-3512	36
5.2.- Factor de preconcentración de los exosomas	37
5.3.- Determinación del contenido proteico total	38
5.3.1.- Kit EVs SEC-7012	39
5.3.2.- Kit EVs SEC-3512	39
5.4.- Determinación de la pureza mediante HPLC-SEC	40
5.4.1.- Kit EVs SEC-7012	40
5.4.2.- Kit EVs SEC-3512	42
5.5.- Detección de exosomas mediante citometría de flujo	44
5.5.1.- Kit EVs SEC-7012	44
5.5.2.- Kit EVs SEC-3512	45
5.6.- Caracterización morfológica mediante TEM	46
5.6.1.- Kit EVs SEC-7012	46
5.6.1.- Kit EVs SEC-3512	48



5.7.- Caracterización morfológica mediante DLS	50
5.7.1.- Kit EVs SEC-7012	50
5.7.2.- Kit EVs SEC-3512	50
<b>6.- CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>
<b>8.- ANEXOS</b>	<b>57</b>



## TABLA DE ACRÓNIMOS

ALIX	Proteína de interacción con ALG-2
BCA	Ácido bicinconínico
BLMA	Banco de Leche Materna de Asturias
BSA	Albúmina de suero bovino
CD9	Tetraspanina CD9
CD63	Tetraspanina CD63
CD81	Tetraspanina CD81
DAD	Diode array detector
DG-UC	Ultracentrifugación con gradiente de densidad
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DUC	Ultracentrifugación diferencial
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción con acoplamiento enzimático
EMBA	Asociación Europea de Bancos de Leche
EVs	Vesículas extracelulares
GC	Cromatografía de gases
GEAB	Grupo de Espectrometría Analítica y Bioanalítica
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMBANA	Asociación Norteamericana de Bancos de Leche Humana
HMDEs	Exosomas derivados de la leche humana
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
ISEV	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares
LC	Leche cruda
LP	Leche pasteurizada
MGECs	Células epiteliales de las glándulas mamarias
mRNA	ARN mensajero
miRNA	microARN
NTA	Análisis del seguimiento de nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Ficoeritrina



Universidad de  
Oviedo

MCAB  
Trabajo de Fin de Máster  
Alexandra Mansilla Roux

PEG Polietilenglicol  
PFA Paraformaldehído  
RSD Desviación estándar relativa  
SD Desviación estándar  
SEC Cromatografía de exclusión por tamaños  
TEM Microscopía de transmisión electrónica  
Tg Tiroglobulina



## RESUMEN

Este trabajo de fin de máster se enfoca en la caracterización de los exosomas presentes en la leche humana y el efecto que tiene la pasteurización sobre estos componentes biológicamente activos. Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares que desempeñan un papel crucial en la comunicación intercelular y pueden influir significativamente en la salud y el desarrollo del lactante. En este estudio se emplean diversas técnicas analíticas avanzadas, tales como la cromatografía de exclusión por tamaños, la microscopía electrónica, la citometría de flujo y la dispersión dinámica de la luz para la caracterización de los exosomas en muestras de leche cruda y leche pasteurizada donadas al Banco de Leche Materna de Asturias. Se han empleado dos kits de aislamiento por SEC con diferente rango de exclusión, proporcionando mejores resultados el kit SEC-7012, siendo el de mayor intervalo de separación (70-1000 nm). Se analizan aspectos como la reproducibilidad de los métodos de aislamiento, el factor de preconcentración, el contenido proteico total, el tamaño, la pureza y la concentración de los exosomas aislados. Los resultados indican que la pasteurización puede alterar la morfología, el contenido proteico y la pureza de los exosomas, lo que tiene implicaciones importantes para la conservación de sus propiedades bioactivas en la leche materna donada. La información obtenida sobre el efecto que tiene la pasteurización en los exosomas puede ser relevante para la optimización de los procesos de tratamiento de la leche materna en bancos de leche, con el objetivo de preservar al máximo sus beneficios nutricionales e inmunológicos, asegurando así una mejor calidad de la leche administrada a los lactantes.

**PALABRAS CLAVE:** Aislamiento, caracterización, exosomas, leche humana, pasteurización.



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- La leche materna: un superalimento

La leche materna es un superalimento funcional desarrollado por los mamíferos para promover el adecuado crecimiento de sus crías. Se trata de un complejo y dinámico sistema de nutrientes que interviene en el correcto desarrollo de las funciones inmunológicas del lactante protegiéndolo de las enfermedades mientras su sistema inmunitario madura. Es un mecanismo clave para la modulación de la actividad metabólica y de la respuesta inflamatoria además de representar un sofisticado sistema de señalización endocrina.<sup>[1-4]</sup>

Al ser la leche materna la única fuente de alimentación del neonato, se ha visto sometida a un gran número de procesos evolutivos para ser capaz de adaptarse a las necesidades específicas de cada individuo, por lo que se considera que se trata del alimento ideal para la alimentación infantil. De hecho, se recomienda seguir una alimentación exclusiva a base de leche materna durante los primeros seis meses de vida y continuar con la lactancia durante los primeros dos años introduciendo una alimentación combinada a partir de los seis meses.<sup>[5-7]</sup>

La leche humana varía a lo largo de todo el periodo de lactancia, distinguiéndose principalmente tres etapas: el calostro, la leche de transición y la leche madura, tal y como lo refleja la figura 1.



Figura 1. Etapas del periodo de lactancia (adaptación de Nuñez-Delgado et al., (2024))<sup>[8]</sup>

El calostro se define como el primer fluido secretado por la madre y se establece generalmente que su producción ocurre entre los días 1 a 4 tras el parto, aunque esta temporalidad varía de un individuo a otro pudiendo alcanzar hasta el séptimo día. Su textura es viscosa, es de color amarillo debido a la presencia de  $\beta$ -caroteno y se producen normalmente unos pocos mililitros al día (~ 20). En esta etapa la leche está compuesta mayoritariamente por



vitaminas liposolubles, minerales, proteínas, lactobacilos *Bifidus*, leucocitos e inmunoglobulinas como la inmunoglobulina A (IgA), que son las que le confieren inmunidad pasiva al recién nacido permitiendo así que su sistema inmunológico se desarrolle correctamente. Además, en menor concentración se encuentran las grasas y la lactosa, lo que refuerza el hecho de que su principal función no es nutricional sino inmunológica.<sup>[3,8,9]</sup>

La leche de transición aparece en el quinto día y permanece normalmente hasta el vigésimo día tras el parto, pudiendo llegar a producir hasta 660 mL al día. Aunque comparte algunas de las características del calostro, su textura es más líquida y es de color crema debido a la emulsificación de las grasas que la componen. Esta fase de la leche está enriquecida en lactosa, grasas y vitaminas hidrosolubles y disminuye su contenido en proteínas, anticuerpos y vitaminas liposolubles respecto al calostro, supliendo así las necesidades nutricionales del bebé y estimulando su crecimiento por su mayor aporte calórico.<sup>[3,8,9]</sup>

A partir de la tercera semana post-parto la leche se considera madura y se producen una media de 750 mL al día. La leche madura está compuesta en un 90 % por agua, lo que permite mantener al bebé hidratado haciendo innecesario el aporte de otros líquidos. Se compone principalmente de hidratos de carbono (lactosa y galactosa), grasas (ácidos grasos de cadena larga y colesterol) y proteínas (enzimas digestivas, proteínas séricas y caseína), además de diversos aminoácidos, factores de crecimiento, vitaminas y minerales que fomentan el crecimiento continuado y el correcto desarrollo del bebé.<sup>[8,9]</sup>

## 1.2.- Composición de la leche humana

Tal y como se ha comentado previamente, la leche humana es un fluido biológico cuya composición cambia a lo largo de todo el periodo de lactancia de manera a satisfacer las necesidades específicas del recién nacido en cada etapa de crecimiento.

Los componentes de la leche pueden clasificarse en tres categorías principales descritas a continuación. En primer lugar destacan los macronutrientes como las proteínas, los lípidos y los carbohidratos y en segundo lugar los micronutrientes como las vitaminas, los minerales y los oligoelementos. En la tabla 1 se recoge de manera resumida la composición de macro y micronutrientes de la leche humana y se compara con la de la leche bovina.

Además de los nutrientes esenciales, la leche materna también contiene una variedad de componentes bioactivos que proporcionan beneficios adicionales para la salud del bebé. Estos incluyen anticuerpos, enzimas, hormonas y factores de crecimiento que ayudan a proteger al bebé contra infecciones y enfermedades, promueven el desarrollo del sistema inmunológico, mejoran la digestión y la absorción de nutrientes y contribuyen al desarrollo cerebral y neuronal del bebé.<sup>[10]</sup> En la tabla 2 se recogen de manera detallada estos componentes bioactivos y sus efectos sobre la salud del neonato.



Tabla 1. Composición de macro y micronutrientes de las leches humana y bovina (adaptación de García-López (2011), Hester et al. (2012), Samuel et al. (2020) y Wood et al. (2021)) [9,11,12,13]

Composición	Calostro	Leche de transición	Leche madura	Leche bovina
Energía (kcal/L)	536	577	652	701
<b>Macronutrientes (g/L)</b>				
Proteínas	25	17	13	32
Ratio suero:caseína	90:10	70:30	60:40	20:80
Lípidos	22	30	38	38
Carbohidratos	56	59	67	47
<b>Micronutrientes (mg/L)</b>				
Vitamina A	1,610		0,610	0,270
Hierro	0,700	Información no disponible en la literatura	30,000	0,460
Cobre	0,400		0,011	0,100
Zinc	0,400		0,300	-
Minerales catiónicos (mEq/L)	70		50	150

Tabla 2. Componentes bioactivos de la leche humana y sus efectos sobre la salud del neonato (adaptación de Rodríguez Avilés et al. (2020)) [10]

Compuestos antimicrobianos	Compuestos de tolerancia	Compuestos para el desarrollo del sistema inmune	Compuestos antiinflamatorios
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inmunoglobulinas</li> <li>- Lactoferrina</li> <li>- Lisozima</li> <li>- Lactoperoxidasa</li> <li>- Mucinas</li> <li>- Ácidos grasos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citoquinas</li> <li>- Anticuerpos anti idiotípicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Macrófagos</li> <li>- Neutrófilos</li> <li>- Linfocitos</li> <li>- Citoquinas</li> <li>- Factores de crecimiento</li> <li>- Hormonas</li> <li>- Péptidos lácteos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citoquinas</li> <li>- Receptores antagonistas</li> <li>- Moléculas de adhesión</li> <li>- Ácidos grasos de cadena larga</li> <li>- Hormonas</li> <li>- Factores de crecimiento</li> <li>- Lactoferrina</li> </ul>





### 1.3.- Vesículas extracelulares

Además de los componentes bioactivos mencionados en la tabla 2, la leche materna posee otros componentes con actividad biológica denominados como vesículas extracelulares (EVs). Inicialmente se creía que estas vesículas servían como medio para deshacerse de los desechos y se pensaba en consecuencia que no cumplían ninguna función biológica o nutritiva, pero recientemente se ha descubierto que ejercen otras muchas funciones.<sup>[14]</sup>

Se distinguen tres tipos de EVs en función de su biogénesis y su tamaño: las microvesículas, los cuerpos apoptóticos y los exosomas.

#### 1.3.1.- Microvesículas y cuerpos apoptóticos

Las microvesículas y los cuerpos apoptóticos son dos clases de EVs que se describen como pequeñas partículas con una envoltura membranosa.<sup>[2]</sup>

Las microvesículas son estructuras de tamaño variable, generalmente establecido entre 100 nm y 1 µm, que se forman tras el abultamiento de la membrana plasmática (*bleb* celular) y su consiguiente expulsión. Pese a la similitud estructural que guardan con los exosomas, las microvesículas difieren en tamaño, composición y origen celular. Además, poseen diversos receptores de membrana, proteínas involucradas en migración y señalización celular, lípidos, carbohidratos y material genético.<sup>[15,16]</sup>

Por otra parte, los cuerpos apoptóticos son considerados como las EVs de mayor tamaño, comprendido entre 500 nm y 2 µm. Estas vesículas aparecen tras la ruptura de una célula apoptótica en fragmentos subcelulares y pueden contener micronúcleos, restos de cromatina, porciones del citosol, proteínas desnaturalizadas, fragmentos de ADN e incluso orgánulos intactos.<sup>[16,17]</sup>

#### 1.3.2.- Exosomas

En el año 2007 se identificó por primera vez la presencia de grandes cantidades de exosomas en la leche humana.<sup>[18]</sup>

Los exosomas se definen como pequeñas EVs<sup>[17,19]</sup> con un tamaño generalmente comprendido entre los 30 y los 120 nm, aunque algunos sugieren que su tamaño puede abarcar hasta los 150 nm.<sup>[1,6,14,17,18,19,20,21]</sup> Se trata de nanopartículas esféricas envueltas por una bicapa fosfolipídica que son secretadas por casi cualquier tipo de célula y se encuentran en diversos fluidos biológicos, como el líquido cefalorraquídeo, la sangre, la orina, la linfa y la saliva.<sup>[14,17,18,21,22,23]</sup> Además, se han encontrado en el calostro y la leche madura de un gran número de mamíferos, incluyendo a los humanos, y en este caso son secretados exclusivamente por las células epiteliales de las glándulas mamarias (MGECs).<sup>[1,3,6,17,20,21,23]</sup>



Su concentración es entre un 50 y un 270 % mayor en la leche bovina que en la humana y son más abundantes en el calostro y menos en las leches de transición y madura.<sup>[18]</sup>

Los exosomas derivados de la leche humana (HMDEs) encierran en su interior una valiosa carga compuesta por un gran número de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos procedentes de las células de origen, entre los que se destacan el ARN mensajero (mRNA), el microARN (miRNA) y el ADN.<sup>[1,2,14,17,20,21,22]</sup> Estos exosomas se caracterizan fundamentalmente

por la presencia de diversas proteínas de membrana como las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90, las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, la proteína de interacción con ALG-2 (ALIX) y la sintenina.<sup>[6,17,19,21]</sup> La figura 2 ilustra de manera simplificada la estructura y los contenidos de un exosoma.

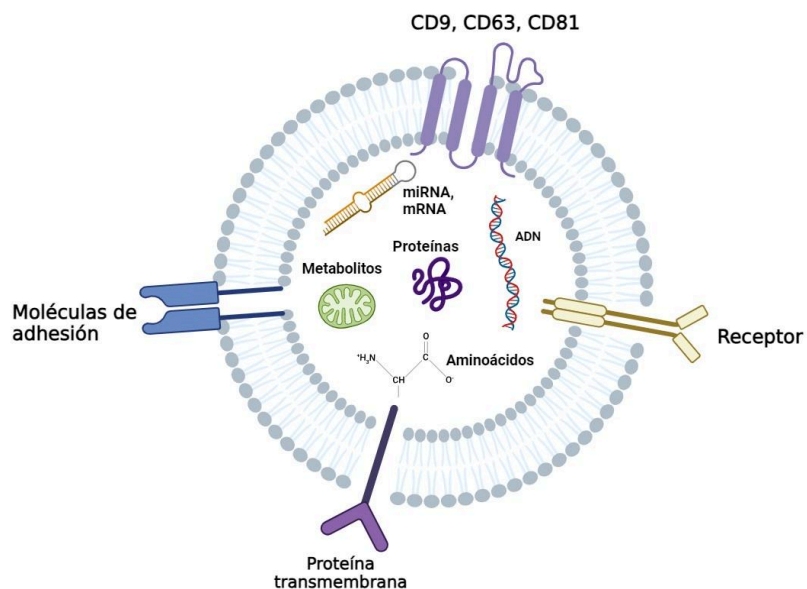


Figura 2. Estructura simplificada y contenidos de un exosoma (creado con BioRender)

Los HMDEs son considerados como las moléculas señalizadoras de mayor importancia en la mediación de la comunicación celular entre la madre y el lactante a través de la interacción entre los antígenos de su superficie y los receptores de la célula diana.<sup>[3,17,18,21]</sup> Diversos estudios han centrado su investigación en el posible impacto que tienen estas partículas sobre el desarrollo de los sistemas inmunitario y digestivo del lactante, así como el papel que juegan sobre su metabolismo y su crecimiento.<sup>[18,23]</sup> Los HMDEs son capaces de atravesar el endotelio intestinal del lactante tras su ingesta para ingresar a la circulación sanguínea y ser asimilados por múltiples células de los órganos y tejidos colindantes.<sup>[6,20]</sup> De esta manera pueden transportar su carga y liberarlo en las células correspondientes, regulando sus funciones, cambiando su fenotipo celular, controlando la actividad de las células inmunológicas, favoreciendo la comunicación metabólica entre los órganos y desempeñando un papel en enfermedades infecciosas y no transmisibles.<sup>[14,18,20,22,23]</sup>

Estudios recientes han demostrado la capacidad de los HMDEs y su carga de resistir las condiciones degradantes encontradas en el tracto gastrointestinal (bajo pH), destacando así



su potencial para ser empleados en medicina traslacional por su gran biodisponibilidad tras la administración oral.<sup>[3,6,14,19,20]</sup> Sin embargo, la pasteurización de la leche puede alterar la bicapa lipídica de los HMDEs perturbando su absorción intestinal y acelerando la degradación del miRNA.<sup>[2]</sup>

La habilidad de los HMDEs para proteger y transportar moléculas bioactivas *in vivo* así como su baja inmunogenicidad, sus propiedades mecánicas, su circulación prolongada en el torrente sanguíneo y el hecho de que ofrezcan un medio biocompatible de transporte por su compatibilidad con las células receptoras ha alertado a la industria farmacéutica sobre su gran potencial como plataforma vanguardista de distribución de fármacos.<sup>[14,17,18]</sup>

#### 1.4.- Bancos de leche

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que los neonatos sean alimentados con leche materna.<sup>[24]</sup> Sin embargo, en los casos en los que la cantidad de leche producida por la madre es insuficiente, las alternativas son la leche de fórmula o leche humana donada.<sup>[24,25]</sup> En estos casos, la OMS recomienda alimentar al recién nacido con leche humana donada a bancos de leche ya que la consideran como la mejor opción para asegurar una nutrición óptima del neonato,<sup>[26]</sup> especialmente para la alimentación del recién nacido prematuro con mayor riesgo de desarrollar patologías digestivas o intestinales y déficit inmunitario.<sup>[27]</sup>

La leche de fórmula resulta más difícil de digerir para los bebés prematuros que la leche humana además de poder suponer un riesgo severo para el desarrollo de problemas intestinales. Aun así, la leche humana donada es más cara que la leche maternizada y puede no contener los nutrientes suficientes para el correcto crecimiento del bebé prematuro.<sup>[25]</sup> La alimentación a base de leche humana donada frente a leche de fórmula ha demostrado reducir el riesgo de padecer trastornos intestinales, enterocolitis necrotizante y otras infecciones invasivas.<sup>[24,25]</sup>

Por esta razón, un gran número de bancos de leche han sido creados en todo el mundo para tratar de atender a la gran demanda de leche humana donada. Los bancos de leche humana están establecidos en hospitales de más de 60 países y cada vez son más frecuentes en países subdesarrollados.<sup>[28]</sup> Existen diversas organizaciones encargadas de gestionar estos bancos de leche como son la Asociación Europea de Bancos de Leche (EMBA), con más de 200 bancos disponibles en 20 países europeos o la Asociación Norteamericana de Bancos de Leche Humana (HMBANA), que cuenta con 32 bancos de leche distribuidos por todo el territorio estadounidense.<sup>[29,30]</sup> Así, en un informe de 2020 la Virtual Communication Network compuesta por los líderes mundiales de bancos de leche estimó que el número de bancos de leche operativos era de 756 y que aproximadamente 800000 neonatos recibían leche humana donada anualmente.<sup>[26]</sup>



### **1.5.- Efecto de la pasteurización en los componentes nutricionales de la leche**

Para asegurar la calidad y seguridad de la leche humana donada, los bancos de leche llevan a cabo múltiples controles microbiológicos, toxicológicos y nutricionales sobre esta.<sup>[27]</sup> La leche donada debe ser sometida a un proceso de pasteurización para inactivar los agentes víricos y bacteriológicos, aunque este proceso puede alterar la composición de la leche.<sup>[27,31]</sup> Actualmente, la pasteurización de Holder es el proceso recomendado por las guías internacionales ya que ofrece un buen compromiso entre seguridad microbiológica y calidad nutricional de la leche donada.<sup>[31]</sup>

Tras la pasteurización, se ha encontrado en los análisis de macronutrientes que existen diferencias significativas en el contenido graso, pero no en el proteico o en el de lactosa en la leche donada. Además, este proceso afecta también a los niveles de ciertos componentes bioactivos como la IgA secretora o la lactoferrina, aunque son escasos los estudios que evalúan el efecto que tiene la pasteurización sobre los exosomas.

Por todo ello, se necesita establecer un consenso sobre la naturaleza de la leche humana como sustancia regulada para poder establecer un procedimiento unificado para su adecuado tratamiento, manejo y empleo.<sup>[28]</sup>

### **1.6.- Técnicas para el aislamiento de los exosomas**

En 2014, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) publicó los requisitos mínimos y las recomendaciones para el estudio de las EVs. Actualmente, aún no existen métodos estandarizados y reproducibles para el aislamiento de los HMDEs, lo que se explica por la gran variabilidad inter- e intraespecífica que ocurre naturalmente entre las diferentes muestras de leche.<sup>[20]</sup>

Uno de los grandes retos enfrentados a la hora de aislar los HMDEs radica en la elección de un método óptimo, fiable y eficiente.<sup>[17,20,32,33]</sup> Es más, ni siquiera existe un consenso sobre la vida útil y el procesamiento de muestras de leche cruda para la investigación de las EVs, encontrando estudios que aseguran que los cambios de temperatura y el almacenamiento prolongado no afectan a la composición de la leche y a la integridad de los HMDEs mientras que otros estudios aseguran todo lo contrario.<sup>[20]</sup>

Existen diversos métodos para el aislamiento de los HMDEs, siendo los más habituales aquellos basados en la ultracentrifugación en presencia o ausencia de un gradiente de densidad, la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), la ultrafiltración, la precipitación y la inmunoafinidad.<sup>[17,18,33,34]</sup> Estas técnicas ofrecen la posibilidad de discriminación entre las distintas poblaciones de EVs, aunque para obtener EVs íntegras y correctamente purificadas se requiere la combinación de varios de estos métodos.<sup>[33,34]</sup>



La pureza de los HMDEs está sujeta a variaciones debido a la presencia de partículas, proteínas, ácidos nucleicos y otras EVs similares en tamaño y composición que en ocasiones pueden co-precipitar e interactuar con estos impidiendo su aislamiento.<sup>[20,33]</sup>

Al final de este apartado, se propone la figura 3 a modo de resumen en la que se expone una comparativa de las diferentes técnicas de aislamiento.

### **1.6.1.- Ultracentrifugación diferencial (DUC)**

La DUC fue la primera técnica utilizada para el aislamiento de las EVs.<sup>[33]</sup> Se trata de la técnica más ampliamente utilizada para este fin y se estima que el 56 % de las metodologías de aislamiento de exosomas empleadas en la investigación sobre estos se basan en esta técnica,<sup>[32,35]</sup> siendo apropiadamente considerada como el patrón-oro frente al cual las nuevas alternativas de aislamiento deberían compararse.<sup>[33,35,36]</sup>

La DUC separa los exosomas del resto de los componentes de la muestra en base a su densidad, su tamaño y su forma mediante una serie de centrifugaciones secuenciales en las que la fuerza centrífuga aumenta progresivamente a lo largo del tiempo, eliminando así células, virus, bacterias, orgánulos subcelulares y otros tipos de EVs.<sup>[20,32,33,35,36,37]</sup> Aunque no existe un protocolo unificado, generalmente la DUC comprende las siguientes etapas: una primera centrifugación a 400 x g para eliminar células y desechos celulares seguida de una centrifugación a 2000 x g para sedimentar los cuerpos apoptóticos (EVs de mayor tamaño), tras lo que se lleva a cabo un nuevo ciclo a 10000-20000 x g para eliminar las microvesículas (EVs de tamaño intermedio) para finalmente realizar una última centrifugación a 100000-120000 x g para sedimentar los exosomas.<sup>[20,32,35,36,37]</sup> Existe la posibilidad de realizar varios lavados tras la DUC para aumentar la pureza de los exosomas, lo que disminuye el rendimiento del aislamiento.<sup>[32]</sup> Además, la duración de las centrifugaciones, la temperatura empleada y la dilución de la muestra afectan a la eficacia del aislamiento.<sup>[33]</sup>

Como ventajas de esta técnica se destacan el aislamiento de los exosomas con un gran rendimiento, el bajo coste de la separación (sin tener en cuenta el equipo), su gran eficacia, la gran pureza de los exosomas aislados, la posibilidad de separar diferentes tipos de EVs sin emplear reactivos químicos y el hecho de que apenas requiere tratamiento de muestra previo.<sup>[18,20,32,33,35,36]</sup>

Asimismo, esta técnica presenta algunas desventajas como son la contaminación proteica procedente de los agregados de caseínas ya que precipitan a la misma fuerza centrífuga que los exosomas, la restricción en el empleo de grandes volúmenes de muestra, la necesidad de equipos especializados, la pobre reproducibilidad, el gran consumo de tiempo, la dificultad para comparar los resultados entre estudios por su gran variabilidad y finalmente los efectos negativos sobre la integridad de los exosomas por la fuerza aplicada sobre ellos.<sup>[18,20,32,33,36,37]</sup>



### **1.6.2.- Ultracentrifugación con gradiente de densidad (DG-UC)**

La DG-UC es otra técnica basada en la ultracentrifugación que ha ganado una reciente popularidad para el aislamiento de exosomas y ya es considerada por muchos como otro patrón-oro en este campo.<sup>[20,33,35,36]</sup> La principal diferencia entre la DG-UC y la DUC es que en la primera la centrifugación ocurre en un tubo con un gradiente de densidad pre-construido.<sup>[33]</sup>

Mediante esta técnica, los exosomas son separados del resto de componentes de la muestra en base a su tamaño y densidad en gradientes *top-down* o únicamente en base a su densidad en el caso de gradientes *bottom-up* gracias al empleo de disoluciones con densidades específicas.<sup>[20,32,35,36,37]</sup> La muestra se coloca en el fondo o en la parte superior de un gradiente continuo o discontinuo y se somete a varios ciclos de ultracentrífuga.<sup>[32,35]</sup> El uso de fuerza centrífuga en combinación con el gradiente de densidad permite que los componentes de la muestra se desplacen hacia su zona de densidad equivalente a un ratio de sedimentación específico para cada uno, donde generalmente los constituyentes más densos se acumulan en el fondo del tubo.<sup>[32,35,36]</sup>

Los dos componentes empleados habitualmente para la construcción de estos gradientes son la sacarosa y el iodixanol.<sup>[33,37]</sup> Los exosomas poseen una flotabilidad característica en gradientes continuos de sacarosa y pese a que este medio es capaz de eliminar agregados proteicos y de EVs, resulta en una disminución sustancial de la recuperación de exosomas.<sup>[36]</sup> Como alternativa, se emplea el iodixanol por ser menos viscoso, inerte, no tóxico, poseer capacidad autoformadora y ser isoosmótico con las EVs, lo que significa que el medio posee una osmolaridad similar a la de las EVs y la osmolaridad es la misma en todas las capas del gradiente. Por todo ello, el iodixanol ofrece un menor tiempo de centrifugación y una mayor resolución que la sacarosa para el aislamiento de exosomas.<sup>[36,37]</sup>

Como ventajas de esta metodología se destacan su gran resolución y la pureza de los exosomas obtenidos ya que permite su separación de los agregados proteicos, la posibilidad de discriminar entre diferentes tipos de EVs y el hecho de que el volumen de la muestra no se vea afectado.<sup>[32,33,36,37]</sup> Por otra parte, esta técnica presenta diversas desventajas como son la necesidad de emplear grandes volúmenes de muestra, la contaminación lipoproteica, el gran consumo de tiempo, la baja productividad, el costoso equipamiento, un rendimiento de 10-50 % y el posible deterioro o agregación de los exosomas.<sup>[20,33,35,36,37]</sup>

### **1.6.3.- Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)**

La SEC es otra de las técnicas aplicadas al aislamiento de exosomas basada en la separación de los componentes de la muestra de acuerdo a su radio hidrodinámico, es decir su tamaño o su peso molecular, mediante el uso de una fase estacionaria porosa.<sup>[32,33,35,37]</sup>



En esta técnica, la muestra se hace pasar a través de un polímero poroso (fase estacionaria) gracias a un flujo constante de disolvente (fase móvil).<sup>[32]</sup> Los componentes con un radio hidrodinámico menor que el tamaño de poro de la fase estacionaria, como las proteínas, son capaces de atravesar estos poros, por lo que son ampliamente retenidos por la fase estacionaria y el tiempo que residen en el interior de la columna es mayor. Por otra parte, los componentes con un radio hidrodinámico mayor que el tamaño de poro de la fase estacionaria, como las EVs, son completamente excluidos del entramado polimérico y por lo tanto se mueven con mayor velocidad en el interior de la columna, lo que causa su elución inmediatamente después del volumen muerto.<sup>[32,33,35,37]</sup> La resolución de una separación por SEC depende esencialmente del tipo de polímero empleado para la fase estacionaria, del tamaño de la columna, de la velocidad del flujo y del volumen de la muestra (recomendable 1-10 % del volumen total de la columna).<sup>[32]</sup>

La SEC se suele emplear para enriquecer las EVs procedentes de diversos fluidos biológicos obtenidas generalmente mediante un proceso de ultracentrifugación y es capaz de eliminar hasta el 99 % de proteínas plasmáticas solubles, más de un 95 % de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y también los ácidos nucleicos, obteniendo EVs con un contenido mínimo de proteínas no asociadas a estas.<sup>[32,36,37]</sup>

Esta técnica ofrece un gran número de ventajas, a saber, su gran reproducibilidad, su bajo coste, su rapidez (10-20 minutos por cromatograma), su sencillez, una buena recuperación (40-90 %), el hecho de no inducir la agregación de las EVs, la preservación de la integridad y la función biológica de las EVs y un rendimiento similar o mayor y una mayor pureza en comparación con las técnicas basadas en la ultracentrifugación.<sup>[32,33,36,37]</sup> Además, esta técnica presenta muy pocas desventajas, destacando únicamente su baja resolución y la co-elución de componentes cuyo tamaño excede el límite de la columna (virus y agregados proteicos).<sup>[36,37]</sup>

#### **1.6.4.- Ultrafiltración**

La ultrafiltración es otra de las técnicas más populares para el aislamiento de los exosomas en base a su tamaño/peso molecular y generalmente se emplea acoplada a la ultracentrifugación para concentrarlos.<sup>[32,33,35,36]</sup>

El fundamento de la ultrafiltración es idéntico al de la filtración convencional.<sup>[35]</sup> Los componentes solubles de la muestra son forzados a pasar a través de varios filtros de membrana con diferente tamaño de poro mediante la aplicación de una presión o de fuerza centrífuga.<sup>[32,33,35,37]</sup> Las partículas grandes se eliminan mediante filtros de 0,8 y 0,45  $\mu\text{m}$ , obteniendo un filtrado relativamente enriquecido en exosomas. Otras EVs son eliminadas del filtrado mediante filtros de 0,22 y 0,1  $\mu\text{m}$ .<sup>[38]</sup> Sin embargo las EVs pueden obstruir los filtros, lo que puede ser evitado mediante una filtración previa con filtros de mayor tamaño de poro.<sup>[33]</sup>





Esta técnica permite la separación de los exosomas de otros componentes solubles de la muestra como las mitocondrias, los lisosomas, los centriolos, las bacterias, los ácidos nucleicos y los agregados proteicos.<sup>[32,36,37]</sup>

Las principales ventajas de la ultrafiltración son su bajo coste, su rapidez (20-30 minutos de proceso), la posibilidad de emplear volúmenes relativamente grandes (>100 mL), el hecho de no requerir equipamiento específico, una recuperación de hasta el 80 % y su gran eficacia, alcanzando una preconcentración de hasta 240 veces.<sup>[32,33,35,36,37]</sup>

Entre sus desventajas se encuentran la obstrucción de los filtros, las uniones inespecíficas a las membranas, las tasas de recuperación variables (10-80 %), la deformación de los exosomas y la ruptura de EVs de mayor tamaño.<sup>[32,33,35,36]</sup>

### **1.6.5.- Precipitación**

La precipitación mediante el empleo de polímeros es una técnica basada en la alteración de la solubilidad o la dispersabilidad de los analitos que ha sido utilizada desde hace años para separar macromoléculas y virus de diversos tipos de muestras y es hoy en día habitualmente empleada para extraer y enriquecer las EVs.<sup>[32,33,35,36]</sup>

Para ello, se emplean polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) que disminuyen la solubilidad de los componentes de la muestra absorbiendo al disolvente, forzándolos así a sedimentar y permitiendo su separación mediante una etapa de filtración o centrifugación.<sup>[32,33,35,37]</sup> Actualmente existen varios kits comerciales basados en este principio, entre los cuales se destaca como el más ampliamente utilizado el ExoQuick™ (System Biosciences) ya que es capaz de aislar los exosomas humanos a partir de suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y medios de cultivo eliminando satisfactoriamente las lipoproteínas.<sup>[32,33,35,36,37,39]</sup>

Como ventajas de la precipitación se destacan su rapidez, su sencillez, una recuperación de hasta el 90 % y el hecho de no requerir equipamiento específico.<sup>[20,32,33,36,35,37,39]</sup> Sin embargo, esta técnica posee algunas desventajas como son la baja selectividad y el enriquecimiento y la co-precipitación de contaminantes proteicos.<sup>[20,32,33,36]</sup>

### **1.6.6.- Ensayos de inmunoafinidad**

Los exosomas poseen un gran número de proteínas en su superficie cuya interacción con anticuerpos específicos permite su aislamiento mediante ensayos de inmunoafinidad, consiguiendo así su separación de una muestra heterogénea.<sup>[32,33,35]</sup>

Estos ensayos emplean anticuerpos monoclonales inmovilizados sobre una superficie para capturar EVs que posean un marcador específico que idealmente debería estar ligado a su membrana y ser expresado únicamente por las EVs de interés.<sup>[32,33,35,36,37]</sup>





Generalmente, se suelen seleccionar como marcadores específicos para el aislamiento de exosomas a las proteínas CD9, CD63 y CD81. Los ensayos de inmunoabsorción con acoplamiento enzimático (ELISA) son los métodos más empleados para este fin<sup>[33,35]</sup> y pueden desarrollarse sobre diferentes superficies inmovilizadoras como placas multipocillo o partículas magnéticas. Estas últimas han demostrado una mayor eficacia para capturar EVs debido a su mayor área de contacto, a sus características de difusión y a la captura magnética.<sup>[32,33,36,37]</sup>

Las principales ventajas de este tipo de técnicas son su simplicidad, la posibilidad de realizar múltiples ensayos simultáneamente, la gran pureza de los exosomas obtenidos y la preservación de la integridad de su contenido.<sup>[32,33,36,37]</sup> Por otra parte, esta técnica posee un gran número de desventajas como son su lentitud, la dificultad de encontrar un marcador específico, la estabilidad de los epítopos de los marcadores, la afinidad y avidéz de los anticuerpos y su disponibilidad y la necesidad de un tratamiento previo por ultracentrifugación o ultrafiltración.<sup>[32,33,36,37]</sup>

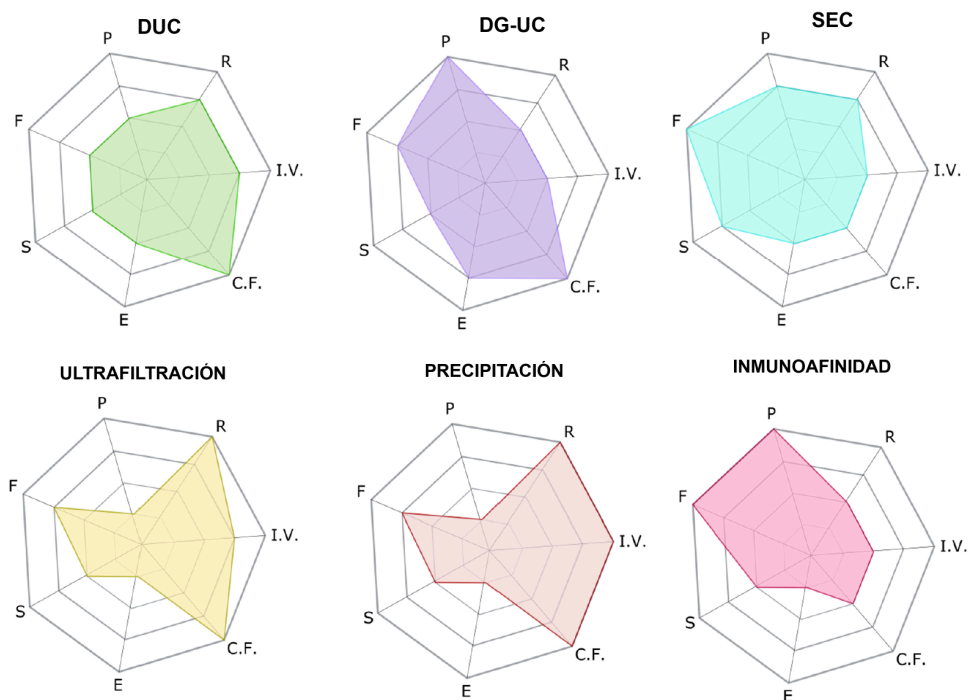


Figura 3. Comparativa de las técnicas para el aislamiento de exosomas, donde P es la pureza, R la recuperación, IV el volumen empleado, CF el factor de preconcentración, E la habilidad requerida, S el cribado de biomarcadores poco abundantes y F la captura del biomarcador seleccionado (adaptación de Clos-Sansalvador et al. (2022))<sup>[32]</sup>



## 1.7.- Técnicas para la caracterización de los exosomas

### 1.7.1.- Caracterización morfológica

#### ***Microscopía de transmisión electrónica (TEM)***

La TEM es una técnica de microscopía en la que un haz de electrones es transmitido a través de una muestra ultrafina interaccionando con ella a medida que la atraviesa.<sup>[40,41,42]</sup> Los electrones prácticamente no transfieren su energía cinética debido a su pequeña masa, por lo que la dispersión de estos por la muestra es esencialmente elástica. Es este tipo de dispersión la que aporta la información sobre la muestra.<sup>[41]</sup> Tras la interacción de los electrones con la muestra, se forma una imagen que se magnifica mediante una serie de lentes electromagnéticas gracias a la carga negativa de estos y se lleva hasta el detector.<sup>[40,41]</sup>

Debido a la pequeña longitud de onda del haz de electrones, es posible obtener una resolución de unos 0,2 nm en un microscopio TEM convencional, aunque en muestras biológicas el límite de resolución se encuentra entorno a los 2 nm por el tratamiento que requieren.<sup>[42]</sup> La calidad de una imagen de TEM está definida por la resolución, el contraste y la relación señal/ruido y aunque existen limitaciones en el procesamiento de las muestras, la resolución de esta técnica es muy superior a la de un microscopio óptico convencional.<sup>[41,42]</sup>

#### ***Dispersión dinámica de la luz (DLS)***

La DLS es una técnica óptica que se basa en la medida con resolución temporal de la luz dispersada por moléculas o partículas. Cuando el haz de un láser incide sobre una disolución de macromoléculas la luz es dispersada en todas las direcciones en función del tamaño y la forma de estas macromoléculas. Por lo tanto, las fluctuaciones en la componente eléctrica de la luz dispersada elásticamente, que son debidas al movimiento browniano de las moléculas en un disolvente dado, pueden emplearse para determinar su tamaño en tiempo real.<sup>[43,44,45]</sup> El movimiento browniano depende del tamaño de las partículas, de la temperatura y de la viscosidad del disolvente. Así, las partículas grandes difunden lentamente y son encontradas en posiciones cercanas a distintos tiempos, mientras que las partículas pequeñas como las del disolvente difunden rápidamente y por tanto no adoptan una posición específica. Este posicionamiento viene determinado por el coeficiente de difusión de la partícula siguiendo la ecuación de *Stokes-Einstein*.<sup>[43,45]</sup>

Los patrones de intensidad de la dispersión se correlacionan consigo mismos para monitorizar el decaimiento de la correlación. Según la velocidad de difusión de las partículas, el tiempo de decaimiento de la correlación es diferente, siendo menor para partículas pequeñas.<sup>[44]</sup>



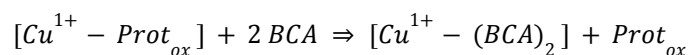
### **Análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA)**

El fundamento de esta técnica es idéntico al de la DLS, es decir, que se mide la luz dispersada por la muestra tras la incidencia de un láser sobre ella, con la diferencia de que el NTA emplea el movimiento browniano para obtener el coeficiente de difusión de cada partícula individualmente y poder calcular su tamaño mediante la citada ecuación de *Stokes-Einstein*.<sup>[46,47,48]</sup>

El sistema óptico empleado en esta técnica posee una iluminación multiespectral basada en tres láseres distintos (generalmente de 450, 520 y 635 nm) que permite analizar un gran rango de tamaños de partícula diferentes simultáneamente (desde 10-30 nm a 1-2 μm). Otros parámetros que pueden ser determinados mediante esta técnica son la concentración de nanopartículas, la intensidad relativa de la luz dispersada y la fluorescencia de partículas marcadas.<sup>[46,48]</sup>

#### **1.7.2.- Determinación del contenido proteico total**

La determinación del contenido proteico proporciona una estimación de la cantidad de vesículas extracelulares presentes en la muestra. Uno de los ensayos más empleados para la determinación del contenido proteico total es el ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Este ensayo se basa en la determinación de Cu(I) tras la formación del complejo Cu(I)-(BCA)<sub>2</sub> mediante la siguiente reacción:



que ocurre en condiciones alcalinas. El complejo formado, de color morado intenso, muestra una banda de absorción con un máximo a 592 nm.<sup>[49,50]</sup> Un paso crucial de este ensayo es la disponibilidad de Cu(I) que reaccione con el BCA, que a su vez depende de la capacidad oxidoreductora de las proteínas para reducir al Cu(II). Existen dos mecanismos aceptados: la reducción del Cu(II) gracias a aminoácidos como el triptófano, la tirosina y la cisteína y la reducción del Cu(II) a través de los enlaces peptídicos.<sup>[49]</sup>

Mientras que la temperatura no afecta al primer mecanismo, la eficiencia del segundo depende ampliamente de esta. Así, a 37°C solo se observa una oxidación parcial de las proteínas y por lo tanto una formación parcial del color, mientras que a 60°C la intensidad de color observada es mayor.<sup>[49]</sup>

#### **1.7.3.- Caracterización de la pureza**

##### **Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

La HPLC es un tipo de cromatografía de columna empleada para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla.



Su principal ventaja frente a la cromatografía de gases (GC) es que no requiere que los analitos sean volátiles, por lo que se pueden separar macromoléculas fácilmente. Este tipo de cromatografía emplea una columna empaquetada con una fase estacionaria (que puede ser sólida o líquida) y una fase móvil líquida que se introduce en la columna con presiones de hasta 400 atm.<sup>[51,52,53]</sup>

La retención de un compuesto en el interior de la columna está determinada por la partición de este entre las fases móvil y estacionaria, es decir, las interacciones físicas o químicas del analito con estas fases, que dependen de la naturaleza del analito y de la composición de ambas fases. Por lo tanto, pequeños cambios en la naturaleza de la fase móvil pueden tener un enorme impacto sobre el tiempo de retención de los analitos. La separación puede ser isocrática, donde no varía la composición de la fase móvil o en gradiente, donde la composición varía a lo largo de la separación.<sup>[51,52,53]</sup>

El HPLC se emplea para identificar las proteínas solubles y otros componentes de pequeño tamaño que puedan estar presentes en muestras biológicas para así determinar la pureza de los exosomas aislados.

### **Citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica empleada para la cuantificación de la luz dispersada por células, vesículas, microorganismos o partículas sintéticas examinadas una por una a gran velocidad y de la emisión fluorescente tras la irradiación con uno o múltiples láseres. La dispersión puede medirse en línea recta (*Forward Scatter*), ofreciendo información sobre el tamaño o a un ángulo de 90° (*Side Scatter*), ofreciendo información sobre la granularidad y la complejidad interna, aunque la caracterización de los parámetros celulares deriva principalmente de las características fluorescentes.<sup>[54,55,56]</sup>

La dispersión de la luz y la emisión fluorescente son independientes entre sí. Para conseguir una emisión fluorescente, la muestra se modifica mediante transfección y expresión de proteínas fluorescentes, mediante tinción con colorantes fluorescentes o mediante unión de anticuerpos conjugados a una marca fluorescente.<sup>[54]</sup> Además, se pueden emplear marcadores específicos (como las tetraspaninas en el caso de los exosomas) para identificar inequívocamente a un grupo de partículas específico.

## **2.- OBJETIVOS**

Este trabajo se centra principalmente en cumplir dos objetivos:

- ❖ Aislamiento y caracterización de los exosomas de la leche humana en la etapa de lactancia correspondiente a la leche madura, donde se pretende comparar las características que presentan los exosomas aislados por SEC



- ❖ Evaluación del efecto que tiene la pasteurización sobre las características de los exosomas aislados mediante este procedimiento

### 3.- MATERIALES Y REACTIVOS

#### *Material fungible*

- ❖ Tubos de centrifuga CTGP-050-050 (astiK's)
- ❖ Bandejas de pesada WPAP-041-500 (astiK's)
- ❖ Espátulas smartSpatula® (Merck Millipore)
- ❖ Jeringas de plástico de 2,5 mL y 5 mL (Pentaferte Italia)
- ❖ Agujas BD Microlance™ 3 (Becton Dickinson)
- ❖ Filtros de jeringa SPFV-122-100 y SPFV-222-100 (Branchia)
- ❖ Filtros de jeringa SLVV033RS (Merck Millipore)
- ❖ Tubos para recogida de muestras (Deltalab)
- ❖ Tubos de microcentrifuga PCR-005-1K0, PCR-015-5K0 y PCR-020-500 (astiK's)
- ❖ Puntas de micropipeta TIPP-010-1K0 y TIPP-201-1K0 (astiK's)
- ❖ Puntas de micropipeta 50-1000 µL (Deltalab)
- ❖ Placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific)
- ❖ Placas de 384 pocillos (Thermo Fisher Scientific)
- ❖ Filtros de centrifuga Amicon™ Ultra 0,5 mL 100 kDa y tubos colectores (Merck Millipore)

#### *Equipos y materiales asociados*

- ❖ Centrifuga Gyrozen 1580R, rotores Gyrozen GRF-G-m2.0-30 y GRF-G-85-6 (Gyrozen, Daejeon, Corea)
- ❖ Baño termostático (Raypa, Terrassa, España)
- ❖ Balanza Pioneer™ Analytical PX (Ohaus, Nänikon, Suiza)
- ❖ Kit EVs SEC-7012 y SEC-3512 (Immunostep Biotech, Salamanca, España)
- ❖ Micropipetas de 0,5-10 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- ❖ Suministro de agua ultrapura Purelab® flex 3 (ELGA LabWater, High Wycombe, Reino Unido)
- ❖ Espectrofotómetro Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca)
- ❖ Centrifuga MiniSpin™ con rotor F-45-12-11 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)



- ❖ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Illinois, EEUU)
- ❖ Termoagitador TS-100C (Biosan, Riga, Letonia)
- ❖ Liquid Chromatograph LC-10AD VP, System Controller SCL-10A VP, Diode Array Detector (DAD) SPD-M10A VP (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón), botellas para fases móviles
- ❖ Válvula 7725i (Rheodyne, California, EEUU)
- ❖ Columna Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva, Uppsala, Suecia)
- ❖ Loop 50 µL
- ❖ Medidor de pH FiveEasy (Mettler Toledo, Ohio, EEUU)
- ❖ Agitador magnético FB15038 (Fisher Scientific, New Hampshire, EEUU)
- ❖ Electron Microscope JEM-1011 (Jeol, Tokio, Japón)
- ❖ DLS Zetasizer Nano ZS, micro-cubeta Zetasizer Nano Series ZEN0040 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido)
- ❖ ExoStep™ Exosome FACS capture and detection kit (Immunostep Biotech, Salamanca, España)
- ❖ Citómetro Cytoflex S (Beckman Coulter, California, EEUU)

### **Reactivos**

- ❖ Hidróxido sódico (Merck Millipore, Solna, Suecia)
- ❖ Azida sódica (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- ❖ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- ❖ Agua ultrapura (ELGA LabWater, High Wycombe, Reino Unido)
- ❖ Albúmina de suero bovino (BSA) liofilizada (Sigma-Aldrich, Steinheim Alemania)
- ❖ Tris-HCl (EMD Millipore, Massachusetts, EEUU)
- ❖ Cloruro sódico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- ❖ Metanol de grado HPLC (Sigma-Aldrich, Chesnes, Francia)
- ❖ Cloruro potásico (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU)
- ❖ Patrón liofilizado de exosomas de suero humano (HansaBioMed Life Sciences, Tallinn, Estonia)
- ❖ Fosfato potásico monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Tokio, Japón)
- ❖ Fosfato sódico dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- ❖ Paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)



### **Disoluciones**

- ❖ *Running buffer*: PBS comercial con 0,09 % (p/v) de  $\text{NaN}_3$ . Preparado pesando 0,09 g de  $\text{NaN}_3$ , disolviéndolos en 100 mL de PBS y filtrando la disolución mediante filtro de jeringa de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- ❖ NaOH 0,5 M. Preparado pesando 0,1 g de NaOH y disolviéndolos en 5 mL de agua ultrapura.
- ❖ Patrón de BSA 100 ppm. Preparado tomando 45  $\mu\text{L}$  de un stock de BSA de 2000 ppm y llevándolos a 900  $\mu\text{L}$  con PBS comercial.
- ❖ *Working reagent*: 50 partes de reactivo A y 1 parte de reactivo B del kit Pierce™ BCA Protein Assay. Preparado mezclando 686  $\mu\text{L}$  del reactivo A con 14  $\mu\text{L}$  del reactivo B y almacenando en oscuridad por la fotosensibilidad del reactivo B.
- ❖ Agua ultrapura y metanol de grado HPLC desgasificados durante 15 minutos en baño de ultrasonidos.
- ❖ Fase móvil: Tris-HCl 10 mM y NaCl 75 mM a pH 7,22. Preparada pesando 1,578 g de Tris-HCl y 4,383 g de NaCl, llevando a 500 mL con agua ultrapura, ajustando el pH a 7,22 por adición de 5 gotas de una disolución concentrada de  $\text{NH}_3$  (acuoso), completando el volumen hasta 1 L con agua ultrapura y desgasificando durante 15 minutos en el baño de ultrasonidos.
- ❖ Stock de exosomas de suero 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Preparado tomando 100  $\mu\text{g}$  de patrón liofilizado de exosomas de suero humano y disolviéndolos en 100  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura.
- ❖ *Assay buffer* 1X. Preparado tomando 5 mL de *assay buffer* 10X del kit ExoStep™ y llevándolo a 50 mL con PBS comercial para después filtrar por duplicado mediante filtro de PVDF de 0,1  $\mu\text{m}$ .
- ❖ PBS 10X. Preparado pesando 0,2 g de KCl, 8 g de NaCl, 0,24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,15 g de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  y disolviéndolos en 100 mL de agua ultrapura.
- ❖ PFA al 4 % en PBS 1X. Preparado pesando 2 g de PFA, añadiendo 5 mL de PBS 10X y 45 mL de agua ultrapura y calentando la disolución resultante en un baño a 50 °C hasta disolver completamente el PFA.



## 4.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En la figura 4 se muestra un esquema resumen de las etapas seguidas en este trabajo para el aislamiento y la caracterización de los exosomas de la leche humana.

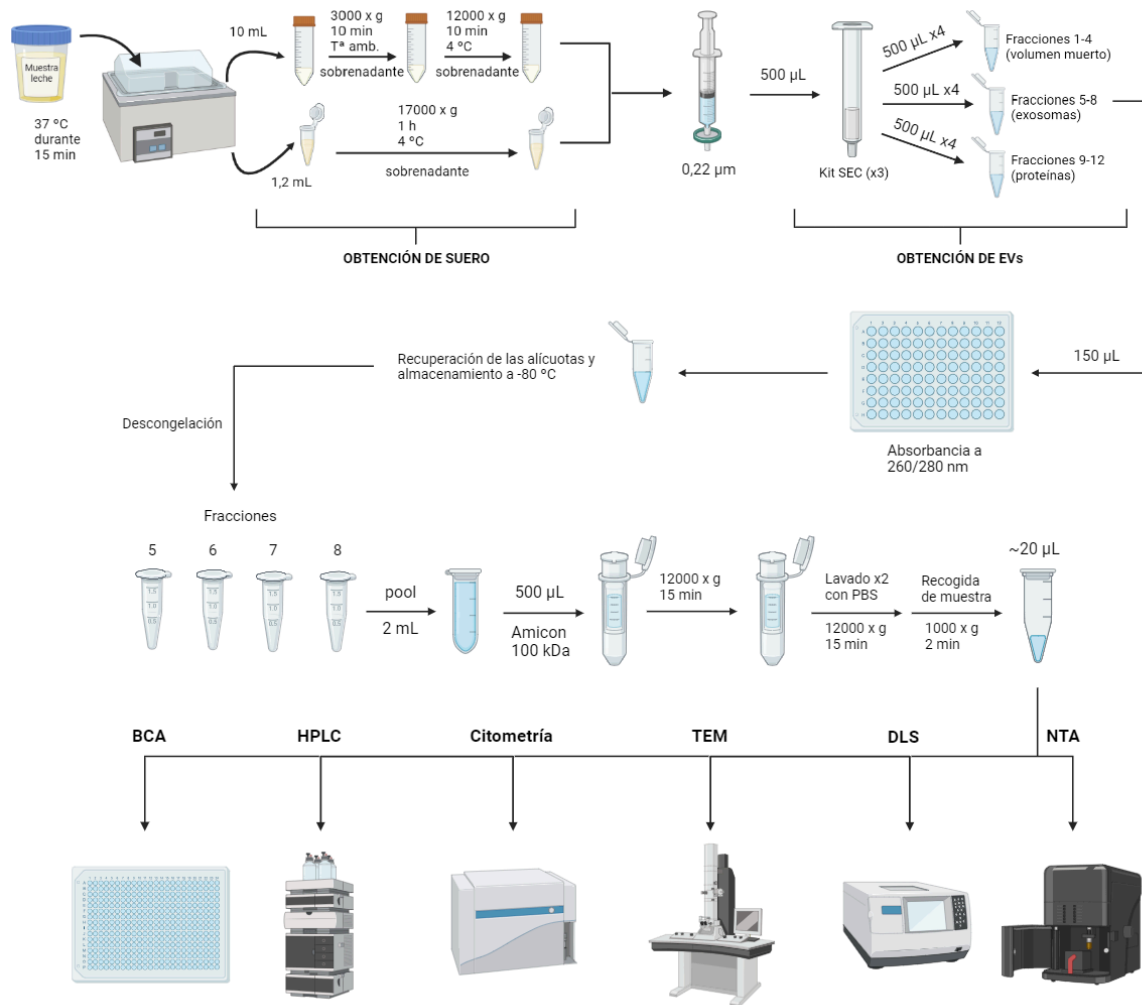


Figura 4. Esquema resumen de las etapas seguidas para el aislamiento de los exosomas de la leche humana por SEC y su posterior caracterización empleando diversas técnicas analíticas. Las muestras de leche cruda y leche pasteurizada fueron tratadas de la misma manera y el proceso de aislamiento fue el mismo para ambos kits.

(creado con BioRender)

### 4.1.- Obtención de las muestras de leche

Las muestras de leche cruda (LC) y leche pasteurizada (LP) fueron cedidas por el Banco de Leche Materna de Asturias (BLMA) ubicado en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) en el seno de una colaboración con el Grupo de Espectrometría Analítica y Bioanalítica (GEAB) de la Universidad de Oviedo.





La muestra de LC donada el día 31-01-2024 fue alicuotada en dos recipientes y almacenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el BLMA. Una de las alícuotas de la muestra fue pasteurizada el día 28-02-2024 para después ser almacenada de nuevo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ver figura 5).



Figura 5. Muestras de LC (a) y LP (b) cedidas por el BLMA del HUCA al GEAB

#### 4.2.- Obtención del suero lácteo

El suero procedente de las muestras de LC y LP se obtuvo mediante dos procedimientos distintos tras la descongelación y el correcto atemperamiento de ambas muestras en baño de agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos (ver figura 4).

Para el primer procedimiento, el suero se obtuvo empleando una centrífuga con rotor GRF-G-85-6. Para ello, se tomaron 10 mL de leche que se centrifugaron dos veces a  $3000\text{ x g}$  durante 10 minutos a temperatura ambiente descartando la capa de grasa formada en la superficie tras cada centrifugación. Tras esto, la leche desnatada se centrifugó a  $12000\text{ x g}$  durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para eliminar células y caseínas en forma de *pellet* y se recuperó el sobrenadante, que correspondía al suero lácteo (ver figura 4). El suero obtenido fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el posterior aislamiento de sus exosomas.

Por otra parte, se empleó un segundo procedimiento para la obtención del suero empleando una centrífuga con rotor GRF-G-m2.0-30. Para ello, se tomaron 1,2 mL de leche y se centrifugaron a  $17000\text{ x g}$  durante una hora a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el suero y se descartaron la capa superior de grasa y el *pellet* de células y caseínas (ver figura 4). Este nuevo proceso de extracción del suero, aunque algo más lento que el anterior, demostró eliminar de manera más eficiente la grasa y las caseínas presentes en ambas muestras de leche.



#### 4.3.- Aislamiento de los exosomas

El proceso de aislamiento de los exosomas se llevó a cabo mediante los kits Immunostep SEC-7012 y SEC-3512, compuestos por cartuchos empaquetados con una resina con un rango de exclusión de 70 a 1000 nm y de 35 a 350 nm, respectivamente. En el anexo 1 se recogen las especificaciones de cada kit y el protocolo detallado a seguir para su empleo, que es el mismo para ambos.

De manera resumida, se acondicionó el cartucho con 21 mL de *running buffer* para después cargar 500  $\mu$ L de suero de LC o LP previamente filtrado mediante un filtro de jeringa de PVDF de 0,22  $\mu$ m (ver figura 4), ya que este es el pre-tratamiento que se realiza habitualmente en la literatura.<sup>[14,17,19,20,34,39]</sup> Una vez cargado el suero, se dejó penetrar completamente en el filtro, se rellenó la columna con el tampón y tras descartar las 3 primeras gotas, se recogieron 12 alícuotas de 500  $\mu$ L (ver figura 4). Finalmente, se lavó el cartucho con 21 mL de *running buffer*, seguidos de 500  $\mu$ L de NaOH 0,5 M, 10 mL de agua ultrapura y finalmente otros 21 mL de *running buffer*. Tras el proceso de lavado, se rellenó el cartucho con el *running buffer* a los 3/4 de su capacidad y se almacenó en nevera para su posterior uso. Este proceso de aislamiento se realizó por triplicado para la LC y la LP con ambos kits.

Para evaluar la reproducibilidad de este método para el aislamiento de exosomas, se tomaron 150  $\mu$ L de cada una de las 12 alícuotas recogidas y se colocaron en una placa de 96 pocillos. Se midió su absorbancia en el espectrofotómetro de placas a 260 y 280 nm junto con la de un blanco por triplicado de *running buffer*. En el anexo 2 aparece un esquema de la disposición de cada alícuota en la placa multipocillo. Finalmente se recuperó el contenido de cada pocillo y se almacenaron las alícuotas a -80°C para su posterior caracterización (ver figura 4).

#### 4.4.- Preconcentración de los exosomas

La preconcentración de los exosomas se realizó mediante filtros Amicon™ con un umbral de discriminación de pesos moleculares de 100 kDa y una capacidad de 0,5 mL. Para ello, se descongelaron las fracciones 5, 6, 7 y 8 de LC o LP y se combinaron obteniendo un *pool* de 2 mL de disolución de exosomas (ver figura 4).

A continuación, se acondicionó el filtro mediante la adición de 0,5 mL de PBS comercial y la subsiguiente centrifugación a 12000 x g durante 5 minutos en un miniSpin, descartando el tubo colector empleado. Una vez acondicionado, se colocó el filtro en un nuevo tubo colector y se pesó el conjunto filtro-tubo colector. Se tomaron 0,5 mL de muestra, se adicionaron al filtro y se pesó de nuevo el conjunto filtro-tubo colector-muestra para determinar la masa de muestra adicionada por diferencia de pesada.



Tras esto, se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos en el miniSpin, se desechó el tubo colector y se colocó el filtro en un nuevo tubo para realizar las operaciones de lavado. Para ello, se adicionaron 500  $\mu$ L PBS y se centrifugó de nuevo a 12000 x g durante 15 minutos. Esta operación se repitió por duplicado desechando el tubo colector tras cada lavado. Finalmente, se tomó un nuevo tubo colector, se pesó, se colocó el filtro boca abajo en el tubo y se centrifugó a 1000 x g durante 2 minutos para recuperar la disolución concentrada de exosomas (ver figura 4). La masa de muestra recogida se determinó por diferencia de pesada.

#### 4.5.- Ensayo del BCA

Para la determinación del contenido proteico total se empleó el ensayo del BCA. Se preparó un calibrado de BSA con concentraciones entre 0 y 60 ppm tomando el volumen adecuado de patrón de BSA de 100 ppm y completando con el volumen necesario de PBS de manera a conseguir un volumen final de 250  $\mu$ L. Los volúmenes empleados para la construcción del calibrado aparecen en el anexo 3.

Los exosomas previamente preconcentrados fueron diluídos a dos niveles de concentración. Para los exosomas procedentes del kit SEC-7012, se preparó una primera dilución 1:50 tomando 2  $\mu$ L de la disolución concentrada de exosomas y llevándolos a 100  $\mu$ L con PBS. A continuación, se tomaron 50  $\mu$ L de esta disolución y se llevaron a 100  $\mu$ L con PBS, consiguiendo una dilución 1:100. Para los exosomas procedentes del kit SEC-3512, se prepararon las diluciones tomando 2  $\mu$ L de la disolución concentrada de exosomas y llevándolos a 400 o a 500  $\mu$ L con PBS para conseguir una dilución 1:200 o 1:250, respectivamente.

En una placa de 384 pocillos, se colocaron 10  $\mu$ L de patrón de BSA a cada nivel de concentración por triplicado salvo para el patrón de concentración 0 ppm (blanco) que se colocó en 12 pocillos. A su vez, se colocaron 10  $\mu$ L de cada muestra a cada nivel de concentración por triplicado. La disposición de los patrones y las muestras en la placa aparece detallada en el anexo 4. A continuación, se adicionaron 10  $\mu$ L de *Working Reagent* a cada pocillo, se cubrió la placa con papel de aluminio y se incubó durante media hora a 55 °C y 300 rpm en el termoagitador. Pasado este tiempo, se retiró la placa del termoagitador, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante unos 15 minutos y finalmente se midió la absorbancia de los pocillos en el espectrofotómetro de placas a 562 nm.

#### 4.6.- Análisis mediante HPLC-SEC

La pureza de las muestras se determinó mediante un método de HPLC empleando una columna de exclusión por tamaños Superose™ 6 Increase 10/300 GL con un volumen total de 24 mL.



Esta columna se compone de un polímero entrecruzado de agarosa con un límite de exclusión de  $4 \times 10^7$  Da, un rango de fraccionamiento para proteínas globulares de 5000 a  $5 \times 10^6$  Da, un rango de estabilidad de pH comprendido entre 3 y 12 y una temperatura operacional óptima entre 4 y 40 °C.

Se purgó el equipo con agua ultrapura durante 15 minutos, se conectó la botella de agua a la bomba A y la botella de metanol a la bomba B y se lavó la columna con una mezcla agua:metanol (80:20) durante 40 minutos. A continuación, se realizó un segundo lavado de la columna con 100 % de agua ultrapura durante otros 40 minutos y se equilibró con la fase móvil durante otros 40 minutos. Una vez equilibrada la columna, se procedió a la limpieza del bucle de inyección mediante la adición de fase móvil en modo carga. Inmediatamente después, se realizó la inyección de 50  $\mu$ L de un blanco de PBS comercial a un flujo de 0,7 mL/min. Tras esto, se inyectaron 50  $\mu$ L de un patrón de BSA y se comparó su tiempo de retención con el obtenido en el calibrado previamente realizado por los compañeros del grupo GEAB, que se muestra en el anexo 5.

Una alícuota de 20  $\mu$ L de la muestra de exosomas concentrada se diluyó a 60  $\mu$ L con PBS y se inyectó a un flujo de 0,7 mL/min. Las muestras de LC y LP de cada kit fueron tratadas de igual manera. Tras finalizar el análisis, se lavó de nuevo la columna con agua ultrapura durante 40 minutos seguido de una mezcla agua:metanol (80:20) durante otros 40 minutos para finalmente desconectarla y almacenarla.

#### 4.7.- Análisis mediante citometría de flujo

Esta técnica se empleó para evaluar la presencia de exosomas en las muestras. Para ello, la muestra se preparó empleando el kit ExoStep™, cuyas especificaciones técnicas y protocolo detallados se muestran en los anexos 6a y 6b.

Inicialmente, se preparó un calibrado empleando un stock de patrón comercial de exosomas de concentración 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Las concentraciones de los patrones empleados para el calibrado junto con el volumen empleado para prepararlos se recogen en el anexo 6c. Por otra parte, se prepararon dos niveles de dilución distintos de cada muestra tomando el volumen adecuado y diluyéndolo con PBS filtrado por un filtro de 0,1  $\mu$ m. La nomenclatura empleada junto con las diluciones realizadas para cada muestra aparecen descritas en el anexo 6d.

Una vez preparados el calibrado y las muestras, se inició el protocolo del kit ExoStep™. De manera resumida, se mezclaron 5  $\mu$ L de *capture beads* (CD63+) con 45  $\mu$ L de *incubation buffer*, se agitó en el vórtex y se adicionaron 50  $\mu$ L de patrón de calibrado o muestra, homogeneizando por aspiración. Los patrones y las muestras se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante toda la noche. Se lavó con 1 mL de *assay buffer* 1X y se centrifugó a 2500 x g durante 5 minutos descartando el sobrenadante.



Tras esto, se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  del anticuerpo primario de detección (anti-CD9 biotina), se homogeneizó y se incubó durante 60 minutos a 4 °C. Se lavó de nuevo y se centrifugó descartando el sobrenadante. Se añadieron 5  $\mu\text{L}$  del reactivo secundario de detección (estreptavidina-ficoeritrina (PE)), se homogeneizó y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Se lavó, se centrifugó y el *pellet* se resuspendió en 350  $\mu\text{L}$  de *assay buffer* 1X.

Finalmente, el calibrado y las muestras se midieron en el citómetro. El volumen medido fue de 200  $\mu\text{L}$  a un flujo de 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  (condiciones *fast*). Mediante el uso de los canales PE, se determinó si alguna población de vesículas extracelulares presentes en el *pellet* era 'positiva', es decir, si había unión de exosomas y se generaba un pico fluorescente en el canal mencionado.

#### 4.8.- Análisis mediante TEM

Una de las técnicas empleadas para la caracterización morfológica de los exosomas es el TEM. Previamente al análisis mediante esta técnica, se requiere el fijado de los exosomas mediante PFA para asegurar una adecuada preservación de la estructura de sus membranas, evitando así su posible ruptura y permitiendo su correcta caracterización morfológica. Para ello, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra previamente preconcentrada que se fijaron con 5  $\mu\text{L}$  de PFA al 4 %.

La preparación de las muestras para su medida mediante esta técnica fue realizada por el técnico del equipo. Las muestras fijadas se depositaron sobre rejillas para TEM y se dejaron reposar durante 2 minutos. Se eliminó cuidadosamente el exceso de muestra mediante papel de filtro, se realizó una tinción con unas gotas de ácido wolfrámico al 2 % y se dejó reaccionar durante 1 minuto. El exceso del tinte se retiró cuidadosamente con papel de filtro y se dejaron secar las rejillas a temperatura ambiente durante 10 minutos.

La muestra se visualizó con el TEM empleando un potencial de aceleración de 100 kV y una magnificación de 100000X y se capturaron las imágenes necesarias para asegurar la obtención de 100-200 vesículas. Las muestras de LC y LP aisladas con cada kit se trataron de la misma manera.

#### 4.9.- Análisis mediante DLS

Otra de las técnicas empleadas para la caracterización morfológica de los exosomas es el DLS. Para ello, se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra en sendos tubos de microcentrífuga y se llevaron a 200  $\mu\text{L}$  con PBS comercial previamente filtrado mediante un filtro de jeringa de PVDF de 0,1  $\mu\text{m}$ , eliminando así las posibles partículas que pudieran interferir en las medidas. Para las medidas de DLS, se establecieron los parámetros descritos en la tabla 3.



Tabla 3. Parámetros empleados para la medida de exosomas mediante DLS

Parámetro	Valor
Índice de refracción	1,390
Temperatura	20 °C
Tiempo de acondicionado	60 s
Ángulo de medida	173° ( <i>backscattering</i> )
Número de ciclos	30
Número de medidas	1
Modo de análisis	<i>Normal resolution</i>

Se empleó una celda ZEN0040 al ser la adecuada para la caracterización del tamaño mediante los parámetros establecidos.

Las muestras se midieron sucesivamente tomando los 200 µL preparados e introduciéndolos en la celda de medida. Al iniciar la medida, el equipo tardó unos 30 segundos en alcanzar la temperatura establecida, tras lo que prosiguió a realizar un acondicionamiento de la muestra durante el tiempo establecido para finalmente ejecutar 30 ciclos de medida sobre la muestra. Una vez finalizada la medida, se extrajo la cubeta del equipo y se homogeneizó su contenido por aspiraciones sucesivas con una micropipeta para resuspender los exosomas, ya que tienen tendencia a sedimentar al fondo de la disolución.

Las muestras se midieron por triplicado, resuspendiendo los exosomas tras cada medida y limpiando adecuadamente la cubeta antes de introducir la siguiente muestra.

## 5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.- Reproducibilidad de los métodos de aislamiento

La reproducibilidad de los métodos de aislamiento empleados, los kits Immunostep SEC-7012 y SEC-3512, se evaluó mediante el aislamiento por triplicado de los exosomas de la LC y la LP con cada kit y la comparación de las medidas de absorbancia a 280 nm de los correspondientes perfiles de elución con el perfil de absorbancia proporcionado por el fabricante.

#### 5.1.1.- *Kit EVs SEC-7012*

Tras el aislamiento por triplicado de los exosomas de cada tipo de leche, se midió la absorbancia de las 12 fracciones recogidas tal y como se detalla en el apartado 4.3.



A los valores de absorbancia obtenidos a 280 nm para cada fracción se les restó la media del valor de absorbancia obtenido para el triplicado del blanco. A partir de estos valores, se construyeron las gráficas de las figuras 6 y 7 correspondientes a la LC y la LP, respectivamente.

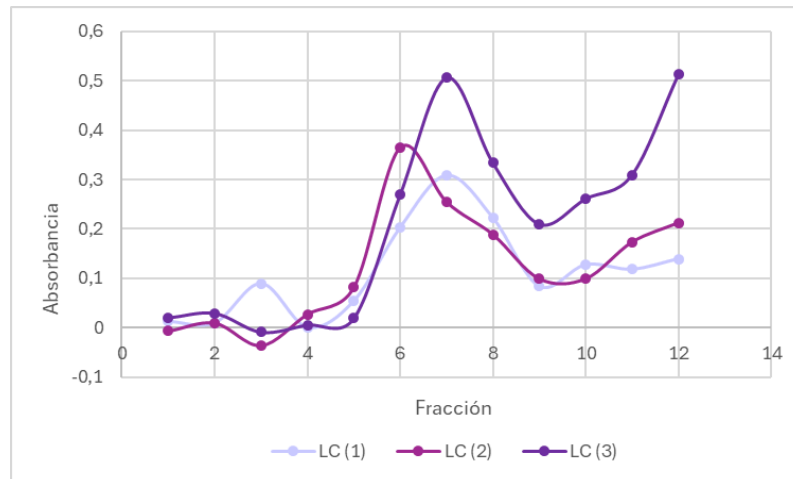


Figura 6. Perfil de absorbancia ( $n=3$ ) de las 12 fracciones de LC recogidas con el kit SEC-7012

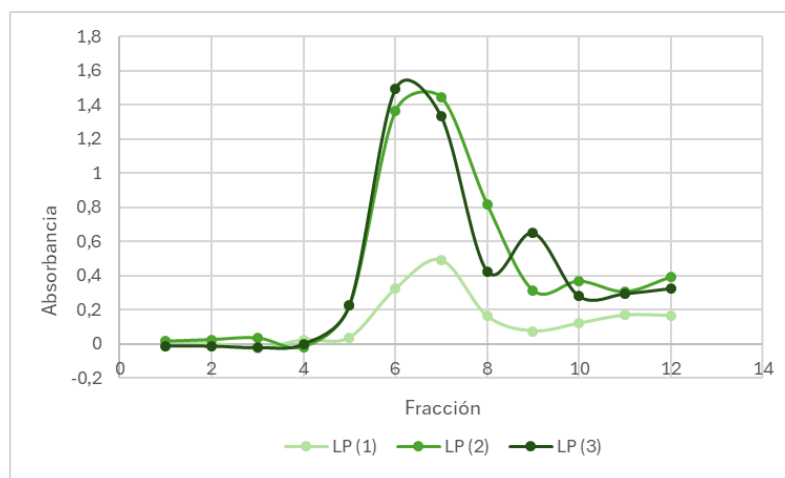


Figura 7. Perfil de absorbancia ( $n=3$ ) de las 12 fracciones de LP recogidas con el kit SEC-7012

Tal y como se observa en las gráficas, las fracciones conteniendo los exosomas corresponden a las fracciones 5, 6, 7 y 8 tanto en la LC como en la LP. Las absorbancias elevadas de las fracciones 9, 10, 11 y 12 en la LC se explican por la presencia de proteínas en estas fracciones, que eluyen después de los exosomas debido a su menor tamaño. Esto se observa también en las muestras de LP aunque en menor medida. Por otra parte, en el anexo 7 se muestra el perfil de absorbancias ofrecido por el fabricante para estos kits.



Al comparar los perfiles de absorbancia obtenidos en las figuras 6 y 7 con el del anexo 7, se puede observar una concordancia entre ambos en las fracciones de elución de los exosomas. Sin embargo, la absorbancia máxima obtenida por el fabricante del kit (alrededor de 1,8 unidades) es muy superior a la obtenida en este trabajo, que oscila entre 0,3 y 0,5 unidades para la LC y entre 0,6 y 1,6 unidades para la LP. Esto podría explicarse por una mayor concentración de exosomas en el plasma frente al suero de leche. Además, las diferencias de absorbancia observadas entre LC y LP pueden ser debidas a la desnaturalización de las proteínas durante el proceso de pasteurización, lo que causa que los aminoácidos estén más expuestos y por lo tanto explica que la absorbancia sea mayor en la LP que en la LC.

A pesar de las pequeñas diferencias observadas entre los distintos aislamientos de los exosomas de cada tipo de leche, que pueden ser razonablemente atribuidas a la gran heterogeneidad que presentan este tipo de muestras biológicas, se puede concluir que este método de aislamiento es reproducible en cuanto a las fracciones en las que eluyen los exosomas.

#### 5.1.2.- Kit EVs SEC-3512

El proceso de aislamiento y medida de absorbancias con este kit se desarrolló de la misma manera que con el anterior. A partir de los valores de absorbancia obtenidos para las muestras de LC y LP se construyeron las gráficas de las figuras 9 y 10, respectivamente.

De igual modo que con el kit anterior, las fracciones en las que eluyen los exosomas corresponden a las fracciones 5, 6, 7 y 8 para ambos tipos de leche. Además, vuelven a aparecer absorbancias elevadas en las fracciones 9, 10, 11 y 12 atribuibles a la elución de proteínas en estas.

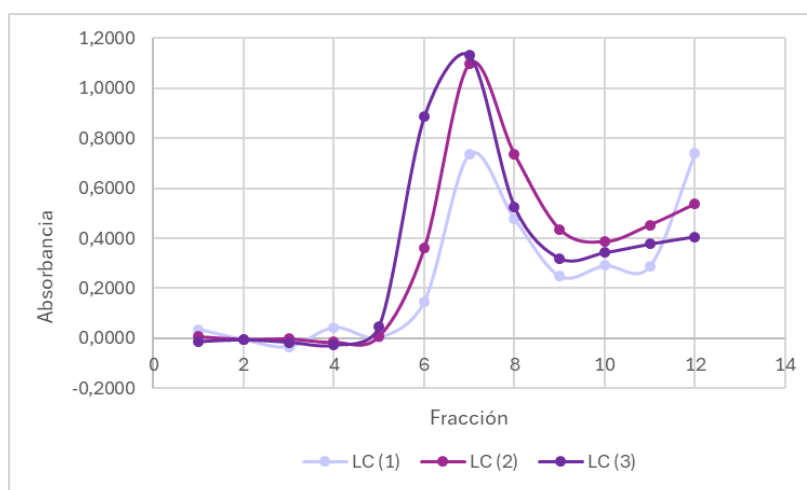


Figura 9. Perfil de absorbancia (n=3) de las 12 fracciones de LC recogidas con el kit SEC-3512



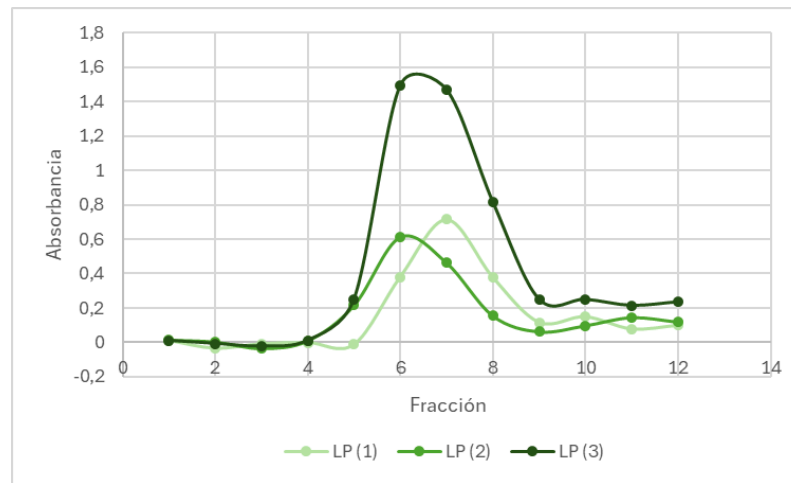


Figura 10. Perfil de absorbancia (n=3) de las 12 fracciones de LP recogidas con el kit SEC-3512

Por otra parte, al comparar los perfiles de absorbancia de las figuras 9 y 10 con el del anexo 7 se observa de nuevo una concordancia entre las fracciones de elución de los exosomas. Sin embargo en este caso las absorbancias obtenidas, aunque más bajas que las obtenidas por el fabricante, se acercan bastante más a su valor, oscilando entre 0,8 y 1,2 unidades para la LC y entre 0,5 y 1,6 unidades para la LP. Este aumento de las absorbancias con respecto al kit SEC-7012 podría explicarse por el hecho de que este kit, al poseer un menor rango de exclusión (35-350 nm frente a 70-1000 nm para el otro kit), concentra de manera más efectiva a los exosomas resultando así en una mayor absorbancia.

Las diferencias observadas entre las absorbancias de la LC y la LP pueden ser nuevamente atribuidas a la desnaturalización de las proteínas en la LP. Por todo ello se concluye que este kit, al igual que el kit anterior, proporciona un método sencillo y rápido para el aislamiento de exosomas del suero de leche, además de ofrecer una buena reproducibilidad, lo que convierte a estos kits en una gran alternativa a los laboriosos métodos de DUC y DG-UC.

## 5.2.- Factor de preconcentración de los exosomas

Del *pool* obtenido con las fracciones aisladas 5-8 (2 mL) se tomaron 0,5 mL y se preconcentraron con el Amicon a 0,02 mL (ver figura 4). Las masas de cada muestra antes y después de la preconcentración aparecen en los anexos 8a (SEC-7012) y 8b (SEC-3512). A partir de estos valores, se calculó el factor de preconcentración obtenido para cada muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\text{factor de preconcentración} = \frac{\text{masa original (g)}}{\text{masa preconcentrada (g)}} \quad (1)$$



Por otra parte, se calculó el factor de preconcentración promedio para cada triplicado junto con su desviación estándar (SD) mediante la ecuación 2. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Factor de preconcentración calculado para cada muestra junto con el factor de preconcentración medio para cada triplicado

Kit	Réplica	Factor de preconcentración	Promedio	SD
SEC-7012	LC 1	18,5	23	4
	LC 2	24,8		
	LC 3	24,9		
	LP 1	18,7	20	3
	LP 2	22,9		
	LP 3	18,3		
SEC-3512	LC 1	28,1	24	4
	LC 2	21,5		
	LC 3	22,5		
	LP 1	24,3	26	3
	LP 2	25,3		
	LP 3	29,4		

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (2)$$

Tal y como se observa en la tabla, el factor de preconcentración varía entre 20 y 26 veces.

### 5.3.- Determinación del contenido proteico total

A partir de los valores de absorbancia a 532 nm obtenidos para los patrones de BSA, se construyó la recta de calibrado mostrada en el anexo 9a. Mediante la función ESTIMACION.LINEAL de Microsoft Excel se determinaron la ecuación de la recta de calibrado y el coeficiente de linealidad mostrados a continuación:



$$y = 0,002584x + 0,001926 \quad (3)$$

$$R^2 = 0,996949$$

### 5.3.1.- Kit EVs SEC-7012

Se realizaron distintas diluciones de cada una de las muestras de exosomas aislados por SEC y los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la ecuación 3 para obtener la concentración de proteína. Tras esto, se calculó la concentración real de proteína en las muestras multiplicando la concentración obtenida para las muestras diluídas por su correspondiente factor de dilución y los resultados obtenidos aparecen en el anexo 9b.

Tras comprobar que únicamente la dilución 1:100 entraba dentro del rango del calibrado para ambos tipos de leche, se calcularon los promedios de la concentración de cada triplicado junto con su SD (ecuación 2) y su desviación estándar relativa (RSD) mediante la siguiente ecuación:

$$RSD (\%) = \frac{SD}{x} * 100 \quad (4)$$

Las concentraciones reales de proteína total para cada muestra se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de proteína total (n=3) de las muestras de LC y LP aisladas mediante el kit SEC-7012

Muestra	LC	LP
[Promedio] (ppm)	$2,8 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$
SD (ppm)	$2,4 \cdot 10^2$	$3,9 \cdot 10^2$
RSD (%)	8,5	7,3

Tal y como puede observarse en la tabla, existe una gran diferencia entre la concentración de proteína total hallada en la muestra de LP respecto a la de LC. Esto podría deberse a una ruptura parcial de las membranas de los exosomas tras este proceso y/o a la desnaturalización de las proteínas de membrana, lo que conduce a un aumento del contenido proteico total hallado en esta muestra.

### 5.3.2.- Kit EVs SEC-3512

La concentración de proteína en las muestras obtenidas mediante este kit se calculó de la misma manera que en el apartado anterior y los resultados obtenidos se presentan en el anexo 9c.



Tras comprobar que todas las diluciones ensayadas entraban dentro del rango del calibrado, se calcularon el promedio, la SD y la RSD mediante las ecuaciones 2 y 4. Las concentraciones de proteína total para cada muestra se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración de proteína total ( $n=3$ ) de las muestras de LC y LP aisladas mediante el kit SEC-3512

Muestra	LC	LP
[Promedio] (ppm)	$8,6 \cdot 10^3$	$8,9 \cdot 10^3$
SD (ppm)	$9,9 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$
RSD (%)	11,5	1,6

Tal y como se observa en la tabla, en este caso la concentración proteica total es idéntica para ambos tipos de leche. Además, en este caso la concentración de proteína es superior a la obtenida con el kit SEC-7012, lo que refuerza la idea mencionada en el apartado 5.1.2.

#### 5.4.- Determinación de la pureza mediante HPLC-SEC

En este apartado, se puso a punto una metodología de HPLC-SEC para determinar si las fracciones de vesículas aisladas con ambos kits contenían proteínas de menor tamaño que pudieran co-eluir con estos.

##### 5.4.1.- Kit EVs SEC-7012

Los cromatogramas obtenidos para las muestras a dos longitudes de onda de detección, 215 y 280 nm, a los que se les restó punto por punto la señal del blanco se muestran en las figuras 11 y 12, que corresponden a la LC y la LP, respectivamente.

A partir de los cromatogramas a 215 nm se determinó la pureza de las muestras con ayuda del software Origin. Para ello, se llevaron los datos de los cromatogramas al programa, se trazó el gráfico y se seleccionó la herramienta *Integrate*. El área total del cromatograma se integró estableciendo como línea de base una línea recta y seleccionando una ventana de tiempos adecuada. De la misma manera, se integró el área correspondiente al pico cromatográfico de interés y las áreas obtenidas junto con las ventanas de integración empleadas aparecen en el anexo 10a.

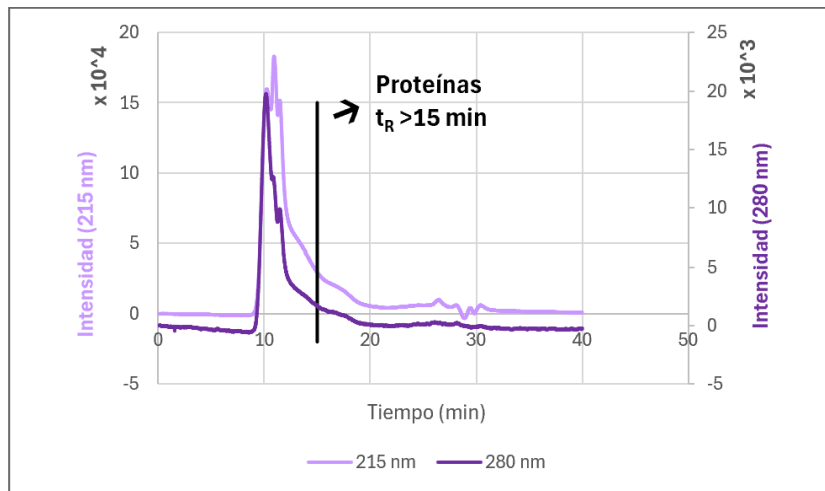


Figura 11. Cromatograma obtenido para la muestra de LC aislada mediante el kit SEC-7012 a 215 (lila) y 280 nm (morado)

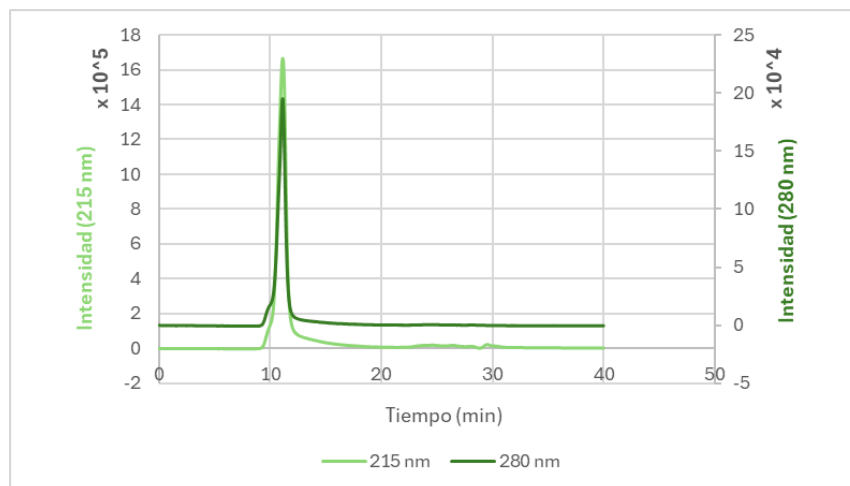


Figura 12. Cromatograma obtenido para la muestra de LP aislada mediante el kit SEC-7012 a 215 (verde claro) y 280 nm (verde oscuro)

Sabiendo que los exosomas eluyen a un tiempo de retención de aproximadamente 10 minutos en las condiciones cromatográficas empleadas, se consideró para las muestras de LC que la fracción del pico con un tiempo de retención superior a los 15 minutos no correspondía a los exosomas (marcado en la figura 11 con una línea vertical). Esta fracción seguramente corresponda a micelas de caseínas de tamaño similar al de los exosomas o incluso a liposomas, que presentan estructuras y tamaños muy similares a los de estas vesículas. Para las muestras de leche pasteurizada se consideró el pico completo al no aparecer esta fracción adicional, lo que refuerza el hecho de que la pasteurización rompe estas micelas o estos liposomas que posiblemente existan en la leche cruda.



La pureza de las muestras se calculó mediante la ecuación 5 y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Pureza de los exosomas de LC y LP aislados mediante el kit SEC-7012

Muestra	Pureza (%)
LC	62,3
LP	74,3

$$Pureza (\%) = \frac{\text{Área pico tr 10 min}}{\text{Área total}} * 100 \quad (5)$$

Tal y como se intuía en los cromatogramas anteriores, la muestra de LP posee una pureza superior a la muestra de LC, mostrando una mayor intensidad de la señal medida, un pico más estrecho y la ausencia de interferentes que co-eluyan con los exosomas.

#### 5.4.2.- Kit EVs SEC-3512

Los cromatogramas obtenidos para las muestras a dos longitudes de onda de detección, 215 y 280 nm, a los que se les restó punto por punto la señal del blanco se muestran en las figuras 13 y 14, que corresponden a la LC y la LP, respectivamente.

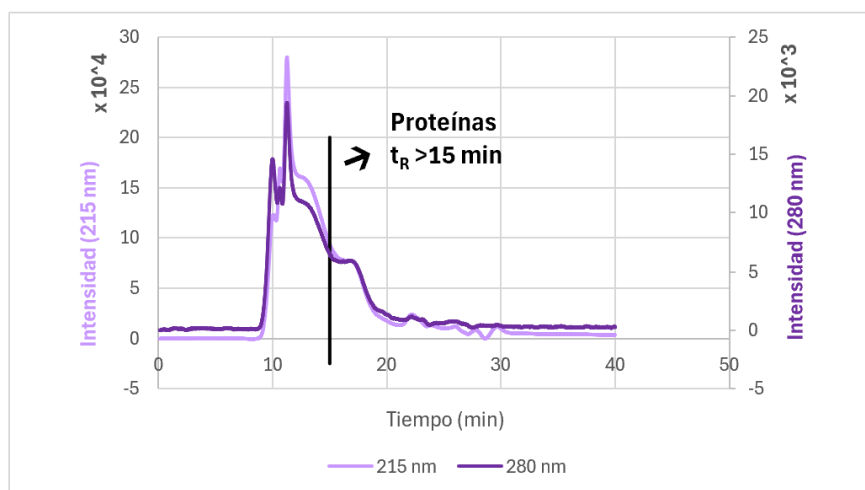


Figura 13. Cromatograma obtenido para la muestra de LC aislada mediante el kit SEC-3512 a 215 (lila) y 280 nm (morado)

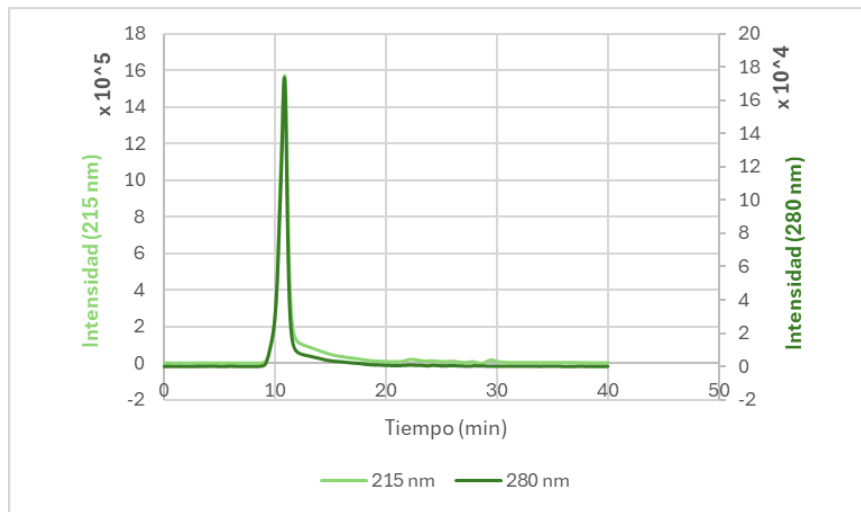


Figura 14. Cromatograma obtenido para la muestra de LP aislada mediante el kit SEC-3512 a 215 (verde claro) y 280 nm (verde oscuro)

Los cromatogramas fueron tratados de la misma manera que en el apartado anterior. Las áreas obtenidas junto con las ventanas de integración empleadas aparecen en el anexo 10b. La pureza de las muestras se calculó mediante la ecuación 5 y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Pureza de los exosomas de LC y LP aislados mediante el kit SEC-3512

Muestra	Pureza (%)
LC	43,6
LP	68,2

De la misma manera que ocurría en el apartado anterior, la muestra de LP posee una mayor pureza que la muestra de LC, lo que confirma lo observado en los cromatogramas de las figuras 13 y 14. Sin embargo, la pureza de las muestras obtenidas mediante este kit de aislamiento es bastante inferior a la obtenida con el SEC-7012.

Este efecto es más notable para la muestra de LC, lo que podría deberse a una concentración más efectiva de los interferentes mencionados por el menor rango de exclusión del SEC-3512. Este efecto es menos notable para la muestra de LP debido a la eliminación de estos interferentes en la pasteurización.



### 5.5.- Detección de exosomas mediante citometría de flujo

La citometría de flujo se empleó para identificar y distinguir a los exosomas del resto de vesículas e interferentes presentes en las muestras y para determinar su concentración. Para ello los exosomas se marcaron con un anticuerpo específico anti-CD9 unido a una marca fluorescente tal y como se describe en el apartado 4.7, ya que la proteína CD9 es un marcador característico de los exosomas. Del mismo modo se procedió al marcaje de los exosomas presentes en el estándar de suero y la gráfica de calibrado obtenida se presenta en el anexo 11a. Mediante la función ESTIMACION.LINEAL de Microsoft Excel se determinaron la ecuación de la recta de calibrado y el coeficiente de linealidad mostrados a continuación:

$$y = 1,1956 \cdot 10^{-8} x + 136,9813 \quad (6)$$
$$R^2 = 0,9935$$

#### 5.5.1.- Kit EVs SEC-7012

La intensidad de fluorescencia obtenida para cada muestra a cada dilución ensayada a las que se les ha restado el valor del blanco se muestran en el anexo 11b. De entre las dos diluciones de cada muestra, se escogió aquella con una intensidad de fluorescencia lo más próxima posible al centro del calibrado, que fueron las muestras LC<sub>70</sub> Dil1 y LP<sub>70</sub> Dil1. Sus citogramas (15b y 15c, respectivamente) junto con el del blanco (15a) se muestran en la figura 15.

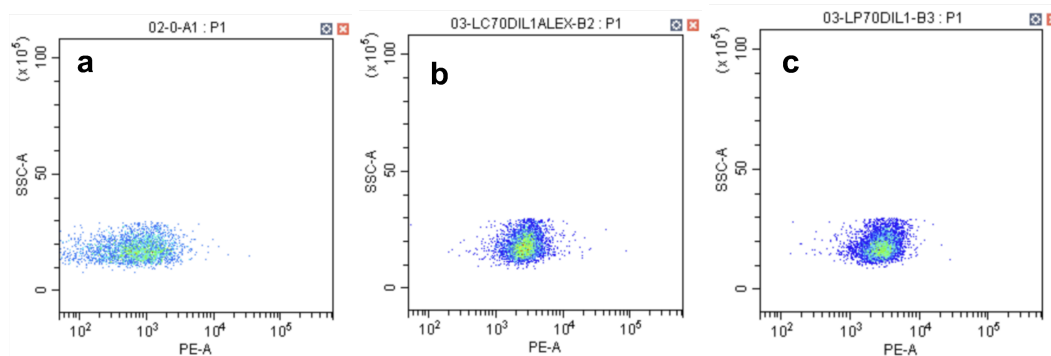


Figura 15. Citogramas obtenidos para el blanco (a) y las muestras de LC (b) y LP (c) aisladas mediante el kit SEC-7012

Como puede verse, en los citogramas 15b y 15c aumenta la fluorescencia (en unidades logarítmicas) respecto al blanco, desplazándose las gráficas hacia la derecha y demostrando así una mayor intensidad de fluorescencia cuanto mayor es la concentración de exosomas en la muestra.





La concentración de exosomas en las muestras diluidas se calculó mediante interpolación de la intensidad de fluorescencia en la ecuación 6. A continuación, se calculó la concentración real de exosomas en las muestras multiplicando el valor obtenido por el factor de dilución correspondiente y los resultados se presentan en la tabla 9.

*Tabla 9. Concentración de exosomas en las diluciones y concentración real en las muestras aisladas mediante el kit SEC-7012*

Muestra	[Exosomas]Dil (partículas/mL)	[Exosomas]Real (partículas/mL)
LC <sub>70</sub> Dil1	1,48E+11	7,40E+13
LP <sub>70</sub> Dil1	1,58E+11	7,92E+13

Tal y como se observa en la tabla, la concentración de exosomas es mayor para la muestra de LP que para la de LC, del mismo modo que se observaba en la figura 15. Este resultado confirmaría los resultados obtenidos mediante el ensayo BCA, donde la concentración de proteína total era mayor para la muestra de LP.

#### **5.5.2.- Kit EVs SEC-3512**

En este caso, únicamente se ensayó una de las dos diluciones establecidas para cada muestra por falta de tiempo, que fueron la diluciones LC<sub>35</sub> Dil2 y LP<sub>35</sub> Dil1. La intensidad de fluorescencia obtenida para cada una aparece en el anexo 11c. Los citogramas obtenidos para cada muestra (16b y 16c, respectivamente) junto con el citograma del blanco (16a) se muestran en la figura 16.

Los resultados son similares a los obtenidos con el kit SEC-7012, observándose en estas figuras lo comentado en el apartado anterior. Por otra parte, la concentración real de exosomas en cada muestra se calculó de la misma manera que en el apartado anterior y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 10.

En este caso, el resultado obtenido para la muestra de LC no es fiable ya que al interpolar, su intensidad de fluorescencia (175,4) cae en la parte más baja del calibrado, entre los puntos de concentración 0 y 2 µg/mL, por lo que el error cometido en la determinación de su concentración es elevado. Sin embargo, los resultados parecen seguir la tendencia observada en el apartado anterior y podrían confirmar los resultados obtenidos en el ensayo del BCA.

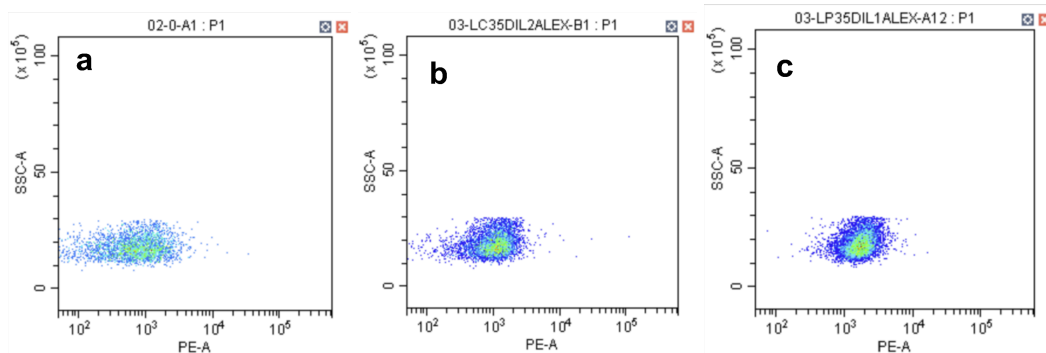


Figura 16. Citogramas obtenidos para el blanco (a) y las muestras de LC (b) y LP (c) aisladas mediante el kit SEC-3512

Tabla 10. Concentración de exosomas en las diluciones y concentración real en las muestras aisladas mediante el kit SEC-3512

Muestra	[Exosomas]Dil (partículas/mL)	[Exosomas]Real (partículas/mL)
LC <sub>35</sub> Dil2	3,21E+09	9,64E+12
LP <sub>35</sub> Dil1	5,89E+10	4,71E+13

### 5.6.- Caracterización morfológica mediante TEM

Para la caracterización morfológica de los exosomas, se empleó el software ConfocalUniovi Fiji. El tamaño de los exosomas se determinó en cada una de las imágenes tomadas teniendo en cuenta la barra de escala proporcionada por el TEM. Finalmente, las medidas se llevaron a una hoja de cálculo para construir un diagrama de distribución de tamaños.

#### 5.6.1.- Kit EVs SEC-7012

En la figura 17 se muestran dos imágenes tomadas para las muestras de LC (figura 17a) y LP (figura 17b). En la figura 17a se puede observar como los exosomas tienen una forma circular más definida y puede distinguirse una zona oscura correspondiente al interior del exosoma rodeada de una zona más clara correspondiente a la bicapa lipídica. Sin embargo, en la figura 17b se observan exosomas con una estructura irregular, donde la bicapa lipídica aparece más difusa y desestructurada. Este efecto podría atribuirse a la pasteurización, que podría causar la disrupción de las membranas lipídicas interrumpiendo así la actividad biológica de estas vesículas.

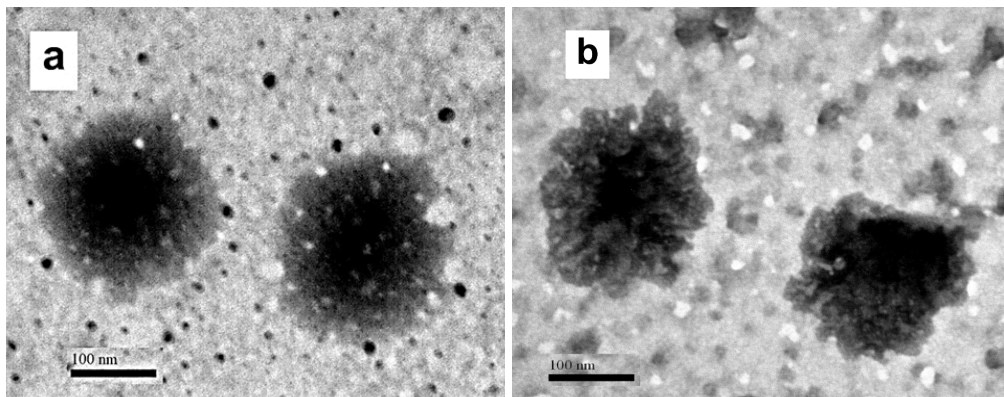


Figura 17. Imágenes de exomas procedentes del kit SEC-7012 tomadas con el TEM a una magnificación de 100000X, donde aparecen los exomas de la LC (a) y de la LP (b)

A partir de las medidas del tamaño correspondiente a 118 vesículas en cada muestra se construyó una gráfica de distribución de tamaños donde se representó la cantidad de vesículas en porcentaje del total frente al rango de tamaño. Los resultados se muestran en la figura 18.

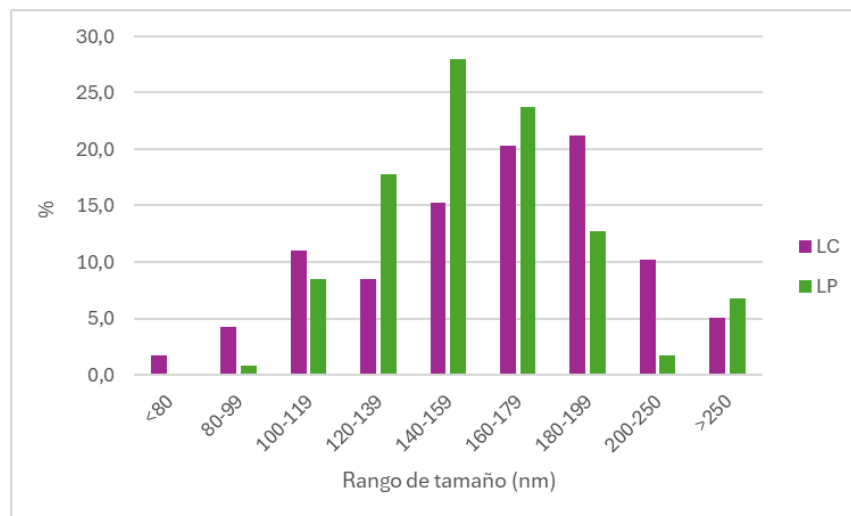


Figura 18. Distribución de tamaños de los exomas aislados mediante el kit SEC-7012 de las muestras de LC (morado) y LP (verde)

En esta gráfica, se observa como los tamaños de las vesículas medidas están en acuerdo con el rango de exclusión del kit de aislamiento (70-1000 nm), donde ninguna vesícula tiene un tamaño menor a 75 nm ni mayor a 500 nm. La muestra de LC contiene un 1,7 % de exomas con un tamaño inferior a 80 nm y un 40,7 % de exomas con un tamaño inferior a 160 nm. Por su parte la muestra de LP no contiene exomas con un tamaño menor a 80 nm y el 55,1 % de estos tienen un tamaño comprendido entre 80 y 160 nm.



Pese al tamaño descrito para los exosomas en el apartado 1.3.2, se ha encontrado en la literatura que los HMDEs pueden llegar a ser más grandes que los exosomas aislados de otros fluidos, abarcando hasta los 265 nm de tamaño.<sup>[57]</sup> Esto concuerda con los resultados obtenidos ya que más de la mitad de los exosomas medidos en la LC (51,7 %) y el 38,1 % en la LP tienen un tamaño comprendido entre los 160 y los 250 nm.

El tamaño más recurrente para los exosomas de la LC se encuentra entre los 180-199 nm, representando un 21,2 % del total, mientras que para la LP se encuentra entre los 140-159 nm, representando un 28,0 % del total. Además, se observan vesículas con un tamaño superior a los 250 nm (microvesículas), que en la LC representan el 5,1 % y en la LP representan el 6,8 % del total.

Finalmente, se calculó el tamaño medio de las vesículas de la muestra junto con su SD y RSD mediante las ecuaciones 2 y 4 y los resultados se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Tamaño medio (n=118) de las vesículas aisladas mediante el kit SEC-7012 junto con su SD y RSD

Muestra	Tamaño medio (nm)	SD (nm)	RSD (%)
LC	170	50	27
LP	170	70	43

Tal y como se muestra en la tabla anterior, el tamaño medio de las vesículas aisladas mediante este kit es idéntico para ambas muestras, encontrando una variabilidad más alta en los tamaños medidos en la muestra de LP frente a la de LC.

#### 5.6.1.- Kit EVs SEC-3512

En la figura 19 se muestran dos imágenes tomadas para las muestras de LC (figura 19a) y LP (figura 19b), donde se pone de manifiesto lo descrito en el apartado anterior.

A partir de las medidas del tamaño correspondiente a 137 vesículas en cada muestra se construyó una gráfica de distribución de tamaños donde se representó la cantidad de vesículas en porcentaje del total frente al rango de tamaño. Los resultados se muestran en la figura 20.

En esta gráfica, se observa como los tamaños de los exosomas medidos están en acuerdo con el rango de exclusión del kit de aislamiento (35-350 nm), donde ninguno tiene un tamaño menor a 45 nm ni mayor a 152 nm.

La muestra de LC no contiene exosomas con un tamaño inferior a los 55 nm y el 48,2 % de estos tienen un tamaño entre 75 y 104 nm. Por su parte, la muestra de LP posee un 2,9 % de exosomas con un tamaño inferior a los 55 nm y más de la mitad (51,1 %) tienen un tamaño comprendido entre 75 y 104 nm.

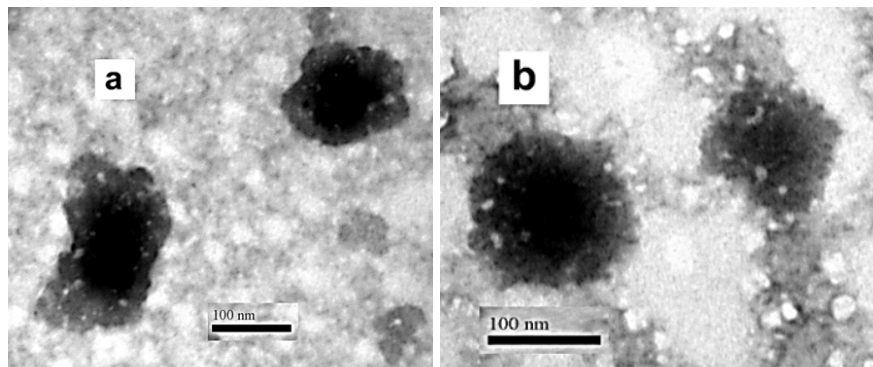


Figura 19. Imágenes de exosomas procedentes del kit SEC-3512 tomadas con el TEM a una magnificación de 100000X, donde aparecen los exosomas de la LC (a) y de la LP (b)

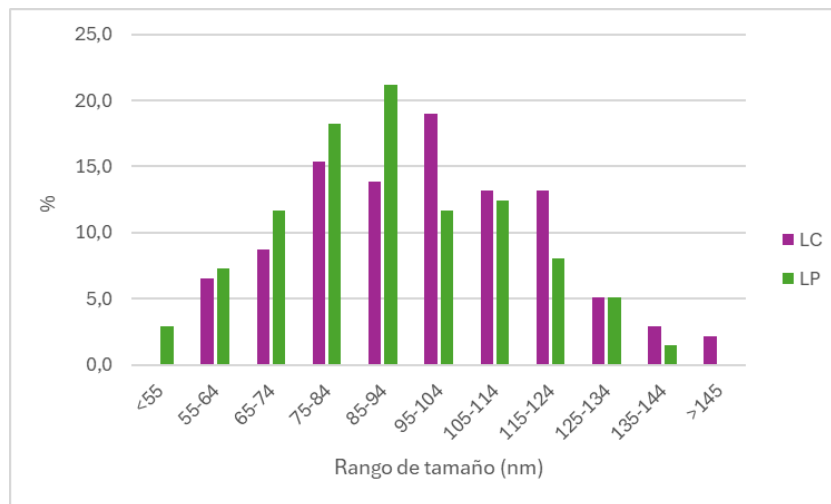


Figura 20. Distribución de tamaños de los exosomas aislados mediante el kit SEC-3512 de las muestras de LC (morado) y LP (verde)

El rango de tamaño más frecuente para los exosomas de la LC es 95-104 nm, representando un 19,0 % del total mientras que para los exosomas de la LP es 85-94 nm, representando un 21,2 % del total. Además, en estas muestras no se observan microvesículas lo que concuerda con el rango de exclusión de este kit.

Finalmente, se calculó el tamaño medio de las vesículas de la muestra junto con su SD y RSD mediante las ecuaciones 2 y 4 y los resultados se presentan en la tabla 12.

Tal y como se observa en la tabla anterior, el tamaño medio de las vesículas aisladas mediante este kit es muy similar para ambas muestras, pudiendo ser considerado idéntico si se tiene en cuenta sus SD. Además, la variabilidad es idéntica para los tamaños medidos en ambas muestras. Como era de esperar además, los exosomas aislados mediante este kit poseen un tamaño medio muy inferior a los aislados mediante el SEC-7012.



Tabla 12. Tamaño medio ( $n=137$ ) de los exosomas aislados mediante el kit SEC-3512 junto con su SD y RSD

Muestra	Tamaño medio (nm)	SD (nm)	RSD (%)
LC	100	20	22
LP	90	20	22

### 5.7.- Caracterización morfológica mediante DLS

El tamaño de los exosomas se caracterizó a su vez mediante la técnica DLS. Para ello, se procedió de la manera descrita en el apartado 4.9 midiendo las muestras por triplicado.

#### 5.7.1.- Kit EVs SEC-7012

El software ofrece directamente el valor promedio de tamaño de las vesículas de la muestra junto con su SD y su RSD, cuyos valores aparecen en la tabla 13.

Tabla 13. Tamaño medio ( $n=3$ ) de las vesículas aisladas mediante el kit SEC-7012 junto con su SD y RSD

Muestra	Tamaño medio (nm)	SD (nm)	RSD (%)
LC	173	9	5
LP	110	2	1

El tamaño medio de las vesículas de la LC medidas mediante esta técnica concuerda perfectamente con el tamaño medio obtenido mediante el TEM. En cuanto a la LP, el tamaño de las vesículas difiere del medido mediante el TEM, lo que puede ser debido seguramente a la baja sensibilidad y resolución de esta técnica frente al TEM. Además, se trata de muestras complejas y heterogéneas con una gran cantidad de partículas pequeñas en adición a los exosomas que pueden interferir en el valor real de las medidas.

#### 5.7.2.- Kit EVs SEC-3512

En la tabla 14 se muestra el tamaño medio de los exosomas medidos junto con su SD y su RSD.

Tabla 14. Tamaño medio ( $n=3$ ) de los exosomas aislados mediante el kit SEC-3512 junto con su SD y RSD

Muestra	Tamaño medio (nm)	SD (nm)	RSD (%)
LC	135	7	6
LP	103	3	3



En este caso, se observa como el tamaño medio de los exosomas medidos en cada muestra difiere del tamaño medio obtenido con el TEM, con una mayor diferencia para los exosomas de la LC. Aunque los valores siguen siendo razonables teniendo en cuenta el rango de exclusión de este kit, estas diferencias se deben de nuevo a la menor competencia de esta técnica frente al TEM.

## 6.- CONCLUSIONES

A modo de conclusión, este estudio ha demostrado que los kits de aislamiento de exosomas SEC-7012 y SEC-3512 proporcionan un método efectivo, rápido y reproducible para la obtención de exosomas de suero de leche en comparación con los métodos tradicionales como la DUC y la DG-UC.

Al comparar ambos kits de aislamiento, se han observado diferencias en sus características. Así, el kit SEC-3512, con un menor rango de exclusión, ha demostrado concentrar de manera más efectiva los exosomas que el SEC-7012, pero la menor pureza de los exosomas aislados con este kit pone de manifiesto que este concentra también de manera más efectiva a los contaminantes de tamaño similar a los exosomas y/o que co-eluyen junto a estos. Además, el tamaño medio de las EVs medidas mediante TEM y DLS concuerda con los rangos de exclusión descritos para cada uno de los kits. Pese a que el kit SEC-3512 posee un rango de exclusión (35-350 nm) aparentemente más adecuado para el aislamiento de exosomas, el kit SEC-7012 ha ofrecido globalmente mejores resultados por lo que sería recomendable escogerlo para futuros trabajos.

Por otra parte, la comparación entre LC y LP ha revelado diferencias en la composición y calidad de los exosomas. Los exosomas aislados de la LP presentan mayores concentraciones de proteína debido posiblemente a la desnaturalización de las proteínas tras el proceso de pasteurización, además de una mayor pureza por la eliminación de interferentes durante este proceso. La observación mediante TEM ha revelado que los exosomas de la LP presentan una membrana lipídica más difusa y desestructurada que los de la LC, hecho que puede atribuirse de la misma manera a la pasteurización.

Estos hallazgos son cruciales para futuras investigaciones que pretendan evaluar la calidad de los exosomas en la leche humana donada, la actividad de estos componentes biológicamente activos y con ello, su potencial uso en aplicaciones biomédicas.





## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Melnik, B. C. (2015). Milk—A Nutrient System of Mammalian Evolution Promoting mTORC1-Dependent Translation. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16(8), 17048-17087. <https://doi.org/10.3390/ijms160817048>
- [2] Melnik, B. C., John, S. M., Carrera-Bastos, P., & Schmitz, G. (2016). Milk: a postnatal imprinting system stabilizing FoxP3 expression and regulatory T cell differentiation. *Clinical And Translational Allergy*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0108-9>
- [3] Melnik, B. C., & Schmitz, G. (2017). MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Baillière's Best Practice And Research In Clinical Endocrinology And Metabolism/Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 427-442. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.003>
- [4] Andreas, N. J., Kampmann, B., & Doare, K. L. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- [5] De Leoz, M. L. A., Kalanetra, K. M., Bokulich, N. A., Strum, J. S., Underwood, M. A., German, J. B., Mills, D. A., & Lebrilla, C. B. (2015). Human Milk Glycomics and Gut Microbial Genomics in Infant Feces Show a Correlation between Human Milk Oligosaccharides and Gut Microbiota: A Proof-of-Concept Study. *Journal Of Proteome Research*, 14(1), 491-502. <https://doi.org/10.1021/pr500759e>
- [6] Melnik, B. C., Stremmel, W., Weiskirchen, R., John, S. M., & Schmitz, G. (2021). Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules*, 11(6), 851. <https://doi.org/10.3390/biom11060851>
- [7] Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. *Pediatric Clinics Of North America/ The Pediatric Clinics Of North America*, 60(1), 49-74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- [8] Núñez-Delgado, A., Mizrachi-Chávez, V. M., Welti-Chanes, J., Macher-Quintana, S. T., & Chuck-Hernández, C. (2024). Breast milk preservation: thermal and non-thermal processes and their effect on microorganism inactivation and the content of bioactive and nutritional compounds. *Frontiers In Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1325863>
- [9] García-López, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediatrica Mexico*, 32(4), 223-230. <https://doi.org/10.18233/apm32no4pp223-230>
- [10] Rodríguez Aviles, D. A., Barrera Rivera, M. K., Tibanquiza Arreaga, Lady del, & Montenegro Villavicencio, A. F. (2020). Beneficios inmunológicos de la leche materna. *RECIAMUC*, 4(1), 93-104. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/4.\(1\).enero.2020.93-104](https://doi.org/10.26820/reciamuc/4.(1).enero.2020.93-104)
- [11] Hester, S. N., Hustead, D. S., Mackey, A. D., Singhal, A., & Marriage, B. J. (2012). Is the macronutrient intake of formula-fed infants greater than breast-fed infants in early infancy? *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2012/891201>
- [12] Samuel, T. M., Zhou, Q., Giuffrida, F., Munblit, D., Verhasselt, V., & Thakkar, S. K. (2020). Nutritional and non-nutritional composition of human milk is modulated by maternal, infant, and methodological factors. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.576133>





- [13] Wood, E. L., Christian, D. G., Arafat, M., McColl, L. K., Prosser, C. G., Carpenter, E. A., Levine, A. S., Klockars, A., & Olszewski, P. K. (2021). Adjustment of whey:casein ratio from 20:80 to 60:40 in milk formulation affects food intake and brainstem and hypothalamic neuronal activation and gene expression in laboratory mice. *Foods*, 10(3), 658. <https://doi.org/10.3390/foods10030658>
- [14] Warren, M. R., Zhang, C., Vedadghavami, A., Bokvist, K., Dhal, P. K., & Bajpayee, A. G. (2021). Milk exosomes with enhanced mucus penetrability for oral delivery of siRNA. *Biomaterials Science*, 9(12), 4260–4277. <https://doi.org/10.1039/d0bm01497d>
- [15] Ståhl, A., Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R., & Karpman, D. (2017). Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatric Nephrology*, 34(1), 11–30. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3816-z>
- [16] Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- [17] Marsh, S. R., Pridham, K. J., Jourdan, J., & Gourdie, R. G. (2021). Novel protocols for scalable production of high quality purified small extracellular vesicles from bovine milk. *Nanotheranostics*, 5(4), 488–498. <https://doi.org/10.7150/ntno.62213>
- [18] Weiskirchen, R., Schröder, S. K., Weiskirchen, S., Buhl, E. M., & Melnik, B. (2023). Isolation of bovine and human milk extracellular vesicles. *Biomedicines*, 11(10), 2715. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102715>
- [19] Benmoussa, A., Ly, S., Shan, S. T., Laugier, J., Boilard, E., Gilbert, C., & Provost, P. (2017). A subset of extracellular vesicles carries the bulk of micrnas in commercial dairy cow's milk. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1401897>
- [20] Wijenayake, S., Eisha, S., Tawhidi, Z., Pitino, M. A., Steele, M. A., Fleming, A. S., & McGowan, P. O. (2021). Comparison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk. *PLOS ONE*, 16(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257633>
- [21] Yamauchi, M., Shimizu, K., Rahman, M., Ishikawa, H., Takase, H., Ugawa, S., Okada, A., & Inoshima, Y. (2018). Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(3), 359–364. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1539743>
- [22] Go, G., Jeon, J., Lee, G., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2021). Bovine milk extracellular vesicles induce the proliferation and differentiation of osteoblasts and promote osteogenesis in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13705>
- [23] O'Reilly, D., Dorodnykh, D., Avdeenko, N. V., Nekliudov, N. A., Garsen, J., Elolimy, A. A., Petrou, L., Simpson, M. R., Yeruva, L., & Munblit, D. (2021). Perspective: The role of human breast-milk extracellular vesicles in child health and disease. *Advances in Nutrition*, 12(1), 59–70. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa094>
- [24] World Health Organization. (2019). *Donor human milk for low-birth-weight infants*. World Health Organization. (Accedido el 05 - 05 - 2024) <https://www.who.int/tools/elena/interventions/donormilk-infants#:~:text=WHO%20Recommendations,or%20can%20be%20set%20up.>



- [25] Quigley, M., & McGuire, W. (2014). Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd002971.pub3>
- [26] Shenker, N., Staff, M., Vickers, A., Aprigio, J., Tiwari, S., Nangia, S., Sachdeva, R. C., Clifford, V., Coutsoydis, A., Reimers, P., Israel-Ballard, K., Mansen, K., Mileusnic-Milenovic, R., Wesolowska, A., Goudoever, J. B., Hosseini, M., Klotz, D., Grøvslien, A. H., & Weaver, G. (2021). Maintaining Human Milk Bank services throughout the COVID-19 pandemic: A global response. *Maternal & Child Nutrition*, 17(3). <https://doi.org/10.1111/mcn.13131>
- [27] Gutierrez dos Santos, B., & Perrin, M. T. (2021). What is known about Human Milk Bank donors around the world: A systematic scoping review. *Public Health Nutrition*, 1–11. <https://doi.org/10.1017/s1368980021003979>
- [28] Tyebally Fang, M., Grummer-Strawn, L., Maryuningsih, Y., & Biller-Andorno, N. (2021). Human milk banks: A need for further evidence and guidance. *The Lancet Global Health*, 9(2). [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(20\)30468-x](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(20)30468-x)
- [29] Welcome!. EMBA. (2021). (Accedido el 05 - 05 - 24) <https://europeanmilkbanking.com/>
- [30] About the Human Milk Banking Association of North America (HMBANA). The Human Milk Banking Association of North America (HMBANA). (2024). (Accedido el 05 - 05 - 24) <https://www.hmbana.org/about-us/>
- [31] Peila, C., Moro, G., Bertino, E., Cavallarín, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., Cresi, F., & Coscia, A. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients*, 8(8), 477. <https://doi.org/10.3390/nu8080477>
- [32] Clos-Sansalvador, M., Monguió-Tortajada, M., Roura, S., Franquesa, M., & Borràs, F. E. (2022). Commonly used methods for extracellular vesicles' enrichment: Implications in downstream analyses and use. *European Journal of Cell Biology*, 101(3), 151227. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151227>
- [33] Akbar, A., Malekian, F., Baghban, N., Kodam, S. P., & Ullah, M. (2022). Methodologies to isolate and purify clinical grade extracellular vesicles for medical applications. *Cells*, 11(2), 186. <https://doi.org/10.3390/cells11020186>
- [34] Deregibus, M. C., Figliolini, F., D'antico, S., Manzini, P. M., Pasquino, C., De Lena, M., Tetta, C., Brizzi, M. F., & Camussi, G. (2016). Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(5), 1359–1366. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2759>
- [35] Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- [36] Rosado, M., Silva, R., G. Bexiga, M., G. Jones, J., Manadas, B., & Anjo, S. I. (2019). Advances in Biomarker Detection: Alternative Approaches for blood-based biomarker detection. *Advances in Clinical Chemistry*, 141–199. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.04.003>
- [37] Coumans, F. A. W., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., van der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., ... Nieuwland, R. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circulation Research*, 120(10), 1632–1648. <https://doi.org/10.1161/circresaha.117.309417>



- [38] Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- [39] Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T., & Ishiguro, N. (2012). Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(11), 1523–1525. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0032>
- [40] Mohanta, S. (2021). Transmission electron microscopy. *Indian Association For The Cultivation Of Science*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21280.71681>
- [41] Franken, L. E., Grünewald, K., Boekema, E. J., & Stuart, M. C. (2020). A technical introduction to transmission electron microscopy for soft-matter: Imaging, possibilities, choices, and technical developments. *Small*, 16(14). <https://doi.org/10.1002/sml.201906198>
- [42] Malatesta, M. (2021). Transmission electron microscopy as a powerful tool to investigate the interaction of nanoparticles with subcellular structures. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12789. <https://doi.org/10.3390/ijms222312789>
- [43] Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- [44] Falke, S., & Betzel, C. (2019). Dynamic light scattering (DLS). *Radiation in Bioanalysis*, 173–193. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6)
- [45] Babick, F. (2020). Dynamic light scattering (DLS). *Characterization of Nanoparticles*, 137–172. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814182-3.00010-9>
- [46] Comfort, N., Cai, K., Bloomquist, T. R., Strait, M. D., Ferrante Jr., A. W., & Baccarelli, A. A. (2021). Nanoparticle tracking analysis for the quantification and size determination of extracellular vesicles. *Journal of Visualized Experiments*, (169). <https://doi.org/10.3791/62447-v>
- [47] Kim, A., Ng, W. B., Bernt, W., & Cho, N.-J. (2019). Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38915-x>
- [48] *Nanoscale material characterization: A review of the use of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*. Analysis & Separations from Technology Networks. (2015). (Accedido el 16 - 05 - 24) <https://www.technologynetworks.com/analysis/white-papers/nanoscale-material-characterization-a-review-of-the-use-of-nanoparticle-tracking-analysis-nta-228432>
- [49] Cortés-Ríos, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., Aliaga, M., & López-Alarcón, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short Incubation Times. *Analytical Biochemistry*, 608, 113904. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113904>
- [50] Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In *Methods in molecular biology* (Vol. 32, pp. 5–7). Essay, Humana Press Inc.



- [51] Malviya, R., Bansal, V., Pal, O., & Sharma, P. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 22–26.
- [52] Sadapha, P., & Dhamak, K. (2022). Review article on high-performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23–29. <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2022.v74i02.003>
- [53] Abdu Hussen, A. (2022). High-performance liquid chromatography (HPLC): A Review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6(1), 010–020. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>
- [54] McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- [55] Papa, S., Ortolani, C., Fernández, P., & O'Connor, J.-E. (2023). Flow cytometry and its applications to molecular biology and diagnosis 2.0. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16215. <https://doi.org/10.3390/ijms242216215>
- [56] Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: Basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- [57] Hu, Y., Thaler, J., & Nieuwland, R. (2021). Extracellular vesicles in human milk. *Pharmaceuticals*, 14(10), 1050. <https://doi.org/10.3390/ph14101050>



## 8.- ANEXOS

- **Column equilibration**
- 4. The column must be at room temperature (8°C – 24°C) for 30 minutes before use.
- 5. Use only fresh filtered (0.2 µm) buffer to avoid particulate contamination.
- 6. Rinse the column with 21 mL of running buffer (7.5 mL for the lower volumes columns).
- 7. Do not allow the column to run dry. The top filter must stay wet.

- **Sample fraction collection**
- 8. Once the column is washed, add the sample onto the top filter (500 µL and 150 µL for the lower volumes columns). Once it passes through the filter, fill the column with the running buffer.
- 9. Let pass three drops of running buffer, and collect fractions of 500 µL (150 µL for the lower volumes columns) (minimum 12 fractions).
- 10. When the column is used according to the protocol, the first four fractions (2.0 mL, and 500 µL for the lower volumes columns) is the void volume which does not contain vesicles. These vesicles elute predominantly in fractions 5, 6, 7 and 8 with removal of protein contamination. Fractions beyond 9 usually contain higher protein and lower vesicle levels (Fig.2).

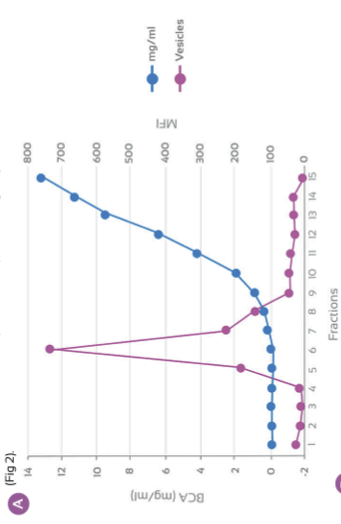


Figure 2. Comparison of EVs and protein in each fraction from the column. A. Comparison of protein (BCAs) vesicles (BCAs CD93-CD91) content. B. Western Blot. SEC fractions were probed on SDS-PAGE and immunoblotted for CD9 tetraspanin with anti-CD9 (V1720), under non-reducing conditions.

- **Column cleaning and storage**
- 11. After the collection of the vesicle fraction, rinse the column with 21 mL (7.5 mL for the lower volumes columns) of running buffer to rinse out all the protein and small molecules before the next sample application.
- 12. NaOH cleanup is performed to remove precipitated proteins or other contaminants that may be accumulated on the column, a running buffer change or a sample change. To do this, add 0.5 mL (0.15 mL for the lower volumes columns) of sodium hydroxide (500 mM NaOH), then equilibrate the columns with 10 mL of water (3.5 mL for the lower volumes columns) followed by 21 mL of running buffer (7.5 mL for the lower volumes columns) immediately after cleanup. Note that the column should never be stored in sodium hydroxide.
- 12. Put the bottom cap on.
- 13. Put the top cap on carefully, as drastic changes in pressure could damage the column.
- 14. Stopcocks cannot be heat sterilized as they do not withstand high temperatures. To sterilize them, it can be done by passing a 30% ethanol solution (5 mL) with the help of a syringe.
- **Fraction collection concentration**
- 11. If the volume of the starting sample is small and / or the concentration and EVs is low in the sample, it is possible that the EVs will be much diluted in the collected fractions. In many cases, for downstream processing it is necessary to concentrate the fractions, for that, we recommended to use an Amicon Ultra-4, membrane PLHK Ultracel-PL, 100 kDa (Merck).

### 5. APPROPRIATE STORAGE AND HANDLING CONDITIONS

- Running buffer is not supplied. Some examples of buffers that can be used are:
- PBS 20 mM, 0.32% trisodium citrate (pH 7.4, 0.22 mm filtered and degassed).
  - PBS 20 mM, 150 mM NaCl (pH 7.2, 0.22 mm filtered and degassed)
- It is recommended to use buffers with an ionic strength of 0.15 M or higher, because in low ionic strength buffers, the concentration of competing buffer ions is low, and contaminant proteins spend most of their time adsorbed to binding sites on the stationary phase. For buffer choice it is also important consider the downstream protocol for isolated vesicles. For example citrate buffers could interfere with molecular biology protocols.

Note: All buffers must contain sodium azide.

### 6. EVIDENCE OF DETERIORATION

Columns are reusable up to 5 times and should not be used if any evidence of deterioration is observed. For more information, please contact our technical service: [tech@immunostep.com](mailto:tech@immunostep.com).

### 7. RECOMMENDATIONS AND WARNINGS

- a. The column anti-bacterial solution contains sodium azide. In acid conditions, it is transformed into hydrazoic acid, a highly toxic compound. Azide compounds must be diluted in running water before being discarded. These conditions are recommended so as to avoid deposits in plumbing, where explosive conditions could develop. The safety data sheet (SDS) is available online at [www.immunostep.com](http://www.immunostep.com)
- b. The biological samples should be handled in the same way as those capable of transmitting infection. Appropriate handling procedures should be guaranteed.
- c. Do not use after the expiry date indicated on the column.
- d. Temper running buffer and columns before sample purification for an adequate Volumetric Flow Rate.
- e. For professional use only.

### 8. WARRANTY

Warranted only to conform to the quantity and contents stated on the label or in the product labelling at the time of delivery to the customer. Immunostep disclaims hereby other warranties. Immunostep's sole liability is limited to either the replacement of the products or refund of the purchase price.

### 9. PROTOCOL

1. Place the column in a rack and level it, make sure the column is vertical. Column box can be used as a rack, as shown in figure 1.
2. Remove the top cap carefully, as drastic changes in pressure could damage the column.
3. Remove the bottom cap.



Figure 1. Graphic instructions to use column box as well as rack, avoiding to get a specific column rack in the laboratory and facilitating the protocol.

## EVs SEC Size Exclusion Chromatography Columns for EVs isolation from biological fluids

### 1. INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) are thought to provide a means of intercellular communication (23) and of transmission of macromolecules between cells allowing the spread of proteins, lipids, mRNA, miRNA and DNA and as contributing factors in the development of several diseases. EVs can also modulate cancer microenvironment (4) and the immune response (5,6) and are recognized as potential markers of human diseases, including cancer. In particular, due to their presence and stability in most body fluids and the similarity of their content with tumor cells, EVs have great potential as non-invasive biomarkers for liquid biopsy. Nevertheless, the use of EVs for diagnostic purposes has been limited by the lack of reproducible isolation methods (7). About isolation methods, ultracentrifugation remains by far like the most widely used primary method despite it is a time consuming method, that provide aggregated proteins and nucleic acid may be pelleted and is not very suitable for small sample volumes. In this sense, size exclusion chromatography (SEC) has been described as most efficient method for isolating EVs from complex biological fluids by single-step (8), with a good recovery and with almost complete removal of contaminants, such as proteins and lipoproteins.

### 2. PRODUCT DESCRIPTION

Immunostep has developed SEC columns for EVs isolation from complex biological fluids such as: plasma, serum, urine and cerebrospinal fluid.

SPECIFICATIONS	
Reference	SEC3512
Separation size	70-1000nm
Volumetric Flow Rate at RT	>0.75 ml/min
Sample volume	<1 ml (500 µl optimal volume)
Column volume	10 ml
Void volume	3 ml
pH stability working range	3-13
pH stability cleaning in place (CIP)	2-14
Shelf life	12 months at 2-8°C

\*Columns available for lower volumes (optimal of 150 µL). Ask us for more information about them. The kit includes a stopcock for each column.

### 3. REAGENTS PROVIDED

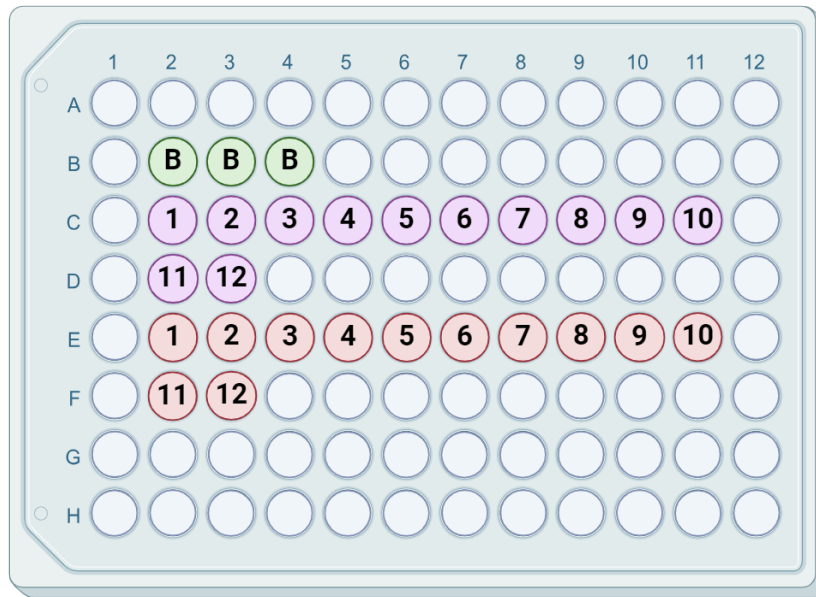
DESCRIPTION	REFERENCE	COLUMNS (UNITS)
12 ml SEC columns, which a diameter of 1.56 cm and 7.9 cm high, packed with a resin for a separation size of 35-350 nm.	SEC3512-4	4
	SEC3512-8	8
12 ml SEC columns, which a diameter of 1.56 cm and 7.9 cm high, packed with a resin for a separation size of 70-1000 nm.	SEC7012-4	4
	SEC7012-8	8

\*Columns available for lower volumes (optimal of 150 µL). Ask us for more information about them.

### 4. APPROPRIATE STORAGE AND HANDLING CONDITIONS

Store the columns at 2-8 °C in the presence of a bacteriostatic agent (e.g. filtered PBS containing Sodium Azide 0.09% or 20% ethanol). This one can be introduced during the rinsing step. Keep columns upright.

Revision: N° 11 | Emission date: 04/10/2021

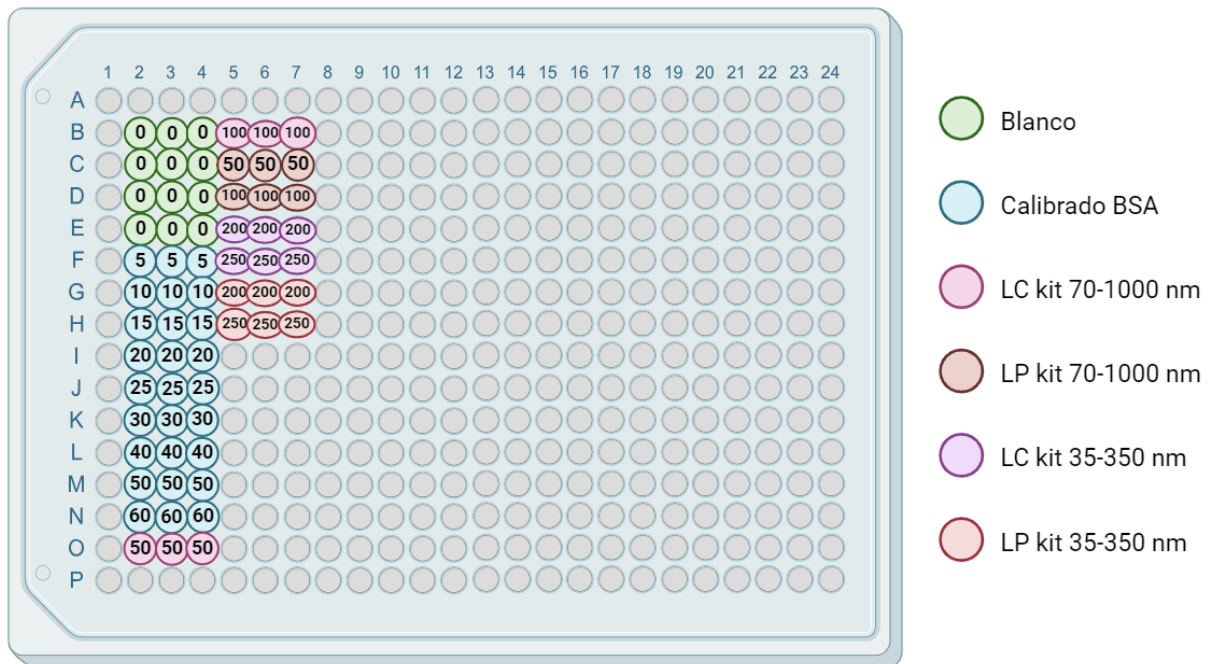


Anexo 2. Esquema de la disposición de cada alícuota en la placa multipocillo para las medidas de absorbancia, donde el color verde representa al blanco, el color rosa representa las alícuotas de LC y el color naranja representa las alícuotas de LP. La disposición fue la misma para ambos kits (creado con BioRender)

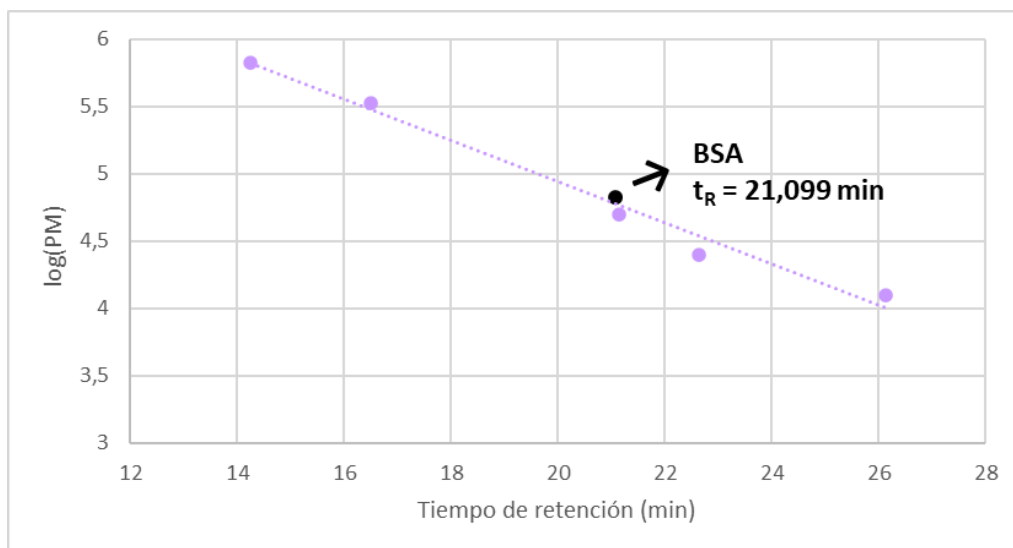
Anexo 3. Volúmenes tomados del patrón de BSA de 100 ppm para la construcción del calibrado en el ensayo del BCA

Concentración (ppm)	Volumen BSA ( $\mu\text{L}$ )	Volumen PBS ( $\mu\text{L}$ )	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )
0	0,0	250,0	
5	12,5	237,5	
10	25,0	225,0	
15	37,5	212,5	
20	50,0	200,0	
25	62,5	187,5	250
30	75,0	175,0	
40	100,0	150,0	
50	125,0	125,0	
60	150,0	100,0	





Anexo 4. Esquema de la disposición de cada alícuota en la placa multipocillo, donde aparecen el nivel de concentración de los patrones y el factor de dilución de cada muestra (creado con BioRender)



Anexo 5. Calibrado con la columna SEC (realizado por lo compañeros del GEAB empleando la misma columna y el mismo equipo HPLC) donde se destaca el punto correspondiente a la BSA junto con su tiempo de retención y el resto de los puntos corresponden, en orden, a la tiroglobulina (Tg), la Tg dimerizada, la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG), la cadena ligera de la IgG y al citocromo C



The hit has been validated for pre-enriched human exosomes from cell culture and bodily fluids, such as serum/plasma, and urine, through an ultracentrifugation protocol (Fig 2)<sup>1</sup>. The principle for exosome purification is the same for cell culture and bodily fluids, but due to the viscosity of some fluids it is necessary to dilute them with an equal volume of PBS, before centrifugations.

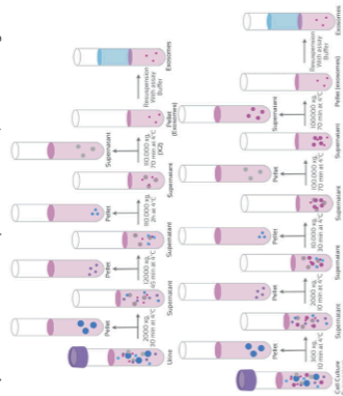


Figure 2: Workflow for the exosome pre-enrichment based on differential ultracentrifugation. Please, refer to <https://immunistep.com/exomastep/>, for additional technical information.

**b) Sample pretreatment for direct exosome detection on cell-culture supernatant.**

The sample pretreatment for direct exosome detection from cell culture supernatant is not recommended for detection of exosomes from body fluids. Specific sample pretreatment protocols are available for body fluids (plasma, urine) each optimized for its specific type of biological sample. To ensure that detected exosomes originate from your cells of interest, culture the cells with exosome depleted fetal bovine serum (FBS), because normal FBS contains extremely high levels of exosomes that will contaminate the cells derived exosomes.

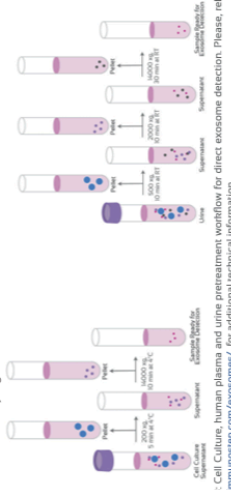


Figure 3: Cell Culture, human plasma and urine pretreatment workflow for direct exosome detection. Please, refer to <https://immunistep.com/exomastep/>, for additional technical information.

**10. PROTOCOL**

- **Isolate CD63+ exosomes**

  1. Resuspend the capture beads by vortex for approximately 20 seconds.
  2. Add 5µL of the capture bead to each 12x75 mm Polystyrene Round Bottom tube (Cytometer tube).
  3. Add 45µL of ExoStep Incubation Buffer and a vortex for 20 seconds.
  4. Add 50µL of sample previously prepared according to "Sample Preparation" to the appropriate tubes. Mix the reactions gently by pipetting up and down several times with a pipette and vortexing for few seconds.
  5. Add direct 10-15µg of exosomes isolated by differential ultracentrifugation or until 100µl for cell exosomes. Previously prepared according to "Sample Preparation" to the appropriate tubes. Mix the reactions gently by pipetting up and down several times with a pipette and vortexing for few seconds.
  6. Incubate in the dark overnight at room temperature (RT). NO STIRRING.
  7. Alter overnight incubation wash the sample (bead-bound exosomes) by adding 1ml of Assay Buffer IX.

**3. REAGENTS PROVIDED**

DESCRIPTION	COMPONENTS	AMOUNT
Superparamagnetic Polystyrene Beads with Magnet-Disc Capture Beads	CD63+ Clone TEA3/18 capture beads. Polystyrene beads with Magnet-Disc Capture Beads. 6.5 µm (CV:3%). Fluorescence intensity characteristics	6000 beads/test (5 µl/test)
ExoStep Incubation Buffer	Incubation buffer for ExoStep kits	12 ml (65 µl/test)
Primary detection antibody	Anti-CD9 biotin or Anti-CD81 biotin (Clone MB8)	(5 µl/test)
Secondary detection reagent	Streptavidin-Phycoerythrin (PE) is useful for detecting biotinylated antibodies. The excitation and emission maxima are 495 nm (excitation) and 665 nm (emission) respectively. Light emission maximum of 575 nm	(5 µl/test)
Assay Buffer IX	PEBS (0.8 MBSA, pH 7.4) + IX. Do not freeze. Dilute contents of the IX Assay Buffer to IX (PEBS 1% BSA) in PEBS, for use in this assay	15 ml

**4. APPROPRIATE STORAGE AND HANDLING CONDITIONS**

Store in the dark, refrigerated between 2 °C and 8 °C. DO NOT FREEZE. The hit is stable until the expiry date stated on the vial label if kept at 2-8 °C. Do not use after the date indicated.

**5. REAGENTS NOT PROVIDED**

- Pre-enriched exosomes by ultra-centrifugation.
- Magnetic Rack; MagnaSpheres® Mag. Sep. Stand 12-hole, 12x75mm (PROMEGA, Ref Z5343).
- 12x75 mm Polystyrene Round Bottom Tubes (Cytometer tubes)
- Sterile syringe filter with a 0.45 µm pore (EMD Millipore Millex, Ref. SLHV033R5).
- Syringe of adequate volume.

**6. EVIDENCE OF DETERIORATION**

Reagents should not be used if any evidence of deterioration is observed. For more information, please contact our technical service: [tech@immunistep.com](mailto:tech@immunistep.com)

**7. RECOMMENDATIONS AND WARNINGS**

- a. Avoid microbial contamination of the reagent: Assay Buffer IX can be filtered before use.
- b. Microspheres and reagents should be protected from prolonged exposure to light throughout this procedure.
- c. Microspheres are internally dyed with a fluorescent dye (fluorescent in PerCP, PerCP-Cy5, PerCP-Cy5.5 and APC). For exosome staining protocol ensure that the detector antibody does not occupy these fluorescent channels.
- d. The samples should be treated with appropriate handling procedures.
- e. Depending on the type of exosomes used, the number of exosomes may vary with respect to the concentration of the protein.
- f. Do not use after the expiry date indicated on the vial.
- g. Deviations from the recommended procedure could invalidate the analysis results.
- h. Before acquiring the samples, it is necessary to make sure that the flow cytometer is calibrated and compensated.
- i. The isolation and detection success is dependent on the quality of the sample pre-enrichment process.
- j. Pay attention if the hit is used in combination with annexin assays. The buffer used to work with annexin generates non-specificity with the ExoStep hit.

**8. WARRANTY**

Warranted only to conform to the quantity and contents stated on the label or in the product labelling at the time of delivery to the customer. ImmunoStep disclaims hereby other warranties. ImmunoStep sole liability is limited to either the replacement of the products or refund of the purchase price.

**9. SAMPLE PREPARATION**

ExoStep allows the detection of isolated exosomes from differential ultracentrifugation (a) as well as direct detection in the sample without the need for ultracentrifugation, just with simple pre-treatment (b).

**a) Purification of Exosomes by Differential Ultracentrifugation.**

**ExoStep™**

**Exosome FACS capture and detection hit**

REF	DESCRIPTION	AMOUNT
Exo5-25-G9	Includes CD9 biotin as primary detection antibody	25 test
Exo5-25-C81	Includes CD81 biotin as primary detection antibody	25 test

**1. INTRODUCTION**

Exosomes are small extracellular vesicles that are released from cells upon fusion of an immediate endocytic compartment, the multivesicular body (MVB), with the plasma membrane. They are thought to provide a means of intercellular communication<sup>2,3</sup> and of transmission of macromolecules between cells allowing the spread of proteins, lipids, mRNA, miRNA and DNA and as contributing factors in the development of several diseases. Exosomes can also modulate cancer microenvironment<sup>4,5</sup> and the immune response<sup>6,4</sup>.

**2. PRODUCT DESCRIPTION**

The hit is a simple immunobead assay for isolation/detection of exosome, using a bead-bound anti-CD63 capture antibody and a fluorochrome conjugated anti-CD9 detection antibody. The hit provides reproducible results and can be run in parallel to exosome immunophenotyping.

- **Tested application:** Flow Cytometry<sup>7,8</sup>
- **Species reactivity:** Human
- **Storage buffer:** aqueous buffered solution containing protein stabilizer and 0.05% sodium azide (NaN<sub>3</sub>).
- **Recommended usage:** ImmunoStep's ExoStep is intended for the immunoisolation (immunomagnetic or FACS) and Flow Cytometry analysis of pre-enriched CD63+ human exosomes from biofluids (plasma, urine) or cell culture media.
- **Presentation:** Liquid

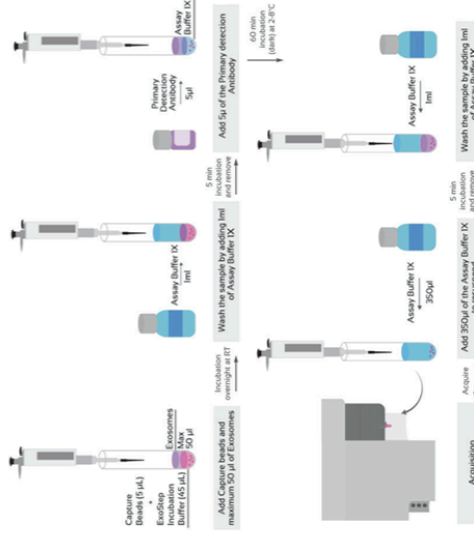


Figure 1: Immunobead assay for isolation/detection of exosome workflow.

Revision N° 10 | Emission date: 04/10/2021





8. Collect the Magnetic beads by placing tubes on a magnetic rack and incubate 5 minutes or by centrifugation at 2500xg for 5 minutes. Remove supernatant from tubes by Hand-decanting in the case of using the magnetic rack (Fig. 4) or by aspiration. Take care not to disturb the microspheres, and make sure not to leave more than 100ul of supernatant in the tube.

■ **Stain exosomes for flow cytometry**

7. Add 5ul of the primary detection antibody to the bead-bound exosomes tube. Mix gently by pipetting and/or by tapping. It is advisable to prepare an additional tube with the appropriate isotype control or without exosomes, for background determination.
8. Incubate in the dark 60 minutes at 2-8°C, without stirring.
9. Wash the sample (bead-bound exosomes) by adding 1 ml of Assay Buffer IX.
10. Collect the magnetic beads by placing tubes on a magnetic rack and incubate 5 minutes or by centrifugation at 2500xg for 5 minutes. Remove supernatant from tubes by hand-decanting in the case of using the magnetic rack (Fig. 4) or by aspiration. Take care not to disturb the microspheres, and make sure not to leave more than 100ul of supernatant in the tube.
11. Add 5 µL of the secondary detection reagent (5 µL) to the bead-bound exosomes tube. Mix the reactions gently by pipetting up and down several times with a micropipette.
12. Incubate in the dark 30 minutes at 2-8°C, without stirring.
13. Wash the sample (bead-bound exosomes) by adding 1 ml of Assay Buffer IX.
14. Collect the magnetic beads by placing tubes on a magnetic rack and incubate 5 minutes or by centrifugation at 2500xg for 5 minutes. Remove supernatant from tubes by hand-decanting decanting in the case of using the magnetic rack (Fig. 4) or by aspiration.
15. Resuspend the sample in 350µL Assay Buffer IX and Acquire on a flow cytometer or store in the dark max up to 2 hours at 2-8°C, until the analysis is carried out.

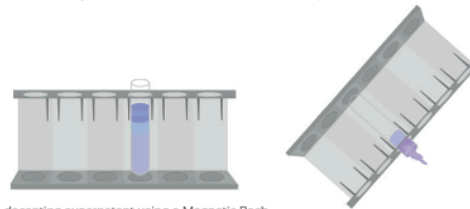


Figure 4: Hand-decanting supernatant using a Magnetic Rack.

*Anexo 6b. Especificaciones y protocolo detallados del kit ExoStep™ (continuación)*

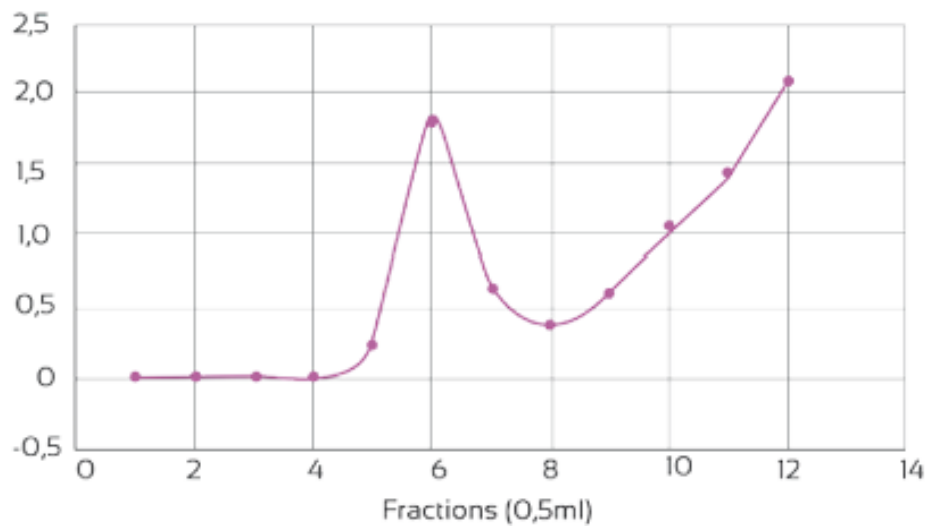
*Anexo 6c. Concentración de los patrones de exomas empleados para la construcción del calibrado de citometría junto con el volumen del stock de 1 µg/µL empleado para cada uno*

[Exosomas] (µg/mL)	[Exosomas] (partículas/mL)	Volumen patrón (µL)	Volumen final (mL)
0	0	0	
2	2,00E+10	2	
10	1,00E+11	10	1
25	2,50E+11	25	
50	5,00E+11	50	



Anexo 6d. Nomenclatura empleada para cada muestra junto con su correspondiente dilución para el análisis por citometría

Kit de aislamiento	Muestra	Dilución
SEC-3512	LC <sub>35</sub> Dil1	1:1500
	LC <sub>35</sub> Dil2	1:3000
	LP <sub>35</sub> Dil1	1:800
	LP <sub>35</sub> Dil2	1:1600
SEC-7012	LC <sub>70</sub> Dil1	1:500
	LC <sub>70</sub> Dil2	1:1000
	LP <sub>70</sub> Dil1	1:500
	LC <sub>70</sub> Dil2	1:1000



Anexo 7. Perfil de absorbancia de las fracciones de EVs aisladas del plasma mediante los kits SEC-7012 y SEC-3512

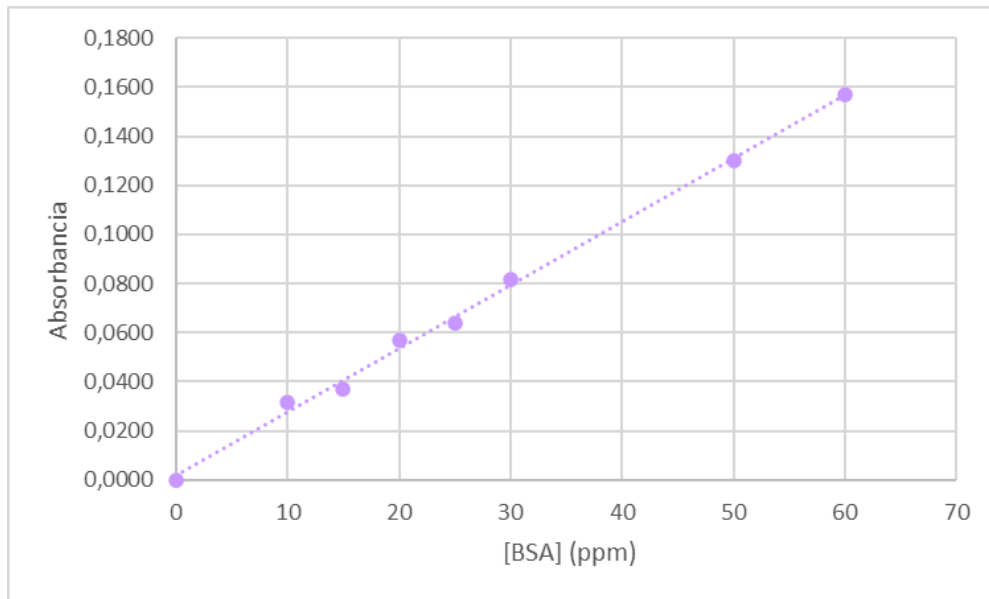


*Anexo 8a. Masas de las muestras antes y después del proceso de preconcentración para las muestras aisladas con el kit SEC-7012*

<b>Réplica</b>	<b>Masa original (g)</b>	<b>Masa preconcentrada (g)</b>
LC 1	0,51387	0,02776
LC 2	0,51269	0,02069
LC 3	0,51852	0,02086
LP 1	0,51735	0,02766
LP 2	0,52434	0,02289
LP 3	0,51453	0,02810

*Anexo 8b. Masas de las muestras antes y después del proceso de preconcentración para las muestras aisladas con el kit SEC-3512*

<b>Réplica</b>	<b>Masa original (g)</b>	<b>Masa preconcentrada (g)</b>
LC 1	0,51284	0,01824
LC 2	0,51991	0,02414
LC 3	0,51661	0,02297
LP 1	0,51380	0,02117
LP 2	0,50911	0,02014
LP 3	0,51385	0,01747



Anexo 9a. Gráfica de calibrado obtenida para el ensayo del BCA, donde se representa la absorbancia frente a la concentración de patrón

Anexo 9b. Valores de absorbancia y concentración de proteína obtenidos para LC y LP a diferentes diluciones y en la muestra para el kit SEC-7012

LC		LP	
Abs 1:50	Abs 1:100	Abs 1:50	Abs 1:100
0,1973	0,0711	0,3877	0,1313
0,2200	0,0713	0,4502	0,1509
0,2226	0,0819	0,4517	0,1370
Concentración muestras diluídas (ppm)			
75,61106	26,77284	149,2941	50,06968
84,39575	26,85024	173,481	57,65469
85,40192	30,95234	174,0615	52,27552
Concentración real (ppm)			
3780,553	2677,284	7464,704	5006,968
4219,787	2685,024	8674,05	5765,469
4270,096	3095,234	8703,074	5227,552



Anexo 9c. Valores de absorbancia y concentración de proteína obtenidos para LC y LP a diferentes diluciones y en la muestra para el kit SEC-3512

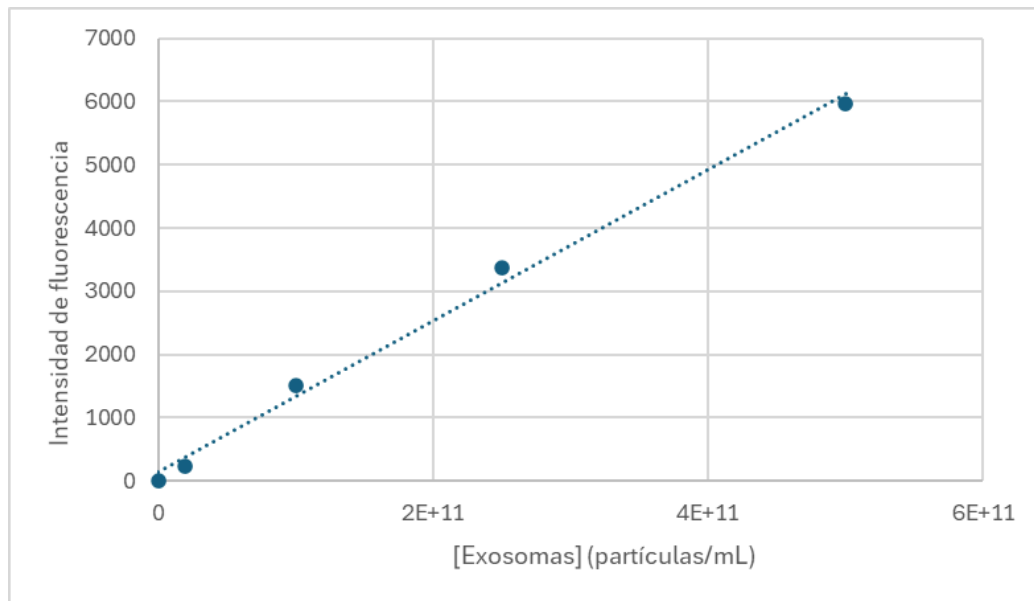
LC		LP	
Abs 1:200	Abs 1:250	Abs 1:200	Abs 1:250
0,0836	0,0827	0,0933	0,0936
0,0842	0,1020	0,0887	0,0951
0,1057	0,0866	0,0987	0,0921
Concentración muestras diluídas (ppm)			
31,61022	31,26193	35,36403	35,48013
31,84242	38,73085	33,58388	36,06062
40,16272	32,77120	37,45378	34,89964
Concentración real (ppm)			
6322,045	7815,483	7072,807	8870,032
6368,484	9682,713	6716,775	9015,154
8032,543	8192,799	7490,756	8724,911

Anexo 10a. Área total y área del pico cromatográfico integradas junto con la ventana de integración empleada para las muestras del kit SEC-7012

Muestra	Área total	Área pico	Ventana (min)
LC	629897,30719	392614,45352	Total: 7,7 a 39,2 Pico: 8,6 a 15,0
LP	1,94661E+06	1,44575E+06	Total: 8,4 a 39,6 Pico: 9,0 a 12,5

Anexo 10b. Área total y área del pico cromatográfico integradas junto con la ventana de integración empleada para las muestras del kit SEC-3512

Muestra	Área total	Área pico	Ventana (min)
LC	1,21536E+06	529327,54985	Total: 8,0 a 39,0 Pico: 8,6 a 15,0
LP	1,96249E+06	1,33861E+06	Total: 8,1 a 39,0 Pico: 8,8 a 12,2



Anexo 11a. Calibrado obtenido de la medida de los patrones de exosomas de suero por citometría de flujo, donde se representa la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de exosomas

Anexo 11b. Intensidad de fluorescencia medida para cada muestra procedente del kit SEC-7012 en cada dilución ensayada

Muestra	Intensidad de fluorescencia
LC <sub>70</sub> Dil1	1906,7
LC <sub>70</sub> Dil2	1205,8
LP <sub>70</sub> Dil1	2031,3
LP <sub>70</sub> Dil2	1701,4

Anexo 11c. Intensidad de fluorescencia medida para cada muestra procedente del kit SEC-3512

Muestra	Intensidad de fluorescencia
LC <sub>35</sub> Dil2	175,4
LP <sub>35</sub> Dil1	841,1