



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Vesículas extracelulares: potencial como biomarcadores y papel en la patogénesis de la enfermedad

**Extracellular vesicles: potential as biomarkers and role in the
pathogenesis of the disease**

Autora

Laura Pastor Bernad

Director/es

Dra. Inmaculada Martín Burriel

Dr. David Sanz Rubio

Facultad de Veterinaria

Máster en Salud Global: Integración de la Salud Ambiental, Humana y
Animal

2020/2021

Agradecimientos

No sería justo que este trabajo no mencionase a Adelaida Hernaiz, por su disposición, paciencia y ayuda en todos los aspectos.

Agradecer también a Alicia Otero su disposición y sus aportaciones, y a las compañeras del CIEETE.

Mencionar también a M^a Ángeles del Servicio de microscopía electrónica de materiales. Al Servicio de microscopía electrónica de sistemas biológicos y a Nuria Navascués del INMA.

A Inma y a David, por adaptarse a pesar de todo.

A mis compis de CerTest.

A mis compis de máster y a mis compis de vida.

Abreviaturas

CIEETE Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes

ECJe (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica)

ES (error estándar)

EET (Enfermedad Espongiforme Transmisible)

ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ExoQuick-TC (*ExoQuick-TC™*)

hpi (horas post-inoculación)

INMA (Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón)

miRCURY *miRCURY® Exosome Serum/Plasma Kit*

miRNAs (microRNAs)

mRNA (*messenger RNA*)

MSCs (*Mesenchymal stem cells*)

NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*)

PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*)

PrP Proteína prion

PrP^C Proteína prion celular

PrP^{res} Proteína prion resistente a la digestión por proteinasa K

PrP^{Sc} Proteína prion patológica

SD (*Standard Deviation*)

SOFIA (*Surround Optical Fiber Immunoassay*)

sPMCA (*serial Protein Misfolding Cyclic Amplification*)

TEM (*Transmission Electron Microscopy*)

vECJ (variante de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob)

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
Abstract	2
2. Introducción	3
2.1. Enfermedades espongiformes transmisibles y scrapie	3
2.1.1. Scrapie	3
2.1.1.1. Agente causal del scrapie y las EET	3
2.1.1.2. Factores genéticos de riesgo en scrapie	4
2.1.1.3. Transmisión y patogenia del scrapie.....	5
2.1.2. Relevancia en salud global de las EET y el scrapie	6
2.1.3. Diagnóstico del scrapie en la actualidad	7
2.1.4. Biomarcadores en EET	8
2.2. Vesículas extracelulares.....	8
2.2.1. Exosomas: aspectos generales y función	8
2.2.2. Aplicaciones de los exosomas	9
2.2.3. Aislamiento de exosomas.....	10
2.3. Exosomas en las EET y el scrapie	11
3. Objetivos	13
4. Material y métodos.....	13
4.1. Origen de las muestras y población de estudio.....	13
4.2. Procesamiento de las muestras de tejido nervioso.....	14
4.2.1. Homogeneización de tejido del sistema nervioso central	15
4.3. Aislamiento y caracterización de exosomas.....	15
4.3.1. Aislamiento de los exosomas	15
4.3.1.1. Aislamiento de exosomas de plasma mediante el kit miRCURY.....	16

4.3.1.2.	Aislamiento de exosomas de orina y tejido nervioso mediante el kit ExoQuick-TC.....	17
4.3.1.2.1.	Aislamiento de exosomas de orina mediante el kit ExoQuick-TC	18
4.3.1.2.2.	Aislamiento de exosomas de tejido nervioso mediante el kit ExoQuick-TC.....	18
4.3.2.	Caracterización de los exosomas.....	19
4.3.2.1.	Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	19
4.3.2.2.	Análisis de la distribución de tamaños y la concentración de exosomas mediante <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	19
4.4.	Determinación de PrP ^{Sc} mediante PMCA	20
4.4.1.	Amplificación de PrP ^{Sc} mediante PMCA	20
4.4.2.	Detección de PrP ^{Sc} mediante <i>Dot blot</i>	21
4.5.	Evaluación del efecto de los exosomas sobre células madre mesenquimales	22
4.5.1.	Expansión y condiciones de crecimiento del cultivo celular	22
4.5.2.	Tratamiento con exosomas y estudio de la viabilidad celular mediante MTT	22
4.5.2.1.	Tratamiento de los datos y cálculo de la viabilidad celular	23
4.6.	Estadística y herramientas informáticas.....	24
5.	Resultados y discusión	24
5.1.	Caracterización de los exosomas.....	24
5.1.1.	Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	25
5.1.2.	Análisis de la distribución de tamaños y la concentración de exosomas mediante <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA)	28
5.1.3.	Determinación de la concentración de proteína en las muestras de exosomas.....	31

5.2. Determinación de la presencia/ausencia de PrP ^{Sc} en exosomas de orina y plasma mediante PMCA.....	33
5.3. Evaluación del efecto de los exosomas de plasma sobre la proliferación celular de células madre mesenquimales ovinas	36
5.3.1. Efecto de la dosis de exosomas sobre la proliferación celular.....	36
5.3.2. Efecto de los exosomas de ovejas con scrapie y ovejas control sobre la proliferación celular	37
6. Conclusiones.....	41
7. Bibliografía	42
ANEXOS.....	47

1. Resumen

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas de evolución fatal producidas por la acumulación de proteína prion patológica (PrP^{Sc}), una isoforma mal plegada de la proteína prion celular (PrP^C), en el tejido nervioso. Se han descrito EET en varias especies animales, incluida la especie humana, donde la más común es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Este trabajo se realizó en scrapie ovino, ya que esta enfermedad se emplea como modelo de investigación de las EET. El diagnóstico de las EET se realiza en base a la clínica o detectando la PrP^{Sc}, ya sea *post-mortem* o in vivo mediante técnicas invasivas y poco sensibles en el caso del scrapie. Esto hace necesaria la búsqueda de biomarcadores tempranos en las EET. Los exosomas son vesículas extracelulares membranosas de hasta 150 nm de diámetro que participan en el transporte intercelular y son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. En este estudio se pretendió investigar si los exosomas participan en la propagación y la diseminación de la proteína prion en el scrapie ovino y evaluar el potencial de los exosomas como fuente de biomarcadores de scrapie en fluidos periféricos accesibles (sangre y orina) en la especie ovina. Se aislaron exosomas de ambos fluidos, siendo la primera vez que se describe su aislamiento a partir de orina ovina. Posteriormente se caracterizaron y se determinó la posible presencia de PrP^{Sc} mediante amplificaron mediante PMCA, no detectándose la presencia de PrP^{Sc} en ninguna de las muestras. Además, se analizó si estas vesículas participan en la toxicidad asociada a estas enfermedades observada previamente in vitro. Para ello se evaluó el efecto del tratamiento con exosomas de plasma de ovino con scrapie y control sobre cultivos de células madre mesenquimales ovinas con genotipo susceptible a scrapie. Se observó una elevada variabilidad entre los diferentes orígenes de exosomas y se detectaron algunos factores que podían estar influenciando los resultados observados. Esto permitió definir un protocolo para minimizar la variabilidad en este tipo de ensayos, que podrá utilizarse en trabajos posteriores. Por último, se logró aislar y caracterizar por primera vez exosomas de tejido nervioso en ovino. Se optimizó la homogeneización y el aislamiento de estas vesículas, lo cual permitirá analizar exosomas de tejido nervioso de ovino con scrapie en futuros estudios para conocer cuál es su implicación en la patogenia de la enfermedad.

Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of fatal neurodegenerative diseases caused by the accumulation in the central nervous tissue of pathological prion protein (PrP^{Sc}), which is a misfolded isoform of the cellular prion protein (PrP^C). TSE have been described in several animal species, including humans. The most common human TSE is Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). This work was performed on ovine scrapie since this disease is used as a model for TSE research. The diagnosis of TSE is made according to clinical features or by detecting PrP^{Sc}, either *post-mortem* or *in vivo* by using invasive and non-sensitive techniques in the case of scrapie. This makes it necessary to search for early biomarkers in TSE. Exosomes are membranous extracellular vesicles up to 150 nm in diameter that participate in intercellular transport and are able to cross the blood-brain barrier.

This study aimed to investigate whether exosomes participate in the spread and dissemination of prion protein in scrapie and to evaluate the potential of exosomes as a source of scrapie biomarkers in accessible peripheral fluids (blood and urine) in sheep. Exosomes were isolated from both fluids, being the first time that their isolation from sheep urine has been described. Subsequently, they were characterized and the possible presence of PrP^{Sc} was determined by PMCA amplification. PrP^{Sc} was not detected in any of the samples. Furthermore, we analyzed whether these vesicles participate in the toxicity of scrapie tissues observed previously *in vitro*. We evaluated the effect of the treatment with exosomes obtained from plasma of scrapie and control sheep on cultures of ovine mesenchymal stem cells with a genotype susceptible to scrapie was evaluated. We observed a high variability between different exosome origins, and we detected some factors that could be influencing the observed results. These findings allowed us to define a protocol to minimize variability in this type of assay, which can be used in subsequent work. Finally, in this work we were able to isolate and characterize for the first-time exosomes from nervous tissue in sheep. Tissue homogenization and exosome isolation was optimized, which will allow us to analyze exosomes from nervous tissue of sheep with scrapie in future studies to determine their involvement in the pathogenesis of the disease.

2. Introducción

2.1. Enfermedades espongiformes transmisibles y scrapie

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un conjunto de enfermedades priónicas neurodegenerativas de evolución fatal que afectan a algunas especies animales, incluida la especie humana. Están causadas por la acumulación de proteína prion patológica (PrP^{Sc}), una isoforma mal plegada de la proteína prion celular (PrP^C), en el sistema nervioso central, donde produce lesiones características degenerativas de tipo espongiforme¹. La EET tiene tiempos de incubación generalmente largos, tras los cuales se manifiesta la sintomatología nerviosa que, aunque puede ser variada, suele incluir pérdida del control motor, demencia o parálisis^{1,2}.

2.1.1. Scrapie

El scrapie se describió por primera vez en Gran Bretaña en 1732 y fue la primera EET descrita. Afecta a ovejas y cabras y sus principales signos son cambios en el comportamiento, ataxia, temblores y rascado excesivo, el cual da nombre a la enfermedad³. El scrapie se ha empleado y se emplea como modelo de investigación de EET que afectan a otras especies², motivo por el cual la proteína prion patológica se conoce con el nombre de PrP^{Sc}, donde “Sc” hace referencia al scrapie (*Scrapie Prion Protein*).

2.1.1.1. Agente causal del scrapie y las EET

Aunque se postularon diferentes hipótesis sobre la etiología de las EET y su agente causal, la que está aceptada actualmente es la propuesta por Prusiner en 1982, quien acuñó el término “prion” para denominar a partículas infecciosas proteicas causantes del scrapie⁴. Los priones presentan algunas propiedades que permitieron descartar a los ácidos nucleicos (virus y microorganismos) como agentes causales del scrapie y, en general, de las EET: producen largos tiempos de incubación (meses, años o incluso décadas) y son resistentes a las altas temperaturas, al tratamiento con formaldehído y a las radiaciones ultravioletas y ionizantes.

La proteína prion o PrP^{Sc}, considerada agente causal de las EET, es una isoforma mal plegada de la proteína prion celular PrP^C, una glicoproteína de membrana que está codificada en el gen *PRNP*.

Este gen está altamente conservado entre especies y se expresa de forma constitutiva en diferentes tipos de células de mamífero, especialmente en las células nerviosas¹. Aunque todavía no se conoce perfectamente la función de la PrP^C, se ha demostrado que está implicada en procesos importantes de la fisiología neuronal, como la sinapsis, la conservación de la vaina de mielina y protege las neuronas de la apoptosis y el estrés oxidativo².

La PrP^{Sc} y la PrP^C tienen la misma estructura primaria, pero difieren en su plegamiento: la PrP^{Sc} tiene un mayor contenido en láminas β (40%) que la proteína celular PrP^C (apenas un 3%) y un menor contenido en hélices α ⁵. La transformación de PrP^C a PrP^{Sc} es un cambio de conformación post-traducciona que puede estar inducido por contacto de la PrP^C con una molécula de PrP^{Sc}. Esta capacidad “infectiva” de la PrP^{Sc} es la base del mecanismo de propagación de las EET. Este cambio de conformación confiere a la PrP^{Sc} propiedades características que son de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad: es resistente a detergentes y a la acción de las proteasas, que solo la digieren parcialmente; mientras que la PrP^C es soluble en detergentes suaves y se digiere con proteasas como la proteinasa K^{1,5}.

2.1.1.2. Factores genéticos de riesgo en scrapie

En la PrP^C hay aminoácidos y dominios críticos que favorecen o dificultan el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc}^{1,5}. Es por ello por lo que las EET están altamente influenciadas por factores genéticos: diferentes mutaciones y polimorfismos del gen *PRNP* determinan la susceptibilidad de contraer la enfermedad, así como la duración del periodo de incubación de esta¹.

El gen *PRNP* ovino presenta diferentes polimorfismos en los codones 136 (A/V (alanina/valina)), 154 (R/H (arginina/histidina)) y 171 (Q/H (glutamina/histidina) o Q/R (glutamina/arginina)) que determinan el grado de susceptibilidad o resistencia al scrapie de las ovejas portadoras⁶. Tal como muestra la Tabla 1, los diferentes genotipos que generan las diferentes combinaciones haplotípicas en estos codones se han clasificado en cinco categorías según si producen menor o mayor riesgo de padecer scrapie clásico, la forma más común de la enfermedad.

Tabla 1. Categorías de riesgo de los diferentes polimorfismos del gen *PRNP* ovino según si producen mayor (categoría de riesgo 5) o menor (categoría de riesgo 1) susceptibilidad al scrapie clásico. Acín C., 2021; Dawson M., 1998 ^{2,6}.

Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> ovino	Categoría de riesgo
ARR/ARR	1
ARR/AHQ AHQ/AHQ	2
ARR/ARQ ARR/ARH ARQ/AHQ AHQ/ARH	3
ARH/ARH ARQ/ARH ARQ/ARQ ARR/VRQ AHQ/VRQ	4
ARQ/VRQ ARH/VRQ VRQ/VRQ	5

2.1.1.3. Transmisión y patogenia del scrapie

La vía oral es el mecanismo más común de entrada al organismo de la proteína prion, aunque no es el único. En el scrapie, a diferencia de lo que ocurre en otras EET, es frecuente la transmisión horizontal en los rebaños (especialmente entre animales susceptibles a la enfermedad)⁷. Se ha descrito la presencia de PrP^{Sc} en diferentes tipos de excreciones y secreciones en la especie ovina: leche materna⁸, saliva⁹, heces¹⁰ y, más recientemente, orina¹¹, lo cual las convierte en posibles vías de transmisión horizontal de la enfermedad. No obstante, la vía de infección más importante en el scrapie clásico es la ingesta de placentas contaminadas con proteína prion⁷ y se ha descrito también la transmisión vertical materno-filial (se desconoce si es intrauterina o por vía oral tras el parto)².

Los mecanismos de distribución y acumulación de la PrP^{Sc}, el cuadro lesional generado y la duración del periodo de incubación dependen de varios factores: la cepa, la cantidad de prion infeccioso, la vía de infección y el genotipo del individuo infectado. El scrapie afecta normalmente a ovejas de entre 2 y 5 años, tiene largos periodos de incubación (de uno a varios años) y tras la aparición de los primeros síntomas, los individuos infectados sobreviven entre 1 y 6 meses^{1,2}.

En el scrapie y la EEB, la principal vía de entrada de los priones en el organismo es a través del tejido linfoide asociado al intestino, donde la proteína prion patológica se acumula en las placas de Peyer y las células M. En el caso del scrapie, la tonsila palatina también se ha descrito como una vía de entrada de la PrP^{Sc} ¹². Los linfocitos B circundantes realizan la presentación antigénica de la proteína prion, induciendo la maduración de células dendríticas foliculares. Estas células acumulan y replican de forma muy efectiva la PrP^{Sc} en su interior, y sirven como puente a la proteína patológica entre el sistema linforreticular y el sistema nervioso entérico. Esta constituye la principal vía de distribución de la proteína prion patológica en el scrapie¹³.

Después, los priones alcanzan su tejido diana, el sistema nervioso central, a través del sistema nervioso periférico o bien a través del sistema linfoide. Además, se han realizado estudios que parecen indicar que la vía hematológica es otra vía de distribución de la PrP^{Sc} ².

Esta acumulación de proteína prion en el sistema nervioso central normalmente produce neuroinflamación por activación de astrocitos y microglía, alteraciones sinápticas y finalmente inducción de estrés y apoptosis en las neuronas. Esta pérdida progresiva de neuronas da lugar a la vacuolización del neuropilo o degeneración neuronal esponjiforme, característica de este tipo de enfermedades¹².

2.1.2. Relevancia en salud global de las EET y el scrapie

Las enfermedades esponjiformes transmisibles tienen y han tenido históricamente un gran impacto en el ámbito de la salud global. Hasta la fecha se han descrito dieciocho EET diferentes, nueve de ellas en especies animales tanto domésticas como salvajes y otras nueve en la especie humana².

En 1987 se describió por primera vez la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB) como una patología con signos muy similares a los del scrapie en el ganado bovino². Esta enfermedad ha tenido un grandísimo impacto en salud global, ya que dio pie a una crisis alimentaria a finales del siglo XX., y por haberse demostrado su potencial zoonótico: su transmisión a humanos es la responsable de la variante de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ), descrita por primera vez en 1996. La crisis alimentaria generada por la EEB llevó a implantar mejoras muy importantes en los sistemas de seguridad alimentaria a nivel europeo¹.

Además de la vECJ, las EET de mayor relevancia que afectan a la especie humana son la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe), el kuru, el insomnio familiar fatal o el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheincker. Entre ellas, la más prevalente es ECJe: afecta a uno de cada millón de individuos por año en el mundo y supone el 85-90% de los casos de EET humanas¹⁴. Esta enfermedad, al igual que el scrapie, también tiene componente genético: diferentes polimorfismos metionina/valina en el codon 129 del gen *PRNP* humano producen diferentes subtipos de la enfermedad,

Además de las EET ovina, caprina, bovina y humana, otras EET que se han descrito y estudiado por estar potencialmente relacionadas con las anteriores son la encefalopatía transmisible del visón, la encefalopatía espongiiforme felina, la enfermedad crónica caquetizante de los ciervos y alces. Por otra parte, no se han descrito EET en perros, cerdos, aves, caballos, conejos y peces^{1,2}.

Aunque el scrapie no se considera una enfermedad zoonótica, sí se ha demostrado que puede transmitirse a otras especies (por ejemplo, su transmisión a la especie bovina se ha reconocido como uno de los posibles orígenes de la EEB clásica) y se han realizado algunos estudios que evidencian su potencial zoonótico^{15,16}.

2.1.3. Diagnóstico del scrapie en la actualidad

El diagnóstico del scrapie (al igual que para otras EET como la EEB) se realiza en base a diferentes criterios: diagnóstico clínico; detección directa de la proteína prion patológica (mediante *western blot*, ELISA o test rápidos inmunocromatográficos) y/o detección de las lesiones provocadas por la acumulación de la PrP^{Sc} (mediante histopatología o inmunohistoquímica)^{1,2}. Estas técnicas se realizan normalmente *post-mortem* sobre cortes histológicos del sistema nervioso central, o bien *in vivo* utilizando biopsias de tejido linfoide accesible (biopsia del tercer párpado, de la tonsina palatina o biopsia rectal). El diagnóstico *in vivo* permite anticipar la detección de casos de scrapie en los rebaños y establecer medidas de control para evitar la propagación de la enfermedad. Sin embargo, su realización es invasiva y costosa y su sensibilidad limitada, dado que los animales infectados en fase pre-clínica pueden no tener cantidades detectables de PrP^{Sc} en el tejido linforreticular². Esto hace necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores y técnicas diagnósticas en scrapie, que faciliten un diagnóstico más sensible y sencillo de la enfermedad.

2.1.4. Biomarcadores en EET

Un biomarcador ideal debería ser además de sensible y específico, accesible mediante técnicas no invasivas o mínimamente invasivas y medible mediante técnicas rápidas, sencillas y económicas. Numerosas investigaciones se han dedicado a la búsqueda de biomarcadores genómicos y proteómicos en las diferentes EET. Entre estos biomarcadores, cabe destacar el uso en EET humanas de tres proteínas: la detección de la proteína 14-3-3 y la proteína Tau en líquido cefalorraquídeo permite distinguir entre pacientes con ECJe y vECJ¹⁷, mientras que la detección de altos niveles de Alpha 1-antitripsina en orina se encontró correlacionada con la progresión de la ECJe¹⁸. Esta proteína se ha encontrado también aumentada en orina de animales con diferentes EET, incluidas ovejas con scrapie¹⁸. Estos hallazgos sugieren que el modelo natural del scrapie puede ser de gran utilidad en la búsqueda de nuevos biomarcadores en EET humanas.

2.2. Vesículas extracelulares

2.2.1. Exosomas: aspectos generales y función

Los exosomas son vesículas extracelulares de forma esférica de entre 30 y 150 nm de diámetro que son liberados por la mayoría de tipos celulares y cuya presencia se ha descrito en casi todos los fluidos biológicos en diferentes especies¹⁹, por ejemplo en sangre²⁰, orina²¹ o líquido cefalorraquídeo²⁰. Estas vesículas constituyen un importante mecanismo de comunicación intercelular, ya que transportan su contenido, procedente de la célula liberadora de exosomas, hasta otra célula receptora que internaliza los exosomas y que puede estar (o no) muy alejada de la célula liberadora en el organismo²².

Los exosomas se diferencian de otros tipos de vesículas extracelulares por su tamaño y, sobre todo, por su mecanismo de biogénesis característico. Las microvesículas y los cuerpos apoptóticos son otros tipos de vesículas extracelulares de mayor tamaño que los exosomas y que se generan por evaginación de la membrana plasmática¹⁹. La biogénesis de los exosomas es un proceso más complejo (Figura 1) que comienza con el proceso de maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares, en el cual la membrana de los endosomas se invagina para generar

unas pequeñas vesículas en su interior (denominadas vesículas intraluminales) que cuando se liberen al medio extracelular pasarán a ser exosomas. Para que esto ocurra, la membrana de los cuerpos multivesiculares se fusiona con la membrana plasmática, liberando las vesículas de su interior al medio extracelular. Este proceso de formación de los exosomas y la selección del contenido que estas vesículas incorporan (conocido como *sorting*) son especialmente interesantes porque son muy selectivos. En ellos participan gran cantidad de proteínas y lípidos que se agrupan formando dominios específicos en las membranas de las células y las vesículas.

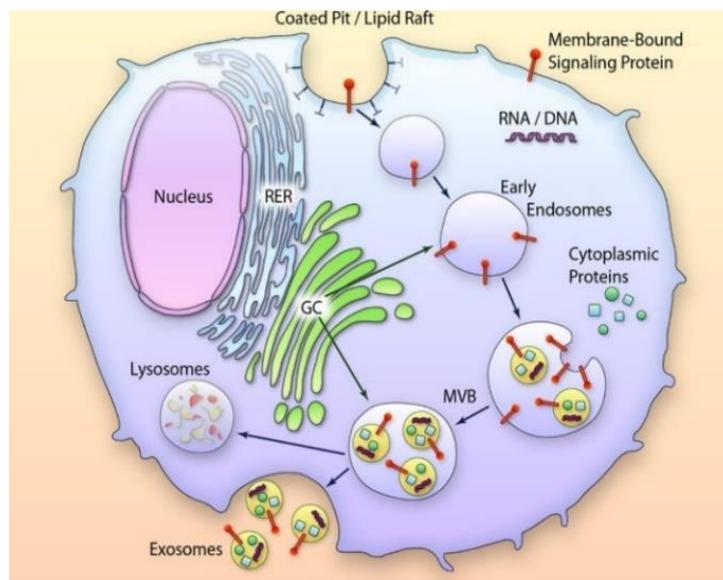


Figura 1. Biogénesis de los exosomas. *Waldenstrom and Ronquist, 2014*²³.

2.2.2. Aplicaciones de los exosomas

Según una base de datos actualizada sobre exosomas y su contenido [<http://www.exocarta.org/>], actualmente se ha descrito la presencia en estas vesículas de 9.769 proteínas, 3.408 mRNAs (RNAs mensajeros), 2.838 miRNAs (microRNAs) diferentes, además de gran variedad de lípidos.

Dado el mecanismo selectivo de incorporación del contenido de los exosomas en el interior de dichas vesículas (*sorting*), este contenido es muy diferente según el tipo de célula de origen y su estado fisiológico o patológico. La internalización de los exosomas en sus células diana también puede tener cierta especificidad y, a su vez, el efecto que estas vesículas produzcan en sus células receptoras dependerá en gran medida de qué moléculas contengan ^{24,25}.

Por todo ello, los exosomas han sido ampliamente estudiados durante las últimas décadas como fuente de biomarcadores. Su contenido tiene elevada especificidad según su célula receptora y su estado fisiológico o patológico, tienen una importante función biológica y, además, se encuentran fácilmente accesibles en diferentes biofluidos^{24,25}. Por ejemplo, se ha demostrado su utilidad como biomarcadores en el diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas²².

Por otro lado, existen también numerosos estudios que investigan cuál es el papel o el destino de determinados exosomas en diferentes procesos fisiológicos o en la patogenia de enfermedades, incluido el scrapie, realizados tanto *in vitro*²⁶, como *in vivo*. Por último, además de la aplicación de los exosomas en diagnóstico, se ha investigado también su uso terapéutico como vehículos de biomoléculas dirigidos específicamente a sus células diana, con resultados prometedores²⁷.

2.2.3. Aislamiento de exosomas

Existen numerosas técnicas de aislamiento de exosomas, pero ninguna de ellas se ha establecido como óptima o estándar, sino que la metodología de aislamiento depende de cuál sea la posterior aplicación de los exosomas²⁸.

Actualmente, la ultracentrifugación es la técnica más utilizada en el aislamiento de exosomas. Ofrece la ventaja de que no requiere la adición de ningún reactivo durante el aislamiento que contamine parcialmente las muestras de exosomas aislados, pero tiene un alto coste económico y puede ocasionar daño mecánico a los exosomas^{28,29}. Una técnica de aislamiento menos extendida es la cromatografía de exclusión molecular (SEC, *Size-Exclusion Chromatography*). Aísla los exosomas gracias a su tamaño característico, no les produce daño mecánico y no requiere ningún equipo sofisticado, como es el caso de la ultracentrifugación. Sin embargo, ofrece menor rendimiento porque diluye en mayor medida los exosomas aislados³⁰. Por último, existen gran variedad de kits comerciales para el aislamiento de exosomas, que se basan en la precipitación de estas vesículas mediante la adición de agentes precipitantes, generalmente poliméricos. Este método es rápido, sencillo y ofrece buenos rendimientos, aunque la requiere la adición de soluciones precipitantes que podrían interferir en posteriores aplicaciones de los exosomas si no son correctamente eliminadas²⁸.

Los métodos de aislamiento de exosomas están generalmente optimizados para aislar vesículas a partir de diferentes biofluidos (por ejemplo, plasma, orina o saliva) o bien a partir del sobrenadante de medios de cultivo *in vitro*³¹. El aislamiento a partir de diferentes biofluidos ha despertado gran interés por ser una herramienta en el estudio de los exosomas como fuente de biomarcadores de obtención no invasiva o mínimamente invasiva^{20,32,33}. Por su parte, el aislamiento de exosomas de medios de cultivo *in vitro* permite realizar investigación básica del papel de los exosomas en diferentes patologías o como mecanismo de respuesta ante diferentes estímulos o tipos de estrés³⁴.

Se ha demostrado que los exosomas están también presentes en el espacio intersticial de los tejidos, dado que están implicados en la comunicación intercelular entre células que pueden estar alejadas entre sí en el organismo o no. Por ejemplo, en este sentido se ha demostrado que los exosomas tienen un importante papel en la comunicación célula-célula en el microentorno tumoral³¹. Es por ello que algunos trabajos recientes se han dedicado a la optimización de protocolos de aislamiento de exosomas o vesículas extracelulares a partir de diferentes tipos de tejido^{35,36}. Estos protocolos de aislamiento consisten generalmente en un primer paso de homogeneización del tejido, que está adaptado a cada tipo de tejido (por ejemplo, en el uso de diferentes enzimas para la digestión) y/o al tipo de vesículas que se quieran aislar posteriormente. Después de este procesamiento inicial del tejido, constan de un segundo paso de aislamiento de exosomas mediante diferentes técnicas, que suelen incluir filtración de los homogeneizados y aislamiento mediante centrifugación diferencial o ultracentrifugación^{35,37}.

2.3. Exosomas en las EET y el scrapie

Los exosomas, debido a su pequeño tamaño, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual les confiere la capacidad de transportar moléculas procedentes desde otras partes del organismo hasta el sistema nervioso central³⁸. Por ello tiene interés investigar si los exosomas podrían estar implicados en la propagación y la neuroinvasión del scrapie y otras EET transportando PrP^{Sc} entre diferentes células.

La mayoría de los estudios de vesículas extracelulares en EET se han realizado en modelos celulares *in vitro*. Por ejemplo, Alais S. *et al* comprobaron en un modelo celular de scrapie de neuroblastoma que células infectadas producen vesículas de tipo exosomal que contienen proteína prion (además de otras proteínas y ácidos nucleicos virales de origen endógeno). Además, se observó que había relación entre la producción de una mayor cantidad de vesículas extracelulares y la infectividad del scrapie³⁹. También se ha demostrado en cultivo *in vitro* que los exosomas son capaces de transmitir PrP^{Sc} entre células⁴⁰.

En vista de estos hallazgos, resulta de gran interés el estudio de los exosomas en las EET, tanto para comprender su posible implicación en la patogenia de la enfermedad, como para analizar su potencial como fuente de biomarcadores.

En modelo natural de scrapie se ha comprobado que en fluidos periféricos (orina y sangre), la concentración de PrP^{Sc} es muy baja y su detección requiere de técnicas que potencien su amplificación e inmunodetección^{11,41}. En un estudio reciente de Lopez-Pérez *et al.* no se detectó proteína prion en exosomas aislados a partir de plasma, pero sí en exosomas aislados a partir de líquido cefalorraquídeo, lo cual parece apoyar la hipótesis de que estas vesículas estén implicadas en la transmisión del prion²⁰.

3. Objetivos

Partiendo de la hipótesis de que los exosomas y su carga desempeñan un papel relevante en la evolución del scrapie en animales infectados, participando en la propagación y la neuroinvasión de la proteína prion, el objetivo principal de este trabajo es evaluar el potencial de los exosomas como fuente de biomarcadores en scrapie y su implicación en la patogénesis de esta enfermedad.

Para llevar a cabo el objetivo general, los objetivos específicos que se proponen son los siguientes:

1. Aislar y caracterizar exosomas a partir de tres tipos de muestras diferentes: plasma, orina y tejido nervioso de ovejas sanas y con scrapie.
2. Evaluar el potencial diagnóstico de los exosomas como fuente de biomarcadores en scrapie y estudiar la capacidad de propagación de la enfermedad mediante la determinación de la PrP^{Sc} en los exosomas aislados.
3. Evaluar *in vitro* el efecto de los exosomas de plasma de ovejas con scrapie sobre cultivos de células madre mesenquimales (MSCs) ovinas.

4. Material y métodos

4.1. Origen de las muestras y población de estudio

Las muestras empleadas en este estudio fueron obtenidas del banco de tejidos del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE) y del Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Se utilizaron muestras de plasma, orina y tejido nervioso procedentes de ovinos sanos de un rebaño en el que nunca se ha presentado la enfermedad (n=6; ovejas C1-C6) y muestras de plasma y orina de ovinos infectados de forma natural con scrapie, provenientes de distintos rebaños regionales (n=6; ovejas Sc1-Sc6). Todos los animales eran hembras de la raza Rasa Aragonesa, de entre 2 y 8 años de edad.

En concreto, se utilizaron:

- Tres muestras de plasma de ovejas control (C1-C3) y tres muestras de plasma de ovejas con scrapie (Sc1-Sc3);
- Dos muestras de orina de ovejas control (C4, C5) y tres muestras de orina de ovejas con scrapie (Sc4-Sc6)
- Una muestra de tejido nervioso procedente del tálamo de una oveja control (C6).

Aunque nuestra intención original era realizar el aislamiento a partir de un número mayor de muestras de sistema nervioso central de animales control y con scrapie, los problemas de suministro de material de laboratorio consecuencia de la pandemia COVID-19 nos han impedido su realización.

Todos los procedimientos realizados para la obtención previa de las muestras (estabulación de los animales, eutanasia y necropsia) fueron aprobados por el Comité de Ética para Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Proyecto PI17/21). Las muestras de plasma, orina y tejido nervioso (tálamo) se encontraban congeladas a -80 °C para su correcta preservación desde que fueron obtenidas.

Por otro lado, las MSCs empleadas en este estudio habían sido aisladas de la médula ósea de una oveja de un año de edad de la raza Rasa Aragonesa con genotipo ARQ/ARQ para el gen *PRNP* (genotipo susceptible a scrapie). Estas células se encontraban criopreservadas en nitrógeno líquido en el banco de células de LAGENBIO a una concentración de 1,5 millones de células/ml en medio compuesto por 90 % de suero fetal bovino y 10 % de dimetilsulfóxido.

4.2. Procesamiento de las muestras de tejido nervioso

En primer lugar, para poder realizar el aislamiento de exosomas a partir de muestras de tejido de cualquier tipo, el tejido debe ser procesado (disgregado y homogeneizado). La mayoría de los métodos y técnicas de aislamiento de exosomas están optimizados para utilizar como matriz de partida diferentes tipos de muestras líquidas (diferentes biofluidos o medio de cultivo celular). Por ello, previamente al aislamiento de exosomas a partir de tejido nervioso, fue necesario realizar un primer paso de homogeneización del tejido, basado en la metodología descrita recientemente por Muraoka *et al* para el

aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares de cerebro de ratón y humano³⁷.

4.2.1. Homogeneización de tejido del sistema nervioso central

La muestra de tálamo ovino (Figura 2) fue descongelada en frío y se tomó como material de partida 0.5 g de tejido. Se colocó el tejido sobre una placa de Petri y se añadió 1 ml de Hibernate E (*Hibernate™-E Medium*; Gibco™ ThermoFisher Scientific) frío. Se disgregó el tejido con un bisturí desechable generando secciones lo más pequeñas posible ($<0.5 \text{ mm}^3$) y se transfirió todo el volumen a un tubo nuevo, donde se añadieron 20 unidades de papaína (*Papain from Carica papaya*, SigmaAldrich) en 3 ml de Hibernate E. Se incubó a 37 °C durante 15 minutos, removiendo cada 5 minutos.



Figura 2. Muestra de partida de tálamo de ovino sano.

Tras la incubación se añadieron 6 ml de cóctel de inhibidores de proteasas 1X (*Halt™ Protease Inhibitor Cocktail* (100X); ThermoFisher Scientific) en Hibernate E frío para inactivar la digestión. A continuación, se filtró todo el volumen a través de un tamiz celular de 40 μm (*Cell Strainer 40 μm Nylon*; BD Falcon™). El eluido se recogió en un nuevo tubo y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos, descartando el pellet. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 1,5 ml y se congeló a -80 °C para su preservación.

4.3. Aislamiento y caracterización de exosomas

4.3.1. Aislamiento de los exosomas

Para llevar a cabo el aislamiento de exosomas de los tres tipos de muestra mencionados se emplearon dos kits comerciales diferentes (Tabla 2), ambos precipitan los exosomas gracias a la adición de una solución precipitante.

Se utilizó el kit *miRCURY® Exosome Serum/Plasma Kit* (Qiagen) para realizar el aislamiento de exosomas a partir de plasma y el kit *ExoQuick-TC™* (System Biosciences) para realizar el aislamiento de exosomas a partir de orina y de homogeneizado de tejido nervioso.

Para llevar a cabo el aislamiento de exosomas mediante estos kits comerciales se siguieron las indicaciones del fabricante, introduciendo algunas modificaciones para adaptar el protocolo de aislamiento a los diferentes tipos de muestra de partida. Esto fue así especialmente en el caso del aislamiento a partir de tejido nervioso, dado que el kit comercial utilizado estaba indicado para su uso en otros tipos de muestras (orina, líquido cefalorraquídeo o medio de cultivo celular). En la Tabla 2 se muestran los volúmenes de partida de cada muestra para la obtención de exosomas y el volumen de resuspensión final.

Tabla 2. Tipos de muestra de origen de exosomas, kits de aislamiento empleados, volúmenes de partida y volúmenes finales de resuspensión de los exosomas aislados, para cada tipo de muestra.

Tipo de muestra de origen de exosomas	Kit comercial de aislamiento de exosomas	Volumen de muestra de partida	Volumen de resuspensión de los exosomas aislados
Plasma	Kit <i>miRCURY® Exosome Serum/Plasma Kit</i> (miRCURY)	600 µl	270 µl
Orina	Kit <i>ExoQuick-TC™</i> (ExoQuick-TC)	5 ml	200 µl
Tejido nervioso (tálamo)	Kit <i>ExoQuick-TC™</i> (ExoQuick-TC)	1,5 ml	300 µl

4.3.1.1. Aislamiento de exosomas de plasma mediante el kit miRCURY

Se utilizó el kit *miRCURY® Exosome Serum/Plasma Kit* (Qiagen) para aislar exosomas a partir de 3 muestras de plasma de ovejas control (C1, C2, C3) y 3 muestras de plasma de ovejas con scrapie (Sc1, Ss2, Sc3).

En primer lugar, se descongelaron las muestras de plasma en frío y se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos, descartando el pellet que contiene los restos celulares de mayor tamaño. Se añadieron 6 µl de trombina (200 U) a 600 µl del sobrenadante recuperado y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó de nuevo a 10000 g durante 5 minutos y se descartó el pellet. Sobre 500 µl de sobrenadante se añadió 200 µl de *Buffer* de precipitación A, mezclando bien por pipeteo y formando una nebulosa blanquecina desde el fondo del tubo ascendiendo poco a poco, hasta que todo el contenido tuviera un aspecto homogéneo. Se terminó de mezclar en agitador de tipo vortex durante 5 segundos y se incubó a 4 °C durante 1 hora como mínimo para que se produjese la precipitación de los exosomas. Después, se realizaron dos centrifugaciones a 500 g durante 4 minutos, tras las cuales se podía observar un pellet que contiene los exosomas precipitados. Tras las centrifugaciones se aspiró todo el sobrenadante, ya que su presencia puede interferir en las posteriores aplicaciones de los exosomas aislados, y se transfirió a un nuevo tubo. Finalmente, se resuspendió el pellet de exosomas en 270 µl de *Buffer* de resuspensión en el caso de los exosomas de ovejas control y en 270 µl de PBS (*Phosphate Buffered Saline* pH 7.4 (1x), Gibco® Life Technologies™) filtrado en el caso de los exosomas de ovejas con scrapie, dado que se comprobó experimentalmente que el PBS filtrado es un mejor medio de resuspensión para futuras aplicaciones de los exosomas (véase apartado 4.1.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)).

Posteriormente se midió la concentración de proteína en las muestras de exosomas aislados con el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las muestras de exosomas y las fracciones de sobrenadante sin exosomas obtenidas se congelaron a -20 °C hasta su utilización.

4.3.1.2. Aislamiento de exosomas de orina y tejido nervioso mediante el kit ExoQuick-TC

Se utilizó el kit *ExoQuick-TC™* (System Biosciences) para aislar exosomas a partir de 2 muestras de orina de ovejas control (C4, C5), 3 muestras de plasma de ovejas con scrapie (Sc4, Ss5, Sc6) y dos alícuotas diferentes de homogeneizado de tejido nervioso procedente del tálamo de una oveja control (C6).

En el caso del aislamiento a partir de tejido nervioso, se introdujeron algunas modificaciones en el protocolo basadas en la metodología descrita por Muraoka *et al*³⁷ para aislar exosomas a partir de homogeneizado de tejido nervioso.

4.3.1.2.1. Aislamiento de exosomas de orina mediante el kit ExoQuick-TC

Las muestras de 5 ml de orina fueron descongeladas en frío y se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos para eliminar los restos celulares de mayor tamaño, que quedan en el pellet. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió el volumen conveniente de la solución precipitante *ExoQuick™ Tissue Culture Media Exosome Precipitation Solution* (proporción 1:5) y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche para que se produjese la precipitación de los exosomas. A continuación, se centrifugó dos veces a 1.500 g, la primera durante 30 minutos y la segunda durante 5 minutos, para eliminar por completo el sobrenadante, que se conservó a -20 °C para su preservación como fracción carente de exosomas. El pellet se resuspendió en 200 µl de PBS filtrado y se midió la concentración de proteína en las muestras de exosomas con el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las muestras de exosomas se conservaron a -20 °C.

4.3.1.2.2. Aislamiento de exosomas de tejido nervioso mediante el kit ExoQuick-TC

Dos alícuotas de 1,5 ml de homogeneizado de tejido nervioso fueron descongeladas en frío y centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos, descartando el pellet. Se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo y una de las alícuotas se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos (Prueba 1) y la otra durante 30 minutos (Prueba 2), con la intención de optimizar el aislamiento en este punto del protocolo. Se descartó el pellet y se filtró el sobrenadante a través de unidades de filtración estériles VWR® de 0,2 µm (Avantor). Se obtuvo 1 ml de sobrenadante filtrado, sobre el cual se añadió el volumen conveniente de la solución precipitante *ExoQuick™ Tissue Culture Media Exosome Precipitation Solution* (proporción 1:4) que se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche y se centrifugó a 10000 g durante 75 minutos para precipitar los exosomas. Se descartó el sobrenadante y se repitió la centrifugación durante 5 minutos, para poder descartar por completo todo el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet en 300 µl de PBS filtrado y las muestras de exosomas aislados se congelaron a -20 °C.

4.3.2. Caracterización de los exosomas

La caracterización de exosomas de plasma, orina y tejido nervioso se realizó mediante dos técnicas: una de ellas dirigida a analizar su morfología y tamaño (microscopía electrónica de transmisión o TEM (*Transmission Electron Microscopy*)), y la otra para determinar la concentración de exosomas y la distribución de tamaños de partícula de las muestras (NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*)). Por razones de bioseguridad, sólo se pudieron analizar los exosomas aislados de individuos sanos.

4.3.2.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de los exosomas aislados de ovejas control se analizó mediante TEM, utilizando la metodología previamente descrita por Lötvald *et al*⁴². Los exosomas fueron en primer lugar fijados y teñidos para su posterior visualización. Los exosomas fueron fijados con glutaraldehído al 2,5 % y lavados con agua desionizada. Se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % y fueron adsorbidos en metilcelulosa al 0,13 % y acetato de uranilo al 0,4 %. Este proceso se realizó en el Servicio de Microscopía electrónica de sistemas biológicos (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza). Para su visualización se utilizó el microscopio *Tecnai T20* (FEI Company) del Instituto Universitario de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), un microscopio electrónico de transmisión con un filamento de LaB₆. El voltaje de trabajo fue de 200 KV y se utilizó una cámara CCD 2K x 2K Veleta (Olympus).

Se analizaron por microscopía electrónica tres muestras de exosomas de plasma (C1, C2, C3), dos muestras de exosomas de orina (C4, C5) y dos réplicas de la muestra de exosomas de tejido nervioso (C6); además de un blanco con PBS filtrado.

4.3.2.2. Análisis de la distribución de tamaños y la concentración de exosomas mediante *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Se analizó la distribución de tamaños de las nanopartículas y se determinó la concentración de nanopartículas mediante ensayos de *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) en tres muestras de exosomas de plasma (C1, C3, C3), dos muestras de exosomas de orina (C4, C5) y una de las muestras de exosomas de tejido nervioso (C6) de ovejas control.

Las muestras de exosomas se diluyeron en PBS filtrado - 50 nM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético; Sigma®) para optimizar el número de partículas en el campo de visión: los exosomas de plasma se diluyeron 1/1000, los de orina 1/50 y los de tejido nervioso 1/500. Una vez se prepararon las muestras, se midieron a temperatura ambiente empleando el instrumento *Nanosight* (Malvern Instruments, UK). Se realizaron 5 vídeos de 1 minuto de duración que posteriormente fueron analizados de manera automática por el *software* del aparato.

4.4. Determinación de PrP^{Sc} mediante PMCA

La presencia de PrP^{Sc} en exosomas de orina y plasma de ovejas con scrapie se estudió mediante PMCA, una técnica sensible que permite determinar la presencia de pequeñas cantidades de PrP^{Sc} en una muestra. La PMCA posibilita la amplificación de la proteína prion al ponerla en contacto con PrP^C “en exceso” (sustrato de la PrP^{Sc}) y llevar a cabo ciclos de sonicación que rompen los agregados de PrP^{Sc} formados y permiten que la proteína prion siga replicándose⁴³. La presencia de PrP^{Sc} en el producto final de la PMCA se determinó mediante técnicas de tipo *immunoblot*.

Se analizó la presencia de PrP^{Sc} en las tres muestras de exosomas de orina de ovejas con scrapie (Sc4, Sc5, Sc6) y una sola muestra de exosomas de plasma de una oveja con scrapie (Sc3), dado que en un estudio anterior del propio grupo de investigación no se observó la presencia de PrP^{Sc} en exosomas de plasma de animales infectados²⁰. Además, se analizaron también mediante PMCA las respectivas fracciones sin exosomas obtenidas en el aislamiento de los mismos y las respectivas muestras de origen de orina y plasma.

4.4.1. Amplificación de PrP^{Sc} mediante PMCA

El sustrato de PrP^C utilizado en la PMCA fue lisado de cerebro de ratones Tg338 diluido al 10 % en *Buffer PMCA* (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100). El ensayo se realizó en una microplaca para PCR de 96 pocillos (Axygen Scientific). En cada pocillo se mezclaron 5 µl de cada muestra a analizar con 45 µl de sustrato y se añadió una bola de teflón.

Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un sonicador modificado (QSonica Q700) y constaron de 96 ciclos de 10 segundos de sonicación al 75% de intensidad, seguidos de periodos de 14 minutos y 50 segundos de incubación. Después de cada una de estas rondas de amplificación, 5 µl del producto de la ronda anterior se cargaron en una nueva microplaca en la que se han añadido 45 µl de sustrato para la ronda siguiente. Para todas las muestras se realizaron 3 rondas de amplificación de 24 horas cada una.

Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se incluyeron en el análisis dos controles negativos y una recta de diluciones (10^{-1} – 10^{-6}) de una cepa de scrapie clásico (cepa Dawson) digerida convenientemente con proteinasa K, que se usa como control positivo y como forma de conocer el límite de detección de la técnica.

4.4.2. Detección de PrP^{Sc} mediante *Dot blot*

Al final de cada ronda de amplificación de PMCA se realizó un ensayo *Dot blot* para monitorizar la presencia de PrP^{Sc} en las diferentes rondas (determinación semi-cuantitativa de la proteína prion). En primer lugar, se sometieron los productos de las rondas de PMCA a digestión con proteinasa K (que digiere la PrP^C pero no la PrP^{Sc}). Para ello, se mezclaron 18 µl del producto de una ronda de PMCA con 2 µl de SDS al 3 % y 5 µl de proteinasa K (18,6 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Para detener la digestión, se añadió *Laemmlí Sample Buffer* en proporción 1:1 y se calentó a 95 °C durante 5 minutos.

Después, para llevar a cabo la transferencia a la membrana, se mezclaron 5 µl de muestra, 25 µl de SDS al 1 % y 30 µl de PBS. Se depositaron 30 µl de cada muestra sobre una membrana de nitrocelulosa previamente sumergida junto con papel de filtro en PBS – 0,1 % Tween 20 (PBST). Tras esperar 30 segundos, se limpiaron dos veces los pocillos con 100 µl de SDS al 1 % y dos veces la membrana con PBST.

Por último, para realizar la inmunodetección, se bloqueó la membrana en 50 ml de leche en polvo al 5 % en TBST (*Tris-HCl Buffered Saline* – 0,1% Tween 20) durante 30 minutos en agitación. Se añadieron 30 µl de anticuerpo primario Sha31 (un anticuerpo monoclonal anti-PrP que reconoce los residuos 145-152 de la proteína) diluido 1:8000 en PBST-2 % BSA, y se incubó durante 1 hora en agitación.

Se realizaron dos lavados con PBST durante 5 y 10 minutos en agitación rápida y a continuación se añadieron 40 ml de anticuerpo secundario *HRP anti-mouse* (Biorad) diluido 1:5000 en PBST – 2 % BSA, incubando las membranas a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación lenta. Se realizaron dos lavados de la membrana de igual forma que tras la incubación del anticuerpo primario y se sumergió la membrana en agua destilada para eliminar por completo el PBST. Finalmente, la señal se reveló con 250 µl de luminol y 250 µl de peróxido (Pierce) y se visualizó con el sistema de análisis de imagen Versa Doc System (Biorad).

4.5. Evaluación del efecto de los exosomas sobre células madre mesenquimales

Se estudió el efecto de los exosomas de plasma de ovejas control (C1, C2, C3) y ovejas con scrapie (Sc1, Sc2, Sc3) sobre células madre mesenquimales de ovino con genotipo susceptible a scrapie, dado que se ha estudiado previamente la idoneidad de estas células para el estudio *in vitro* de las EET⁴⁴. Para ello, se sembraron las MSCs en placas de 96 pocillos, se añadieron los exosomas sobre estos cultivos y se realizaron ensayos MTT para medir la viabilidad celular de los cultivos 24 y 48 horas post-inoculación (24 hpi y 48 hpi).

4.5.1. Expansión y condiciones de crecimiento del cultivo celular

Para obtener un número suficiente de células para la realización de los ensayos MTT, las células madre mesenquimales con genotipo ARQ/ARQ para el gen *PRNP* se descongelaron y expandieron en medio DMEM con suero fetal bovino al 10 %, Penicilina-Streptomycin (Sigma-Aldrich) al 1 % y L-glutamina (Sigma-Aldrich) al 1 %, en estufa de cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂.

4.5.2. Tratamiento con exosomas y estudio de la viabilidad celular mediante MTT

Los ensayos MTT dan una medida de la viabilidad de un cultivo celular gracias a que miden la absorbancia del azul formazán a 570 nm. Este compuesto (azul-morado) se forma como producto de la actividad reductasa mitocondrial sobre un tinte de color amarillo añadido al cultivo que da nombre al ensayo, el 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La actividad reductasa mitocondrial está presente únicamente

en células vivas, por lo que la medida de absorbancia del azul de formazán es proporcional a la cantidad de células vivas en el cultivo⁴⁵.

Para llevar a cabo los ensayos MTT, en primer lugar, se sembraron placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 15000 células/cm².

Las placas se mantuvieron en condiciones de crecimiento durante 24 horas, tras las cuales se realizó la inoculación con exosomas aislados a partir de plasma de ovejas control (C1, C2, C3) y plasma de ovejas con scrapie (Sc1, Sc2, Sc3). Se añadieron 10 µl de exosomas sobre 90 µl de medio de cultivo en cada pocillo. Para determinar una posible toxicidad por exceso de exosomas, se ensayaron 4 diluciones diferentes (1/2, 1/5, 1/10 y 1/15) de las muestras de exosomas originales para realizar la inoculación. Cada una de las diluciones de cada muestra de exosomas se analizó por cuadruplicado. Además, se incluyeron en cada ensayo MTT 20 pocillos sin células (solo con medio), para ser empleados 4 de ellos como blanco y los otros 16 como control sin células y con exosomas en las diferentes concentraciones, cada una por cuadruplicado. Se incluyeron también 4 pocillos de células control no tratadas con exosomas.

Transcurridas 24 y 48 horas después de la inoculación, se realizaron ensayos MTT para cuantificar la proliferación celular de las MSCs. Sin retirar el medio, se añadieron 25 µl/pocillo de MTT (M5655, Sigma) previamente preparado a concentración 2 mg/ml en PBS, y se incubaron las placas durante 4 horas a 37 °C en la estufa de cultivo. Después, se retiró el medio de los pocillos volteando la placa rápidamente con un golpe seco para lograr eliminar todo el volumen de medio líquido sin que se despeguen los cristales del fondo. Se añadió a cada pocillo 150 µl de HCl 40 mM en isopropanol y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se agitó suavemente la placa y se midió la absorbancia a 570 nm (longitud de onda a la que absorbe el MTT) y 690 nm (para medir la absorbancia de fondo) en el lector de placas *Infinite F200* (Tecan Ibérica Instrumentación).

4.5.2.1. Tratamiento de los datos y cálculo de la viabilidad celular

En primer lugar, a la lectura de absorbancia a 570 nm se le sustrajo la lectura de absorbancia del fondo, medida a 690 nm. Después, a estos valores se les sustrajo la absorbancia del blanco, que se calculó como la media de los valores de absorbancia de los 4 pocillos que contenían solamente medio de cultivo.

Con estos valores de absorbancia se calculó la viabilidad celular relativa de las células tratadas con exosomas con respecto a las células no tratadas, considerando que estas últimas tenían una viabilidad del 100%. Se calculó el porcentaje de viabilidad relativa para las células tratadas con exosomas mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad relativa}_{\text{Células tratadas}} = \frac{Abs_{\text{Células tratadas}}}{Abs_{\text{Células no tratadas}}} \times 100$$

4.6. Estadística y herramientas informáticas

Se realizaron diferentes pruebas estadísticas de comparación de medias muestrales para analizar si había diferencias significativas entre los resultados obtenidos para diferentes grupos de estudio. Para ello, en primer lugar, se aplicó el test de normalidad *Shapiro-Wilk*, dado el pequeño tamaño muestral. Se realizaron pruebas *t de Student* (paramétrica, *t Student*; no paramétrica, *Mann-Whitney test*) para analizar si había diferencias significativas en la proliferación celular de los cultivos tratados con exosomas de ovejas control y los tratados con exosomas de ovejas con scrapie. También se realizaron pruebas *t de Student* para comprobar si había cambios significativos en la proliferación celular a las 24 hpi y las 48 hpi. Se realizaron test *One-way ANOVA* (paramétrica, *Ordinary One-way ANOVA*; no paramétrica, *Kruskal-Wallis*); para estudiar si había diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de exosomas con las que se trataron las células.

Para realizar los cálculos estadísticos y la generación de figuras y gráficos se utilizaron los programas *Microsoft Excel* y *GraphPad Prism 9.2.0*.

5. Resultados y discusión

5.1. Caracterización de los exosomas

En los tres protocolos de aislamiento de exosomas pudo observarse el pellet que contiene las vesículas precipitadas tras la incubación con la solución precipitante y las centrifugaciones posteriores (Figura 3). En el caso del aislamiento a partir de plasma y tejido fue así para todas las muestras, mientras que en el caso del aislamiento a partir de orina solamente se observó pellet en una de las muestras (C5).

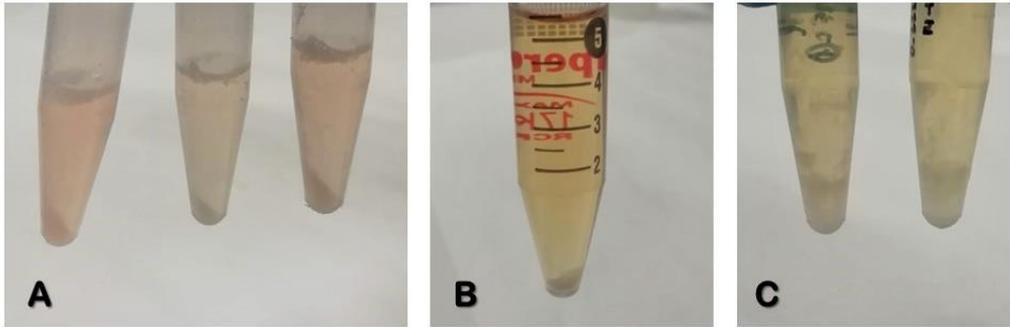


Figura 3. Pellet de exosomas precipitados observado durante el aislamiento de exosomas a partir de diferentes orígenes: **A.** Plasma (C1, C2, C3); **B.** Orina (C5); **C.** Tejido nervioso (C6-Prueba 1 y C6-Prueba 2).

La caracterización mediante TEM y NTA permitió comprobar que las muestras contenían exosomas, logrando por lo tanto el objetivo del aislamiento. Además, estos análisis nos permitieron comparar los diferentes métodos de aislamiento utilizados o los diferentes orígenes de muestra.

5.1.1. Análisis de la morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Por razones de bioseguridad, se analizaron por microscopía electrónica todas las muestras de exosomas procedentes de ovejas control (C1-C6), pero no las aisladas a partir de muestras de animales con scrapie.

Tal como se muestra en la Figura 4, se visualizaron exosomas en todas las muestras analizadas por TEM.

Los exosomas se observan como estructuras esféricas o aproximadamente esféricas con borde oscuro, dado que sus membranas se visualizan teñidas con mayor intensidad debido a su mayor densidad electrónica. También es frecuente observar exosomas como vesículas con forma de copa en su visualización mediante TEM⁴⁶, tal y como se ha podido observar también en este trabajo (Figuras 4G y 4H). Esta morfología de copa se debe al proceso de deshidratación extrema que los exosomas sufren durante el proceso de fijación y tinción. En los tres tipos de orígenes de los exosomas (plasma, orina y tejido nervioso) se identificaron vesículas de diferentes tamaños, desde 30 nm hasta 150-200 nm, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en el análisis mediante NTA (Figura 6) y con el tamaño descrito y esperado para estas partículas¹⁹.

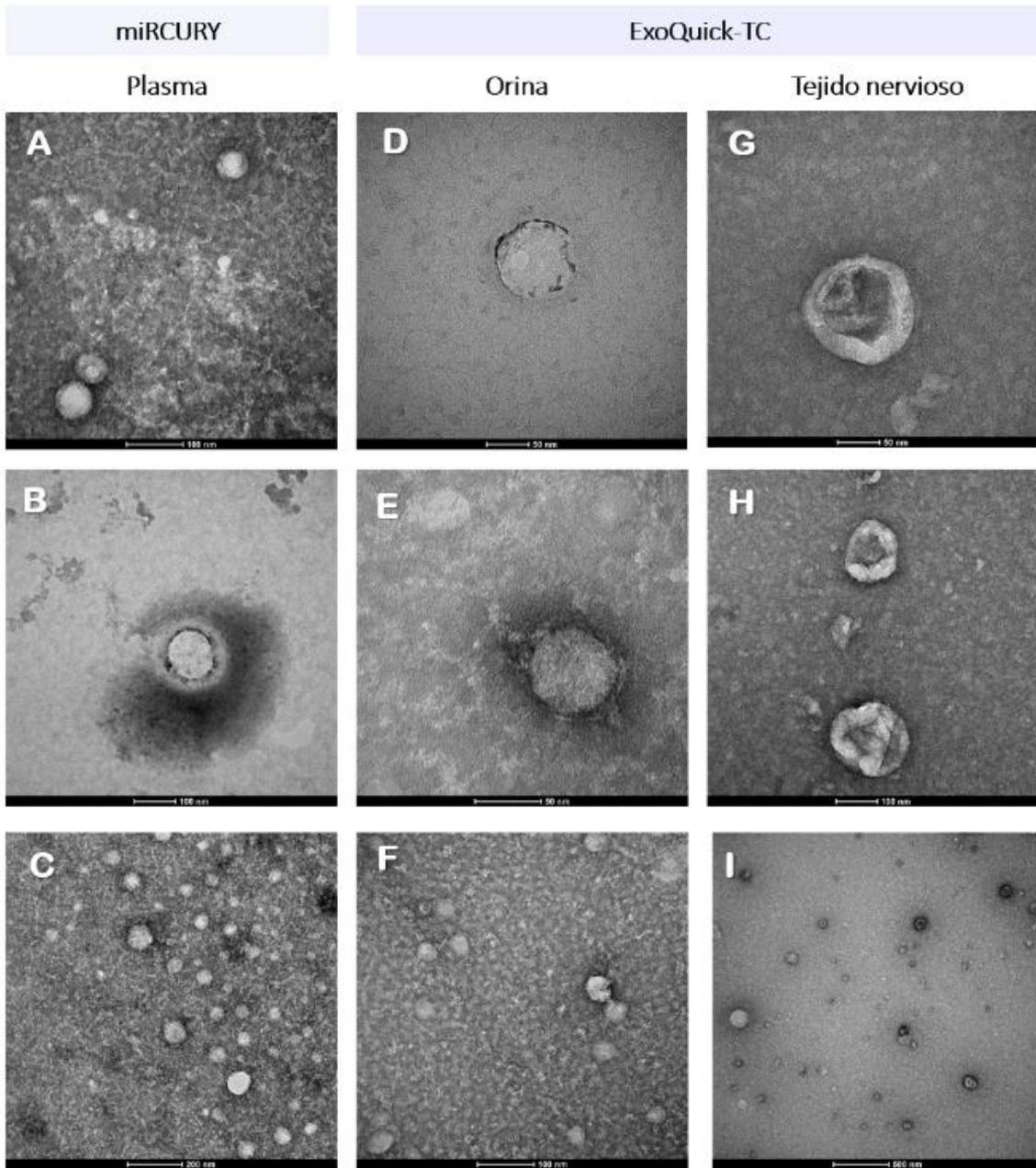
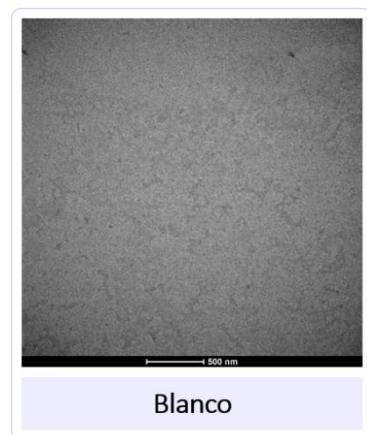


Figura 4. Imágenes capturadas en la visualización de las muestras de exosomas mediante TEM. En la parte superior de la figura se indica el origen de los exosomas y el kit comercial utilizado para su aislamiento. La identificación del origen de las muestras es el siguiente: **A.C1; B. C2; C.C3; D. C4; E. C5; F. C5; G. C6-Prueba 1; H. C6-Prueba 2; I. C6, Prueba 2.** Se añade en la parte inferior derecha una imagen capturada en la visualización del blanco (medio de resuspensión de los exosomas sin exosomas) mediante TEM.



Previamente, se han aislado y analizado vesículas extracelulares de sangre o plasma y de líquido cefalorraquídeo en la especie ovina^{20,47}, dado el especial interés de estos fluidos en la patogenia del scrapie y como posible fuente de biomarcadores para el diagnóstico en ovino y su traslación a la especie humana. Hasta donde sabemos y según la literatura analizada, este es el primer estudio donde se describe el aislamiento de exosomas a partir de orina y de tejido nervioso en la especie ovina. El primero de estos fluidos puede ser útil como fuente de biomarcadores diagnóstico y puede ayudar al conocimiento de la transmisión horizontal de la enfermedad. Por su parte, el aislamiento de vesículas extracelulares del sistema nervioso central facilitará el estudio del papel de estas vesículas en la patogenia y propagación del scrapie y otras EET.

Aunque el análisis mediante TEM sea cualitativo, la concentración de exosomas en las diferentes muestras que pudo observarse fue coherente con las medidas de concentración de nanopartículas realizadas mediante NTA (Tabla 3). En plasma y tejido se detectó una mayor concentración de vesículas que en las muestras obtenidas de orina. También se determinaron diferencias entre las dos muestras de exosomas de orina (Figura 4D: Orina – C4 y Figuras 4E y 4F: Orina C5): en los exosomas de la muestra de orina C4 la cantidad de exosomas observados era menor que en los exosomas de la muestra de orina C5, además de que el fondo de imagen era más claro y “limpio” en el primer caso. Estos resultados concuerdan con las diferencias observadas durante el aislamiento de exosomas entre estas dos muestras: en el aislamiento de la muestra de orina C5 se obtuvo un pellet de tamaño considerable (Figura 3) que contendría un mayor número de vesículas y quizá otros restos biológicos que expliquen la mayor suciedad de fondo; mientras que en el aislamiento de la muestra de orina C4 no se observó un pellet de exosomas.

En las muestras de exosomas aislados mediante el kit ExoQuick-TC, se observó que el fondo de imagen es en general más claro y homogéneo que en las aisladas mediante el kit miRCURY. Esto puede deberse a que en el aislamiento con el kit miRCURY el pellet de exosomas se resuspende en un *Buffer* que viene incluido en el kit, mientras que en el aislamiento mediante el kit ExoQuick-TC, los exosomas se resuspenden en PBS filtrado en el mismo día a través de un filtro de 0,22 μm .

En vista de los resultados, es preferible utilizar PBS filtrado, dado que se trata de un medio más “limpio” y óptimo para las posteriores aplicaciones o análisis de los exosomas, especialmente para su visualización mediante TEM.

Por último, aunque no se observan grandes diferencias en las imágenes obtenidas de las dos pruebas realizadas en el aislamiento de exosomas a partir de tejido nervioso (Figura 4G: C6 – Prueba 1 y Figuras 4H y 4I: C6 – Prueba 2), en la muestra de exosomas resultante de la Prueba 2 se observó que la cantidad de exosomas era ligeramente mayor que en la muestra resultante de la Prueba 1 (Figura 4I), además de que el fondo de imagen es algo más claro. Esta última observación puede deberse a que el mayor tiempo de centrifugación en los pasos previos a la adición de la solución precipitante de exosomas permite eliminar mejor los restos celulares de gran tamaño de las muestras de homogeneizado de tejido nervioso. En base a estas observaciones, el protocolo aplicado en la Prueba 2 ofrece mejores resultados que el de la Prueba 1 en el aislamiento de exosomas a partir de homogeneizado de tejido nervioso. La aplicación de este protocolo adapta y optimiza la metodología descrita por Muraoka *et al.*³⁷ para la homogeneización y el aislamiento de exosomas de cerebro de ratón y humano para su aplicación en tejido nervioso de ovino.

5.1.2. Análisis de la distribución de tamaños y la concentración de exosomas mediante *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

La caracterización mediante TEM permite observar directamente y estudiar la variedad de morfologías y tamaños de parte de los exosomas de la muestra, mientras que el NTA permite conocer la distribución de tamaños de partícula de la población de las vesículas extracelulares aisladas (Anexo I), además de la concentración de partículas en cada muestra. El equipo calcula también, entre otros parámetros, el tamaño medio de nanopartícula de cada muestra. Al igual que en el análisis mediante TEM, por razones de bioseguridad se analizaron mediante NTA únicamente las muestras de exosomas procedentes de ovejas control (C1-C6).

Tabla 3. Diámetro promedio de partícula y concentración de partículas medidos con Nanosight en las diferentes muestras de exosomas analizadas mediante NTA. El diámetro promedio se expresa como moda \pm error estándar (ES) y la concentración de partículas expresa el valor medido \pm ES. Cálculo de la concentración de partículas en cada muestra \pm ES.

Procedencia de los exosomas (Tipo de muestra – Id. oveja)	Diámetro medio de partícula \pm ES (nm)	Concentración de partículas medida \pm ES (partículas/ml)	Concentración de partículas en las muestras (partículas/ml)
Plasma – C1	110,5 \pm 3,5	2,84 \cdot 10 ⁸ \pm 1,12 \cdot 10 ⁷	2,84 \cdot 10 ¹¹ \pm 1,12 \cdot 10 ¹⁰
Plasma – C2	103,4 \pm 3,3	4,99 \cdot 10 ⁸ \pm 2,69 \cdot 10 ⁷	4,99 \cdot 10 ¹¹ \pm 2,69 \cdot 10 ¹⁰
Plasma – C3	99,4 \pm 3,0	2,97 \cdot 10 ⁸ \pm 1,72 \cdot 10 ⁷	2,97 \cdot 10 ¹¹ \pm 1,72 \cdot 10 ¹⁰
Orina – C4	145,1 \pm 23,0	1,30 \cdot 10 ⁷ \pm 1,14 \cdot 10 ⁶	6,50 \cdot 10 ⁸ \pm 5,70 \cdot 10 ⁷
Orina – C5	117,6 \pm 7,7	1,48 \cdot 10 ⁸ \pm 9,18 \cdot 10 ⁶	7,40 \cdot 10 ⁹ \pm 4,59 \cdot 10 ⁸
Tejido nervioso – C6	133,7 \pm 1,8	2,01 \cdot 10 ⁸ \pm 4,41 \cdot 10 ⁶	1,00 \cdot 10 ¹¹ \pm 2,20 \cdot 10 ⁹

Tal como se muestra en la Tabla 3 y se podía apreciar también en la visualización de exosomas mediante TEM, la concentración de exosomas es mayor en las muestras de exosomas aislados a partir de plasma (concentraciones del orden de 10¹⁰ partículas/ml) que en las de exosomas aislados a partir de tejido nervioso (10⁹ partículas/ml) y especialmente en las aisladas a partir de orina (10⁷- 10⁸ partículas/ml). En la Figura 5 se representa la concentración de nanopartículas para cada tipo de muestra de origen.

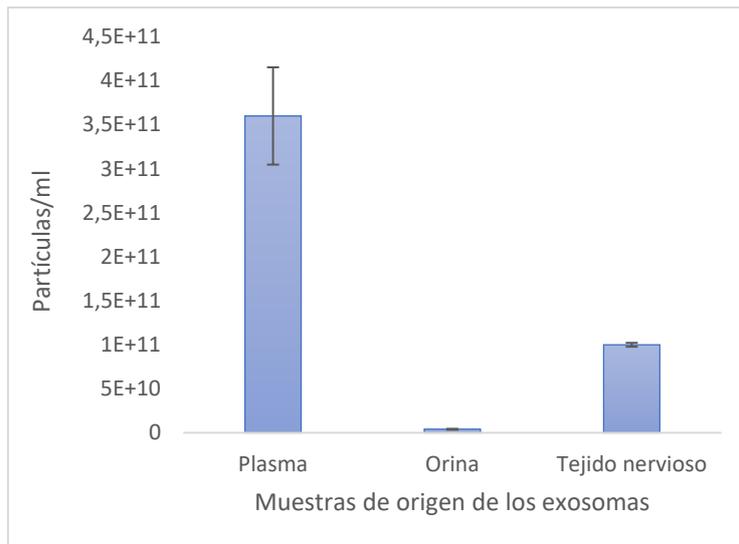


Figura 5. Concentración de partículas medida mediante NTA en las muestras de exosomas aislados para los diferentes tipos de muestras de origen. Las barras representan la concentración de partículas media en cada tipo de muestra de origen (partículas/ml) y las barras de error representan el error estándar (ES).

En cuanto a la distribución de tamaño de partículas en las muestras de exosomas, también se observan diferencias entre los diferentes tipos de muestra de origen y los diferentes métodos de aislamiento. Como se puede observar en la Figura 6 y el Anexo I (Figura A1), las muestras de exosomas aislados con el kit ExoQuick-TC son más polidispersas y heterogéneas en tamaño que las muestras de exosomas de plasma aislados con el kit miRCURY. Un efecto similar fue observado por Lopez-Pérez *et al.* al aislar mediante dos kits comerciales diferentes exosomas de plasma en la especie ovina: con cada kit se aislaron poblaciones de exosomas de diferentes tamaños²⁰.

Según se puede observar en la Figura 6 y el Anexo I, el tamaño de la mayor parte de las vesículas aisladas se corresponde con el tamaño descrito para los exosomas (30-150 nm, aunque el rango puede variar mínimamente según la fuente consultada^{19,48}). Además, el tamaño de partícula más frecuente en las poblaciones de exosomas de todas las muestras está dentro de este rango de tamaños esperado (Tabla 3). Por último, según se observa en la Figura 6, en el aislamiento mediante el kit ExoQuick-TC se han podido precipitar, además de exosomas, algunas vesículas de mayor tamaño (podrían ser microvesículas o cuerpos apoptóticos).

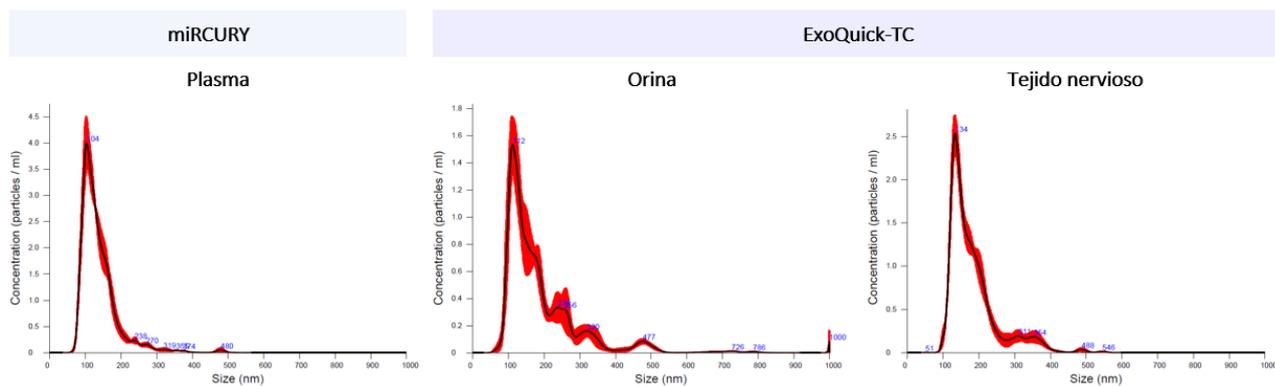


Figura 6. Distribución de tamaño de nanopartículas en exosomas aislados a partir de plasma (C1), de orina (C5) y de tejido nervioso (C6) analizada mediante NTA. Las gráficas representan la concentración de partículas media para los diferentes tamaños de nanopartícula (en nm) con una línea negra y las barras de error con una sombra roja.

5.1.3. Determinación de la concentración de proteína en las muestras de exosomas

Dado que las muestras de exosomas de ovejas con scrapie no pudieron ser analizadas mediante TEM y NTA, se midió la concentración de proteína en todas las muestras de exosomas aislados a partir de plasma (C1, C2, C3, Sc1, Sc2 y Sc3) y de orina (C4, C5, Sc4, Sc5 y Sc6), como medida indirecta y estimada de la concentración de los exosomas aislados. Para ello, se midió por duplicado la absorbancia a 280 nm de las muestras mencionadas con un espectrofotómetro *Nanodrop*. El Anexo II muestra los espectros de absorción obtenidos para alguna de las muestras.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización mediante TEM y NTA de los exosomas de ovejas control y que se han obtenido unos resultados similares al medir con un espectrofotómetro las muestras de exosomas-control y las de exosomas-scrapie (Tabla 4), se puede inferir que se ha logrado aislar exosomas también a partir de las muestras de ovino con scrapie.

Tabla 4. Concentración de proteína en las muestras de exosomas aislados a partir de plasma y orina de ovejas control y ovejas con scrapie medidas con *Nanodrop*. Concentración de proteína media para cada muestra (mg/ml) \pm desviación estándar (*standard deviation*; SD).

Origen de los exosomas	Grupo	Id. Muestra	Concentración de proteína \pm SD (mg/ml)
Plasma	Control	C1	50,15 \pm 0,05
		C2	40,10 \pm 0,38
		C3	59,20 \pm 1,44
	Scrapie	Sc1	77,66 \pm 0,25
		Sc2	60,67 \pm 1,93
		Sc3	43,23 \pm 0,31
Orina	Control	C4	11,82 \pm 0,68
		C5	16,03 \pm 0,76
	Scrapie	Sc4	5,58 \pm 0,94
		Sc5	2,36 \pm 0,01
		Sc6	7,09 \pm 0,88

En coherencia con las medidas de concentración de nanopartículas realizadas por NTA, la concentración de proteína en las muestras de exosomas de plasma es mayor que en las muestras de exosomas de orina (Tabla 4, Figura A2-B), es decir, la concentración de vesículas aisladas a partir de plasma es mayor que la de vesículas aisladas a partir de orina. Esto concuerda con lo observado en anteriores trabajos del grupo en los que se aislaron exosomas de plasma y orina de humana. Los exosomas están menos concentrados en orina que en plasma, motivo por el cual los volúmenes de partida para llevar a cabo el aislamiento de exosomas a partir de orina suelen ser sensiblemente mayores a los volúmenes de plasma⁴⁹.

Comparando entre los diferentes grupos de estudio, la concentración de proteína de las muestras de exosomas de plasma de ovejas enfermas es mayor que la de exosomas de plasma de ovejas sanas, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas.

En el caso de la orina ocurre lo contrario. Aunque hemos analizado un limitado número de muestras, estas han resultado ser muy variables entre sí (ver también Tabla 3), lo que pone de manifiesto la necesidad de normalizar todo el proceso, desde la toma de muestras, para la búsqueda de posibles biomarcadores en orina. Las diferencias en la concentración de exosomas pueden ser debidas a diversos factores como los cambios en la osmolaridad de la orina, debido a una mayor o menor ingesta de agua, o variaciones patofisiológicas⁵⁰. Por ejemplo, se ha descrito disfunción del tracto inferior urinario en ovino con scrapie que empeora durante el curso de la enfermedad. Esta disfunción está relacionada con una hiperactividad del músculo detrusor debido a lesiones neurológicas⁵¹. Futuros estudios ampliando el número de muestras e intentando homogeneizar el protocolo de obtención de las mismas confirmarán si esta disminución en el número de exosomas en orina está relacionada con la disfunción urinaria asociada a la enfermedad.

5.2. Determinación de la presencia/ausencia de PrP^{Sc} en exosomas de orina y plasma mediante PMCA

Se analizó la presencia de PrP^{Sc} en las tres muestras de exosomas de orina de ovejas con scrapie (Sc4, Sc5, Sc6) y una muestra de exosomas de plasma de una oveja con scrapie (Sc3) mediante PMCA, además de en las respectivas fracciones sin exosomas y muestras originales.

Tras el revelado de la membrana de *Dot blot* de los productos de la PMCA (Figura 7), no se detectó presencia de PrP^{res} en ninguna de las muestras analizadas, mientras que sí se observa positividad en las diferentes diluciones del control positivo. Con ello se puede concluir que las muestras analizadas en este estudio mediante PMCA (exosomas de orina y plasma y sus correspondientes fracciones sin exosomas y muestras originales de plasma y orina), en caso de contener PrP^{res}, esta se encuentra en una cantidad menor a la de una dilución 10⁻⁶ de un encéfalo infectado con scrapie clásico.

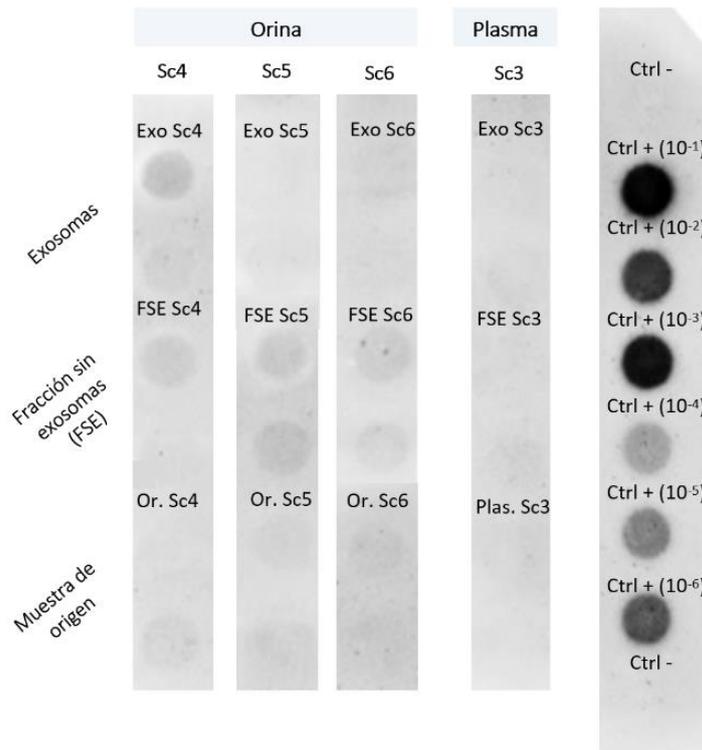


Figura 7. Revelado de la membrana de *Dot blot* para la detección de PrP^{Sc} en los productos de amplificación por PMCA (3 rondas de 24 horas) de exosomas (Exo) de orina y plasma, las fracciones sin exosomas (FSE) correspondientes y las muestras de origen de los exosomas de orina (Or.) y plasma (Plas.). A la derecha se incluyen los controles negativos y positivos (diluciones 10⁻¹–10⁻⁶ de cepa Dawson de scrapie clásico).

Estos resultados concuerdan con los hallazgos realizados hasta la fecha en plasma y orina de ovino con scrapie. La localización principal de proteína prion es el sistema nervioso central, mientras que en biofluidos periféricos más accesibles como el plasma y la orina la concentración de PrP^{Sc} es mucho más baja. Se ha logrado detectar PrP^{Sc} en plasma⁴¹ y orina¹¹ de ovejas infectadas con scrapie utilizando en ambos casos tecnologías que aumentan la sensibilidad de la técnica: sPMCA o PMCA seriada y detección mediante ensayo SOFIA (*surround optical fiber immunoassay*). Brevemente, la sPMCA consiste en la realización de un gran número de ciclos cortos de PMCA (hasta 200); y el ensayo SOFIA se basa en la adición de partículas magnéticas unidas a un anticuerpo monoclonal anti-PrP^{Sc}, de forma que se pueden realizar varios lavados de las partículas concentrando la PrP^{Sc} previamente a la inmunodetección.

En el trabajo realizado en orina no se logró detectar PrP^{Sc} utilizando PMCA y *western blot* convencional, pero sí mediante sPMCA y SOFIA, utilizando un volumen aumentado de muestra al inicio de las rondas de PMCA (500 µl, mientras que en este estudio se emplearon 5 µl)¹¹. Dada la baja concentración de proteína prion en plasma y orina y la posible presencia de inhibidores de la PMCA en estas matrices, la realización de PMCA sobre exosomas aislados a partir de estas muestras podría ser una oportunidad para lograr detectar niveles de PrP^{Sc} en estos biofluidos, en el supuesto de que la proteína prion esté asociada a los exosomas. Sin embargo, en vista de los resultados obtenidos en este y otros trabajos, de cara a futuros estudios convendría tratar de concentrar más las muestras antes de analizarlas mediante PMCA, por ejemplo, en el caso de los exosomas, se podría resuspender el pellet de exosomas en un menor volumen. Moda F. *et al.* lograron detectar PrP^{Sc} en orina humana de pacientes con vECJ mediante PMCA y *western blot*, sometiendo la orina a una centrifugación a 100000 g previamente y utilizando un volumen de 100 µl del pellet obtenido resuspendido en PBS como muestra cargada en PMCA⁵². En este trabajo se obtuvo señal mediante *western blot* tanto para el pellet, que contendría vesículas extracelulares, como para la fracción sin vesículas extracelulares obtenida de la ultracentrifugación, aunque la señal fue más intensa para el pellet con vesículas extracelulares y otros restos celulares. Estos hallazgos concuerdan con nuestra anterior hipótesis.

Por otro lado, debido a la falta de suministro de material de laboratorio, no pudimos realizar la PMCA con

exosomas de tejido nervioso, depósito principal de la proteína prion. Se ha sugerido que los exosomas podrían desempeñar un papel relevante en la diseminación célula a célula de PrP^{Sc} en sistema nervioso central y ya se ha demostrado previamente la presencia de PrP^{Sc} en exosomas de líquido cefalorraquídeo²⁰. En este trabajo describimos por primera vez el aislamiento de exosomas a partir de tejido nervioso de ovino, esta metodología se aplicará en el futuro para determinar si estos exosomas participan activamente en la transmisión de la infectividad *in vivo*.

5.3. Evaluación del efecto de los exosomas de plasma sobre la proliferación celular de células madre mesenquimales ovinas

Según estudios anteriores, las MSCs ovinas infectadas con scrapie muestran una toxicidad inicial, mientras están en contacto con el inóculo, para posteriormente incrementar su proliferación con respecto a las MSCs infectadas con cerebro control²⁶. En este trabajo hemos investigado si estas células reaccionarían también de forma diferente al ser tratadas con exosomas asilados de animales con scrapie. Para ello hemos analizado la viabilidad celular de MSCs ovinas con genotipo susceptible a scrapie tratadas con distintas diluciones de exosomas de ovino con scrapie y control mediante ensayos MTT. Las MSCs son frecuentemente utilizadas en este tipo de estudios porque además de conservar la capacidad de diferenciación a célula nerviosa, se ha comprobado en un modelo murino de estas células que son susceptibles a la infección por proteína prion⁵³, y se pueden obtener fácilmente a partir de tejidos de animales adultos.

En primer lugar, se comprobó que, tras sustraer la absorbancia del blanco, las lecturas de absorbancia de los pocillos sin células a los que se habían añadido las 4 diluciones ensayadas de exosomas eran próximas a 0 ($0,00 \pm 0,015$) para los dos ensayos MTT realizados. Esto permite comprobar que los exosomas no reaccionan al MTT y por lo tanto no interfieren por sí mismos en el ensayo.

5.3.1. Efecto de la dosis de exosomas sobre la proliferación celular

Se realizaron test *One-way ANOVA* (*Ordinary One-way ANOVA/Kruskal-Wallis*) para estudiar si había diferencias significativas entre las diferentes dosis de exosomas con las que se trataron las células (diluciones $\frac{1}{2}$ (Dil.1), $\frac{1}{5}$ (Dil.2), $\frac{1}{10}$ (Dil.3) y $\frac{1}{15}$ (Dil.4)). Según estos test, no se observan diferencias significativas en la proliferación celular de los cultivos tratados con diferentes diluciones de las muestras de exosomas, para ninguno de los grupos de estudio (Control y Scrapie) en ninguno de los dos ensayos MTT realizados (24 hpi y 48 hpi).

Al realizar los test *One-way ANOVA* para cada origen de muestra individualmente en lugar de por grupos (ver Anexo III), sí se pueden observar algunas diferencias significativas entre las diferentes diluciones (incluyendo en el análisis las células control sin exosomas), pero este efecto no es reproducible en todos los animales, ni para unas diluciones en concreto, sino que es muy variable entre las diferentes ovejas de las que proceden los exosomas. Este efecto se observa tanto en el ensayo MTT realizado 24 hpi (Figura A3-A) como en el realizado 48 hpi (Figura A3-B), e indica una gran variabilidad inter-individuo.

5.3.2. Efecto de los exosomas de ovejas con scrapie y ovejas control sobre la proliferación celular

Como se observa en la Figura 8 la viabilidad de las MSCs tratadas con exosomas de plasma de ovejas con scrapie fue en todos los casos mayor que la de las células tratadas con exosomas de plasma de ovejas control. Se observan diferencias significativas entre la viabilidad de las células tratadas con exosomas de ovejas control y la de las células tratadas con exosomas de ovejas con scrapie para tres de las cuatro diluciones de exosomas inoculadas a las 24 horas post-inoculación (dilución $\frac{1}{2}$ $p < 0,05$, dilución $\frac{1}{5}$ y dilución $\frac{1}{10}$; $p < 0,01$) y para otras tres de las cuatro diluciones a las 48 horas post-inoculación (dilución $\frac{1}{2}$ y dilución $\frac{1}{10}$; $p < 0,05$; y dilución $\frac{1}{15}$; $p < 0,01$).

Tal como se indica en el apartado 4.1.3., no hubo diferencias significativas en la concentración de proteína entre las muestras de exosomas de plasma de ovejas con scrapie y control, si bien las concentraciones fueron superiores en las muestras de ovino con scrapie, por lo que se puede descartar que el hecho de que los exosomas de ovejas con scrapie reduzcan menos la viabilidad que los exosomas de ovejas control se deba a que contengan una menor concentración de exosomas que las de ovejas control.

La Figura 8 recoge los resultados obtenidos para cada grupo de estudio en los ensayos MTT.

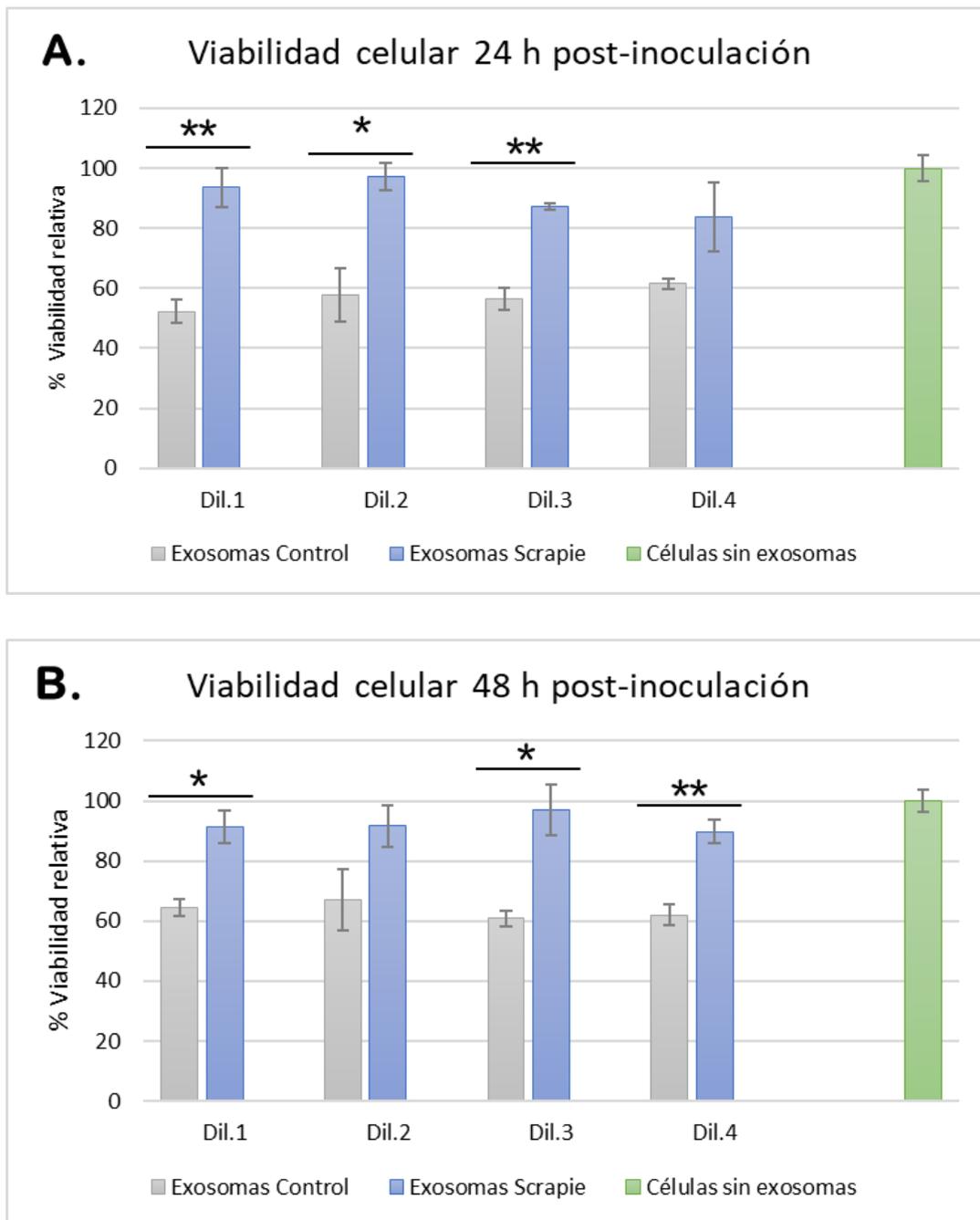


Figura 8. Efecto de los exosomas de plasma de ovejas con scrapie y ovejas control sobre la viabilidad celular de un cultivo de MSCs ovinas con genotipo susceptible a scrapie 24 horas después del tratamiento con exosomas (**Figura 8A**) y 48 horas después del tratamiento con exosomas (**Figura 8B**). Las barras representan el porcentaje de viabilidad relativa de los cultivos respecto de la viabilidad de las células control sin exosomas, considerando que estas células control tienen 100% de viabilidad. Las barras de error representan el error estándar. Significación estadística: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Otro factor que podría afectar a los resultados obtenidos es que los exosomas de plasma de ovejas control fueron resuspendidos en el *Buffer* de resuspensión que viene incluido en el kit comercial, mientras que los exosomas de ovejas con scrapie, al aislarse con posterioridad a la visualización de exosomas en TEM, fueron resuspendidos en PBS filtrado. Una hipótesis que podría explicar los resultados observados, o al menos parte de los mismos, es que el *Buffer* de resuspensión del kit comercial pueda tener cierto efecto tóxico sobre las células, a pesar de que no se observa de forma clara un efecto dilución de este *Buffer* entre las diferentes diluciones de exosomas que se han probado. La hipótesis sería que este efecto citotóxico se produce incluso en la mayor dilución (1/15), y por lo tanto puede estar enmascarando los efectos de los exosomas, en los cuales cabe esperar observar diferencias claras entre las diferentes diluciones y cantidades de exosomas añadidas sobre las células.

Además de los exosomas de plasma ovino añadidos a las células en este ensayo, hay otras dos fuentes de exosomas a tener en cuenta que podrían interferir en el estudio. Una de ellas son los exosomas producidos por las propias células durante la fase de crecimiento. Estos exosomas fueron eliminados de los pocillos previamente a la adición de los exosomas ovinos, ya que se realizó un cambio de medio justo antes de la inoculación. La otra fuente de exosomas es el suero fetal bovino con el que está suplementado el medio de cultivo. Estos exosomas sí podrían estar teniendo efecto sobre las MSCs, enmascarando también los efectos de los exosomas de estudio.

Por todo ello, no consideramos que se pueda concluir que los exosomas de ovino con scrapie estimulen la proliferación celular de las MSCs durante las 24 y las 48 horas próximas al contacto con los mismos. De este ensayo obtenemos conclusiones metodológicas a tener en cuenta en futuros experimentos en esta línea.

En primer lugar, habría que realizar el ensayo con exosomas resuspendidos en PBS filtrado en todos los casos. Por otro lado, dada la variabilidad observada en la especie ovina a todos los niveles, convendría tratar de controlar el ensayo en diferentes puntos.

Se podría realizar una pre-visualización de la placa tras la fase de crecimiento celular, para comprobar que el crecimiento celular en todos los pocillos es similar, y sería conveniente utilizar suero fetal bovino sin exosomas (*Exosome Depleted FBS*) para realizar las diluciones. Además, previamente a la realización de este ensayo, se podría realizar una titulación con un mayor número de diluciones, abarcando un rango más amplio de cantidad de exosomas añadidos (se podría añadir un volumen mayor de exosomas y realizar diluciones con concentración de exosomas todavía menores), utilizando para ello exosomas de ovino control, para intentar discernir cuál es el efecto de estos exosomas según la concentración añadida, dado que se ha visto previamente que exosomas de individuos control sin diluir causaban un efecto citotóxico en las células.

En futuros estudios puede resultar de gran interés realizar este experimento, además de para los exosomas de plasma de ovino con scrapie, también con exosomas de tejido nervioso de ovino control y enfermo.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la realización de este trabajo y el análisis de los mismos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha logrado por primera vez aislar y caracterizar exosomas de orina y tejido del sistema nervioso central en la especie ovina.
- Se ha realizado una optimización en el protocolo de homogeneización y aislamiento de exosomas de tejido nervioso de ovino. De cara a futuros estudios, esto permitirá aislar exosomas de tejido nervioso de ovino con scrapie para evaluar su papel en la patogenia de la enfermedad.
- En exosomas aislados a partir de plasma y orina de ovino con scrapie no se ha detectado la presencia de la proteína prion patológica, ni tampoco en las muestras de origen de los exosomas de plasma y orina. Por tanto, este procedimiento no facilita el diagnóstico de la enfermedad.
- Los protocolos de manipulación y análisis de exosomas requieren, al igual que su aislamiento, un proceso de optimización, especialmente aquellos que requieran ensayos *in vitro*, que incluya factores como el medio de disolución de los exosomas, la presencia de otro tipo de vesículas externas o la toxicidad dosis-dependiente.

7. Bibliografía

1. Badiola, J. J. & Pumarola i Batlle, M. *Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*. (2010).
2. Acín, C. *et al.* Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. Review on the Etiology, Genetic Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Control Measures of Both Diseases. *Anim. an open access J. from MDPI* **11**, 1–20 (2021).
3. Parry, H. B. Scrapie disease in sheep: historical, clinical, epidemiological, pathological, and practical aspects of the natural disease. *Acad. Press* 170–186 (1983).
4. SB, Prusiner. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136–144 (1982).
5. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., & Cohen, F. E. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10962–10966 (1993).
6. Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, H. N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet. Rec.* **142(23)**, 623–625
7. Gough, K. C. & Maddison, B. C. Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* **4**, 275–282 (2010).
8. Maddison, B. C. *et al.* Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J. Virol.* **83**, 8293–8296 (2009).
9. Maddison, B. C. *et al.* Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J. Infect. Dis.* **201**, 1672–1676 (2010).
10. Terry, L. A. *et al.* Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet. Res.* **42**, (2011).
11. Rubenstein, R. *et al.* Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with

- preclinical/clinical chronic wasting disease. *J. Virol.* **85**, 9031–9038 (2011).
12. Castilla, J., Hetz, C., & Soto, C., Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr. Mol. Med.* **4**, 397–403 (2004).
 13. Klein, MA. *et al.* A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390**, 687–690 (1997).
 14. Sitammagari, K. K. & Masood, W. Creutzfeldt Jakob Disease. *Enferm. Creutzfeldt-Jakob* (2021).
 15. Houston, F., & Andréoletti, O. Animal prion diseases: the risks to human health. *Brain Pathol.* **29**, 248–262 (2019).
 16. Cassard, H. *et al.* Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
 17. Filali, H., Martín Burriel, I., Badiola Díez, J. J. & Bolea, R. Biomarcadores asociados con scrapie y otras encefalopatías espongiiformes transmisibles. *ITEA, Inf. técnica económica Agrar. Rev. la Asoc. Interprofesional para el Desarro. Agrar. (AIDA), ISSN 1699-6887, N.º. 1, 2014, págs. 49-70* 49–70 (2014).
 18. Miele, G. *et al.* Urinary alpha1-antichymotrypsin: a biomarker of prion infection. *PLoS One* **3**, (2008).
 19. Doyle, L. & Wang, M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* **8**, 727 (2019).
 20. López-Pérez, Ó. *et al.* Cerebrospinal fluid and plasma small extracellular vesicles and mirnas as biomarkers for prion diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 21. Crossland, R. E., Norden, J., Bibby, L. A., Davis, J. & Dickinson, A. M. Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. *J. Immunol. Methods* **429**, 39–49 (2016).
 22. Van Niel, G., D’Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 213–228 (2018).
 23. Waldenström, A. & Ronquist, G. Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ.*

- Res.* **114**, 315–24 (2014).
24. Zhang, J. *et al.* Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* **13**, 17–24 (2015).
 25. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 193–208 (2018).
 26. García-mendívil, L. *et al.* Effect of Scrapie Prion Infection in Ovine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Ovine Mesenchymal Stem Cell-Derived Neurons. *Anim. an open access J. from MDPI* **11**, (2021).
 27. Sancho-Albero, M. *et al.* Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis. *Nat. Catal.* 1–9 (2019). doi:10.1038/s41929-019-0333-4
 28. Salehi, M. & Sharifi, M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *Journal of Cellular Physiology* **233**, 6370–6380 (2018).
 29. Boriachek, K. *et al.* Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small* **14**, (2018).
 30. Mol, E. A., Goumans, M. J., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G. & Vader, P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **13**, 2061–2065 (2017).
 31. Hurwitz SN., Olcese JM. & Meckes DG,. Extraction of Extracellular Vesicles from Whole Tissue. *J. Vis. Exp.* (2019). doi:10.3791/59143
 32. Salehi, M. & Sharifi, M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *J. Cell. Physiol.* **233**, 6370–6380 (2018).
 33. Khalyfa, A., Kheirandish-Gozal, L. & Gozal, D. Circulating exosomes in obstructive sleep apnea as phenotypic biomarkers and mechanistic messengers of end-organ morbidity. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **256**, 143–156 (2018).
 34. Qiu, G. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs. *Stem Cell Research and Therapy* **9**, (2018).

35. Ishguro, K., Yan, IK. & Patel, T. Isolation of Tissue Extracellular Vesicles from the Liver. *J. Vis. Exp.* **2019**, (2019).
36. Pérez Gonzalez, R. *et al.* A Method for Isolation of Extracellular Vesicles and Characterization of Exosomes from Brain Extracellular Space. *Methods Mol. Biol.* **1545**, 139–151 (2017).
37. Muraoka, S. *et al.* Assessment of separation methods for extracellular vesicles from human and mouse brain tissues and human cerebrospinal fluids. *Methods* **177**, 35–49 (2020).
38. Kalani, A., Tyagi, A. & Tyagi, N. Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol. Neurobiol.* **49**, 590–600 (2014).
39. Alais, S. *et al.* Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol. cell* **100**, 603–618 (2008).
40. Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S. & Schekman, R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife* **5**, (2016).
41. Rubenstein, R. *et al.* A novel method for preclinical detection of PrPSc in blood. *J. Gen. Virol.* **91**, 1883–1892 (2010).
42. Lässer, C., Eldh, M. & Lötvall, J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J. Vis. Exp.* e3037 (2012). doi:10.3791/3037
43. Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810–813 (2001).
44. Mediano, D. R., Sanz-Rubio, D., Ranera, B., Bolea, R. & Martín-Burriel, I. The potential of mesenchymal stem cell in prion research. *Zoonoses Public Health* **62**, 165–178 (2015).
45. Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, 469–471 (2018).
46. Jung, M. K. & Mun, J. Y. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* **2018**, 56482 (2018).

47. Johnstone, R., Bianchini, A. & Teng, K. Reticulocyte Maturation and Exosome Release: Transferrin Receptor Containing Exosomes Shows Multiple Plasma Membrane Functions. *Blood* **74**, 1844–1851 (1989).
48. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **367**, (2020).
49. Li, D. *et al.* Isolation and identification of exosomes from feline plasma, urine and adipose-derived mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.* **17**, (2021).
50. Gunasekaran, P. M., Luther, J. M. & Byrd, J. B. For what factors should we normalize urinary extracellular mRNA biomarkers? *Biomol. Detect. Quantif.* **17**, 100090 (2019).
51. Combrisson, H., Robain, G., Brugère, H. and Brugère-Picoux, J. Urodynamic parameters in scrapie-affected ewes and their modifications in the course of the disease. *Neurourol. Urodyn.* **17**, 555–563 (1998).
52. Moda, F. *et al.* Prions in the Urine of Patients with Variant Creutzfeldt–Jakob Disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 530 (2014).
53. Cervenakova, L. *et al.* Fukuoka-1 strain of transmissible spongiform encephalopathy agent infects murine bone marrow-derived cells with features of mesenchymal stem cells. *Transfusion* **51**, 1755–1768 (2011).

ANEXOS

Anexo I

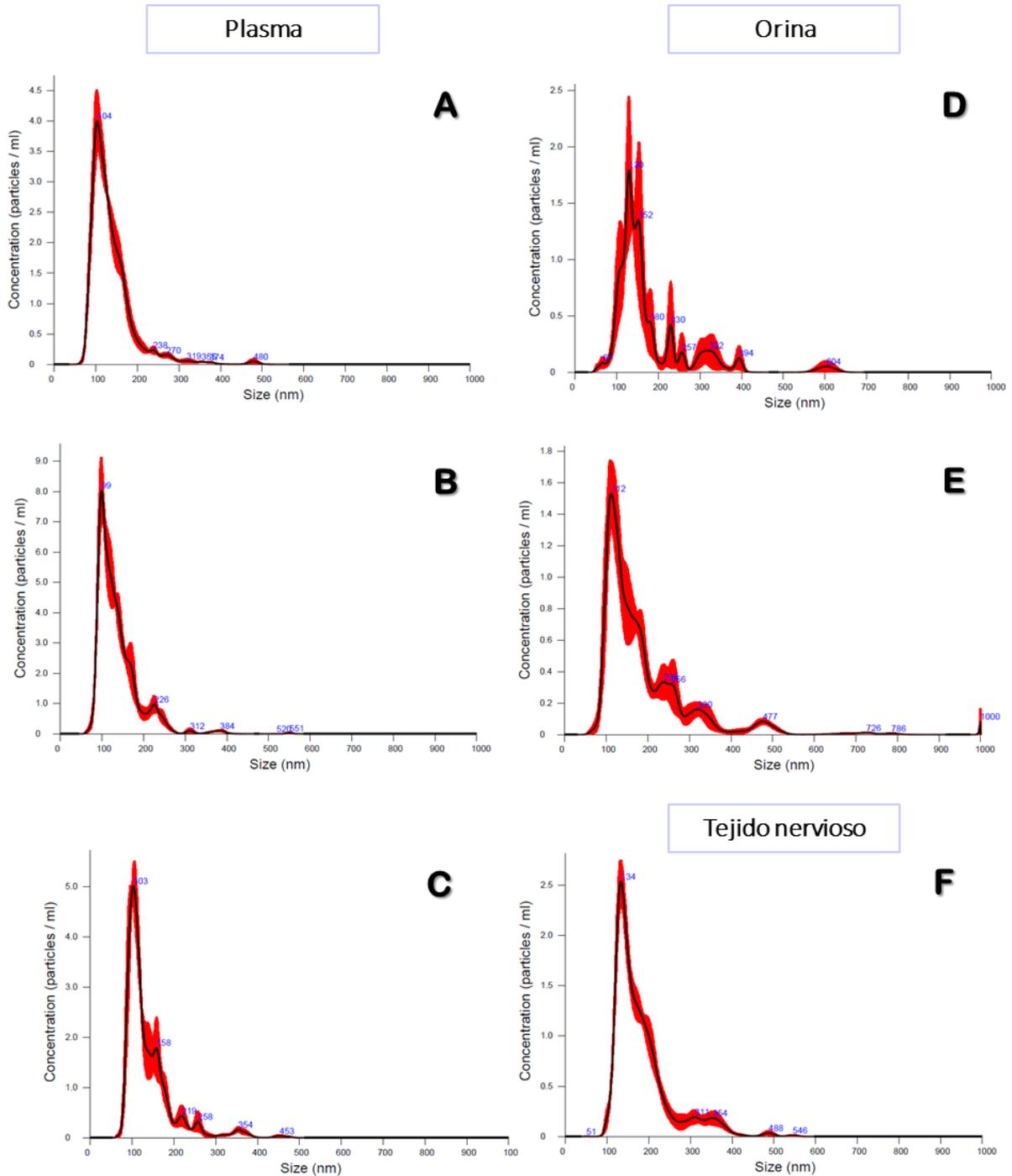


Figura A1. Distribución de tamaño de nanopartículas en exosomas aislados a partir de plasma (**Fig. A1-A.** C1; **Fig. A1-B.** C2; **Fig. A1-C.** C3), exosomas aislados a partir de orina (**Fig. A1-D.** C4; **Fig. A1-E.** C5) y exosomas aislados a partir de tejido nervioso (**Fig. A1-F.** C6) analizada mediante NTA. Las gráficas representan la concentración de partículas media para los diferentes tamaños de nanopartícula (en nm) con una línea negra y las barras de error con una sombra roja.

Anexo II

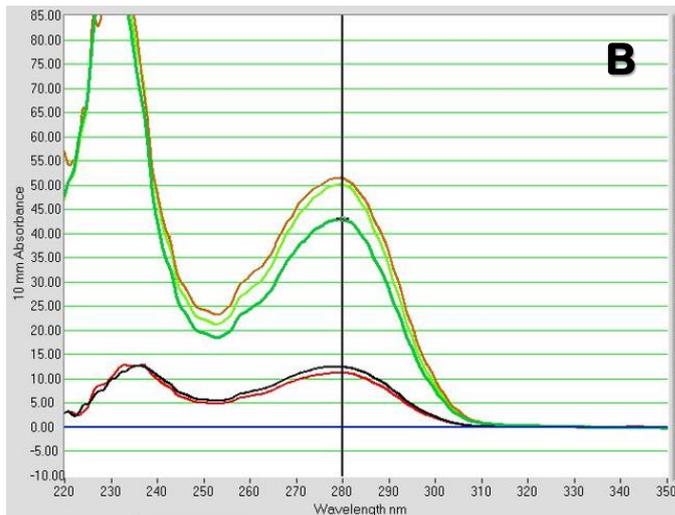
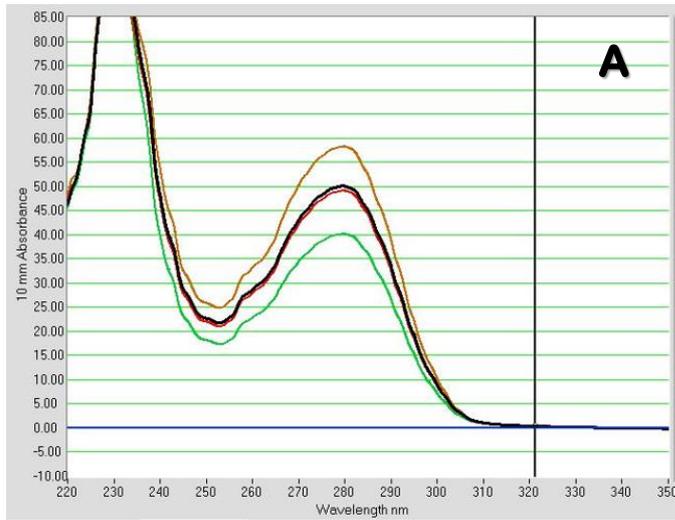


Figura A2. Espectros de absorción obtenidos mediante *Nanodrop* para las muestras de exosomas de plasma de ovejas control (**Figura A2-A**) y para las muestras de exosomas de orina de ovejas control (líneas roja y negra de la **Figura A2-B**) y de plasma de ovejas control (líneas verdes y marrón de la **Figura A2-B**).

Anexo III

Viabilidad celular 24 h post-inoculación

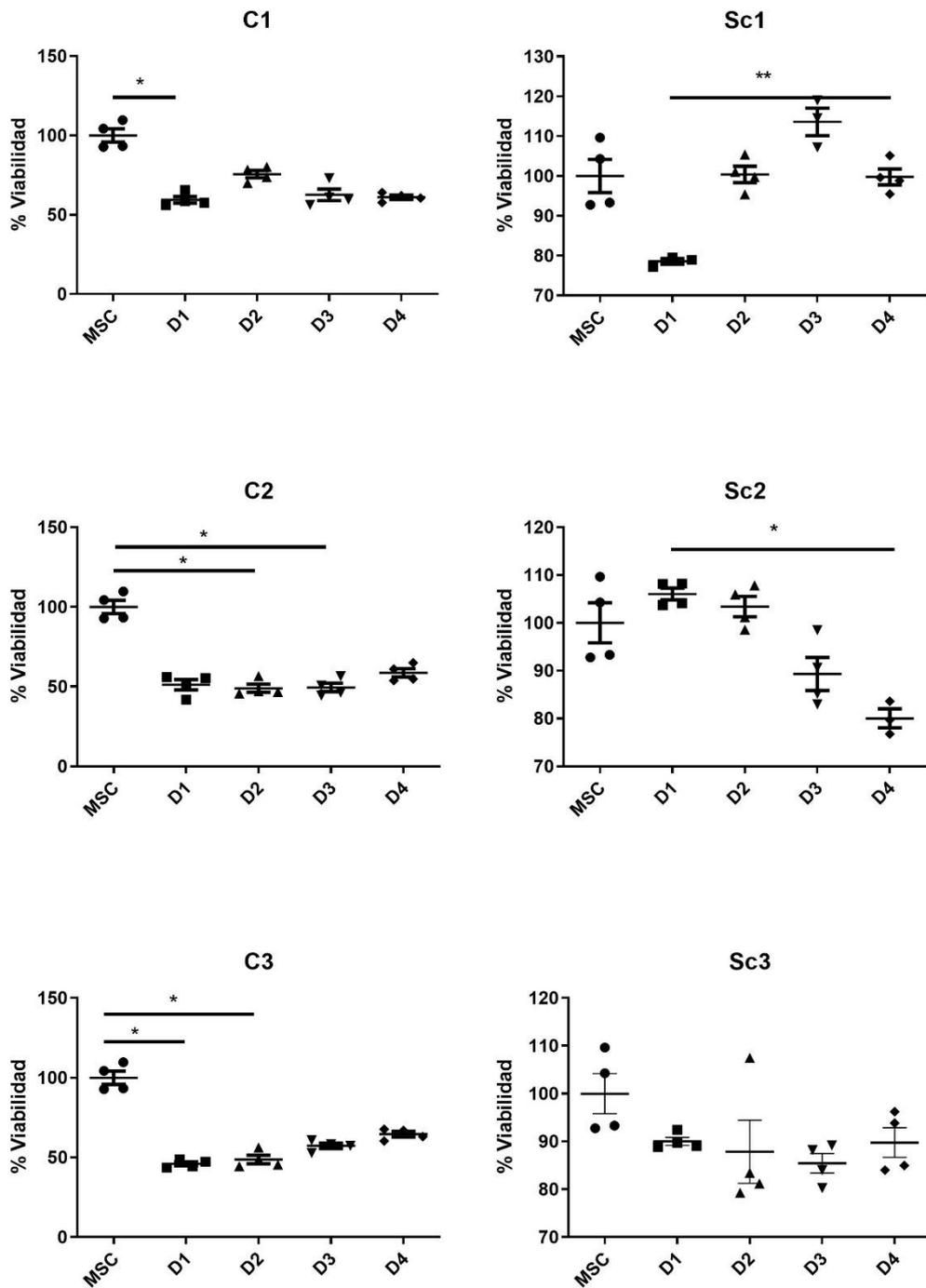


Figura A3-A.

Viabilidad celular 48 h post-inoculación

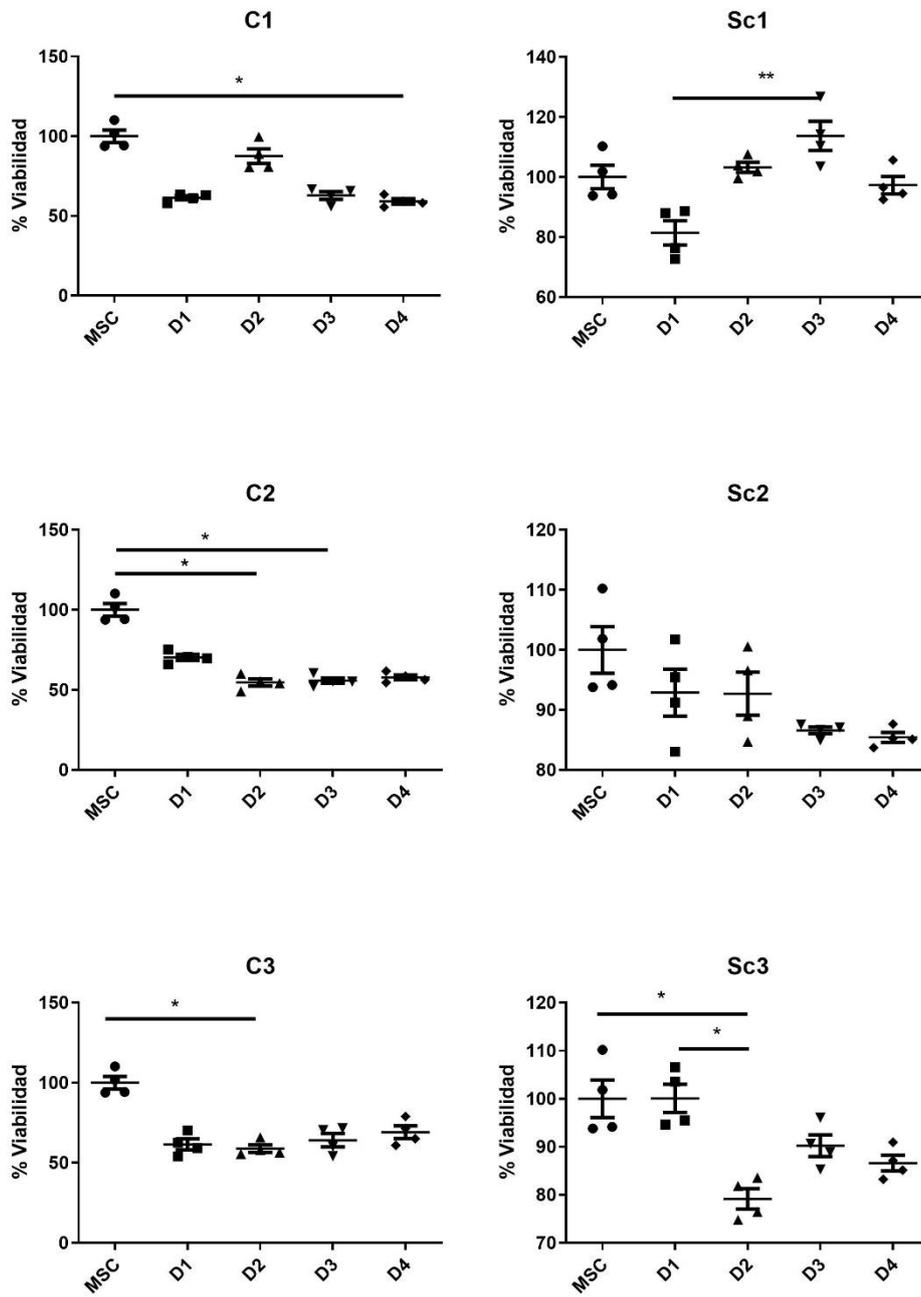


Figura A3-B.

Figuras A3-A y A3-B. Efecto de las diferentes diluciones de exosomas de plasma (D1: 1/2, D2:1/5, D3:1/10, D4:1/15) de ovejas control (C1, C2, C3) y ovejas con scrapie (Sc1, Sc2, Sc3) sobre la viabilidad celular de un cultivo de MSCs ovinas con genotipo susceptible a scrapie 24 horas después del tratamiento con exosomas (**Figura A3-A**) y 48 horas después del tratamiento con exosomas (**Figura A3-B**). Se representa también la viabilidad de las células control sin exosomas (MSC). Las barras de error representan el error estándar. Significación estadística: *P<0,05; **P<0,01.