

Trabajo Fin de Grado

Obtención y caracterización de exosomas de células progenitoras endoteliales

Autora

Ana Cristina Millán Placer

Director

Ángel Luis García Otín

Ponente

Miguel Pocoví Mieras

Hospital Universitario Miguel Servet
Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
Unidad de Investigación Traslacional

2016/2017

ÍNDICE MEMORIA

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. VESÍCULAS EXTRACELULARES	2
2.1.1. Biogénesis de los exosomas	2
2.1.2. Mecanismos de interacción entre exosomas y células diana	3
2.1.3. Propiedades moleculares de los exosomas	3
2.1.3.1. <i>Papel de los RNAs en los exosomas</i>	4
2.2. ENDOTELIO VASCULAR. CÉLULAS ENDOTELIALES Y CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES	5
2.3. RELACIÓN ENTRE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES TIPO ECFC Y EXOSOMAS	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES TIPO ECFC	8
4.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo	8
4.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares	9
4.1.3. Contaje y determinación de la viabilidad celular	9
4.1.3. Congelación y descongelación de células	9
4.1.4. Curvas de crecimiento de las líneas celulares	10
4.2. OBTENCIÓN DE EXOSOMAS DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES TIPO ECFC	10
4.2.1. Cromatografía de exclusión por tamaño (Exo-spin TM)	11
4.2.2. Precipitación con polímeros (reactivo de Invitrogen TM)	12
4.2.3. Ultracentrifugación	12
4.3. CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS AISLADOS DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES TIPO ECFC	12
4.3.1. Análisis de exosomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	12
4.3.2. Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Micro BCA	13
4.3.3. Análisis de la expresión de marcadores exosomales por <i>Western Blot</i>	13
4.3.4. Aislamiento de mRNA y miRNA de exosomas y microvesículas	14
4.3.5. Obtención de cDNA a partir de mRNA y detección mediante RT-qPCR	14
4.3.6. Obtención de cDNA a partir de microRNA y detección mediante RT-qPCR	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES	16
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXOSOMAS AISLADOS A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES TIPO ECFC	16
5.2.1. Análisis de exosomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	16
5.2.2. Cuantificación proteica mediante ensayo de Micro BCA	18
5.2.3. Identificación de marcadores clásicos de exosomas mediante <i>Western Blot</i>	19
5.2.4. Niveles de expresión de mRNA y miRNA en exosomas y microvesículas	21
6. CONCLUSIONES/CONCLUSSIONS	23
7. BIBLIOGRAFÍA	24

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Curvas de crecimiento de ucb-ECFCs en pase 5 y apb-ECFCs en pase 2	16
Figura 2. Visualización mediante TEM de los exosomas derivados de ucb-ECFCs y apb-ECFCs, en función de la condición experimental (normoxia e hipoxia) y metodología (Exo-spin e Invitrogen)	17
Figura 3. Análisis mediante <i>Western Blot</i> de los marcadores clásicos de exosomas CD9 y CD81 (≈ 20 kDa), así como de la β -actina (≈ 40 kDa)..	20
Figura 4. Perfil de expresión relativa de los miRNAs objeto de estudio en las microvesículas procedentes de apb-ECFCs.....	21

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Volumen de medio filtrado (mL) destinado a cada método de aislamiento de exosomas en función de la línea celular de origen.	11
Tabla 2. Condiciones de la reacción de RT-qPCR de los genes analizados en exosomas y microvesículas.....	15
Tabla 3. Condiciones de la reacción de RT-qPCR de los miRNAs estudiados en exosomas y microvesículas.....	15
Tabla 4. Diámetro (nm) de los exosomas de ucb-ECFCs y de apb-ECFCs, en función de la condición experimental y metodología	16
Tabla 5. Cuantificación de proteína total (μ g) en exosomas y microvesículas de ucb-ECFCs en pase 6	18
Tabla 6. Cuantificación de proteína total (μ g) en exosomas y microvesículas de apb-ECFCs en pase 4.	18
Tabla 7. Análisis cualitativo de los resultados obtenidos por RT-qPCR	22

ABREVIATURAS

- ACTB (β -actina)
- AGO1 (argonauta 1)
- apb-ECFCs (ECFCs procedentes de sangre periférica de adulto)
- BCA (ácido bicinconínico)
- BSA (albúmina sérica bovina)
- CD (cluster de diferenciación)
- C_T (ciclo umbral)
- DMSO (dimetil sulfóxido)
- ECFC (células formadoras de colonias endoteliales)
- EPC (célula progenitora endotelial)
- ESCRT (complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte)
- EV (vesícula extracelular)
- FBS (suero fetal bovino)
- GLUT1 (transportador de glucosa 1)
- hEGF (factor de crecimiento endotelial humano recombinante)
- hFGF-B (factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante)
- HIF1 α (subunidad α del factor 1 inducible por hipoxia)
- ILV (vesícula intraluminal)
- MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos)
- MHC (complejo mayor de histocompatibilidad)
- miRNA (microRNA)
- MV (microvesículas)
- MVE (cuerpo multivesicular)
- PI3K (fosfoinositol 3-quinasa)
- PKB (proteína quinasa B)
- PVDF (polifluoruro de vinilideno)
- qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real)
- RT-qPCR (qPCR de transcripción reversa)
- R3-IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina 1 recombinante)
- SD (desviación estándar)
- TA (temperatura ambiente)
- TEM (microscopía electrónica de transmisión)
- T_m (temperatura de melting)
- ucb-ECFCs (ECFCs procedentes sangre de cordón umbilical)
- VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular)

1. Resumen

Las vesículas extracelulares, que incluyen cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas, han suscitado un gran interés en los últimos años debido al papel que ejercen en la comunicación intercelular, tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Estas vesículas pueden modular diversas funciones biológicas mediante la transferencia de su contenido a células vecinas o distantes. Existen estudios que demuestran que los exosomas y microvesículas derivados de ECFCs pueden transmitir información a las células endoteliales, e inducir procesos pro- y antiangiogénicos *in vivo*. Por ello, el objetivo del presente Trabajo Fin de Grado ha sido aislar los exosomas derivados de ECFCs mediante tres métodos diferentes y analizar si existen diferencias en las poblaciones de exosomas que se obtienen. Asimismo, se ha pretendido estudiar si los niveles de oxígeno a los que se exponen las células alteran el contenido de los exosomas y microvesículas. Para ello, se analizó la morfología y tamaño de los exosomas aislados mediante TEM, se cuantificó la proteína total por Micro BCA y se estudió la presencia de marcadores exosomales (CD9, CD63 y CD81) mediante *Western Blot*. Además, se trataron de analizar mRNAs y miRNAs específicos mediante aislamiento de RNA y posterior RT-qPCR. A pesar de que en los exosomas aislados no se lograron detectar los marcadores exosomales ni analizar los perfiles de expresión de los miRNAs y mRNAs objeto de estudio debido a que existía limitación de muestra de partida, se observó que los niveles de expresión de las tetraspaninas CD9 y CD81, y de los miRNAs let-7b-5p, miR-126-3p, miR-99b-5p y miR-20b-5p en las microvesículas dependen de los niveles de O₂ a los que se cultivan las apb-ECFCs. Esto sugiere que las microvesículas aisladas podrían reflejar el estado de la célula en el momento de su biogénesis e incluso mediar acciones pro-angiogénicas.

Abstract

Extracellular vesicles, which include apoptotic bodies, microvesicles and exosomes, have attracted much attention in the past years due to the role they play in intercellular communication, both in physiological and pathological conditions. These vesicles can mediate diverse biological functions through the transfer of their content to neighboring or distant cells. Recent studies have demonstrated that both exosomes and microvesicles derived from ECFCs have the potential to deliver complex information to endothelial cells and to induce either pro- or antiangiogenic signaling *in vivo*. Therefore, the aim of this Final Degree Dissertation was to isolate ECFC-derived exosomes by three different methods and to analyze whether the exosomes showed differences. Likewise, it was intended to study whether the content of exosomes and microvesicles reflected the effects of cellular stress induced by different levels of oxygen. The morphology and size of isolated exosomes were analyzed by TEM, total protein was quantified by Micro BCA and the presence of exosomal markers (CD9, CD63 and CD81) was studied by *Western Blot*. In addition, specific mRNAs and miRNAs were analyzed by RNA isolation and subsequent RT-qPCR. CD9, CD63 and CD81 were not detected in isolated exosomes and the expression profiles of miRNAs and RNAs could not be analyzed in isolated exosomes either because there was not enough sample. However, the data obtained demonstrate that CD9, CD81 and miRNAs (let-7b-5p, miR-126-3p, miR-99b-5p and miR-20b-5p) levels in microvesicles secreted by apb-ECFCs vary depending on the concentration of oxygen to which the cells are exposed to. This suggests that the content of microvesicles could reflect the state of these cells at the time of microvesicles biogenesis and even induce pro-angiogenic processes.

2. Introducción

2.1. Vesículas extracelulares

El término de vesículas extracelulares abarca un grupo de estructuras membranosas muy heterogéneas tanto por su tamaño como por su biogénesis. Desde su descubrimiento hace 30 años, se ha demostrado que las vesículas extracelulares son producidas por una gran variedad de tipos celulares, tales como células sanguíneas, endoteliales y epiteliales, células del sistema nervioso, células madre adultas y embrionarias, e incluso células tumorales [1].

Las vesículas extracelulares generalmente se clasifican en tres categorías según su tamaño y origen: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas.

Los cuerpos apoptóticos se liberan exclusivamente durante los últimos pasos del proceso de apoptosis que sufren determinadas células en un tejido, y presentan un tamaño mayor que los exosomas y microvesículas (50-5000 nm) [2]. Las microvesículas se generan como resultado de evaginaciones de la membrana plasmática, por lo que su composición depende del tipo celular del que proceden, y tienen un diámetro de 100-1000 nm [2]. A diferencia de las microvesículas, los exosomas tienen un origen endosomal, presentan un tamaño menor (30-150 nm) [2] y una densidad entre 1,13-1,19 g/mL [3].

Inicialmente los exosomas se consideraron una vía de eliminación de proteínas, tales como el receptor de transferrina, durante la maduración eritroide (Johnstone *et al.*, 1983) [4]. Sin embargo, han suscitado un gran interés en los últimos años ya que, además de tener un papel importante en la comunicación intercelular, se ha visto que intervienen en procesos fisiológicos y patológicos. Éstos incluyen coagulación, angiogénesis, supervivencia celular, invasión tumoral, modulación de la respuesta inmune, inflamación, y presentación antigénica [3,4]. A modo de ejemplo, se ha visto que exosomas CD147⁺ procedentes de células epiteliales de cáncer de ovario promueven que las células endoteliales realicen la angiogénesis *in vitro* [5]. Además, otros estudios demuestran que los exosomas tienen una mayor capacidad de promover metástasis y angiogénesis cuando las células los liberan bajo condiciones restrictivas de oxígeno (hipoxia); condición muy común durante el desarrollo de los tumores [3].

Los exosomas son vesículas constituidas por una bicapa lipídica, que pueden transmitir señales biológicas reguladoras mediante la transferencia de proteínas de membrana y citosólicas, lípidos, mRNAs y miRNAs a células vecinas o distantes [4]. Numerosos estudios demuestran que su composición puede variar en función de la célula o tejido de origen, lo que les confiere una alta selectividad de interacción con la célula diana. Como resultado, los exosomas se han convertido en objeto de estudio para el desarrollo de numerosas aplicaciones clínicas.

2.1.1. Biogénesis de los exosomas

Las vías de biogénesis de los exosomas no se han descrito en su totalidad por el momento, pero la información disponible revela que la formación de los exosomas se produce dentro del compartimento endosomal de la célula, que consiste en un sistema de vesículas formado por pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática. Posteriormente, se generan unas vesículas intraluminales (ILVs) mediante invaginación de la membrana endosomal, pasando a denominarse cuerpos multivesiculares en este momento (MVEs).

El principal mecanismo de formación de ILVs es mediante la maquinaria del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT). Sin embargo, también existe una vía independiente de ESCRT, que incluye la acción de tetraspaninas y balsas lipídicas. Los cuerpos multivesiculares generados se pueden fusionar con los lisosomas para que se produzca la degradación de su contenido, o bien con la membrana plasmática de las células, para así liberar las ILVs que contienen al medio extracelular, donde se convierten en exosomas [3,5-7].

La liberación de los exosomas puede ser constitutiva o inducible en función del tipo celular y su estado de activación. Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras y las células epiteliales liberan exosomas de forma constitutiva [8]. Además, hay una serie de proteínas de la familia Rab que están implicadas en la secreción de los exosomas, como Rab27a y Rab27b [5,8].

Una vez liberados por las células, los exosomas se pueden detectar en la mayoría de los líquidos biológicos, incluyendo sangre (plasma y suero), orina, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido sinovial, leche materna y saliva, así como en el sobrenadante de cultivos celulares [3,4]. De esta manera, las vesículas circulantes actúan como mensajeros intercelulares, pues pueden ser captadas por las células receptoras independientemente de la distancia entre ellas.

2.1.2. Mecanismos de interacción entre exosomas y células diana

Los exosomas secretados por las células al medio extracelular pueden interaccionar con sus células diana mediante distintos mecanismos.

En primer lugar, los exosomas pueden liberar su contenido a través de diferentes tipos de endocitosis, como endocitosis dependiente de clatrina o de caveolina, endocitosis mediada por balsas lipídicas, fagocitosis y macropinocitosis. Otro de los mecanismos consiste en la fusión de la membrana de los exosomas con la membrana plasmática de las células, lo cual puede estar mediado por receptores específicos. Por último, también pueden interaccionar las proteínas transmembrana de los exosomas y sus correspondientes receptores presentes en la superficie de la célula diana, lo que provoca una cascada de señalización, similar al proceso que tiene lugar durante la presentación antigénica [7,8].

Cabe señalar que estos procesos pueden verse alterados en función de las condiciones del medio y del estado de la célula diana. A modo de ejemplo, las condiciones ácidas -características de los tejidos tumorales- promueven la absorción de los exosomas [8].

2.1.3. Propiedades moleculares de los exosomas

El contenido de los exosomas es significativamente diferente al presente en sus células parentales, lo cual sugiere que deben existir mecanismos específicos de selección de sus componentes. Aunque éstos siguen siendo desconocidos, algunos estudios indican que podría estar relacionado con la actividad del complejo ESCRT, o bien con la afinidad por lípidos o proteínas de membrana [8].

Atendiendo a estudios publicados en los últimos años, se ha detectado que los exosomas presentan una serie de características en común en cuanto a su composición. En general, la bicapa lipídica de los exosomas está enriquecida en colesterol, esfingomielina, fosfatidilserina y glicosfingolípidos, en comparación con la membrana de las células parentales [9].

Esta composición lipídica probablemente contribuye a la estabilidad que muestran los exosomas en los diferentes ambientes extracelulares, así como a la rigidez y elevada resistencia a los procesos de degradación, lo cual es fundamental para dirigirse específicamente a sus células diana y lograr una correcta biodistribución. Además, presentan baja inmunogenicidad debido a su origen endógeno, por lo que los exosomas muestran un gran potencial como vectores de fármacos [8,9].

Asimismo, los exosomas se caracterizan por presentar proteínas procedentes del citoesqueleto, citosol y membrana plasmática de las células, así como proteínas implicadas en el tráfico vesicular y de choque térmico; sin embargo, apenas se detectan proteínas procedentes de orgánulos intracelulares [9]. Entre las principales proteínas exosomales destacan las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), proteínas implicadas en la biogénesis multivesicular (Tsg101 y ALIX) y de choque térmico (Hsc70, Hsp90), proteínas de la familia Rab, proteínas 14-3-3 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [7,8,9]. A pesar de que las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 se emplean en investigación como marcadores de la presencia de exosomas, éstas se han detectado también en cuerpos apoptóticos y microvesículas, por lo que se requieren métodos más específicos para detectar poblaciones puras de exosomas [9].

Por otro lado, la presencia de RNA funcional en el interior de los exosomas fue descrita por primera vez en 2007 por Valadi *et al.*, quienes demostraron que los exosomas contienen mRNAs y miRNAs que son internalizados por las células receptoras, donde serán funcionales [10]. Existen estudios que indican que el perfil de RNAs de los exosomas es diferente al detectado en sus células parentales [4], pues se ha visto que la proporción de miRNAs es mayor en los exosomas que en sus células parentales [5], y que apenas se detecta rRNA 18S y 28S en los exosomas, a diferencia de lo que ocurre en las células [9]. Además, hay ciertos miRNAs que son selectivamente incorporados en los exosomas, lo que indica que las células presentan mecanismos responsables de seleccionar específicamente el contenido de los exosomas, como se ha indicado previamente [5,9].

Como resultado, existen bases de datos que recogen las moléculas y marcadores identificados en los exosomas, como Vesiclepedia (www.microvesicles.org), EVpedia (www.evpedia.info) y ExoCarta (www.exocarta.org) [9].

2.1.3.1. Papel de los RNAs en los exosomas

La presencia de RNA funcional en los exosomas constituye un nuevo mecanismo de intercambio de información genética entre las células que ha suscitado un gran interés en los últimos años.

Los miRNAs son un tipo RNA no codificante, de entre 17-24 nucleótidos, que modulan la expresión génica en una gran variedad de organismos eucariotas mediante la unión a regiones complementarias de sus mRNAs diana -normalmente en el extremo 3' UTR- [5]. De este modo, la transferencia de mRNAs y miRNAs mediante los exosomas y microvesículas liberados por las células puede alterar la expresión génica y regular los procesos biológicos de las células receptoras [4,11]. Estudios publicados por Mocharla *et al.* indicaron que las células madre CD34⁺ secretan microvesículas y exosomas con un alto contenido en miR-126-3p, que son captados por células endoteliales y promueven la angiogénesis en varios modelos *in vivo* [3,12].

Además, hay estudios que demuestran que los niveles de expresión de los mRNAs y miRNAs presentes en los exosomas pueden verse alterados ante diversas condiciones fisiológicas, jugando un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Por ejemplo, se ha visto que el contenido de mRNA difiere significativamente entre exosomas derivados de mastocitos cultivados bajo estrés oxidativo y en condiciones normales [9]. Asimismo, el contenido de los exosomas difiere entre pacientes enfermos y sujetos sanos. A modo de ejemplo, los niveles de let-7f y miR-20b son inferiores en las vesículas procedentes de plasma de pacientes con adenocarcinoma pulmonar que en las de sujetos sanos [5].

Por ello, se considera que el contenido de RNA (así como de proteínas) de los exosomas tiene un gran potencial para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades humanas de forma no invasiva [8]. Debido a este motivo, se han realizado estudios que tratan de caracterizar el perfil de RNA de los exosomas de plasma humano para buscar potenciales biomarcadores. En un estudio llevado a cabo por Huang *et al.* detectaron que uno de los miRNAs más comunes fue miR-99b-5p [4], el cual también se ha identificado en exosomas procedentes de orina humana junto a miR-126-3p, let-7b-5p y miR-20b-5p [11]. Esto sugiere que pueden tener un papel importante en diferentes funciones biológicas, tales como splicing de RNA, anomalías cromosómicas y angiogénesis.

Por tanto, los exosomas funcionan como sistemas dinámicos, capaces de adaptar su contenido en función del tipo celular y de la condición presente durante su biogénesis, por lo que logran llevar a cabo diferentes funciones.

2.2. Endotelio vascular. Células endoteliales y células progenitoras endoteliales

El endotelio vascular está constituido por células endoteliales, responsables de formar una monocapa que recubre la zona interna de todo el sistema vascular en contacto directo con el flujo sanguíneo. Aunque hasta hace pocos años se había considerado el endotelio como una simple barrera física que separa la sangre y los tejidos, actualmente se sabe que juega un papel fundamental en la homeostasis vascular, en el control del tono vascular, en la regeneración de tejidos, en la regulación de la respuesta inmunológica, la inflamación y la angiogénesis [13].

Entre los diversos aspectos de la biología vascular que regulan las células endoteliales, destaca el proceso denominado angiogénesis, que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red vascular preexistente para irrigar correctamente una zona, lo cual es crucial para la homeostasis vascular. De forma general, este proceso tiene lugar durante el crecimiento y desarrollo del organismo, así como en respuesta a lesiones para restaurar el suministro de sangre y promover la cicatrización de heridas. Se trata de un proceso estrictamente regulado por un balance entre señales estimuladoras e inhibitoras, de manera que anomalías en este balance provocan un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y es la principal causa de numerosas enfermedades, como cáncer, aterosclerosis, diabetes e isquemia [13,14].

Encontramos muchas moléculas que actúan como reguladores positivos de la angiogénesis, por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que desempeña un papel amplio en múltiples aspectos de la biología endotelial [15]. Recientemente, numerosos estudios apuntan a que los miRNAs modulan la señalización de VEGF; entre ellos, encontramos miR-126, let-7 y miR-20b [15,16,17].

MiR-126-3p, uno de los miRNAs que más expresan las células endoteliales, ejerce una acción pro-angiogénica, ya que inhibe los reguladores negativos de las rutas intracelulares MAPK y PI3K activadas por VEGF tras unirse a su receptor de membrana [16].

Asimismo, let-7 también regula el proceso de angiogénesis que llevan a cabo las células endoteliales. Un estudio reveló que las células endoteliales sometidas a hipoxia presentan altos niveles de let-7 debido a la acción del factor de transcripción HIF1 α , el cual es estable en condiciones restrictivas de oxígeno. Como consecuencia, let-7 actúa sobre su diana AGO1, por lo que deja de suprimirse la traducción del mRNA de VEGF y se promueve la angiogénesis inducida por hipoxia. Sin embargo, existen estudios que muestran resultados contradictorios, lo que refleja el complejo mecanismo de acción de let-7 en angiogénesis y la necesidad de realizar más estudios al respecto [17].

Por otro lado, miR-20b ejerce un efecto anti-angiogénico ya que reprime la expresión de VEGF. En estudios realizados con una línea celular de carcinoma nasofaríngeo humano sometida a hipoxia, se observó que HIF1 α reduce la expresión de miR-20b, aumentando así la expresión de VEGF en hipoxia para inducir el proceso de angiogénesis [16,18].

La razón por la que la hipoxia desencadena esta respuesta angiogénica sería para recuperar la normalidad del tejido isquémico. Es decir, se produce una remodelación del sistema vascular para que lleguen más vasos sanguíneos a aquella zona del organismo que no tiene suficiente aporte de oxígeno debido a una disminución del riego sanguíneo.

Cabe señalar que las células endoteliales, como células diferenciadas que son, presentan una capacidad proliferativa baja, por lo que tienden a extenderse antes que a aumentar su número. Esta capacidad se ve excepcionalmente reducida en algunos tejidos, por ejemplo, en el riñón, motivo por el cual son especialmente vulnerables a algunas patologías [19]. Sin embargo, en 1997, con el trabajo de Asahara *et al.* se dieron a conocer las células progenitoras endoteliales (EPCs), que son células procedentes de la médula ósea, que conservan su capacidad proliferativa ya que todavía no han completado su diferenciación a célula endotelial [14].

En la actualidad se reconoce que existe un nivel de heterogeneidad importante entre las células consideradas EPCs por distintos grupos de investigación, siendo las llamadas ECFCs (*endothelial colony forming cells*) aquellas que presentan unas características más genuinas asociadas células progenitoras [20]. Estas ECFCs parecen ser las células que confieren a los organismos adultos la capacidad de formar vasos sanguíneos *de novo*, proceso denominado vasculogénesis.

Debido a que las ECFCs tienen la capacidad de incorporarse al endotelio vascular y de participar estructuralmente en procesos angiogénicos en tejidos isquémicos, las ECFCs derivadas de sangre periférica humana o sangre de cordón umbilical se han considerado de potencial interés para el desarrollo de terapias celulares en diferentes patologías o para su aplicación en ingeniería de tejidos [21]. Por otra parte, las ECFCs también son capaces de secretar combinaciones de factores de crecimiento que provocan respuestas angiogénicas en las células receptoras [22].

Sin embargo, el uso directo de ECFCs presenta una serie de limitaciones asociadas al potencial rechazo inmunológico, variaciones cromosómicas, etc. [22] Por tanto, es necesario buscar nuevas estrategias que ejerzan los efectos terapéuticos de las ECFCs, evitando los riesgos asociados al uso directo de ellas.

2.3. Relación entre células progenitoras endoteliales tipo ECFC y exosomas

En los últimos años, numerosos estudios han señalado que, en los procesos de neovascularización mediados por ECFCs, la activación de las células endoteliales mediante mecanismos paracrinós podría ser más relevante que la diferenciación directa de las ECFCs y su incorporación al endotelio vascular. En concreto, se ha visto que parte de su actividad regenerativa parece estar mediada por exosomas o microvesículas que, como se ha descrito anteriormente, juegan un papel crucial en la comunicación intercelular mediante la transferencia de proteínas y material genético.

Existen varios estudios que demuestran su capacidad de estimular procesos angiogénicos [23,24,25,26]. Por ejemplo, los exosomas liberados por ECFCs pueden estimular la formación de vasos sanguíneos en las células endoteliales mediante transferencia horizontal de mRNA relacionado con la ruta intracelular PI3K/PKB, que está implicada en procesos angiogénicos y anti-apoptóticos. Además, se ha observado que los exosomas expresan moléculas de adhesión (ICAM-1, integrina $\alpha 4$, CD44, y CD29) características de las ECFCs de las que derivan, siendo algunas de ellas esenciales para la internalización de los exosomas (integrina $\alpha 4$ y CD29) [23].

Estudios realizados por Cantaluppi *et al.* señalan que los exosomas derivados de ECFCs previenen la lesión renal aguda en un modelo de rata con isquemia renal. Esta acción protectora desaparece al inhibir específicamente miR-126 y miR-296, lo que indica que dichos miRNAs contenidos en los exosomas contribuyen a reprogramar las células renales y ejercen un papel crítico en la angiogénesis [24], como se ha apuntado previamente. Asimismo, otros estudios realizados por el mismo grupo señalaron que dichos miRNAs -presentes en los exosomas liberados por ECFCs- también están implicados en procesos de neovascularización que limitan el daño muscular después de la isquemia arterial periférica [25] e incluso ejercen un importante papel en el trasplante de islotes pancreáticos en pacientes diabéticos [26]. Mientras que la eficacia de estos trasplantes a menudo está limitada por una deficiente vascularización de injerto, se ha visto que los exosomas derivados de ECFCs activan la angiogénesis en el endotelio de los islotes pancreáticos, mediado también por miR-126 y miR-296, por lo que dichos exosomas se consideran cruciales para la supervivencia de los islotes trasplantados [26].

Por tanto, los resultados apuntan a que el efecto protector que ejercen los exosomas procedentes de ECFCs en tejidos hipóxicos podría tener una potencial aplicación terapéutica. Asimismo, cabe señalar el importante papel del RNA presente en los exosomas, que actúan como un nuevo mecanismo de intercambio de información genética.

Un trabajo reciente indica que los exosomas derivados de ECFCs promueven la cicatrización cutánea en ratas diabéticas mediante un aumento de la neovascularización en los sitios de la herida. En este caso, los exosomas activan la ruta intracelular MAPK en las células endoteliales, estimulando así la expresión de moléculas con poder angiogénico [22].

En resumen, el creciente conocimiento de la función de los exosomas en procesos tan relevantes como la vascularización indica que los exosomas presentan funciones similares a las células de las que derivan, lo que ha puesto de manifiesto el potencial uso de éstos para el desarrollo de terapias pro- o anti-angiogénicas usadas para la regeneración de órganos o tratamientos de cáncer, respectivamente. No obstante, se requieren más estudios para comprender el mecanismo de acción de estas vesículas, así como la función de las moléculas presentes en ellas.

3. Hipótesis y objetivos del trabajo

La hipótesis de trabajo se basa en que la metodología de aislamiento de exosomas derivados de células progenitoras endoteliales tipo ECFC mantenidas *in vitro* puede dar lugar a diferencias en las poblaciones de exosomas que se obtienen, y el material transportado por dichos exosomas, así como por las microvesículas, puede ser distinto cualitativa y cuantitativamente según las condiciones de concentración de oxígeno a las que se encuentran expuestas las células.

Por ello, el presente trabajo ha pretendido comparar tres métodos de aislamiento de exosomas procedentes de células progenitoras endoteliales tipo ECFC cultivadas *in vitro* bajo diferentes niveles de oxígeno: normoxia e hipoxia (3% O₂).

Los objetivos y tareas concretas del trabajo han sido:

- Obtener los exosomas derivados de células progenitoras endoteliales tipo ECFC -procedentes de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica de donantes adultos- mediante tres métodos: columnas de exclusión por tamaño (Exo-spin™), precipitación con polímeros (reactivo de Invitrogen™) y ultracentrifugación.
- Analizar mediante TEM la morfología, tamaño y pureza de los exosomas aislados.
- Cuantificar la proteína total en exosomas, microvesículas y lisados celulares mediante Micro BCA y analizar la presencia de marcadores exosomales a través de *Western blot*.
- Analizar miRNAs específicos presentes en células endoteliales -varios de ellos implicados en la regulación de procesos angiogénicos-, así como la expresión de ciertos genes regulados por la disponibilidad de oxígeno, mediante aislamiento de RNA de exosomas y microvesículas y posterior RT-qPCR (retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real).
- Observar si existen diferencias en las poblaciones de exosomas y microvesículas derivadas de células ECFC cultivadas bajo diferentes niveles de oxígeno: normoxia e hipoxia (3% O₂).

Entre las tareas a desarrollar también se incluye una serie de experimentos para evaluar la capacidad proliferativa de las células ECFC cuando éstas se cultivan en medio EGM-2 MV suplementado con 5 % de FBS sin exosomas, lo cual se requiere previamente al aislamiento de exosomas.

4. Materiales y métodos

4.1. Cultivo de células progenitoras endoteliales tipo ECFC

4.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Las líneas de células progenitoras endoteliales tipo ECFC empleadas en este trabajo habían sido obtenidas previamente por el grupo a partir de muestras de sangre periférica de donantes adultos sanos, así como de sangre de cordón umbilical de recién nacidos sanos, pero no útil para trasplante. En ambos casos los procedimientos de obtención fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación Clínica de Aragón (CEICA). Estas células se aislaron conforme al protocolo publicado anteriormente por Hofmann *et al.* [27] y se criopreservaron en N₂ líquido (-196 °C) hasta su posterior uso.

Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² que presentaban la superficie recubierta con colágeno tipo I procedente de cola de rata (Becton-Dickinson), pues se ha visto que facilita la adhesión de las ECFCs, permitiendo así una mejor distribución de éstas y un crecimiento mantenido en el tiempo.

Para el cultivo de las células se empleó el medio EGM-2 MV (Endothelial Growth Medium 2 Microvascular, Lonza), que incluye medio basal suplementado con 5 % de FBS, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, y gentamicina y anfotericina para evitar la contaminación microbiana. La casa comercial también proporciona hidrocortisona como complemento; sin embargo, se ha visto que su presencia en el medio ralentiza ligeramente el crecimiento de las células procedentes de sangre de cordón umbilical. Por ello, dicho complemento solo se añadió para el cultivo de las células procedentes de donantes adultos, donde sí resulta beneficioso.

4.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Durante la expansión de las líneas celulares, los cambios de medio se llevaron a cabo cada dos días en una campana de flujo laminar vertical (Telstar), en condiciones de esterilidad. Cuando los cultivos alcanzaron niveles de confluencia superiores al 80 % (aproximadamente, cada 3-4 días), se realizaron subcultivos en nuevos frascos T75. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se añadió tripsina, que fue neutralizada con medio EGM-2 MV una vez levantadas las células. En función de la densidad celular determinada (*Apartado 4.1.3*), la suspensión celular obtenida se distribuyó en un número variable de frascos y se completó con medio de cultivo.

Las líneas celulares fueron cultivadas a 37 °C, en atmósfera saturada de humedad y con un aporte fijo de 5 % de CO₂ en un incubador termostatzado (Heraeus Hera Cell).

4.1.3. Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para determinar la densidad y viabilidad celular de los cultivos se empleó la tinción con Azul Trypan, colorante que penetra únicamente en las células que tienen dañada su membrana, proporcionándoles un color azul. De esta forma es posible diferenciar las células muertas de las vivas. Para realizar el contaje se empleó la cámara de Neubauer, donde se dispuso una mezcla en proporción 1:1 de Azul Trypan (Invitrogen™) y cultivo celular.

4.1.3. Congelación y descongelación de células

Para la congelación de stocks, las células se levantaron con tripsina y se centrifugaron a 250 xg durante 5 min a temperatura ambiente (TA) para eliminar el medio de cultivo. A continuación, las células se resuspendieron en FBS suplementado con 5 % de DMSO y se trasvasaron a viales de congelación. Éstos se introdujeron en un congelador a -80 °C y durante los días posteriores se transfirieron finalmente a contenedores de N₂ líquido (-196 °C).

En cuanto a la descongelación de las líneas celulares, el contenido de cada vial se descongeló tras sumergirlo brevemente en un baño termostatzado a 37 °C. Tras ello, la suspensión celular se trasvasó a frascos T75 donde previamente se había añadido medio EGM-2 MV, guardando una alícuota para determinar la densidad y viabilidad celular mediante tinción con azul Trypan.

4.1.4. Curvas de crecimiento de las líneas celulares

Uno de los objetivos fue comprobar si el medio EGM-2 MV suplementado con 5 % de FBS libre de exosomas (“medio sin exosomas”) alteraba la capacidad proliferativa de las células ECFC con respecto al medio suplementado con 5% de FBS completo (“medio referencia exosomas”). Esto resulta de gran importancia pues, antes de realizar el aislamiento de los exosomas, es necesario cultivar las células en “medio sin exosomas” para evitar la contaminación con aquellos que proceden del FBS. El FBS sin exosomas se preparó previamente mediante dos rondas de ultracentrifugación de 18 h a 120.000 xg y 4 °C, recogiendo el sobrenadante obtenido.

Los ensayos consistieron en curvas de crecimiento de 12 días de duración, realizadas en placas de 24 pocillos (P24) recubiertos con colágeno. Para cada línea celular se sembraron dos placas P24; una de ellas con “medio referencia exosomas” y la otra con “medio sin exosomas”.

El procedimiento llevado a cabo se basó en sembrar 4.350 células/pocillo, en el caso de la línea celular de adulto (apb-ECFCs), y 1.000 células/pocillo para la línea celular de cordón umbilical (ucb-ECFCs). Esta diferencia en el número inicial de células se debe a que las ucb-ECFCs mostraron una mayor capacidad proliferativa durante las expansiones celulares previas, de acuerdo con lo descrito previamente por Ingram *et al.* [28] Por tanto, se sembró un menor número de ucb-ECFCs para evitar que alcanzasen la confluencia durante el desarrollo del experimento. Las células de los pocillos se fijaron por triplicado a los siguientes tiempos: 1 hora, 24 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, 9 días y 12 días después de la siembra. Para ello, se empleó glutaraldehído diluido al 1% (10 min, 37 °C). Los cambios de medio se realizaron los días impares tras la siembra.

Tras fijar todos los pocillos de la placa, las células se tiñeron con cristal violeta diluido al 0,1 % y el exceso de colorante se lavó con agua, de modo que la cantidad que quedaba presente en el pocillo era proporcional al número de células vivas en el momento de realizar la fijación. Finalmente, el colorante se solubilizó mediante la adición de ácido acético al 10 %, se distribuyó el contenido de cada pocillo por duplicado en una microplaca de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 595 nm con el espectrofotómetro de placas Synergy HT (BioTek). La absorbancia determinada es proporcional al número de células vivas en el momento de la fijación.

Con estas medidas se calculó el número de duplicaciones de cada línea celular para los distintos medios (véase [Ec. 1]) y se representó el número de duplicaciones frente a los días transcurridos tras la siembra.

$$\text{Número de duplicaciones} = \text{Log}_2(\text{Absorbancia final}) - \text{Log}_2(\text{Absorbancia inicial}) \quad [\text{Ec. 1}]$$

4.2. Obtención de exosomas de células progenitoras endoteliales tipo ECFC

Previamente al aislamiento de exosomas fue necesario expandir las líneas celulares para adquirir un número de células suficiente para iniciar el experimento. Estas expansiones permitieron estimar el tiempo de duplicación de cada línea celular, lo que resultó de interés para decidir el número de células que se sembraban en cada uno de los 20 frascos T75 al comienzo del experimento. Las células se incubaron en dos condiciones distintas: 10 frascos T75 en normoxia y los otros 10 frascos en hipoxia 3 %.

Las células procedentes de sangre de cordón umbilical se cultivaron en “medio referencia exosomas” durante 24 horas para que se expandiesen. Posteriormente, se cambió a “medio sin exosomas” con el fin de que las células se adaptasen a él durante 14 horas, periodo tras el cual se recambió el medio. Después de 48 horas en cultivo, se recogió dicho medio para el aislamiento de los exosomas y microvesículas.

Con respecto a la línea celular de adulto, se introdujeron una serie de cambios en el procedimiento de obtención de exosomas, como se detalla en el *Apartado 5.2.2*. Esta línea celular se cultivó inicialmente en “medio referencia exosomas” para que se expandiese. Tras 44 horas de cultivo, se cambió a medio EGM-2 MV suplementado, en este caso, con 2,5 % de FBS libre de exosomas para que las células se adaptasen a dicho medio durante 44 horas. Finalmente, se empleó medio Opti-MEM con 0,5 % de FBS libre de exosomas, y se incubó durante 48 horas hasta su recogida para el aislamiento de los exosomas y microvesículas.

Para ambas líneas celulares, el medio de cultivo recogido se centrifugó a 300 xg (10 min, 4 °C) para precipitar los restos celulares y cuerpos apoptóticos presentes; tras ello, el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 10.000 xg (30 min, 4 °C), generándose un pellet con las microvesículas precipitadas. Dicho pellet se resuspendió en PBS y se conservó alicuotado en el congelador a -80 °C. El sobrenadante obtenido se pasó a través de filtros de 0,22 µm para eliminar todas aquellas vesículas y fragmentos de mayor tamaño.

El medio filtrado se destinó a tres técnicas de aislamiento de exosomas diferentes con el objetivo de establecer una comparación entre ellas. Los volúmenes empleados en cada técnica variaron en función de la línea celular (véase *Tabla 1*), como se describe en el *Apartado 5.2.2*.

Tabla 1. Volumen de medio filtrado (mL) destinado a cada método de aislamiento de exosomas en función de la línea celular de origen.

Sobrenadante (mL)	Método		
	<i>Exo-spin</i> TM	<i>Invitrogen</i> TM	<i>Ultracentrifugación</i>
ucb-ECFCs	30	10	44
apb-ECFCs	25	7,5	60

4.2.1. Cromatografía de exclusión por tamaño (*Exo-spin*TM)

La cromatografía de exclusión por tamaño es una técnica que permite separar las moléculas presentes en una muestra según su tamaño. Se realiza en columnas cilíndricas rellenas con geles poliméricos entrecruzados (*cross-linked*), que están constituidos por partículas porosas de tamaño uniforme. Grubisic *et al.* demostraron una correlación entre el volumen de elución y el radio hidrodinámico de las moléculas: las moléculas que presentan un mayor radio quedan excluidas de los poros y son las primeras que eluyen en el volumen muerto, mientras que aquellas que presentan un menor radio son las que más difunden en la estructura del poro y las últimas en eluirse [29].

Como paso previo al aislamiento de exosomas mediante esta técnica, el medio procedente de ucb-ECFCs se concentró hasta un volumen inferior a 500 µL con filtros Amicon Ultra-15 con un corte de peso molecular de 10 kDa (Merck Millipore); para ello, se centrifugó a 3000 xg, 4 °C en tramos de 5 min. Posteriormente, las columnas de exclusión por tamaño de *Exo-spin*TM Cat EX01 (Cell Guidance Systems) se equilibraron con PBS, se aplicaron 100 µL del medio concentrado a cada columna y se centrifugó a 50 xg durante 1 min.

Después, se descartó el eluido y se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones. En este caso, el eluido debería tener los exosomas. Tras juntar los eluidos obtenidos de varias columnas y concentrarlos con filtros Amicon, los exosomas se resuspendieron en 440 μ L de PBS.

Por otro lado, el medio procedente de apb-ECFCs se concentró con filtros Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) con mayor corte de peso molecular (100 kDa). Las columnas de exclusión por tamaño que se emplearon en este caso (Exo-spin™ Cat EX04, Cell Guidance Systems) presentaban una mayor longitud y diámetro, mejorándose así la resolución y capacidad de la columna, respectivamente [28]. Finalmente, los exosomas se resuspendieron en 400 μ L de PBS.

4.2.2. Precipitación con polímeros (reactivo de Invitrogen™)

El reactivo de Invitrogen™ (Life Technologies) consiste en una solución polimérica que permite el aislamiento de exosomas mediante precipitación, de forma rápida y sin necesidad de un equipamiento especializado [29].

Para ello, se añadieron 0,5 volúmenes del reactivo de Invitrogen al medio de cultivo filtrado, y se incubaron las muestras a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugaron a 10.000 xg (1 h, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con los exosomas en 200 μ L de PBS, tanto en el caso del medio procedente de ucb-ECFCs como de apb-ECFCs.

4.2.3. Ultracentrifugación

La ultracentrifugación se basa en aplicar una fuerza centrífuga a una mezcla de macromoléculas en solución, de modo que aquellas que son más densas sedimentan [29]. A pesar de que es considerada la técnica convencional empleada para el aislamiento de exosomas, la baja reproducibilidad que presenta, así como la necesidad de un equipamiento especializado han motivado la búsqueda de nuevas estrategias para la obtención de exosomas, como las descritas anteriormente.

El medio de cultivo se trasvasó a tubos de ultracentrífuga para realizar la centrifugación a 120.000 xg durante 70 min y a 4 °C (Rotor TH-641, ultracentrífuga Sorvall™ WX 100 de Thermo Fisher Scientific); tras ello, se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con PBS y se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Los pellets de exosomas procedentes de la línea celular de cordón y de adulto se resuspendieron en 600 y 200 μ L de PBS, respectivamente.

Los exosomas aislados mediante las tres técnicas previamente descritas se conservaron convenientemente alicuotados en el congelador a -80 °C hasta su posterior caracterización.

4.3. Caracterización de exosomas aislados de células progenitoras endoteliales tipo ECFC

4.3.1. Análisis de exosomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras de exosomas se observaron con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010 del Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos (Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza). Las imágenes se tomaron a 60.000x, 120.000x y 250.000x, lo que permitió comparar la morfología de los exosomas, así como la pureza de las muestras. Además, las micrografías se analizaron con el programa ImageJ para estimar el diámetro de los exosomas.

4.3.2. Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Micro BCA

La cuantificación de proteínas de los exosomas y microvesículas se realizó con el kit Micro BCA (Thermo Scientific™), una adaptación del kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific™) que está optimizado para cuantificar proteínas totales de muestras diluidas (12,5-200 µg/mL).

Este método emplea el ácido bicinconínico (BCA), reactivo capaz de unirse al ión Cu^{1+} producido tras reducirse el ión Cu^{2+} por la presencia de proteínas en medio alcalino. El complejo BCA- Cu^{1+} generado adquiere un color púrpura, cuya absorbancia puede determinarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 562 nm mediante NanoDrop (Thermo Scientific™) tras 1 hora de incubación a 60 °C. Dicha absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución, y puede ser estimada realizándose una recta de calibrado con un stock de BSA. Una de las ventajas de este método es la posibilidad de emplear volúmenes mínimos de muestra, pues únicamente se requieren 1,5 µL.

También se determinó la cantidad de proteína procedente de las células de las que se aislaron los exosomas (en este caso, mediante el ensayo de BCA convencional). Para la extracción de las proteínas celulares se empleó el buffer RIPA (Sigma-Aldrich), que permite una lisis celular y solubilización proteica eficientes, y se siguió el procedimiento establecido por el fabricante. Cabe señalar que todas las medidas de proteínas se realizaron por triplicado.

4.3.3. Análisis de la expresión de marcadores exosomales por *Western Blot*

Tras realizar la cuantificación proteica, las muestras de exosomas aislados por las tres técnicas, así como las muestras de microvesículas y de lisados celulares procedentes de apb-ECFCs se analizaron mediante *Western Blot* para detectar la expresión de las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81. Estas proteínas se consideran marcadores exosomales y se emplean para su caracterización, como se ha indicado en el *Apartado 2.1.3*. Las muestras obtenidas de ucb-ECFCs no se analizaron mediante *Western Blot*, por motivos que se describen en el *Apartado 5.2.3*.

Para ello, las muestras se mezclaron en proporción 1:1 en volumen con tampón de carga y se sometieron a 100 °C durante 5 min. Se cargó la máxima cantidad posible de proteína en los geles de electroforesis SDS-PAGE preparados 12 %; en concreto, 0,4 µg de exosomas obtenidos por ultracentrifugación, 1-4 µg de exosomas aislados por Exo-spin, 4-6 µg de exosomas obtenidos con Invitrogen, 2-3 µg de microvesículas y 18 µg de lisado celular. Además, se incluyó un marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ PageRuler Plus Prestained Protein Ladder). Las proteínas separadas mediante electroforesis se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Santa Cruz Biotechnology) y las posiciones no ocupadas de la membrana se bloquearon con una solución de leche desnatada al 5 % en PBS 0,2% Tween-20 (tampón de bloqueo) durante 1 hora.

Después de una serie de lavados con PBS 0,2 % Tween-20 (tampón A), cada membrana se incubó con un anticuerpo primario específico dirigido frente a la proteína a analizar, diluido 1:2.000 en una solución de leche desnatada al 0,2 % en PBS 0,2 % Tween-20 (tampón B). La incubación se realizó a 4°C en agitación durante la noche. Posteriormente, se realizaron lavados con tampón A, seguido de la incubación con su correspondiente anticuerpo secundario -diluido 1:20.000 en tampón B- durante una hora a TA y en agitación. Dicho anticuerpo secundario está conjugado con peroxidasa de rábano para la posterior detección de las bandas de proteínas mediante quimioluminiscencia, para lo cual se empleó el kit ECL Pierce™ (Thermo Scientific™).

Después, las membranas se incubaron con un anticuerpo primario dirigido frente a la proteína β -actina -que actúa como control de carga- diluido 1:1.000, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Las referencias comerciales de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la caracterización de exosomas por *Western Blot* se recogen en el *Anexo I y II*, respectivamente.

4.3.4. Aislamiento de mRNA y miRNA de exosomas y microvesículas

Para el aislamiento de mRNA y miRNA de los exosomas y microvesículas derivados de ucb-ECFCs y apb-ECFCs se empleó el kit RNAzol RT (Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones del fabricante (*véase Anexo III*).

Debido a que no hay transcritos de referencia aceptados de manera general para normalizar la expresión de los miRNAs, previamente a la extracción, se agregó una cantidad conocida (spike-in) del miRNA cel-miR-39 (Norgen Biotek) para normalizar la expresión de los miRNAs diana de estudio al realizar la RT-qPCR por la variabilidad introducida durante el proceso de aislamiento.

La cantidad total de ácidos nucleicos, así como su pureza, se cuantificaron con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 1000 mediante medida de absorbancia a 260 nm y ratio de absorbancia 260/280 nm, respectivamente (*Resultados no mostrados*).

4.3.5. Obtención de cDNA a partir de mRNA y detección mediante RT-qPCR

Se realizó la retrotranscripción de todo el mRNA extraído de los exosomas y microvesículas derivados de ucb-ECFCs (30-332 ng) y apb-ECFCs (56-220 ng), utilizando para ello la transcriptasa reversa Superscript IV (Invitrogen™). Para iniciar la síntesis del cDNA, se hizo uso de hexámeros aleatorios, así como de una mezcla de dNTPs. Una vez realizada la retrotranscripción, el cDNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso para llevar a cabo la PCR a tiempo real.

La RT-qPCR es una técnica que permite la cuantificación de patrones de expresión génica en diferentes situaciones biológicas. Se basa en el uso de fluorocromos que emiten una cantidad de fluorescencia cuantificable y proporcional a la cantidad de producto de PCR en la reacción, la cual dependerá de la cantidad inicial de cDNA de la muestra. Esta señal se midió con el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems).

En este caso, se ha pretendido analizar los cambios de expresión debidos a las condiciones normoxia e hipoxia 3 %, teniendo en cuenta las tres técnicas empleadas para el aislamiento de los exosomas de ucb-ECFCs y apb-ECFCs; o bien, en su defecto, realizar un análisis cualitativo de la presencia de determinados mRNAs, tanto en exosomas como en microvesículas. Los genes diana de estudio fueron HIF1 α y GLUT1, pues se ha descrito que, cuando las ECFCs se encuentran en condiciones restrictivas de O₂, HIF1 α se estabiliza y actúa como factor de transcripción de diversos genes (entre ellos, GLUT1) [30]. Como gen de referencia se empleó ACTB.

Las condiciones de RT-qPCR seguidas aparecen recogidas en la *Tabla 2*. El reactivo SYBR Green ReadyMix (ThermoFisher) contiene todos los componentes restantes necesarios, entre ellos, SYBR Green, un fluorocromo intercalante que se une al surco menor del DNA de doble cadena. La secuencia de cada pareja de *primers* se indica en el *ANEXO IV*, los cuales fueron diseñados previamente por el grupo. Cabe señalar que se dispuso la máxima cantidad posible de cDNA para cada pareja de muestras obtenidas por el mismo método (normoxia-hipoxia).

Tabla 2. Condiciones de la reacción de RT-qPCR de los genes analizados en exosomas y MVs

Programa de un ciclo de PCR			Condiciones de la reacción de PCR
	Temperatura	Segundos	
x1	95 °C	600	7,5 µL SYBR Green ReadyMix (2X)
			0,45 µL <i>forward primer</i> (10 µM)
x40	95 °C	15	0,45 µL <i>reverse primer</i> (10 µM)
	60 °C	60	1,6 µL H ₂ O libre de nucleasas
	95 °C	15	Hasta 5 µL cDNA
x1	95	15	Volumen total = 15 µL

4.3.6. Obtención de cDNA a partir de microRNA y detección mediante RT-qPCR

Los miRNAs presentan pequeño tamaño y carecen de cola poly (A), por lo que resulta difícil utilizar los métodos tradicionales de retrotranscripción (hexámeros aleatorios, oligo dT). A pesar de estas limitaciones, la compañía Sigma-Aldrich comercializa el kit MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix, que contiene los componentes necesarios para la retrotranscripción de miRNAs.

En primer lugar, con la enzima poly (A) polimerasa se realizó la poliadenilación de los miRNAs extraídos de los exosomas y microvesículas de ucb-ECFCs (460-4870 ng) y apb-ECFCs (125-3970 ng). Tras ello, se añadió la transcriptasa reversa ReadyScript™ y el oligo dT que incluye el kit, entre otros reactivos, para que se sintetizase el cDNA. El oligo dT lleva una cola de nucleótidos adicionales, que incorpora una secuencia única en el extremo 5' del producto obtenido en la retrotranscripción a partir del sustrato poliadenilado. Esta secuencia permite la unión de un *Primer Universal* (MystiCq, Sigma-Aldrich) en la amplificación del cDNA mediante RT-qPCR.

Para cuantificar la expresión de determinados miRNAs, o bien simplemente detectar su presencia, se usó de nuevo la RT-qPCR utilizando un *Primer Universal* y un *Primer Específico* por cada especie de miRNA a analizar, cuyas referencias se indican en el Anexo V. Los miRNAs objeto de estudio fueron let-7b-5p, miR-126-3p, miR-99b-5p y miR-20b-5p, pues se ha descrito su expresión en células endoteliales y, además, su implicación en la regulación de procesos angiogénicos -excepto para miR-99b-5p- (véase *Apartado 2.1.3.1. y 2.2.*) [18,31]. En este caso, también se dispuso la máxima cantidad posible de cDNA para cada pareja de muestras obtenidas por el mismo método (normoxia-hipoxia), y se realizó una cuantificación relativa gracias al uso de cel-miR-39. Las condiciones de la reacción de RT-qPCR se recogen en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de RT-qPCR de los miRNAs estudiados en exosomas y MVs

Programa de un ciclo de PCR			Condiciones de la reacción de PCR
	Temperatura	Segundos	
x1	95 °C	120	12,5 µL SYBR qPCR Green ReadyMix (2X)
			0,5 µL <i>Primer Específico</i> (10 µM)
x40	95 °C	5	0,5 µL <i>Primer Universal</i> (10 µM)
			Hasta 11,5 µL cDNA
	60 °C	30	Volumen total = 25 µL

Se incorporaron controles negativos para comprobar que los componentes de la reacción no estaban contaminados. Las eficacias de las reacciones de amplificación se comprobaron utilizando el programa LinRegPCR y los resultados de cuantificación obtenidos se trataron estadísticamente con el método descrito por Pfaffl [32]. Asimismo, se analizaron las T_m para confirmar la especificidad de las reacciones de amplificación llevadas a cabo por duplicado.

5. Resultados y discusión

5.1. Curvas de crecimiento de las líneas celulares

En la *Figura 1* se muestran las curvas de crecimiento obtenidas, en las que se observa un crecimiento celular típico, con una primera fase de latencia, seguida de una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria, pudiéndose apreciar incluso la fase de muerte celular en la *Figura 1 ucb-ECFCs*, que se debe a que las células alcanzan la confluencia, de modo que no disponen de superficie para adherirse y continuar proliferando.

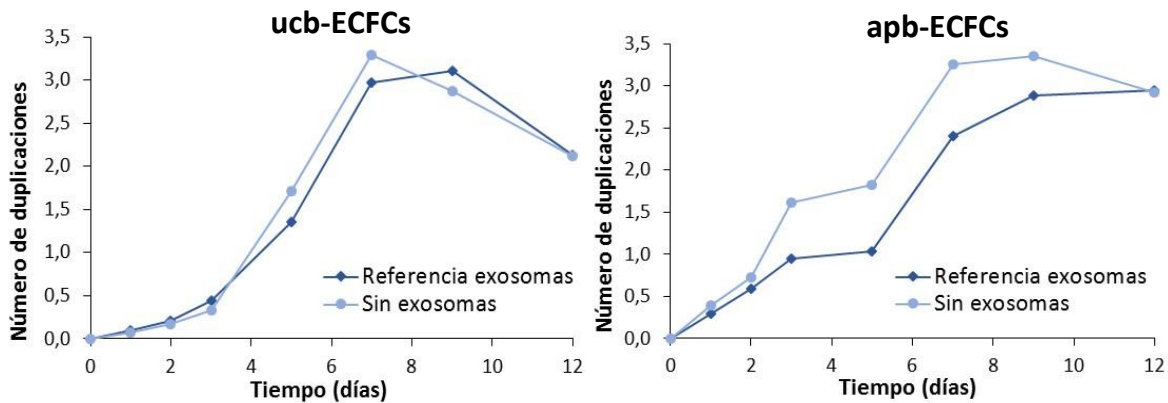


Figura 1. Curvas de crecimiento de ucb-ECFCs en fase 5 y apb-ECFCs en fase 2. Se muestra el número de duplicaciones frente al tiempo (días), diferenciándose una curva para las células cultivadas en medio "referencia exosomas" y otra para aquellas cultivadas en medio "sin exosomas".

Las curvas de crecimiento de apb-ECFCs siguen una tendencia similar, sin apenas detectarse diferencias significativas en su evolución. Esto mismo puede apreciarse en las curvas de crecimiento de ucb-ECFCs, donde la ausencia de exosomas procedentes del FBS parece no alterar el crecimiento de dichas células. Por tanto, se puede concluir que la capacidad proliferativa de ambas líneas celulares no se ve afectada por el empleo de medio sin exosomas.

5.2. Caracterización de los exosomas aislados a partir de células progenitoras endoteliales tipo ECFC

5.2.1. Análisis de exosomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Como se puede observar en la *Tabla 4*, los exosomas aislados con los métodos Exo-spin e Invitrogen presentan un tamaño promedio que se encuentra dentro del rango descrito en la literatura (30-150 nm) [2]. Además, no se detectan diferencias significativas motivadas por el método de aislamiento de exosomas empleado (Exo-spin e Invitrogen), ni por la condición en la que se cultivaron las células ucb-ECFCs y apb-ECFCs (normoxia e hipoxia 3%).

Tabla 4. Diámetro (nm) de los exosomas de ucb-ECFCs y de apb-ECFCs, en función de la condición y metodología. Se indica media \pm SD de las 100 medidas realizadas de cada muestra con ImageJ.

ucb-ECFCs			apb-ECFCs		
Condición	Método		Condición	Método	
	Exo-spin	Invitrogen		Exo-spin	Invitrogen
Normoxia	35,0 \pm 5,82	28,4 \pm 4,39	Normoxia	31,8 \pm 6,06	33,5 \pm 10,73
Hipoxia 3%	30,9 \pm 5,33	36,5 \pm 21,70	Hipoxia 3%	39,5 \pm 16,92	35,4 \pm 10,77

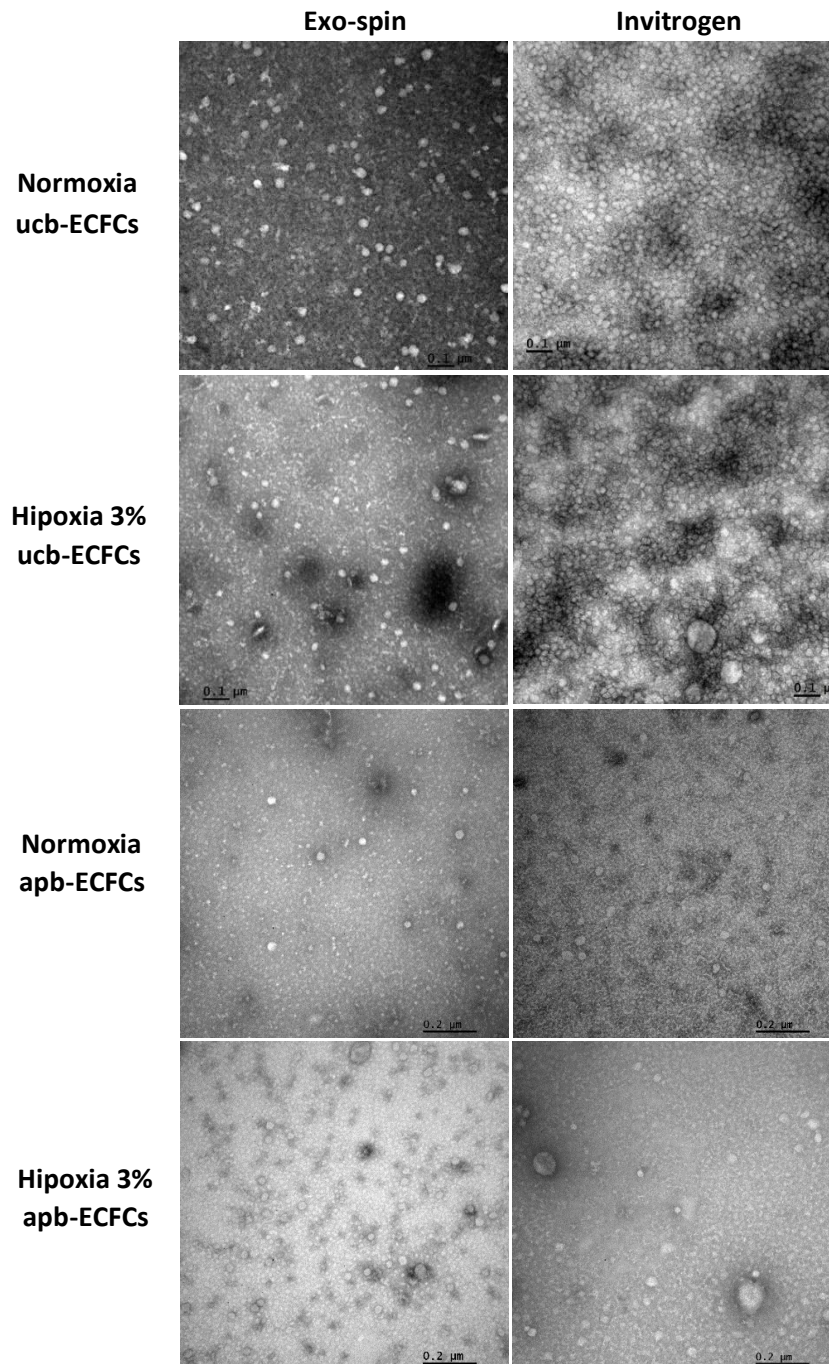


Figura 2. Visualización mediante TEM de los exosomas derivados de ucb-ECFCs y apb-ECFCs, en función de la condición experimental y metodología. Se muestran micrografías a 120.000x.

Los exosomas aislados mediante ultracentrifugación apenas se han logrado identificar por TEM (*Resultados no mostrados*), por lo que su tamaño promedio no ha podido estimarse.

Atendiendo a las micrografías mostradas en la *Figura 2*, los exosomas presentan un aspecto redondeado de acuerdo con lo descrito en la literatura [3]. Si se establece una comparación entre las micrografías de los exosomas derivados de ucb-ECFCs y apb-ECFCs, se intuye un cierto ruido de fondo enmascarando los exosomas de ucb-ECFCs, lo que ha de deberse a la presencia de contaminantes derivados de dichas muestras. Sin embargo, este ruido de fondo apenas se detecta en las muestras de exosomas de apb-ECFCs. Esto podría explicarse por los cambios puntuales que se introdujeron en la metodología de aislamiento de los exosomas de apb-ECFCs.

5.2.2. Cuantificación proteica mediante ensayo de Micro BCA

En las *Tablas 5 y 6* se recogen los resultados de cuantificación de la proteína total presente en las muestras de exosomas y microvesículas derivadas de ucb-ECFCs y apb-ECFCs, lo que proporciona una estimación de la cantidad de vesículas extracelulares secretadas por las células.

Estableciendo una comparación entre los resultados obtenidos para ucb-ECFCs y apb-ECFCs, se aprecia que el rendimiento de proteína determinada en función del medio empleado es notablemente menor en los exosomas derivados de apb-ECFCs, lo que sugiere que los cambios introducidos en la metodología de aislamiento han reducido el arrastre de otros componentes no exosomales, como se ha señalado en el *Apartado 5.2.1*.

Tabla 5. Cuantificación de proteína total (μg) en exosomas y MVs procedentes de ucb-ECFCs en fase 6. Se relaciona la proteína (μg) determinada en exosomas y el medio de cultivo empleado (mL) para cada técnica, así como la proteína (μg) estimada en MVs y el medio de cultivo inicial (100 mL).

ucb-ECFCs			
Muestras	Condición	Proteína total (μg)	Proteína obtenida (μg) / medio empleado (mL)
Exo-spin	N	2122,5	70,8
	H	2941,9	98,1
Invitrogen	N	351,7	35,2
	H	297,8	29,8
Microvesículas	N	22,6	0,2
	H	25,5	0,3

Tabla 6. Cuantificación de proteína total (μg) en exosomas y MVs de apb-ECFCs en fase 4. Se relaciona la proteína (μg) determinada en exosomas y el medio de cultivo empleado (mL) en cada técnica, así como la proteína (μg) estimada en MVs y el medio de cultivo inicial (100 mL).

apb-ECFCs			
Muestras	Condición	Proteína total (μg)	Proteína obtenida (μg) / medio empleado (mL)
Exo-spin	N	106,2	4,3
	H	26,0	1,0
Invitrogen	N	88,1	11,8
	H	62,5	8,3
Ultracentrifugación	N	3,8	0,1
	H	6,4	0,1
Microvesículas	N	75,2	0,8
	H	119,8	1,2

Mientras que el medio de cultivo de apb-ECFCs se concentró con filtros Amicon Ultra-15 con un corte de peso molecular de 100 kDa, el medio procedente de ucb-ECFCs se trató con filtros Amicon Ultra-15 con un corte de 10 kDa. Teniendo en cuenta que la mayoría de las proteínas más abundantes del FBS tienen un peso molecular mayor a 10 kDa, junto con los exosomas derivados de ucb-ECFCs, se habrían retenido proteínas procedentes del 5 % de FBS sin exosomas que presentaba el medio de recogida de exosomas, como albúmina, globulinas, y lipoproteínas. Sin embargo, las proteínas más abundantes del FBS, como la albúmina (≈ 60 kDa), no se habrían concentrado con los filtros empleados para el medio procedente de apb-ECFCs.

Además, las columnas de Exo-spin utilizadas para el aislamiento de exosomas de ucb-ECFCs presentan una menor capacidad y resolución que las empleadas para apb-ECFCs, por lo que podría haber ocurrido que en el primer eluido no se hayan conseguido eliminar todas las proteínas retenidas durante la concentración, apareciendo éstas en el segundo eluido junto con los exosomas. Esto explicaría que se haya estimado una cantidad de proteína considerablemente superior con la técnica de Exo-spin en ucb-ECFCs que en apb-ECFCs.

Con respecto al reactivo precipitante de Invitrogen, numerosos estudios descritos en la literatura han demostrado que esta técnica puede coprecipitar otros componentes no exosomales, incluyendo lipoproteínas (HDLs y LDLs), que son las principales partículas lipídicas presentes en el suero [29]. Por ello, para estimar la cantidad de componentes proteicos procedentes del FBS que coprecipitan con los exosomas, se trató con el reactivo de Invitrogen el medio suplementado con 5 % de FBS sin exosomas, obteniéndose 27 µg de proteína/mL de medio. Por tanto, una parte importante de la proteína cuantificada en las muestras de exosomas de ucb-ECFCs aislados por este método (véase *Tabla 5*) podría deberse a otros componentes no exosomales procedentes del FBS. Sin embargo, el aislamiento de los exosomas derivados de apb-ECFCs se realizó cultivando las células en medio OptiMEM suplementado únicamente con 0,5 % de FBS libre de exosomas, para así disminuir el arrastre de proteínas procedentes del FBS. Esto explica que se haya determinado menor cantidad de proteína en las muestras de exosomas de apb-ECFCs aislados por esta Invitrogen. Cabe señalar que se utilizó el medio Opti-MEM ya que es un medio esencial mínimo mejorado que permite una reducción de la suplementación de FBS sin ningún cambio en la tasa de crecimiento o la morfología de las células, como se ha visto en estudios previos realizados por el grupo.

A diferencia de lo ocurrido en el aislamiento de exosomas de ucb-ECFCs, sí que se ha logrado cuantificar la proteína presente en los exosomas derivados de apb-ECFCs obtenidos por ultracentrifugación. No obstante, a pesar de que en este caso se empleó un mayor volumen de medio para el aislamiento por dicha técnica (véase *Tabla 1*), la cantidad de proteína estimada en los exosomas es muy baja y éstos apenas pueden visualizarse mediante TEM, como se ha citado en el *Apartado 5.2.1*. Esto sugiere que para el aislamiento de exosomas derivados de ECFCs mediante ultracentrifugación se requieren grandes volúmenes de medio de cultivo debido al bajo rendimiento que presenta esta técnica.

5.2.3. Identificación de marcadores clásicos de exosomas mediante *Western Blot*

Teniendo en cuenta los resultados de cuantificación de proteínas descritos en el *Apartado 5.2.2*, únicamente se analizaron mediante *Western Blot* las muestras procedentes de apb-ECFCs (véase *Figura 3*), ya que mostraban un menor grado de contaminación que los exosomas de ucb-ECFCs.

Tomando la proteína β -actina como referencia, se detecta que CD9 se expresa 2,6 veces más en el lisado celular de hipoxia que en el de normoxia. Asimismo, se identifica CD9 en las microvesículas procedentes de apb-ECFCs cultivadas en hipoxia. Sin embargo, no se aprecia en las microvesículas de apb-ECFCs sometidas a normoxia, ni en ninguno de los carriles correspondientes a los exosomas aislados por las diferentes técnicas -en los que tampoco se detecta β -actina-.

Con respecto a CD81, se estima que esta tetraspanina se expresa 1,2 veces más en el lisado celular de normoxia que en el de hipoxia y 4,7 veces más en las microvesículas derivadas de apb-ECFCs cultivadas en normoxia que en las que proceden de apb-ECFCs mantenidas en hipoxia. En este caso, sí que se aprecia una tenue banda en el carril correspondiente a los exosomas obtenidos mediante la técnica de Exo-spin, tanto en normoxia como en hipoxia. Sin embargo, puesto que no se identifica β -actina en los exosomas, no se puede comparar el nivel de expresión de CD81 en función de la condición experimental.

A diferencia de lo que ocurre con CD9 y CD81, la tetraspanina CD63 no se logra detectar en ninguna de las muestras derivadas de apb-ECFCs (*Resultados no mostrados*).

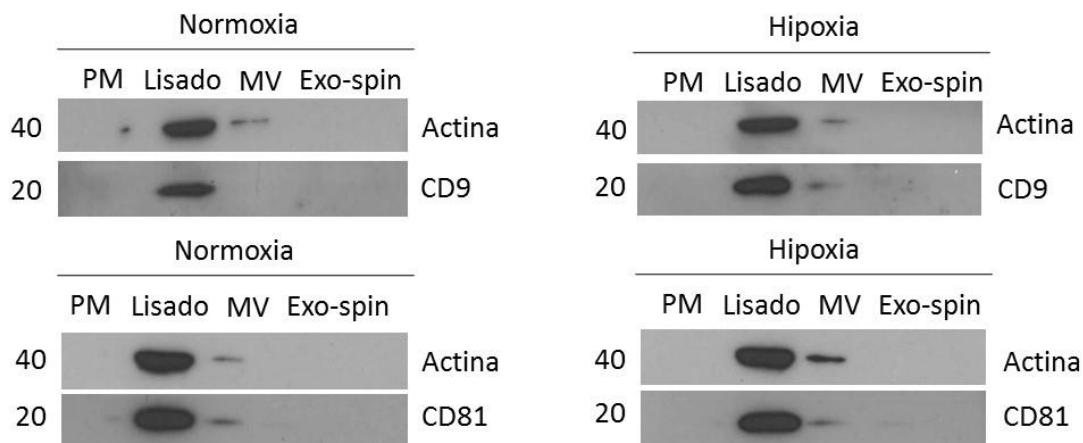


Figura 3. Análisis mediante Western Blot de CD9 y CD81 (≈ 20 kDa), así como de β -actina (≈ 40 kDa). Se muestran los carriles relativos al marcador de peso molecular (PM), lisado celular, microvesículas (MV) y exosomas aislados por Exo-spin, en normoxia e hipoxia. En los carriles de exosomas aislados por Invitrogen y ultracentrifugación no se detectó ninguna banda (*Resultados no mostrados*).

A la vista de los resultados, se observa que la concentración de oxígeno a la que se cultivan las apb-ECFCs influye en la expresión de la tetraspaninas CD9 y CD81. En concreto, los resultados apuntan a que los niveles de expresión de estas tetraspaninas siguen una misma tendencia en lisado celular y microvesículas en función de la condición experimental (normoxia/hipoxia) pues, como se ha descrito previamente, CD81 se expresa más tanto en las microvesículas como en el lisado celular de apb-ECFCs cultivadas en hipoxia. Esto podría deberse a que el mecanismo de biogénesis de las microvesículas consiste en evaginaciones de la membrana plasmática [2], por lo que es de esperar que microvesículas y lisado celular presenten una tendencia similar en los niveles de expresión de tetraspaninas -que son proteínas presentes en la membrana celular-.

Estableciendo una relación entre la biogénesis de los exosomas y los resultados obtenidos, la presencia de CD9 y CD81 en el lisado celular, del cual se cargó una elevada cantidad de proteína, sugiere que quizás se estén detectando los exosomas previamente a su liberación al medio extracelular -cuando se encuentran confinados en los cuerpos multivesiculares-.

A pesar de que CD9 y CD81 se consideran marcadores clásicos de exosomas, estudios previos descritos en la literatura también los han identificado en microvesículas [9,33], de acuerdo con lo obtenido en estos experimentos. No obstante, en este caso no se han logrado detectar en las muestras de exosomas -salvo en los exosomas aislados mediante Exo-spin, donde se aprecia una tenue banda-.

Dado que en los geles de electroforesis se cargó una mayor cantidad de proteína de las muestras de exosomas obtenidos por Invitrogen que de microvesículas, y solo se logran identificar CD9 y CD81 en microvesículas, estos resultados sugieren que la proteína total determinada en las muestras de exosomas aislados por Invitrogen no sería una estimación fiable de la proteína exosomal presente. Es decir, el método precipitante de Invitrogen podría haber coprecipitado otros componentes no exosomales, como se ha descrito en el *Apartado 5.2.2*, de modo que la cuantificación de proteínas realizada estaría sobreestimada, y la cantidad de proteína de origen exosomal cargada habría sido insuficiente para lograr su detección mediante *Western Blot*.

Con respecto a los exosomas aislados mediante ultracentrifugación, esta técnica presenta un bajo rendimiento como se ha apuntado previamente (*véase Apartado 5.2.2.*), de modo que no se puede caracterizar la presencia de proteínas específicas porque existe limitación de muestra.

5.2.4. Niveles de expresión de mRNA y miRNA en exosomas y microvesículas

Los resultados mostrados en la *Figura 4* indican que los miRNAs let-7b-5p, miR-126-3p, miR-99b-5p y miR-20b-5p muestran mayores niveles de expresión en las microvesículas liberadas por apb-ECFCs sometidas a hipoxia 3% que las derivadas de apb-ECFCs cultivadas en normoxia, indicando que el material transportado por las microvesículas puede ser distinto cuantitativamente en función de los niveles de oxígeno a los que se exponen las células.

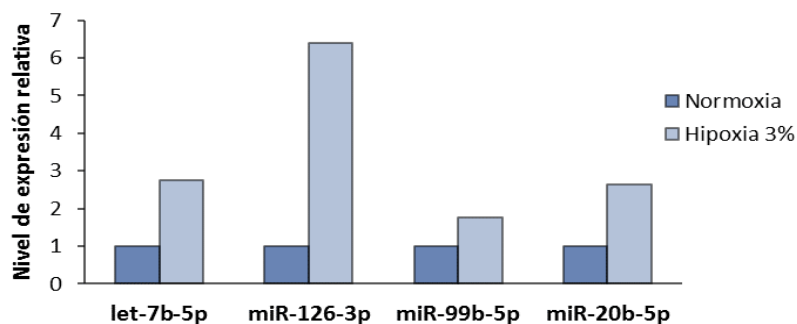


Figura 4. Perfil de expresión relativa de los miRNAs objeto de estudio en las microvesículas procedentes de apb-ECFCs. La expresión génica fue determinada mediante RT-qPCR.

Ciertos estudios de la literatura indican que las células endoteliales sometidas a hipoxia presentan altos niveles de let-7, promoviendo así procesos de angiogénesis [17,34]. De este modo, los niveles de expresión de let-7b-5p en las microvesículas podrían reflejar el contenido de las células de las que proceden, que varía según los niveles de oxígeno a los que se cultivan. Asimismo, numerosos estudios demuestran que la presencia de miR-126-3p en las microvesículas ejerce un papel crítico en la angiogénesis -proceso que tiene lugar para recuperar la normalidad de tejidos isquémicos-. Por ello, la presencia de mayores niveles de expresión de miR-126-3p en las microvesículas de apb-ECFCs cultivadas en hipoxia podría servir como un mecanismo de comunicación de señales de estrés, activando procesos angiogénicos en las células receptoras para recuperar la normalidad de los tejidos.

Por otro lado, estudios previos realizados en una línea celular de carcinoma nasofaríngeo humano apuntan a que miR-20b-5p presenta menores niveles de expresión en hipoxia que en normoxia [16,18], en contraposición a los resultados obtenidos en las microvesículas derivadas de apb-ECFCs. Esto sugiere que las rutas implicadas en la regulación de los miRNAs son muy complejas, pudiendo variar en función el tipo celular.

En cuanto a miR-99b-5p, aunque hasta la fecha no se ha descrito su implicación en procesos angiogénicos, sí se ha detectado en células endoteliales [31], de manera que su presencia en las microvesículas podría reflejar el tipo celular del que proceden.

Con respecto al resto de reacciones de RT-qPCR llevadas a cabo para analizar la presencia de miRNAs y mRNAs en exosomas y microvesículas, se obtuvieron valores C_T (del inglés *cycle threshold*) en el límite de considerarse experimentalmente válidos. La estimación de valores C_T elevados incrementa la incertidumbre de la técnica, e implica cuantificación dudosa. Por ello, en este caso, se ha tratado de realizar un análisis cualitativo de la presencia de los mRNAs y miRNAs a estudiar, que aparece recogido en la *Tabla 7*. Los criterios seguidos para que se considere reacción positiva son, por un lado, calidad de los duplicados y, por otro lado, consistencia en las curvas de melting para confirmar que las reacciones de amplificación han sido específicas y que se trata de un producto único. Se consideran reacciones negativas aquellas que no cumplen estos criterios, y reacciones dudosas cuando solo los cumple uno de los duplicados.

Comparando los resultados obtenidos a nivel cualitativo, se ha logrado mejor grado de detección en los exosomas y microvesículas procedentes de apb-ECFCs que en los derivados de ucb-ECFCs. Por tanto, todos los resultados coinciden en que los cambios introducidos en la metodología de aislamiento han mejorado la calidad de las muestras. No obstante, tanto la caracterización de los exosomas por *Western Blot* como por RT-qPCR indican que existe limitación de muestra, de modo que habría sido necesario emplear un mayor volumen de medio de cultivo inicialmente.

Tabla 7. Análisis cualitativo de los resultados obtenidos por RT-qPCR. Se indica si la reacción es positiva (+), dudosa (¿?) o negativa (-) para cada uno de los miRNAs y mRNAs objeto de estudio en función del origen de la muestra (ucb-ECFCs o apb-ECFCs) y la condición (N-normoxia, H-hipoxia).

	Muestra	Let-7b	miR-126	miR-99b	miR-20b	ACTB	HIF1A	GLUT1
ucb-ECFCs	N	Exo-spin	+	+	¿?	¿?	-	-
		Invitrogen	-	¿?	-	-	-	-
		Ultra	+	+	¿?	-	-	-
		MV	+	¿?	¿?	-	-	-
	H	Exo-spin	+	+	-	¿?	-	-
		Invitrogen	+	+	¿?	-	-	-
		Ultra	-	-	-	¿?	-	-
		MV	+	¿?	+	¿?	-	-
apb-ECFCs	N	Exo-spin	-	+	-	-	+	-
		Invitrogen	¿?	+	-	-	+	-
		Ultra	¿?	+	-	¿?	-	-
		MV	+	+	+	+	+	-
	H	Exo-spin	+	-	+	+	-	-
		Invitrogen	+	+	+	+	-	-
		Ultra	+	¿?	¿?	¿?	-	-
		MV	+	+	+	+	+	-

En definitiva, entre las metodologías de aislamiento de exosomas comparadas en esta primera aproximación experimental llevada a cabo por el grupo, podríamos destacar las columnas de Exo-spin Cat EX04 -aquellas que presentan mayor longitud y tamaño-, pues los resultados obtenidos apuntan a que es la técnica que presenta mejores rendimientos, evitando la coprecipitación de otros componentes no exosomales -como ocurre con el reactivo de Invitrogen-. Sin embargo, es necesario el empleo de mayor cantidad de material de partida.

6. Conclusiones

Una vez analizados los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- 1- La capacidad proliferativa de las líneas celulares apb-ECFCs y ucb-ECFCs no se ve alterada por el empleo de medio EGM-2 MV suplementado con 5 % de FBS libre de exosomas.
- 2- A excepción de los exosomas aislados mediante ultracentrifugación, que apenas se lograron identificar por TEM, el tamaño y la morfología de los exosomas parecen no verse alterados por la metodología empleada, ni por los niveles de O₂ a los que se cultivaron las células.
- 3- El aislamiento de exosomas derivados de ECFCs por ultracentrifugación requiere grandes volúmenes de medio de cultivo (>60 mL) debido al bajo rendimiento que presenta la técnica.
- 4- Aunque los cambios introducidos en la metodología de aislamiento de los exosomas de apb-ECFCs redujeron de forma significativa la presencia de componentes no exosomales, las cuantificaciones de proteínas realizadas no se consideran una estimación fiable de la proteína exosomal presente en las muestras de Invitrogen.
- 5- Las cuantificaciones de proteínas de las muestras de MVs parecen ser más fiables que las de exosomas, ya que en el pellet de 10.000xg no hay contaminación por proteínas.
- 6- Los exosomas aislados por las tres técnicas no se han logrado caracterizar mediante *Western Blot* y RT-qPCR, indicando que existe limitación de muestra.
- 7- Los niveles de O₂ a los que se cultivan las apb-ECFCs modulan la expresión de las tetraspaninas CD9 y CD81, y de los miRNAs let-7b-5p, miR-126-3p, miR-99b-5p y miR-20b-5p en las microvesículas, lo que sugiere que podrían reflejar el estado de la célula en el momento de su biogénesis e incluso mediar acciones pro-angiogénicas.

Conclusions

Once the results obtained in this work have been analysed, we could conclude the following:

- 1- EGM-2 MV medium supplemented with 5% exosome-depleted FBS doesn't disrupt the proliferative capacity of apb-ECFCs and ucb-ECFCs in culture.
- 2- Except for exosomes isolated by ultracentrifugation, which were barely detected by TEM, the size and morphology of exosomes seem not to be altered by the methodology used, nor by the concentration of oxygen to which the cells are exposed to.
- 3- Isolation of ECFCs-derived exosomes by ultracentrifugation requires large volumes of culture medium (>60 mL) due to the poor yield of the technique.
- 4- Although non-exosomal contaminants were significantly reduced by the modifications introduced into the methods for isolation of apb-ECFCs-derived exosomes, protein quantifications of Invitrogen samples are not a reliable estimation of exosomal proteins.
- 5- Protein quantifications of MVs samples seem to be more reliable than those of exosome samples, since there are no protein contaminants in the 10.000 xg pellet.
- 6- Exosomes isolated by the three methods could not be characterized by *Western Blot* and RT-qPCR, indicating that there is not enough sample.
- 7- CD9, CD81 and miRNAs (let-7b-5p, miR-126-3p, miR-99b-5p and miR-20b-5p) levels in microvesicles secreted by apb-ECFCs vary depending on the concentration of oxygen to which the cells are exposed to. This suggests that the content of microvesicles could reflect the state of these cells at the time of microvesicles biogenesis and even induce pro-angiogenic processes.

7. Bibliografía

- [1] Rovira J, Diekmann F, Campistol JM, Ramírez-Bajo MJ. Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica. *Nefrología*. 2017 Mar 1;37(2):126–37.
- [2] Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb 6;17(2):170.
- [3] Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):676–705.
- [4] Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2013 May 10;14:319.
- [5] Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Feb;13(1):17–24.
- [6] Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev*. 2013 Jan;27(1):31–9.
- [7] Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ Res*. 2017 May 12;120(10):1658–73.
- [8] Aryani A, Denecke B. Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine? *Mol Neurobiol*. 2016 Mar;53(2):818–34.
- [9] Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 May 14;4.
- [10] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654–9.
- [11] Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, Coleman BM, Hill AF. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int*. 2014 Aug;86(2):433–44.
- [12] Mocharla P, Briand S, Giannotti G, Dörries C, Jakob P, Paneni F, et al. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34+ and CD14+ PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood*. 2013 Jan 3;121(1):226–36.
- [13] Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*. 2013 Nov 9;9(10):1057–69.
- [14] Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ Res*. 2017 May 12;120(10):1658–73.
- [15] Dang LTH, Lawson ND, Fish JE. MicroRNA control of Vegf signalling output during vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Feb;33(2):193–200.
- [16] van Beijnum JR, Giovannetti E, Poel D, Nowak-Sliwinska P, Griffioen AW. miRNAs: micro-managers of anticancer combination therapies. *Angiogenesis*. 2017;20(2):269–85.
- [17] Bao M-H, Feng X, Zhang Y-W, Lou X-Y, Cheng Y, Zhou H-H. Let-7 in Cardiovascular Diseases, Heart Development and Cardiovascular Differentiation from Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 21;14(11):23086–102.
- [18] Cao Y, Zhang P-Y. miRNAs in vascular integrity. *Exp Ther Med*. 2017 Jul;14(1):473–7.
- [19] Basile DP, Zeng P, Friedrich JL, Leonard EC, Yoder MC. Low proliferative potential and impaired angiogenesis of cultured rat kidney endothelial cells. *Microcirculation*. 2012 Oct;19(7):598–609.

- [20] Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical re-evaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012 Feb 17;110(4):624–37.
- [21] Mund JA, Ingram DA, Yoder MC, Case J. Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies. *Cytotherapy*. 2009 Jan 1;11(2):103–13.
- [22] Zhang J, Chen C, Hu B, Niu X, Liu X, Zhang G, et al. Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1/2 Signaling. *Int J Biol Sci*. 2016 Nov 25;12(12):1472–87.
- [23] Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440–8.
- [24] Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int*. 2012 Aug;82(4):412–27.
- [25] Ranghino A, Cantaluppi V, Grange C, Vitillo L, Fop F, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles improve neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012 Mar;25(1):75–85.
- [26] Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, Beltramo S, Medica D, Deregibus MC, et al. Microvesicles Derived from Endothelial Progenitor Cells Enhance Neoangiogenesis of Human Pancreatic Islets. *Cell Transplant*. 2012 Jun 1;21(6):1305–20.
- [27] Hofmann NA, Reinisch A, Strunk D. Isolation and Large Scale Expansion of Adult Human Endothelial Colony Forming Progenitor Cells. *J Vis Exp*. 2009 Oct 28;(32).
- [28] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2752–60.
- [29] Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods*. 2015 Oct 1;87:3–10.
- [30] Abaci HE, Truitt R, Luong E, Drazer G, Gerecht S. Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Jun;298(6):C1527–37.
- [31] Suárez Y, Sessa WC. microRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res*. 2009 Feb 27;104(4):442–54.
- [32] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45–e45.
- [33] Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *PNAS*. 2016 Feb 23;113(8):E968–77.
- [34] Chen Z, Lai T-C, Jan Y-H, Lin F-M, Wang W-C, Xiao H, et al. Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *J Clin Invest*. 2013 Mar 1;123(3):1057–67.

Anexos

Obtención y caracterización de exosomas de células progenitoras endoteliales

- **Anexo I:** *Anticuerpos primarios utilizados en el análisis de exosomas, microvesículas y lisado celular mediante Western Blot.*
- **ANEXO II:** *Anticuerpos secundarios utilizados en el análisis de exosomas, microvesículas y lisado celular mediante Western Blot.*
- **ANEXO III:** *Protocolo seguido para el aislamiento de mRNA y miRNA de exosomas y microvesículas derivados de células progenitoras endoteliales tipo ECFC.*
- **ANEXO IV:** *Secuencias de los primers utilizados para la amplificación génica mediante RT-qPCR de las muestras de cDNA procedentes de los exosomas liberados por ucb-ECFCs y apb-ECFCs*
- **ANEXO V:** *Referencia de los primers específicos utilizados para la amplificación génica mediante RT-qPCR del cDNA procedente de los exosomas liberados por ucb-ECFCs y apb-ECFCs.*

ANEXO I: Anticuerpos primarios utilizados en el análisis de exosomas, microvesículas y lisado celular mediante Western Blot.

Anticuerpo	Tipo y especie	Referencia comercial
CD9	IgG1 monoclonal de ratón	Cell Guidance Systems
CD63	IgG1 monoclonal de ratón	Cell Guidance Systems
CD81	IgG1 monoclonal de ratón	Cell Guidance Systems
β-actina	IgG policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology

ANEXO II: Anticuerpos secundarios utilizados en el análisis de exosomas, microvesículas y lisado celular mediante Western Blot.

Anticuerpo	Referencia comercial
Goat anti-mouse IgG-HRP	Invitrogen
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology

ANEXO III: Protocolo seguido para el aislamiento de mRNA y miRNA de exosomas y microvesículas derivados de células progenitoras endoteliales tipo ECFC.

Para el lisado de los exosomas se añadió 1 mL de RNazol® RT (Sigma-Aldrich) por 400 µL de muestra, suplementando con agua libre de RNasas para alcanzar dicho volumen en caso de que fuese necesario. A continuación, se agregaron 99 fmol del microRNA cel-miR-39 (Norgen Biotek), así como 400 µL de agua libre de RNasas por mL de RNazol® RT empleado. Tras agitar con vórtex y dejar estabilizar a TA durante 10 min, las muestras se centrifugaron a 12.000 xg (15 min, 4 °C). Como resultado, se obtuvo un pellet semisólido -compuesto por DNA, proteínas y polisacáridos- y un sobrenadante con el RNA de interés, que se transfirió a un tubo Eppendorf.

Posteriormente, se adicionaron 400 µL de etanol 75% para precipitar el mRNA. Tras 10 min a TA, las muestras se centrifugaron a 12.000 xg (8 min, 4 °C), obteniéndose un pellet blanco -apenas detectable- que contenía principalmente mRNA. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y, tras ello, se añadieron 0,8 volúmenes de isopropanol 100% con el fin de aislar miRNAs. A continuación, se dejó estabilizar a 4 °C durante 30 min y se centrifugó a 12.000 xg (15 min, 4 °C), de modo que el miRNA precipitado formó un pellet blanco apenas detectable.

Una vez obtenidos los pellets de mRNA y miRNA, la superficie de éstos se lavó dos veces con 400 µL de etanol 75% y 400 µL de isopropanol 70%, respectivamente, y se centrifugó a 8.000 xg (3 min, TA). El objetivo de ello fue eliminar principalmente las sales que pudieran quedar presentes.

Tras descartar el sobrenadante con micropipeta, los pellets de mRNA y miRNA se resuspendieron en 15 µL y 10,5 µL de agua libre de RNasa, respectivamente. La cantidad total de ácidos nucleicos, así como su pureza, se cuantificaron con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 1000 mediante medida de absorbancia a 260 nm y ratio de absorbancia 260/280 nm, respectivamente

ANEXO IV: Secuencias de los primers utilizados para la amplificación génica mediante RT-qPCR de las muestras de cDNA procedentes de los exosomas liberados por ucb-ECFCs y apb-ECFCs. Se indican los nombres de los genes humanos estudiados, así como las secuencias de los primers diseñados (Fw: primer forward; Rv: primer reverse).

Gen humano	Secuencias primers
HIF1A	Fw: 5' - GCA CTA GAC AAA GTT CAC CTG AGC CT -3' Rv: 5' - TGG GTT CTT TGC TTC TGT GTC TTC AG -3'
ACTB	Fw: 5' - CCC TGG CAC CCA GCA C -3' Rv: 5' - GCC GAT CCA CAC GGA GTA C -3'
GLUT1	Fw: 5' - TCT TCA GCC AGG GTC CAC GTC -3' Rv: 5' - CGT AGG GAC CAC ACA GTT GCT C -3'

ANEXO V: Referencia de los primers específicos utilizados para la amplificación génica mediante RT-qPCR del cDNA procedente de los exosomas liberados por ucb-ECFCs y apb-ECFCs. Se indican los nombres de los miRNAs estudiados, así como la identificación (ID) de la casa comercial (Sigma-Aldrich).

miRNA	ID
hsa-let-7b-5p	MIRAP00004
hsa-miR-126-3p	MIRAP00141
hsa-miR-99b-5p	MIRAP00116
hsa-miR-20b-5p	MIRAP00045