

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Caracterización de vesículas extracelulares tipo exosomas con marcador VEGF en un modelo de cáncer de mama**

**Jorge Luis Molina Bejarano**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia

2024

# **Caracterización de vesículas extracelulares tipo exosomas con marcador VEGF en un modelo de cáncer de mama**

**Jorge Luis Molina Bejarano**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias - Bioquímica**

Directora:

Yadi Adriana Umaña Pérez

Química M.Sc. Doctor en Ciencias

Línea de Investigación:

Factores de crecimiento, diferenciación y cáncer

Grupo de Investigación en Hormonas – GIH

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2024

*A mi familia, por todo su amor y apoyo incondicional.*

*A mi amor bonito, porque contigo el límite es la siguiente meta.*

*A mi yo del pasado, porque lo merecemos.*

*“Silencia tu ego y tu poder surgirá” D.S.*

## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Jorge Luis Molina Bejarano  
CC 1018453231

Fecha 30/01/2024

## **Agradecimientos**

Agradezco al laboratorio de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de Salud y en su representación, al Doctor Luis Alberto Gómez-Grosso por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la pasantía de investigación, una etapa crucial en el desarrollo de mi trabajo de grado. Agradezco especialmente a la Doctora Susana Novoa Herrán por su papel fundamental como mi mentora en el ámbito científico, así como por ser un referente tanto profesional como personal.

A la profesora Adriana Umaña, directora del Grupo de Investigación en Hormonas de la Universidad Nacional, por haberme acogido y por proporcionarme valioso conocimiento y apoyo durante mi proceso de formación en investigación. A mis compañeros del grupo: Erika Díaz, Laura Fernández, Juan José Castro y Valentina Guevara, quienes de diversas maneras contribuyeron en el desarrollo de mi proyecto.

A Dios, mi familia, pareja y amigos porque desde su presencia, compañía y apoyo resignificaron este proceso.

## Resumen

### **Caracterización de vesículas extracelulares de tipo exosomas con marcador VEGF en un modelo de cáncer de mama**

Los exosomas, un tipo de vesícula extracelular, emergen en condiciones fisiológicas y patológicas como en el cáncer de mama, desempeñando un papel clave en la comunicación intercelular dentro y fuera del microambiente tumoral. Para comprender su función es esencial realizar la caracterización física y molecular de su composición, así como establecer sus interacciones en contextos biológicos.

En este trabajo, se obtuvieron exosomas provenientes del cultivo *in vitro* de la línea celular de cáncer de mama MCF7. En condiciones de normoxia, se evaluaron dos métodos comerciales, uno basado en cromatografía de exclusión por tamaño y otro en filtración dirigida. Los exosomas purificados se compararon con los obtenidos mediante el método tradicional de ultracentrifugación diferencial, y la cromatografía de exclusión por tamaño se seleccionó como el método con mayor rendimiento, economía y accesibilidad para la purificación de exosomas.

Posteriormente, se obtuvieron exosomas de la misma línea celular en condiciones de hipoxia mimética inducida por cloruro de cobalto, observando una disminución tanto en la producción como en el tamaño de los exosomas comparados a la condición de normoxia, sumado a una mayor producción de VEGF, aunque no estuvo asociado directamente a los exosomas. Finalmente, se observó que los exosomas producidos en hipoxia mimética favorecen la migración en células MCF7 y promueven características específicas en la formación de tubos en la angiogénesis inducida sobre células HUVEC.

**Palabras clave:** Cromatografía de exclusión por tamaño, ultracentrifugación diferencial, hipoxia, angiogénesis, factor de crecimiento vascular-endotelial.

## Abstract

### **Characterization of exosome-like extracellular vesicles with VEGF marker in a breast cancer model**

Exosomes, a type of extracellular vesicle, arise in physiological and pathological conditions, such as breast cancer. They play a crucial role in intercellular communication within and outside the tumor microenvironment. To comprehend their function, it is essential to conduct a physical and molecular characterization of their composition and establish their interactions in biological contexts.

In this work, exosomes were obtained from in vitro culture of the MCF7 breast cancer cell line. Under normoxic conditions, two commercial methods were evaluated, one based on size exclusion chromatography and the other on targeted filtration. Purified exosomes were compared with those obtained through the traditional method of differential ultracentrifugation, and size exclusion chromatography was chosen as the most economical and accessible method for exosome purification.

Subsequently, exosomes were produced by the same cell line under conditions of mimetic hypoxia induced by cobalt chloride, showing a decrease in the production and size of exosomes compared to normoxia. Additionally, it was identified that VEGF was produced in higher concentrations under hypoxic conditions, although it was not associated with exosomes. Finally, it was observed that exosomes produced under mimetic hypoxia promote migration in MCF7 cells and promote specific characteristics in tube formation in angiogenesis induced in HUVEC cells.

**Keywords:** Size exclusion chromatography, differential ultracentrifugation, hypoxia, angiogenesis, vascular-endothelial growth factor.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Estado del Arte .....</b>	<b>5</b>
1.1 Vesículas extracelulares.....	5
1.2 Exosomas y ambiente tumoral .....	7
1.3 Caracterización de exosomas .....	8
1.4 VEGF y angiogénesis.....	12
1.5 Exosomas como vehículos.....	15
<b>2. Justificación .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
4.1 Objetivo General .....	21
4.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>5. Vesículas extracelulares provenientes de la línea celular MCF7 .....</b>	<b>23</b>
5.1 Caracterización de vesículas extracelulares.....	27
5.2 Materiales y métodos .....	29
5.2.1 Cultivo celular y tratamientos .....	29
5.2.2 Pretratamiento de medio condicionado .....	30
5.2.3 Ultracentrifugación.....	30
5.2.4 Cromatografía por exclusión de tamaño .....	31
5.2.5 Filtración dirigida.....	31
5.2.6 Cuantificación de proteína .....	32
5.2.7 Identificación de marcadores exosomales .....	32
5.2.8 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).....	33
5.3 Resultados y discusión.....	34
<b>6. Exosomas y condiciones de hipoxia .....</b>	<b>49</b>
6.1 Inducción de hipoxia.....	49



XII Caracterización de vesículas extracelulares tipo exosomas con marcador VEGF  
en un modelo de cáncer de mama

---

6.2	Factor de crecimiento vascular endotelial-VEGF .....	52
6.3	Materiales y métodos .....	54
6.3.1	Inducción de HIF por CoCl <sub>2</sub> .....	54
6.3.2	qPCR .....	54
6.3.3	Purificación y lisis de vesículas extracelulares .....	55
6.3.4	Identificación de VEGF .....	55
6.4	Resultados y discusión .....	55
<b>7.</b>	<b>Efecto de exosomas en el microambiente tumoral .....</b>	<b>61</b>
7.1	Proliferación y metástasis .....	62
7.2	Angiogénesis .....	64
7.3	Materiales y métodos .....	65
7.3.1	Ensayo de migración celular.....	65
7.3.2	Ensayo de formación de tubos .....	66
7.4	Resultados y discusión .....	67
7.5	Recomendaciones .....	76
7.6	Perspectivas .....	76
<b>8.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>Producción .....</b>	<b>79</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo: Ensayo de cierre de herida.....</b>	<b>81</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>83</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1</b> Registro de publicaciones con terminología asociada a "Vesículas extracelulares".....	6
<b>Figura 1-2</b> Sugerencias de retenciones y adiciones a la MISEV 2018 dadas por la comunidad ISEV.....	7
<b>Figura 1-3</b> Comparación metodológica para el estudio de vesículas extracelulares .....	10
<b>Figura 1-4</b> Reportes asociados a exosomas en el portal EV-TRACK.....	12
<b>Figura 1-5</b> Inducción de señales pro angiogénicas por las isoformas de VEGF .....	13
<b>Figura 1-6</b> Proceso de angiogénesis tumoral mediado por VEGF y FGF-2.....	14
<b>Figura 5-1</b> Biogénesis de exosomas.....	25
<b>Figura 5-2</b> Propuesta para la clasificación de exosomas .....	26
<b>Figura 5-3</b> Etapas para el estudio de vesículas extracelulares .....	29
<b>Figura 5-4</b> Esquema de cultivo in vitro de la línea celular MCF7.....	30
<b>Figura 5-5</b> Micrografía del cultivo celular de MCF7 en condiciones de cultivo .....	34
<b>Figura 5-6</b> Reporte de muerte por apoptosis y necrosis en cultivo de células MCF-7 ....	35
<b>Figura 5-7</b> Perfil de elución de proteína usando la columna qEV Original Gen 2 35nm y 70nm .....	37
<b>Figura 5-8</b> Esquema general para el uso de PureExo Exosome Isolation Kit.....	38
<b>Figura 5-9</b> Abundancia de proteína para las fracciones obtenidas usando el kit PureExo 101Bio .....	39
<b>Figura 5-10</b> Esquema para la purificación de exosomas por medio de ultracentrifugación diferencial.....	40
<b>Figura 5-11</b> Abundancia de proteína en las fracciones obtenidas a través de la ultracentrifugación diferencial .....	41
<b>Figura 5-12</b> Identificación de marcadores proteicos exosomales .....	43
<b>Figura 5-13</b> Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) para las fracciones purificadas con qEV .....	44
<b>Figura 5-14</b> Comparativos de proteína y NTA en vesículas extracelulares purificadas por los métodos probados .....	46
<b>Figura 5-15</b> Distribución de vesículas producidas por células de la línea MCF7 .....	47
<b>Figura 6-1</b> Exosomas y su relación con el microambiente tumoral de hipoxia .....	50
<b>Figura 6-2</b> Activación de señal angiogénica mediada por HIF .....	51
<b>Figura 6-3</b> Inhibidores de VEGF y VEGF-R como terapia anti-angiogénica .....	53
<b>Figura 6-4</b> Expresión de genes inducidos por CoCl <sub>2</sub> en la línea celular MCF7.....	56

<b>Figura 6-5</b> Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) para las fracciones purificadas en condiciones de normoxia e hipoxia .....	57
<b>Figura 6-6</b> Comparación de concentración de proteína en exosomas producidos en diferentes condiciones .....	59
<b>Figura 7-1</b> Interacciones de las células presentes en el microambiente tumoral mediadas por exosomas .....	62
<b>Figura 7-2</b> Procesos metabólicos y progresión tumoral mediada por exosomas .....	63
<b>Figura 7-3</b> Esquema del proceso angiogénico tumoral mediado por exosomas .....	65
<b>Figura 7-4</b> Ensayo de cierre de herida sobre línea celular MCF7 .....	67
<b>Figura 7-5</b> Índice de migración de la línea celular MCF7 .....	68
<b>Figura 7-6</b> Ensayo de formación de tubos en la línea celular HUVEC .....	70
<b>Figura 7-7</b> Promoción de angiogénesis en células HUVEC .....	71

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 5-1</b> Comparativo de las técnicas empleadas para la purificación de vesículas extracelulares de tipo exosoma provenientes de la línea celular de cáncer de mama MCF7 .....	48
<b>Tabla 6-1</b> Inmunodetección de VEGF en fracciones de exosomas aislados por SEC ....	58

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>BSA</i>	Albúmina de suero bovino
<i>CAF</i>	Fibroblastos asociados al cáncer
<i>CD</i>	Células dendríticas
<i>CD63</i>	Clúster de diferenciación 63
<i>CD81</i>	Clúster de diferenciación 81
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>DMEM</i>	Medio Eagle modificado de Dulbeco
<i>dUC</i>	Ultracentrifugación diferencial
<i>EMT</i>	Transición epitelio-mesénquima
<i>ERK</i>	Señalización extracelular mediada por quinasas
<i>EV-METRIC</i>	Índice de cumplimiento para parámetros experimentales en la investigación de vesículas extracelulares
<i>EV-TRACK</i>	Informes transparentes y conocimiento centralizado en la investigación de vesículas extracelulares
<i>HEPES</i>	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	Factor inducible por hipoxia 1-alfa
<i>HPH</i>	HIF Prolil-hidroxilasa
<i>Hsc70</i>	Proteína de shock térmico 70 kDa
<i>HUVEC</i>	Línea celular endotelial de vena umbilical humana
<i>ILV</i>	Vesículas intraluminales
<i>ISEV</i>	Sociedad internacional de vesículas extracelulares
<i>MAPK</i>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<i>MCF7</i>	Línea celular tumoral de cáncer de mama
<i>MDSC</i>	Células supresoras derivadas de mieloides
<i>MHC</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<i>miRNA</i>	microRNA
<i>MISEV</i>	Información mínima para el estudio de vesículas extracelulares
<i>MSC</i>	Células estromales mesenquimales
<i>MVB</i>	Cuerpo multi-vesicular
<i>M2</i>	Macrófagos con fenotipo 2 activados alternativamente.
<i>NF<math>\kappa</math>B</i>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<i>NP1</i>	Neuropilina 1
<i>NP2</i>	Neuropilina 2
<i>NTA</i>	Análisis de seguimiento de nanopartículas
<i>PBS</i>	Buffer fosfato salino
<i>PEST</i>	Penicilina/Estreptomicina
<i>PI3K</i>	Fosfatidilinositol 3-quinasa
<i>pVHL</i>	Proteína Von Hippel-Lindau
<i>qEV</i>	Columna cromatográfica de exclusión por tamaño IZON qEV Gen 2

---

<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>SEC</i>	Cromatografía por exclusión de tamaño
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>TBS</i>	Buffer salino Tris
<i>TBS-T</i>	Buffer salino Tris-Tween
<i>TEM</i>	Microscopía electrónica de transmisión
<i>TNBC</i>	Cáncer de mama triple negativo
<i>VE's</i>	Vesículas extracelulares
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento vascular endotelial
<i>VEGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

# Introducción

Según el Observatorio Global de Cáncer (GLOBOCAN) de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2020, el cáncer de mama representó el porcentaje más alto de casos de incidencia de cáncer reportados en mujeres de todas las edades a nivel mundial, con un 24,5%. Esta estadística también se refleja en los datos reportados en Colombia para el mismo año, con un porcentaje de incidencia de cáncer de mama del 25,7% (1). En 2021, el Instituto Nacional de Cancerología registró un total de 505 nuevos casos de cáncer de mama en mujeres, lo que representa aproximadamente el 16,3% del total de casos reportados en dicho año. Esto sitúa al cáncer de mama como la segunda forma de cáncer más frecuente entre las mujeres colombianas. Dada la alta incidencia de esta enfermedad, es crucial contar con pruebas de diagnóstico rápidas y precisas. Sin embargo, para la fecha el 99,3% de los diagnósticos se basan en la histología del tejido primario, lo cual, a pesar de los avances en el control preventivo del cáncer, demanda pruebas más eficientes y ágiles (2).

El proceso tumorigénico del cáncer implica la promoción de su progresión a través de señales angiogénicas que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos afectados. Esto permite el suministro de nutrientes y oxígeno a las células tumorales, así como la migración y proliferación metastásica a otros tejidos. La señalización angiogénica involucra la liberación de vesículas extracelulares (VE's), como los exosomas, por parte de las células cancerosas. Estas vesículas están dirigidas hacia las células epiteliales y pericitos circundantes, los cuales son blancos del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). El VEGF desempeña un papel crucial en la proliferación de las células vasculares y en su maduración, lo cual contribuye a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Los exosomas son un tipo de vesícula extracelular producida por una variedad de células en diferentes estados, ya sea fisiológicos o patológicos. Se forman a través de un proceso en el cual la membrana plasmática se invagina, formando un endosoma temprano. Si este endosoma no se fusiona con un lisosoma o fagolisosoma y su membrana se invagina

nuevamente, se convierte en un cuerpo multivesicular que finalmente se fusiona con la membrana plasmática, liberando su contenido como exosomas. Estos exosomas tienen un tamaño que oscila entre 40 y 160 nm y están compuestos por una bicapa lipídica que incorpora moléculas como tetraspaninas, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), ceramidas, así como diversos metabolitos, ácidos nucleicos y proteínas.

Para investigar los exosomas tumorales y su potencial como objetivo para detener la señal angiogénica o utilizarlos como carga terapéutica, es necesario explorar métodos de purificación que proporcionen un alto porcentaje de recuperación y permita establecer si cumplen con la expresión de los marcadores proteicos positivos y negativos recomendados en MISEV (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles) (3).

El MISEV es una guía que permite estandarizar y reportar los protocolos utilizados en el estudio de las vesículas extracelulares. La última versión de esta guía, publicada en 2023, contribuye a establecer consensos en cuanto a la nomenclatura y la caracterización de los diferentes tipos de vesículas. Además, promueve el registro de los resultados en la plataforma EV-TRACK, que categoriza los métodos de purificación y caracterización, asignando un porcentaje denominado EV-METRIC que representa la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

El seguimiento de los estándares propuestos por el MISEV y el uso de la plataforma EV-TRACK brindan un marco común para la investigación de las vesículas extracelulares, lo cual facilita la comparación y validación de los resultados en diferentes estudios. Dado que hay pocos registros con un bajo porcentaje EV-METRIC en la plataforma EV-TRACK que estén directamente relacionados con el VEGF como marcador para exosomas tumorales y específicamente en estudios realizados en la línea celular MCF7, es necesario investigar y establecer la relación entre este factor de crecimiento y la producción de exosomas en dicha línea celular.

Con base a lo expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo establecer la relación entre el factor de crecimiento VEGF y la producción de exosomas en la línea celular MCF7, específicamente en el proceso angiogénico. Esto es particularmente relevante en el estudio de exosomas tumorales, ya que la caracterización precisa y confiable de estos puede proporcionar información crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas.



En cuanto a los métodos de obtención y purificación de los exosomas, se propuso evaluar alternativas comerciales como el kit PureExo basado en filtración dirigida y las columnas de exclusión por tamaño qEV de IZON. Estos métodos son más prácticos y podrían mejorar la reproducibilidad en comparación con los métodos de separación reportados previamente, como la ultracentrifugación diferencial y por gradiente de densidad.

La caracterización bioquímica de los exosomas se centró en la expresión del marcador VEGF, el cual ha mostrado ser prometedor para el estudio de las vesículas relacionadas con el proceso tumoral. Se realizó una evaluación de la presencia de este marcador en los exosomas en comparación con marcadores conocidos como CD81.

Los estudios funcionales abordaron la variación en la concentración y composición de los exosomas en respuesta a condiciones pro angiogénicas, como la hipoxia inducida químicamente. Además, se investigó la interacción de estos exosomas con las células vasculares endoteliales. Estos estudios permitieron establecer la diferencia entre los exosomas producidos en condiciones de normoxia e hipoxia y su relación con el microambiente tumoral.

# 1. Estado del Arte

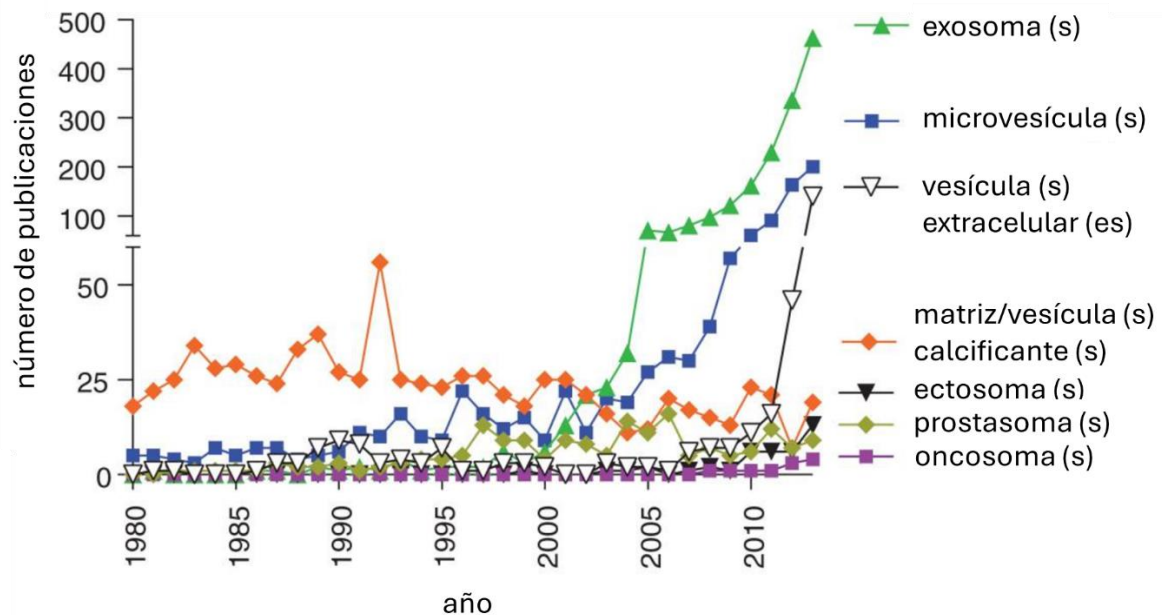
## 1.1 Vesículas extracelulares

Las células producen una variedad de vesículas que mejoran la comunicación en diferentes entornos. La respuesta de las células blanco a estas vesículas extracelulares depende de las moléculas que transportan, como el ARN mensajero (mRNA) y el micro ARN (miARN), factores de crecimiento, lípidos de membrana, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y proteínas específicas de adhesión y estabilidad. Esta composición específica ha permitido establecer parámetros para la caracterización y clasificación de los tipos de vesículas extracelulares, que anteriormente solo se clasificaban según su tamaño (4).

En 2014 se estableció la Sociedad Internacional para Vesículas Extracelulares (ISEV), con el objetivo de alcanzar un consenso en la clasificación y los parámetros de estudio de las vesículas extracelulares. Hasta la fecha de su creación, y a pesar de la terminología utilizada específicamente para las vesículas, los exosomas han sido los más ampliamente reportados, como se ilustra en la Figura 1-1.

En el mismo año, la ISEV introdujo el primer manual para establecer los parámetros de investigación (MISEV 2014). En él se destacó la importancia de reportar proteínas tanto transmembranales como citosólicas, intracelulares y extracelulares, además de considerar su tamaño, para mejorar la clasificación de las vesículas.

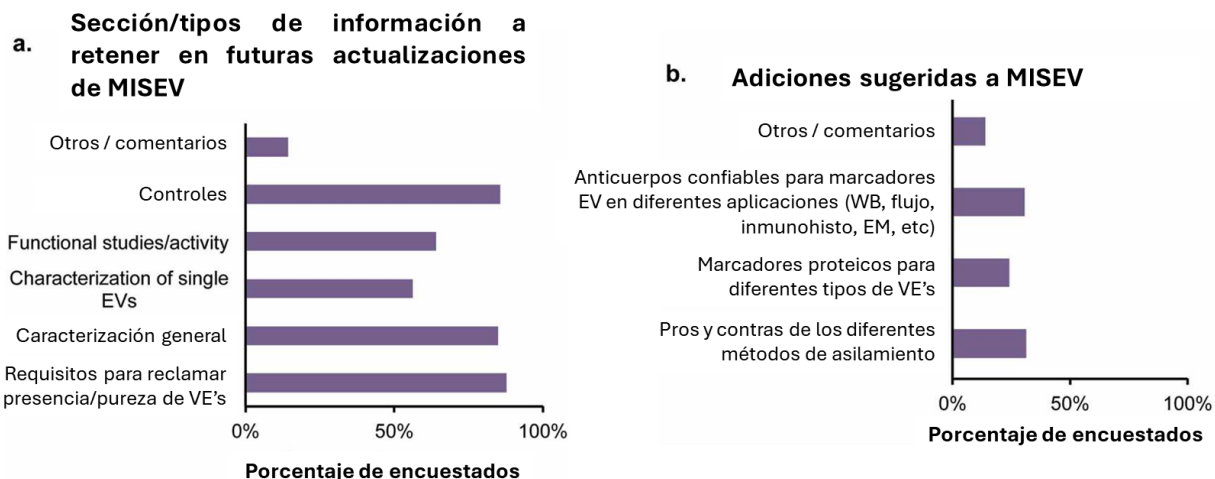
En el año 2018, la ISEV publicó la segunda versión de los requisitos mínimos para la caracterización y el informe de las vesículas extracelulares ([MISEV 2018](#)). Este documento proporciona directrices más detalladas, incluyendo la identificación de proteínas enriquecidas y no enriquecidas, así como los métodos para la separación y caracterización de las partículas.



**Figura 1-1 Registro de publicaciones con terminología asociada a "Vesículas extracelulares".** Términos usados hasta el 2013 para referirse a vesículas extracelulares contenidos en artículos en inglés y otros idiomas encontrados en PubMed. El término exosoma es el más usado a partir del 2004. Modificado de Lötval, J., et al (2014).

Además, el manual MISEV 2018 presenta una serie de recomendaciones adicionales propuestas por la comunidad ISEV, como se muestra en la Figura 1-2. En respuesta a estas sugerencias, se ha establecido la plataforma EV-TRACK, la cual sirve como un repositorio para estudios relacionados con las vesículas extracelulares. Esta plataforma evalúa el cumplimiento de los parámetros establecidos en el manual MISEV 2018 y categoriza los estudios en función de un puntaje denominado EV-METRIC. El objetivo de este sistema de puntuación es definir protocolos estandarizados para la separación y caracterización de las vesículas extracelulares, con el fin de facilitar y enriquecer el avance de las investigaciones en este campo.

La plataforma EV-TRACK desempeña un papel importante al asegurar que los estudios cumplan con los estándares establecidos y al proporcionar una base de conocimiento centralizada que facilita la comparación y el análisis de los resultados. Esto contribuye a la calidad y la reproducibilidad de la investigación en el campo de las vesículas extracelulares, promoviendo un avance sólido y efectivo en el conocimiento de estas estructuras y su implicación en diversos procesos biológicos y patológicos (5).



**Figura 1-2** Sugerencias de retenciones y adiciones a la MISEV 2018 dadas por la comunidad ISEV. Modificado de Witwer, KW., et al (6).

Actualmente, la ISEV propone los siguientes criterios de informe para las vesículas extracelulares: a) marcadores proteicos positivos asociados a la membrana y al citosol, b) marcadores proteicos negativos como control de pureza, c) marcadores específicos de un subtipo de vesículas extracelulares, y d) proteínas extracelulares solubles con actividades funcionales (3, 7, 8).

En este contexto, los exosomas se clasifican como un tipo de vesícula extracelular con un tamaño aproximado de 40-160 nm. Estas vesículas están rodeadas por una bicapa lipídica y contienen moléculas integradas en su membrana y en su interior (lumen), lo cual refleja el estado metabólico de las células que las producen y su contribución al entorno en el que son liberadas (9).

## 1.2 Exosomas y ambiente tumoral

Los exosomas representan un mecanismo de comunicación óptimo para las células tumorales, son las vesículas extracelulares más pequeñas y pueden transportar moléculas con diferentes dianas dentro del microambiente tumoral. En los fibroblastos asociados al cáncer, los exosomas y su carga promueven la producción de metaloproteasas que remodelan la matriz extracelular, fomentando la invasión del tumor. Además, en este tipo

de fibroblastos, los exosomas pueden activar vías de señalización como Wnt y Notch, afectando el metabolismo y favoreciendo la proliferación del tumor (10).

En las células inmunes, los exosomas desempeñan funciones inmunoactivadoras o supresoras dependiendo del ARN que contengan y de la subpoblación de células inmunes a las que se dirijan, por ejemplo, pueden inducir apoptosis en células T, disminuir la capacidad de las células NK, promover la polarización de macrófagos, entre otras (10-12). La comunicación entre el tumor y el sistema inmune puede verse afectada por la expresión e interacción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que desencadena respuestas positivas para el desarrollo del tumor al actuar como un mecanismo de escape al control inmunológico (13).

En las células endoteliales, los exosomas principalmente contienen factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis, lo cual promueve la proliferación y metástasis, siempre y cuando se regule el ciclo inmunoestimulador vascular (14, 15). Además, los exosomas también contienen microARNs que regulan la acción angiogénica en el microambiente tumoral al dirigirse a los pericitos y las células epiteliales cuando se producen condiciones de hipoxia o privación de nutrientes (9).

### **1.3 Caracterización de exosomas**

Gracias a los consensos propuestos por la ISEV, los procesos de caracterización de exosomas se están normalizando cada vez más, abarcando tanto la purificación como la caracterización de estas vesículas. Entre los métodos más comunes para la purificación de exosomas se encuentra la ultracentrifugación, que, aunque es costosa y requiere mucho tiempo, es preferida cuando hay grandes volúmenes de muestra. Sin embargo, la centrifugación por gradiente de densidad es un método más utilizado, ya que proporciona una mejor separación de las subpoblaciones de vesículas. Su eficacia depende en gran medida de la composición de las vesículas, la cual está relacionada con el estado metabólico de la célula que las produce (16).

Métodos más recientes como la precipitación por polímeros tipo ExoQuick, la cromatografía por exclusión por tamaño tipo qEV y la ultrafiltración ofrecen resultados más rápidos y prácticos. Sin embargo, no logran separar agregados de proteínas,

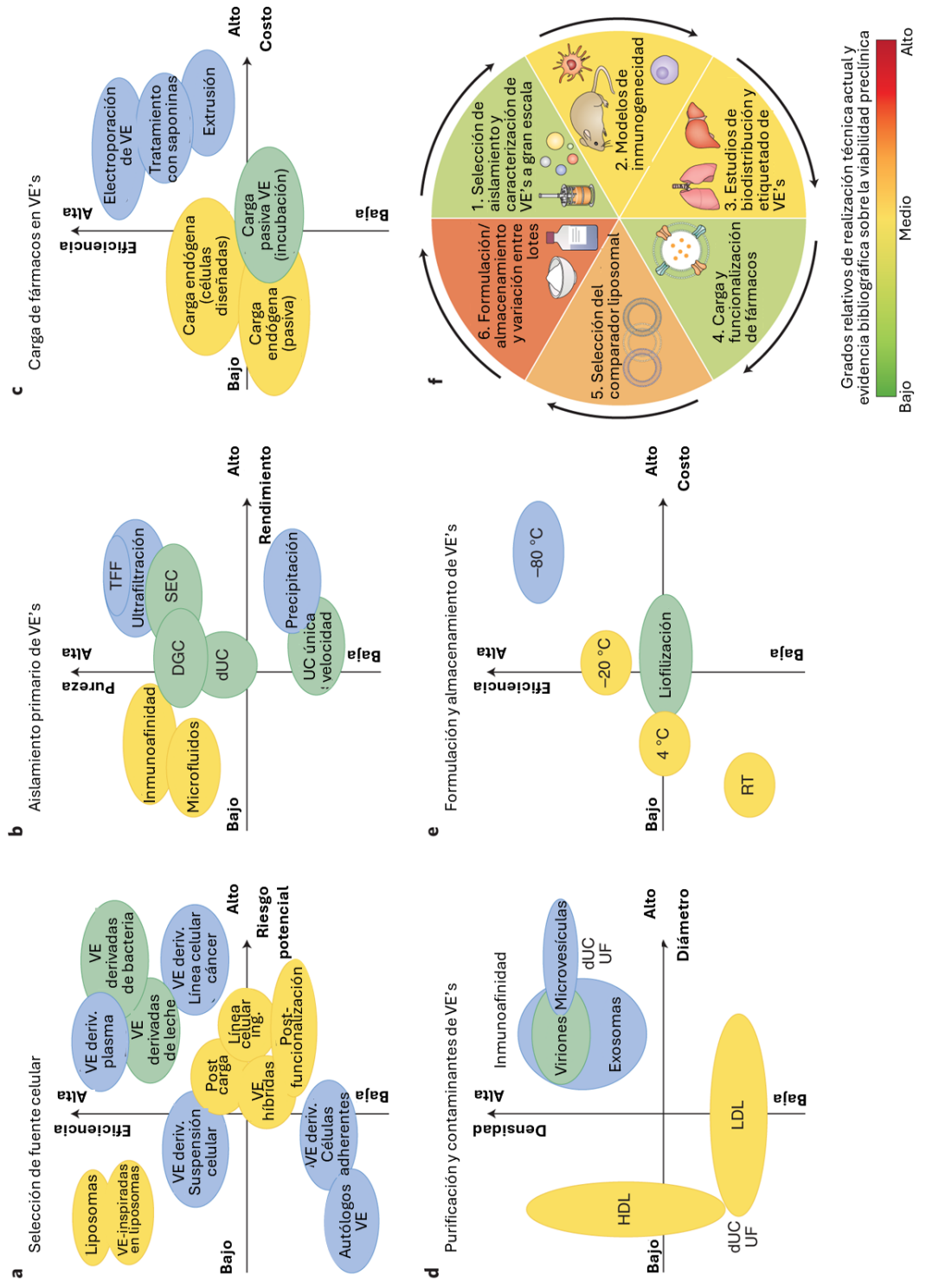
---

microvesículas y otras partículas, por lo que a menudo se combinan con métodos de ultracentrifugación para evitar estas impurezas.

Dada la complejidad de las muestras y la necesidad de combinar múltiples métodos para la purificación, se han desarrollado técnicas más específicas para mejorar la eficiencia, el tiempo y la pureza de los exosomas. Entre ellas se incluyen técnicas de inmunoafinidad utilizando marcadores específicos, perlas magnéticas y plataformas de microfluidos, que han mostrado resultados prometedores (17). Herrmann, IK., et al. (18) proporcionan un compendio de las opciones disponibles para la obtención, aislamiento, purificación y modificación de exosomas, como se muestra en la Figura 1-3 siendo la ultracentrifugación diferencial el método convencional con rendimiento y pureza intermedios que puede ser reemplazado por la cromatografía de exclusión por tamaño o la ultrafiltración en la purificación de exosomas de muestras que contienen microvesículas.

Los estudios sobre vesículas extracelulares pueden ser registrados, validados y comparados en el portal EV-TRACK. Este portal valida y compara los métodos de purificación más utilizados, los métodos de caracterización y los estudios funcionales correspondientes.

Al realizar una búsqueda en el portal EV-TRACK utilizando la palabra clave "*Breast cancer*" para conocer los registros asociados a vesículas de sobrenadante celular humano, se encontraron numerosos registros. Un estudio en particular obtuvo una puntuación máxima de EV-METRIC del 100% al investigar la adhesión de vesículas tumorales mediante la variación de integrinas (19). Este estudio reportó múltiples marcadores entre ellos CD63, Flotilina 1 y Alix, utilizando como métodos de separación a la ultracentrifugación diferencial con filtración y el gradiente de densidad. Además de estos métodos de purificación, el estudio realizó ensayos complementarios como microscopía electrónica, anticuerpos específicos y análisis cualitativos y cuantitativos de lisados y proteínas. El estudio de la invasión celular en TNBC inducida por exosomas producidos en condiciones de hipoxia (20) obtuvo una puntuación máxima de EV-METRIC del 78% utilizando la ultracentrifugación diferencial como método de purificación de vesículas y el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para la caracterización de las mismas.



**Figura 1-3 Comparación metodológica para el estudio de vesículas extracelulares.** Variables experimentales consideradas para (A) Fuentes de obtención de vesículas y los

---

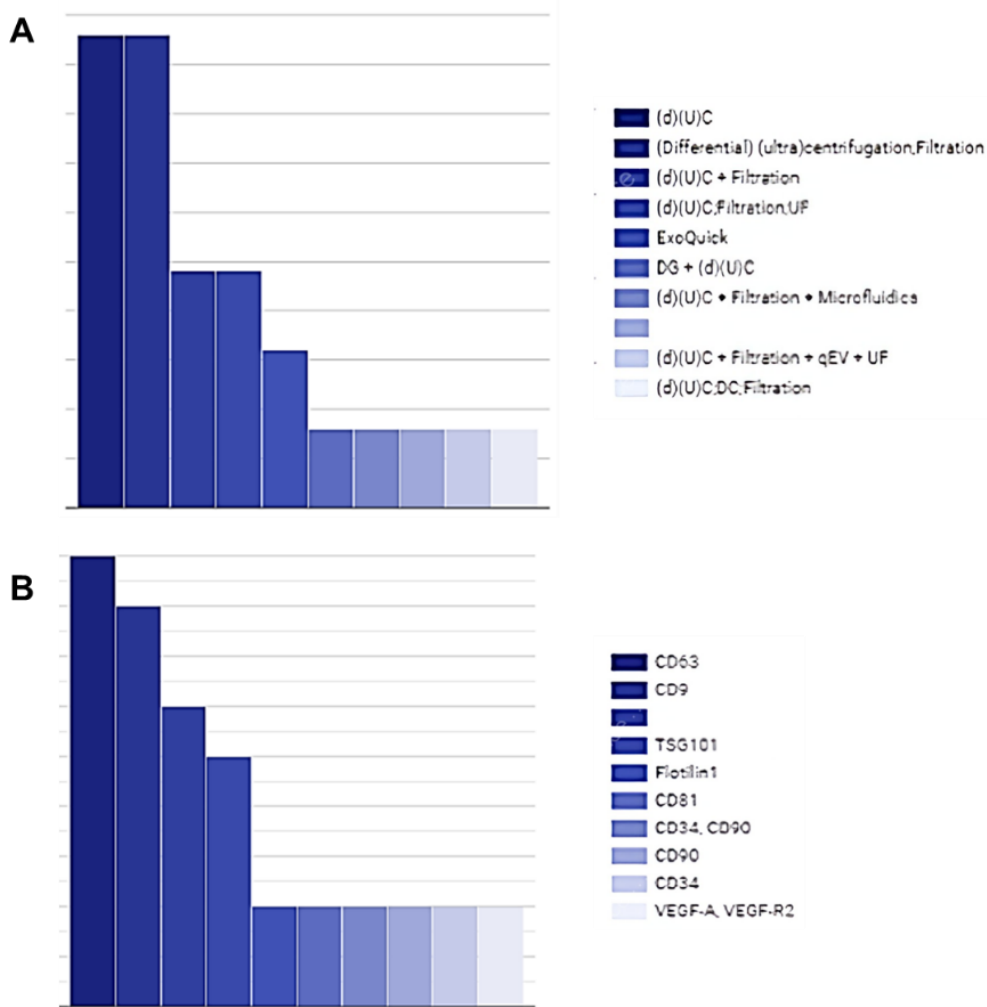
riesgos asociados. (B) Métodos de aislamiento primario en función del rendimiento y la pureza. DGC: centrifugación en gradiente de densidad. dUC: ultracentrifugación diferencial. TFF: filtración de flujo tangencial. (C) Métodos para la carga de medicamentos en función de la eficiencia de la carga y los costos a gran escala. (D) Tamaños y densidad de posibles contaminantes. HDL: lipoproteína de alta densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad. UF: ultrafiltración. (E) Métodos para la formulación y almacenamiento de vesículas extracelulares en relación con la eficiencia y costo. RT: Temperatura ambiente. Modificado de Herrmann, IK., et al (2021).

En otro estudio, se encontró una puntuación de EV-METRIC del 75% al aplicar la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con las columnas qEV de IZON para purificar vesículas marcadas con nanoluciferasa dirigida a CD63 y CD9 (21). Este estudio se enfocó en vesículas provenientes de una línea celular de cáncer de mama triple negativo y utilizó la SEC como método de purificación, NTA y TEM como método de caracterización, prescindiendo de la ultracentrifugación.

Al realizar la búsqueda con la palabra clave "MCF7", se encontró que los protocolos de separación más utilizados incluyen la ultracentrifugación, la ultracentrifugación con filtración y el uso del precipitante ExoQuick. El marcador más reportado en estos registros es el CD63. El resultado con la puntuación más alta de EV-METRIC (33%) utilizó la ultracentrifugación diferencial para evaluar la presencia del marcador CD63 y el potencial de la periestina en el potencial metastásico del cáncer de mama hacia los ganglios linfáticos (22).

Al realizar la búsqueda en el portal con la palabra clave "VEGF", se encontró que los protocolos de separación más utilizados son la ultracentrifugación diferencial y el gradiente de densidad, la ultracentrifugación con filtración y el uso del precipitante ExoQuick. Además, los resultados de esta búsqueda mostraron que los marcadores más utilizados en estos estudios son el CD63 y el CD9, mientras que el VEGF-A y el receptor VEGF-R2 son los menos utilizados, como se muestra en la Figura 1-4. El resultado con la puntuación más alta de EV-METRIC (78%) utilizó la ultracentrifugación para aislar vesículas provenientes de células progenitoras endoteliales y así evaluar la neovascularización mediada por VEGF y miR-183 (23).

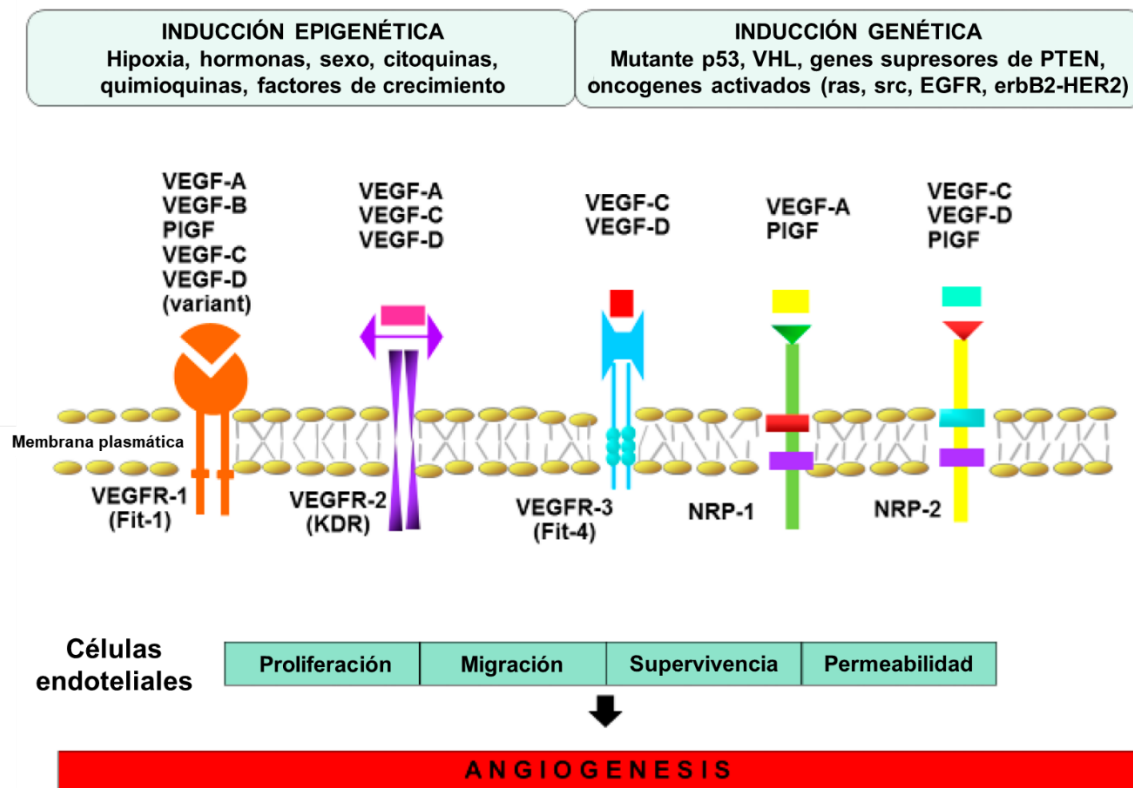




**Figura 1-4 Reportes asociados a exosomas en el portal EV-TRACK.** Resultados de la búsqueda de informes filtrados como investigaciones que emplean medio condicionado de cultivo celular en líneas celulares humanas y usando como palabras clave “*Breast cancer*”, “*MCF7*” y “*VEGF*”. Se presenta la recurrencia de reportes por: A) Métodos de purificación empleados. B) Marcadores proteicos identificados.

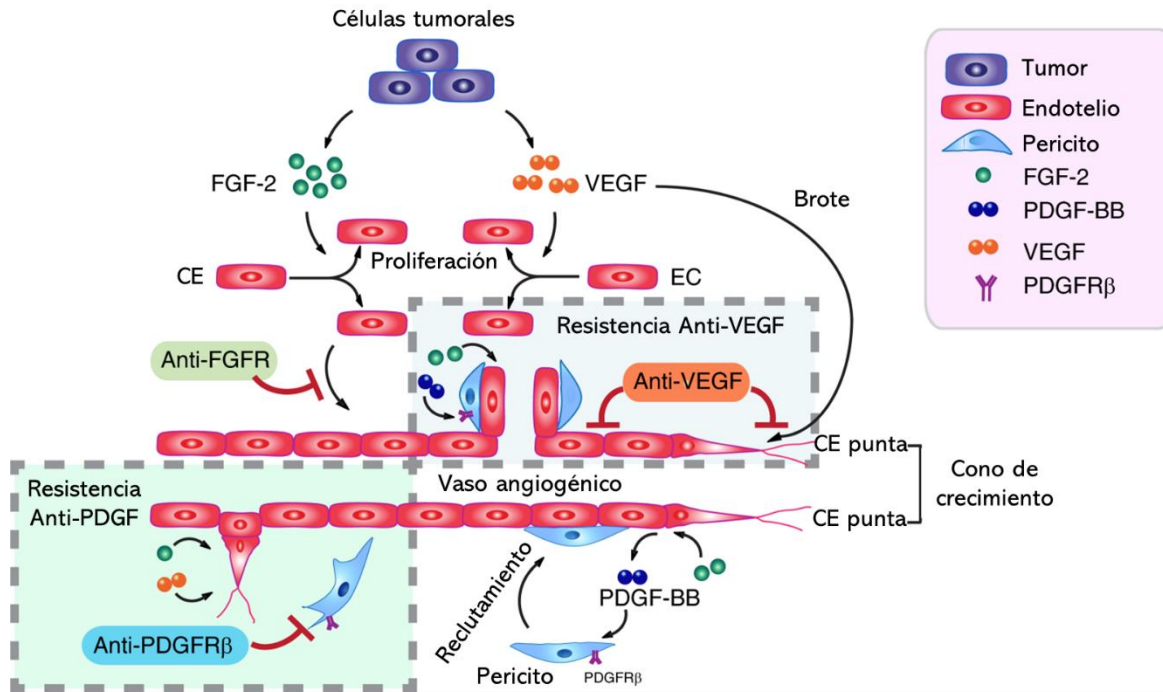
## 1.4 VEGF y angiogénesis

El VEGF es una proteína que presenta varias isoformas, como VEGF-A, B, C y D, las cuales se unen con diferentes afinidades a los receptores VEGFR-1, 2 y 3, como se muestra en la Figura 1-5.



**Figura 1-5 Inducción de señales pro angiogénicas por las isoformas de VEGF.** La expresión de VEGF puede darse por inducción genética y epigenética de células en condiciones fisiológicas y patológicas. La familia del factor de crecimiento vascular endotelial incluye las isoformas: VEGF-A que presenta afinidad por el receptor tirosina-quinasa VEGFR-2 presente principalmente en células endoteliales de los vasos sanguíneos promoviendo el proceso de angiogénesis. Por otro lado, las isoformas VEGF-C y D tienen mayor afinidad por VEGFR-3 presente en células endoteliales linfáticas teniendo un efecto en la proliferación de vasos linfáticos. Modificado de Olejarz, W., et al. (2020) (24).

Cuando se forma un nódulo canceroso que alcanza un volumen superior a  $1 \text{ mm}^3$ , las células cancerosas aumentan sus necesidades de nutrientes y oxígeno. Para iniciar el proceso angiogénico, estas células expresan VEGF, lo que provoca la pérdida de la polaridad en las células receptoras, como las células epiteliales y los pericitos. Esto ocasiona cambios en su citoesqueleto, lo que resulta en una mayor movilidad y una menor adhesión entre estas células vasculares. Como se muestra en la Figura 1-6, esto da lugar a la formación de puntas o filopodios que promueven la proliferación de estas células hasta alcanzar su madurez. El resultado de este proceso angiogénico son vasos sanguíneos irregulares y altamente permeables, que favorecen el transporte de oxígeno, nutrientes y la migración celular desde y hacia el tumor (25).



**Figura 1-6 Proceso de angiogénesis tumoral mediado por VEGF y FGF-2.** Los tumores utilizan factores de crecimiento como FGF-2 y VEGF para promover la angiogénesis. Mientras que VEGF estimula la proliferación, migración y formación de puntas de células endoteliales, FGF-2 induce principalmente la proliferación de células endoteliales. El FGF-2 también estimula la proliferación de pericitos y la cobertura vascular, colaborando con la vía de señalización PDGF-B-PDGFRβ. Una terapia anti-angiogénica propone el bloqueo simultáneo de las vías de señalización de VEGF y PDGFRβ que inhibe la angiogénesis tumoral en tumores positivos para FGF-2. Modificado de Hosaka, K., et al. (2020).

Se han desarrollado tratamientos dirigidos a regular y bloquear las señales de angiogénesis en los procesos de cáncer. Sin embargo, debido a la importancia del VEGF en el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer (26), existen tratamientos específicos dirigidos a esta proteína, siendo el más relevante el Bevacizumab. Este medicamento actúa como un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido al VEGF, y tiene efectos anti angiogénicos. A pesar de esto, las respuestas evasivas de los tumores a esta terapia anti-angiogénica en monoterapia (27) han planteado desafíos y problemas. Por lo tanto, se han propuesto enfoques de terapia combinada que incluyen medicamentos anti angiogénicos junto con quimioterapia, tratamientos endocrinos u otros fármacos de

naturaleza similar. Estos enfoques buscan mejorar las tasas de supervivencia y obtener resultados sostenidos a largo plazo (24).

Es importante destacar que la investigación en el campo de las vesículas extracelulares, incluyendo los exosomas y su relación con el VEGF, sigue siendo un área activa de estudio. Se requiere más investigación para comprender completamente los mecanismos y las implicaciones clínicas de la modulación del VEGF en vesículas extracelulares y su papel en la angiogénesis tumoral y la resistencia a tratamientos.

Efectivamente, se ha observado que el VEGF puede ser expresado y modulado no solo en forma soluble en el plasma, sino también en vesículas extracelulares tipo exosoma. Según el estudio realizado por Ko, SY., et al. (2019) (28), células de cáncer de ovario (ES2), colorrectal (HCT116) y renal (786-0) son capaces de producir pequeñas vesículas extracelulares que expresan VEGF en su membrana. Estas vesículas contienen diferentes isoformas de VEGF, siendo la VEGF189 la más expresada. Se ha observado que estas vesículas extracelulares que expresan VEGF promueven la formación de tubos y la migración de células endoteliales, lo que favorece la angiogénesis en el contexto tumoral. Además, se ha evidenciado que niveles elevados de estas vesículas extracelulares pueden aumentar la resistencia a tratamientos con Bevacizumab, un medicamento anti angiogénico (24, 29).

## **1.5 Exosomas como vehículos**

Es interesante destacar que se están realizando avances en el campo de la manufactura de exosomas a partir de células madre mesenquimales menstruales. Estos exosomas derivados de células madre mesenquimales menstruales han demostrado tener efectos anti angiogénicos sobre las células epiteliales en modelos de cáncer de mama y próstata (30). Este enfoque proporciona una oportunidad para explorar otros tipos de exosomas, su producción y modificación con fines terapéuticos. Sin embargo, es importante tener precaución al utilizar exosomas provenientes directamente de tejidos tumorales como vehículos de tratamiento, ya que pueden tener efectos negativos en otros tejidos.

Además del estudio del VEGF, se han llevado a cabo investigaciones con el objetivo de caracterizar, evaluar y modificar la carga de los exosomas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Kase, Y., et al (2021) (31), se silenciaron oncogenes en un modelo de carcinoma oral de células escamosas mediante la modificación de ARN interferente (RNAi) cargado en exosomas. Este estudio mostró resultados prometedores, como la disminución del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* en ratones. Sin embargo, se destaca la necesidad de investigar más a fondo los mecanismos de interacción entre las células y los exosomas.

Las investigaciones descritas muestran el potencial de los exosomas como vehículos de carga terapéutica y resaltan la importancia de seguir investigando y comprendiendo mejor sus mecanismos de acción y su interacción con las células para aprovechar plenamente su potencial en el desarrollo de terapias innovadoras.

## 2. Justificación

El cáncer de mama, con su alta incidencia y tasa de mortalidad, constituye un significativo desafío para la salud pública a nivel global. La comprensión de los mecanismos biológicos fundamentales asociados con esta enfermedad, incluyendo aspectos como la malignidad y la metástasis, es esencial para abordar la salud de las mujeres con el fin de desarrollar estrategias más efectivas de prevención, diagnóstico y tratamiento. En este contexto, las investigaciones han identificado a las vesículas extracelulares como partículas liberadas por las células cancerosas que desempeñan un papel clave en la modulación del microambiente tumoral y en la progresión del cáncer (32). La modulación del microambiente tumoral se presenta como un área de estudio e intervención central, ya que es el lugar donde interactúan diversas células (cancerosas, fibroblastos asociados, inmunes, endoteliales), generando una variedad de moléculas solubles y cargadas en vesículas extracelulares (citoquinas, metaloproteasas, factores de crecimiento, entre otras) que pueden promover o inhibir el proceso tumorigénico. En consecuencia, cada célula y molécula presente en el microambiente tumoral se convierte en un objetivo crucial para la investigación y la formulación de tratamientos dirigidos que buscan controlar la proliferación e invasión, etapas primarias del cáncer. Esto incluye abordar la angiogénesis como punto de partida para prevenir la vascularización en tumores sólidos, así como enfrentar la metástasis.

Dentro del grupo de vesículas extracelulares, los exosomas han sido objeto de atención debido a su pequeño tamaño y a las moléculas cargadas que transportan, que incluyen ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Estas les permiten dirigirse a diferentes blancos celulares y transmitir señales proliferativas, invasivas y de supervivencia. Uno de los componentes moleculares de interés es el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), que desempeña un papel fundamental en la angiogénesis tumoral, que es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran nutrientes y oxígeno al tumor en desarrollo. El estudio del VEGF en las vesículas extracelulares puede

proporcionar información valiosa sobre la señal angiogénica y potenciales opciones terapéuticas dirigidas a bloquear esta señal para controlar la proliferación, invasión y supervivencia de las células cancerosas.

Este proyecto de investigación se centró en el estudio de las vesículas extracelulares derivadas de la línea celular MCF7, línea celular de cáncer de mama metastásico humano. El objetivo principal fue investigar la presencia y los efectos del VEGF en estas vesículas, y establecer correlaciones entre el proceso angiogénico y posibles opciones terapéuticas medidas a través de las vesículas extracelulares.

### **3.Hipótesis**

Inicialmente se espera que la línea celular MCF7, como una línea de cáncer de mama metastásico humano, presente señales de proliferación e invasión mediadas por la producción de vesículas extracelulares. Además, se espera que estas vesículas extracelulares pueden ser purificadas utilizando métodos no convencionales siendo la cromatografía de exclusión por tamaño un método rápido y conveniente que permita obtener una población de vesículas extracelulares caracterizada como exosomas que presentan el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) en su estructura. La hipótesis postula que el VEGF presente en las vesículas extracelulares provenientes de la línea celular MCF7 puede servir como un marcador para la purificación de los exosomas y que, además, puede tener un potencial angiogénico sobre las células tumorales y las células vasculares endoteliales.



## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar las vesículas extracelulares tipo exosomas provenientes de la línea celular MCF7 y su potencial angiogénico mediado por VEGF.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Estudiar las vesículas extracelulares nativas provenientes del cultivo in vitro de la línea celular MCF7.
- Comparar los métodos de extracción y purificación de exosomas provenientes del cultivo celular MCF7.
- Identificar la expresión de VEGF en los exosomas provenientes de la línea celular MCF7.
- Estimar los efectos en la producción de exosomas en condiciones angiogénicas del cultivo de la línea MCF7.
- Evaluar los efectos de los exosomas tumorales sobre el cultivo de células endoteliales.

## **5. Vesículas extracelulares provenientes de la línea celular MCF7**

Según la definición proporcionada por Gupta. et al. (33): “las vesículas extracelulares son nanopartículas membranosas naturales liberadas por todos los tipos de células y presentes en todos los fluidos biológicos”. Desde una perspectiva biológica, se pueden definir como estructuras que consisten en una bicapa lipídica que envuelve o encapsula moléculas con potencial biológico, como ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y lípidos. Estas moléculas no solo pueden estar contenidas en el interior o lumen de las vesículas (carga), sino que también se presentan en su membrana. La función principal descrita para las vesículas extracelulares es la transmisión de información intercelular (34).

Basándose en factores como su biogénesis, tamaño, carga, función y contenido, se pueden identificar tres poblaciones principales de vesículas extracelulares: exosomas, microvesículas (también conocidas como ectosomas o micropartículas) y cuerpos apoptóticos (35, 36).

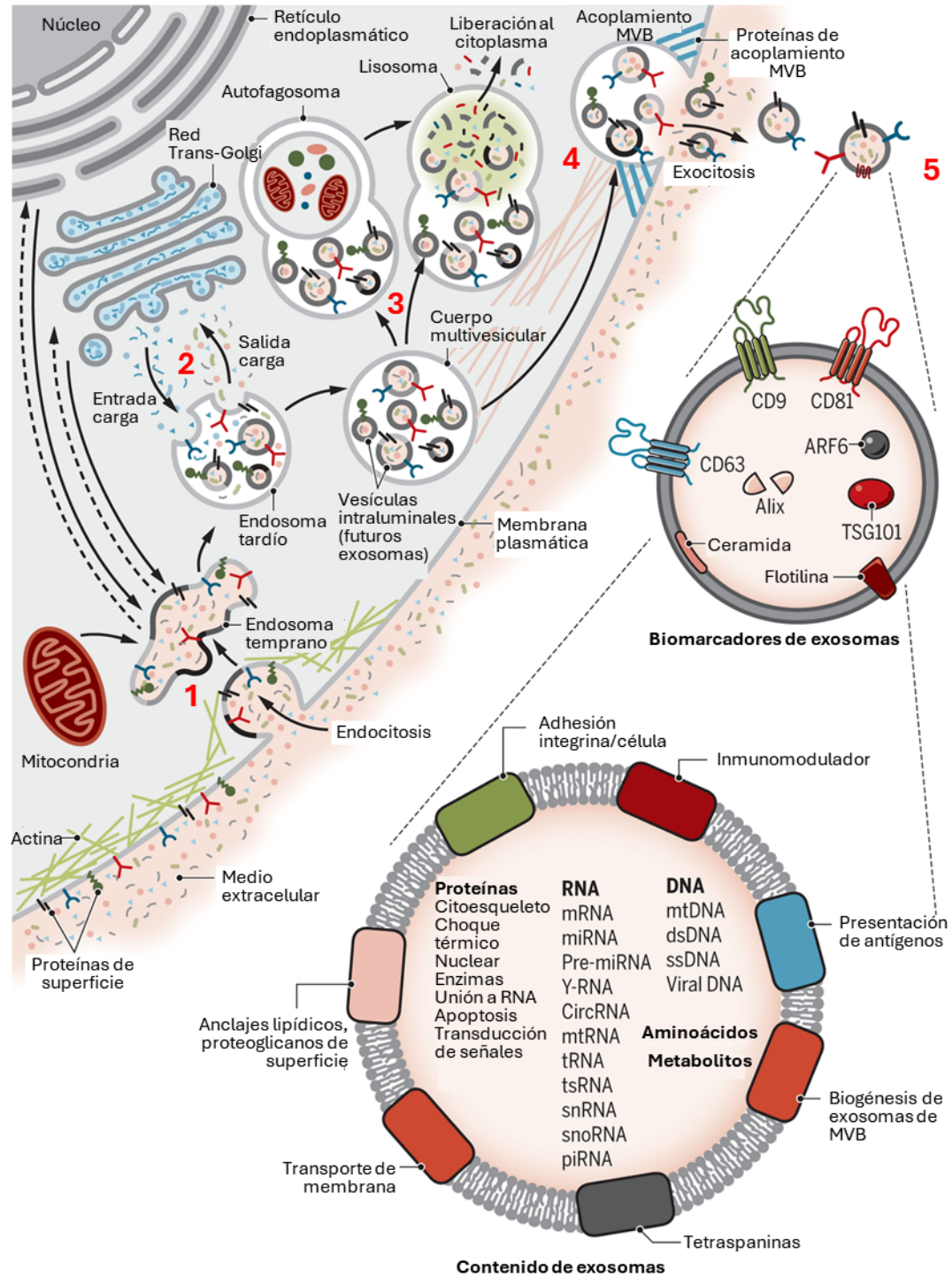
Los exosomas son de gran interés tanto en la investigación científica como en la práctica clínica, ya que, dependiendo de la célula de origen y su estado fisiológico, pueden desempeñar un papel crucial en la progresión de diversas enfermedades (37). Estas vesículas, gracias a su tamaño, tienen la capacidad de migrar eficazmente y amplificar las señales emitidas por las células de las que se originan. De hecho, se han identificado exosomas en una variedad de fluidos corporales, como la saliva, la leche materna, la sangre, la orina y el líquido cefalorraquídeo (38).

La biogénesis de los exosomas es fundamental para comprender su composición, funciones y características en la comunicación extracelular. El proceso comienza cuando la membrana plasmática de la célula de origen se invagina, llevando consigo proteínas de superficie y algunas solubles en el medio extracelular, formando un endosoma temprano.

Este endosoma, a medida que madura, puede fusionarse con la red trans-Golgi y el retículo endoplasmático, lo que altera su contenido y lo convierte en un endosoma tardío ubicado en la región perinuclear. Posteriormente, el endosoma tardío puede formar un cuerpo multivesicular (MVB) por la invaginación de su propia membrana, lo que da como resultado múltiples vesículas intraluminales (ILV); el MVB puede tomar diferentes caminos: dirigirse a la fusión con lisosomas o autofagosomas para la degradación de su contenido, o bien, puede desplazarse hacia la periferia celular y así fusionarse con la membrana plasmática, y en ese caso, los ILV se identifican como exosomas (39, 40), como se muestra en la Figura 5-1.

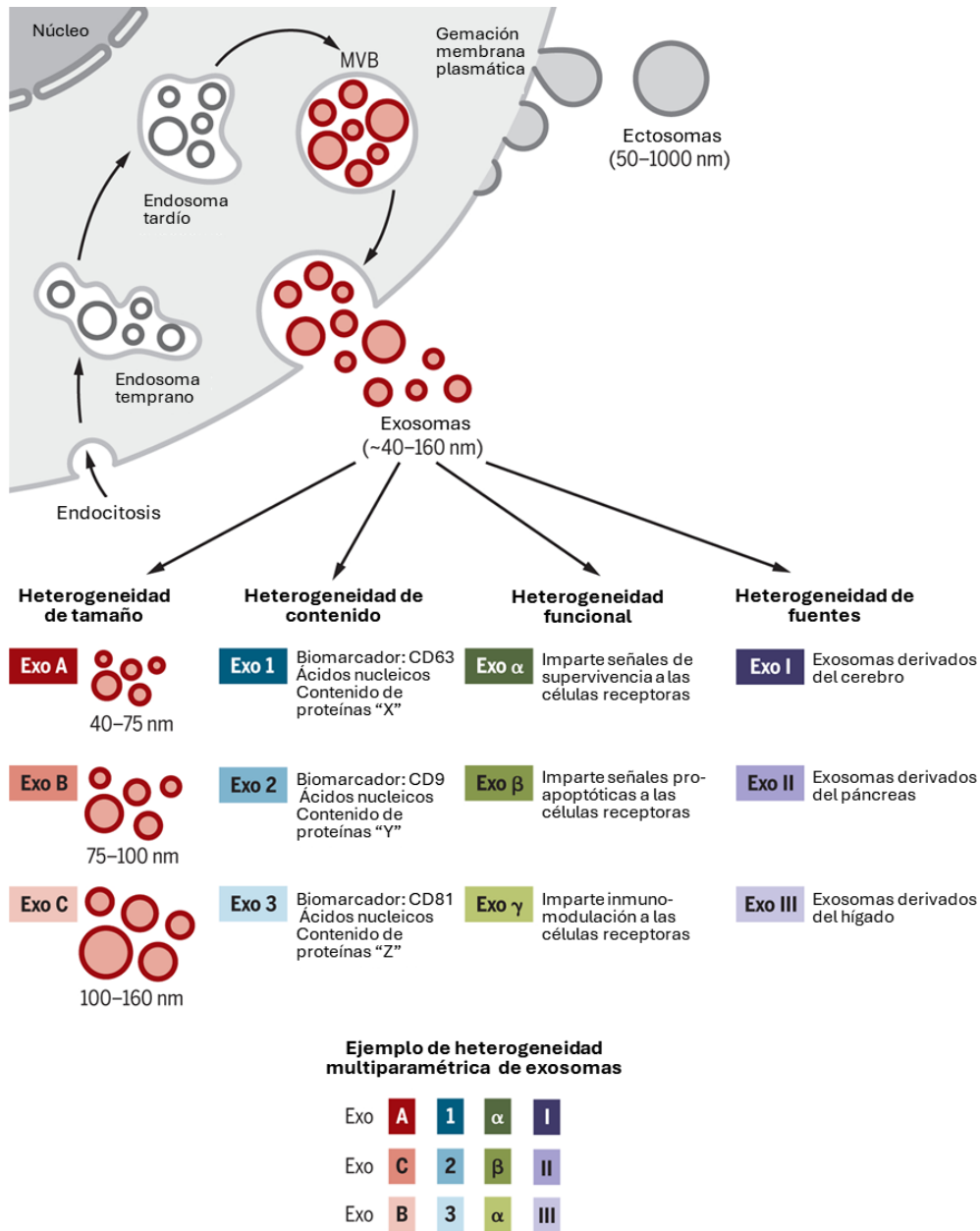
También se conoce que la forma en que los exosomas endocitados en la célula diana son internalizados en el endosoma temprano implica la liberación de su carga en el espacio intracelular mediante el uso de Bis(monoacilglicerol)fosfato (BPM), una molécula presente en exosomas endocitados y en endosomas tempranos. El BPM funciona como una molécula fusogénica en un proceso denominado retrofusión (41-43).

Con el transcurso del tiempo y como resultado numerosas discusiones, se han establecido parámetros uniformes para la caracterización de los exosomas. En general, se caracterizan por tener un tamaño de entre 40 y 160 nm, con una media de unos 100 nm. Contienen una amplia gama de moléculas, incluyendo ARN, ADN, proteínas, aminoácidos y metabolitos. En 2020, Kalluri propuso la clasificación de los exosomas que se presenta en la Figura 5-2, en la que se incluye tamaño, contenido, funcionalidad y fuente.



**Figura 5-1 Biogénesis de exosomas.** (1) El proceso de endocitosis implica el ingreso de moléculas como proteínas de membrana, lípidos, metabolitos y iones a través de la formación del endosoma temprano; (2) éste puede interactuar con la red trans-Golgi, el retículo endoplasmático y las mitocondrias realizando un intercambio de moléculas que lo madura convirtiendo en endosoma tardío. Cuando el endosoma tardío sufre una nueva invaginación de su membrana se transforma en un cuerpo multivesicular (MVB) que

contiene cuerpos intraluminales (ILV). (3) El MVB puede ser fusionado con lisosomas, autofagosomas o (4) fusionarse con la membrana plasmática, esta última vía libera sus vesículas intraluminales al espacio extracelular en forma de exosomas. Modificado de Kalluri, R., et al. (2020) (44).



**Figura 5-2 Propuesta para la clasificación de exosomas.** Los exosomas pueden ser muy diversos y tener diversas capacidades para desencadenar una respuesta biológica. Su diversidad puede entenderse en términos de tamaño, contenido, impacto funcional en las células receptoras y célula de origen. Las variaciones en estas características dan lugar a una gran diversidad de exosomas. Modificado de Kalluri, R., et al. (2020).

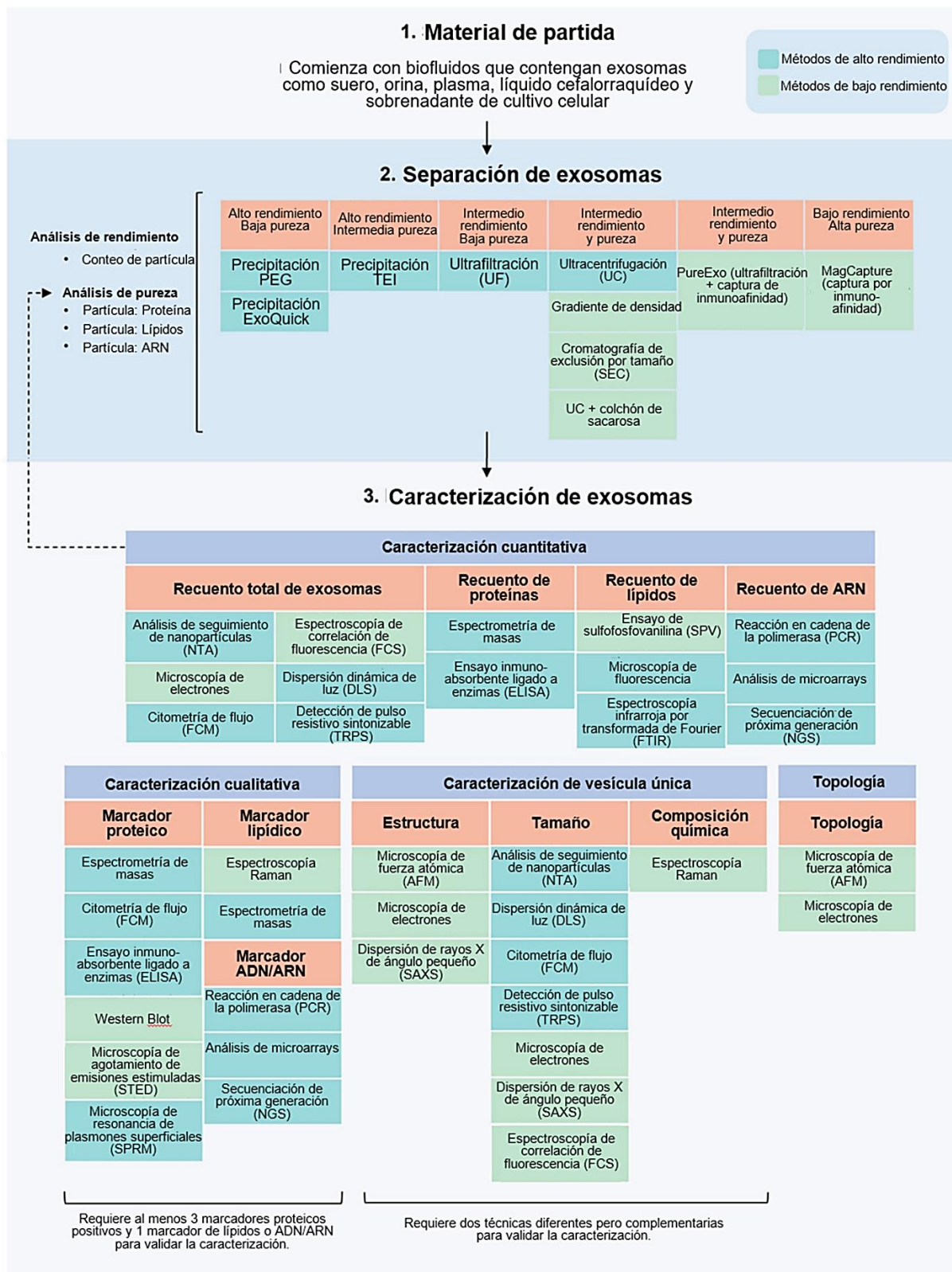
## 5.1 Caracterización de vesículas extracelulares

En la actualidad siguiendo las recomendaciones establecidas por la MISEV (7), se han definido tres etapas fundamentales para la obtención y caracterización de vesículas extracelulares: la purificación de la subpoblación de interés, la caracterización proteica y la caracterización de las partículas obtenidas. Se han empleado diversas técnicas convencionales para este propósito. Sin embargo, dada la creciente relevancia y el interés comercial en estas partículas, se han propuesto métodos específicos para la purificación, además de su combinación con técnicas modernas de caracterización (45), tal como se ilustra en la Figura 5-3.

Dada la complejidad de las partículas de estudio, las investigaciones plantean la combinación de las técnicas para hacer un estudio más completo y con resultados confiables (46).

La ultracentrifugación, ha sido considerada el método estándar para la purificación de vesículas extracelulares, aunque presenta limitaciones derivadas de la necesidad de equipos robustos y de las cantidades significativas de muestra requeridas. Por lo tanto, se han desarrollado alternativas más ágiles que, además, usan volúmenes de muestra más reducidos e integran técnicas avanzadas para la identificación de las vesículas (47-49). Un ejemplo de ello es la cromatografía de exclusión por tamaño ofrecida por [IZON](#), que combinada de la ultrafiltración como un paso previo para la concentración de las vesículas proporciona una herramienta que facilita la obtención de exosomas.

Según Lai (2022), la cromatografía alcanzaría niveles de pureza comparables a los de la ultracentrifugación. Posteriormente, la caracterización física de las vesículas purificadas se puede llevar a cabo utilizando equipos especializados en su visualización. Aunque la microscopía electrónica de transmisión ha sido la técnica convencional, han surgido otros métodos, como el seguimiento de nanopartículas. Un equipo basado en este principio es el Nanosight, que, mediante el uso de un rayo láser sobre la suspensión de partículas, analiza el movimiento browniano de cada partícula utilizando la ecuación de Stokes-Einstein. Esto proporciona estimaciones del diámetro hidrodinámico, la concentración y la intensidad de las partículas. Así mismo, para la identificación de marcadores exosomales, se buscan proteínas constituyentes de la población de vesículas de estudio (50), y se utilizan métodos cuantitativos y cualitativos convencionales, como el western blot y la citometría de flujo, para identificarlos (51).



**Figura 5-3 Etapas para el estudio de vesículas extracelulares.** El flujo de trabajo comienza con la evaluación de los materiales iniciales, como el recuento celular, el volumen de líquido y la cantidad de moléculas que no están relacionadas con las VE. Luego, se elige un método de procesamiento adecuado según el material inicial y los objetivos de pureza y rendimiento. Después de aislar los exosomas, se lleva a cabo la caracterización para medir la pureza y el rendimiento de partículas, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Modificado de Lai, Y., et al. (2022) (52).

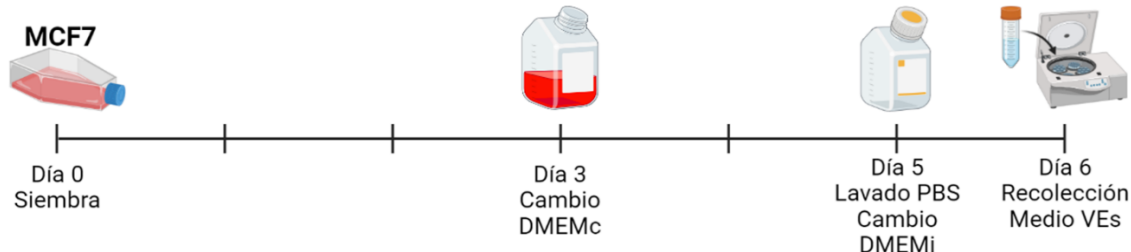
## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Cultivo celular y tratamientos

La línea celular MCF7 (ATCC HTB-22), empleada por el Grupo de Investigación en Hormonas de la Universidad Nacional de Colombia, se cultivó en frascos T-150 a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-Glutamina 2mM, Piruvato de Sodio 1mM, HEPES 10mM y solución de antibiótico penicilina-estreptomicina 0,1%. El cultivo se realizó con cambios de medio cada tres días hasta alcanzar una confluencia del 80%. Llegada esta etapa, se retiró el medio de cultivo, se realizaron tres lavados con buffer fosfato salino (PBS, composición NaCl 0,14M, KCl 2,68mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47mM, pH 7,30) y se añadió medio DMEM incompleto (libre de SFB). Se incubó durante 24 horas con una confluencia de 1x10<sup>6</sup> células/mL de medio. Después de las 24 horas, se colectó el medio condicionado, se centrifugó a 300xg durante 10 minutos y luego a 4500xg durante 20 minutos a 4°C para eliminar células y detritos celulares, respectivamente (Centrífuga Sorvall ST 16R, rotor TX-400, adaptador 75003655). El medio se conservó a -80°C hasta su uso. La Figura 5-4 ilustra el proceso de obtención de medio condicionado. Las células condicionantes de medio se trataron con tripsina al 0,25%-EDTA al 0.53mM hasta alcanzar el desprendimiento de la superficie de crecimiento. La suspensión celular se centrifugó a 300xg durante 5 minutos.

El pellet celular se suspendió en PBS, se hizo una revisión morfológica y se evaluó el porcentaje de apoptosis celular mediante el Tali<sup>®</sup> Apoptosis Kit, usando Annexin V Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (células en apoptosis) y yoduro de propidio 535/617 (células muertas por necrosis).





**Figura 5-4 Esquema de cultivo in vitro de la línea celular MCF7.** Siembra de células MCF7 y recolección de medio condicionado. DMEMc es el medio suplementado con SFB 10% y PEST 1X, DMEMi hace referencia al medio incompleto sin SFB. El medio VE's se denomina al medio condicionado que contiene las vesículas y otras moléculas secretadas por las células (secretoma).

### 5.2.2 Pretratamiento de medio condicionado

El medio condicionado, obtenido del cultivo celular y previamente centrifugado, se clarificó mediante un equipo de filtración Steriflip GP 0,22µm Express PLUS®PES. Posteriormente, se concentró utilizando un filtro Amicon Ultra-15 (MWCO 10 kDa) mediante una centrifugación a 4000xg durante 30 minutos a 4°C, realizando un intercambio de buffer a PBS, pH 7,40. Como resultado, se obtuvieron tres soluciones de medio condicionado concentradas, denominadas secretomas a 20X, 70X y 140X, respectivamente.

### 5.2.3 Ultracentrifugación

Se colocaron 2,2mL de secretoma 70X en cada tubo Thinwall Polyallomer, según los parámetros establecidos para la ultracentrífuga Beckman Optima™ TL-100 con rotor TLS-55 Swinging Bucket. Inicialmente, se llevó a cabo una centrifugación a 10000xg durante 10 minutos a 4°C; luego, el sobrenadante resultante se sometió a una centrifugación a 19000xg durante 30 minutos a 4°C para obtener un pellet de vesículas grandes. Posteriormente, el sobrenadante se filtró usando la unidad de filtración Millex™-GV, PVDF, 0,22µm, seguido de un primer ciclo de ultracentrifugación a 100.000xg durante 70 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue recolectado y etiquetado como fracción 1 de proteína. El pellet se suspendió en PBS, pH 7.40, y se sometió a un segundo ciclo de ultracentrifugación a 100000xg durante 90 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se colectó y etiquetó como fracción 2 de proteína. El pellet obtenido se suspendió nuevamente en PBS, y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

### 5.2.4 Cromatografía por exclusión de tamaño

Los secretomas 20X y 140X se centrifugaron a 17000xg durante 30 minutos a 4°C, utilizando una microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R. El pellet resultante se suspendió en PBS a pH 7.40, correspondiendo a las Vesículas Extracelulares Grandes (L-EVs), y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Se sembraron 500 µL del sobrenadante en las columnas qEV Original Gen 2 de 35 y 70nm (35nm Serial # ICO3510002, 70nm Serial # ICO7010003) respectivamente. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se añadieron secuencialmente 400µL de Gibco™ PBS a pH 7,40, lo que permitió la elución de 16 fracciones de igual volumen. Estas fracciones se conservaron en tubos pretratados con albúmina sérica bovina (BSA, 10mg/mL) y en tubos de bajo enlace (Eppendorf® Protein LoBind Tube PCR clean, Lote L202431H) a -80°C hasta su uso.

### 5.2.5 Filtración dirigida

Se empleó el kit PureExo® Exosome Isolation Kit (Cat #P100, Lote 20171016, 101Bio.com) como técnica de filtración dirigida. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se utilizaron 2mL de secretoma 1X, a los cuales se les añadió 0,75mL de la solución de trabajo, homogeneizándola durante 10 minutos. La mezcla resultante se incubó durante 30 minutos a 4°C. Después de este período se espera la formación de dos fases diferenciadas y una interfase denominada “Cloudly layer”; sin embargo, el fabricante contempla la posibilidad de aparición de una sola fase y la capa nubosa con las que se debe seguir el protocolo recomendado. Al observar la presencia de una sola fase superior y una capa nubosa, se retiró la fase superior, que se reservó y etiquetó como fracción 8b. La capa nubosa se procesó llevando a cabo dos series de centrifugaciones a 5000xg por 3 minutos y 4°C, retirando la fase superior e inferior en cada paso, que se reservaron y etiquetaron como fracción 10top/bottom y 11 top/bottom.

Posteriormente, la capa nubosa se dejó secar a temperatura ambiente durante 7 minutos y se suspendió en PBS a pH 7,40 a un volumen cuatro veces superior al volumen de la capa nubosa, pipeteando vigorosamente 40 veces. Seguidamente, la mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex durante 3 minutos, seguido de pipeteo vigoroso 10 veces. Después se centrifugó a 5000xg por 5 minutos. El pellet se suspendió en 100 µL de PBS, se reservó y etiquetó como fracción “Cloudly Layer”, mientras que el sobrenadante se transfirió a la columna provista en el kit y se centrifugó a 1000xg por 5 minutos; el filtrado

se reservó y etiquetó como fracción 16. Todas las etapas de centrifugación se realizaron en la centrifuga (Thermo IEC Micromax RF Microfuge). Las siete fracciones obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **5.2.6 Cuantificación de proteína**

La cuantificación de proteínas en el secretoma concentrado se llevó a cabo mediante el método de Amido Black. Se sembraron 2 µL de cada estándar y de las muestras en una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond-C extra, Amersham, Lote 59607). Después de 5 minutos de secado de la membrana a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con buffer tris salino-tween (TBS-T, Tris base 0,025M, NaCl 0,13M, KCl 0,0025M, Tween 20 0,05%) durante 3 minutos cada uno. Posteriormente, se efectuó un lavado con agua tipo I durante 3 minutos.

A continuación, la membrana se incubó en la solución de tinción (Amido Black 0,1%, metanol 45%, ácido acético 10%) durante 3 minutos. Después de este tiempo, se lavó la membrana dos veces con agua tipo I durante 3 minutos cada vez y luego con solución de lavado (Metanol 90%, ácido acético 2%) dos veces por 3 minutos. Para finalizar, se realizó un lavado con agua tipo I durante 5 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente. La cuantificación se llevó a cabo mediante el análisis de densitometría utilizando el programa ImageJ. Para la curva de calibración, se empleó un estándar de BSA (Pierce 2 mg/mL, Lote 23209, IL, USA).

En cuanto a la cuantificación de proteínas en las fracciones obtenidas durante los métodos de purificación de vesículas extracelulares, se empleó el método colorimétrico de ácido bicinonínico con el Kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Enhanced) de Thermo Scientific. Este método se adaptó al protocolo de Micro BCA y se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro/fluorómetro DeNovix Serie DS-11. La curva de calibración para este caso también se construyó utilizando un estándar de BSA (Pierce 2mg/mL, Lote 23209, IL, USA).

### **5.2.7 Identificación de marcadores exosomales**

Los secretomas 20X y 140X, así como las fracciones procedentes de la cromatografía de exclusión por tamaño, de la filtración dirigida y de la ultracentrifugación, se sembraron en

membranas de nitrocelulosa de 0,22 $\mu$ m (Hybond-C extra, Amersham, Lote 59607) utilizando el dispositivo de microfiltración BioDot (Bio-Dot Apparatus #1706545, Biorad) siguiendo las indicaciones del manual (53).

Después de la siembra, se llevó a cabo un lavado con buffer tris salino-tween (TBS-T, Tris base 0,025M, NaCl 0,13M, KCl 0,0025M, Tween 20 0,05%) a presión. Luego, se liberó la membrana del dispositivo y se realizó un segundo lavado con TBS-T, cada uno durante 3 minutos.

A continuación, la membrana se incubó con la solución de bloqueo fresca (Tris base 0,025M, NaCl 0,13M, KCl 0,0025M, Tween 20 0,05%, PVP40 1%) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de este período, se lavó la membrana tres veces con TBS-T durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios CD81 (1:1000) (Mouse monoclonal [M38], ab79559, abcam), CD63 (1:1000) (Mouse monoclonal [TS63], ab59479, abcam), Hsc70 (1:1000) (Mouse monoclonal [B6], sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, INC) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados con TBS-T por 5 minutos cada uno. Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario Anti-ratón (1:30000) durante 45 minutos, seguido de 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno. Las señales fueron registradas mediante la reacción ECL (ECL™ Prime Western Blotting System, Cytiva RPN2232).

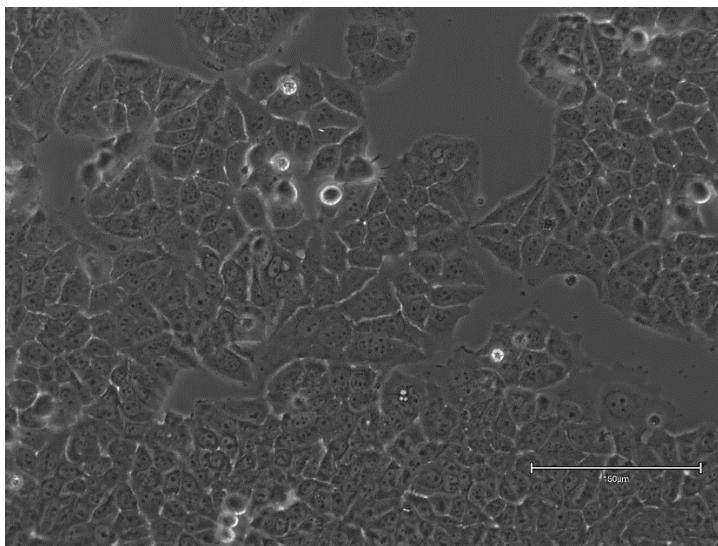
### **5.2.8 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)**

Las fracciones obtenidas mediante la cromatografía qEV de 35 y 70 nm se agruparon en pares según el orden de elución, siguiendo el perfil establecido por el fabricante. Las fracciones derivadas del kit PureExo junto con las obtenidas por ultracentrifugación, se diluyeron a factores de 1:10 y 1:100 antes de someterlas al análisis con el equipo NanoSight NS300 de Malvern. Se utilizó el láser verde, la cámara sCMOS, y se ajustaron automáticamente los niveles y la ganancia de la cámara. Se capturaron 5 videos de 60 segundos cada uno, los cuales fueron analizados mediante el software NTA 3.4 Build 3.4.4. Los resultados se calcularon y expresaron por mililitro de medio condicionado o su equivalente a  $1 \times 10^6$  células condicionantes y se reporta el error estándar de la medición del equipo.

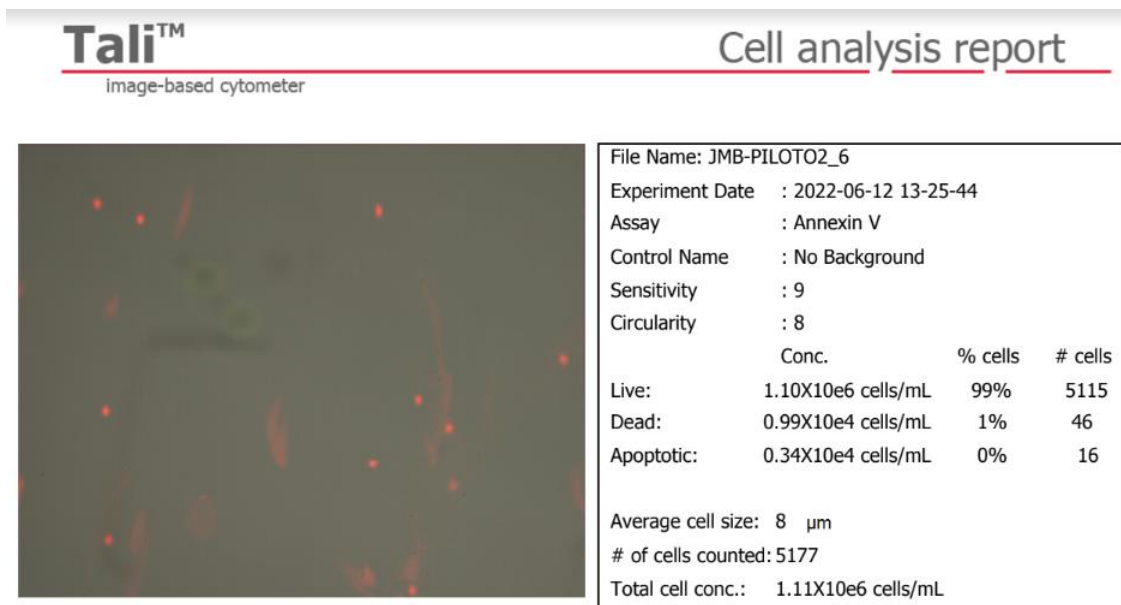
## 5.3 Resultados y discusión

### La ultrafiltración como método previo a la purificación de vesículas

El cultivo celular se comporta de acuerdo con lo estudiado por el Laboratorio de Fisiología Molecular del INS alcanzando la confluencia deseada de  $1 \times 10^6$  células/mL de medio con dos cambios de medio y uno de privación de SFB. La morfología se conserva con una geometría poligonal, tamaño variado y la formación de agregados como se observa en la Figura 5-5. La tasa de apoptosis que se encontró fue baja y considerada por el sistema en 0%, como se muestra en la Figura 5-6; esto representa que el cultivo bajo las condiciones seguidas tiene una viabilidad óptima y permite la obtención de vesículas extracelulares en el medio recolectado con una baja tasa de cuerpos apoptóticos que interfieran en los procesos de purificación e identificación de las vesículas de interés. Además, el uso de DMEM incompleto durante las 24 horas permitió conservar la viabilidad celular e indirectamente simplificar el proceso de obtención de medios puesto que no fue necesario usar SFB depletado de vesículas.



**Figura 5-5 Micrografía del cultivo celular de MCF7 en condiciones de cultivo.** Las células en cultivo de medio DMEM completo se observaron en microscopio de contraste de fase y se registró la imagen usando el microscopio Invitrogen™ EVOS™ M5000 Imaging System en un aumento de 40X.



**Figura 5-6 Reporte de muerte por apoptosis y necrosis en cultivo de células MCF-7.** Se usó el citómetro basado en imágenes Tali® y el Apoptosis Kit – Annexin V Alexa Fluor® 488 y yoduro de propidio. En rojo se observan las células en proceso de muerte y en verde las células apoptóticas. Las células vivas son contadas como eventos de acuerdo con la calibración del equipo en circularidad: 8 y sensibilidad: 9 que se muestran con otras capas.

Siguiendo la metodología detallada en la Figura 5-4, se obtuvo un medio condicionado que se clarificó mediante el equipo de filtración Steriflip GP 0,22μm sin pérdida de volumen. La concentración y el intercambio de buffer a través del Amicon (MXCO 10kDa) resultaron en un primer secretoma 20X. La cuantificación de proteína del secretoma se hizo usando del método AmidoBlack dado que el rojo fenol contenido en el DMEM representa un interferente en el protocolo de cuantificación por ácido bicinonínico. El secretoma 20X mostró una concentración de proteína de 0,28 mg/mL, Dado que esta concentración debería ser suficiente para los siguientes procesos de purificación y, además, no mostró señales claras en el dot blot para los marcadores de vesículas, se decidió realizar un segundo proceso de concentración hasta alcanzar los valores de 70X y 140X que se utilizaron para los análisis posteriores.

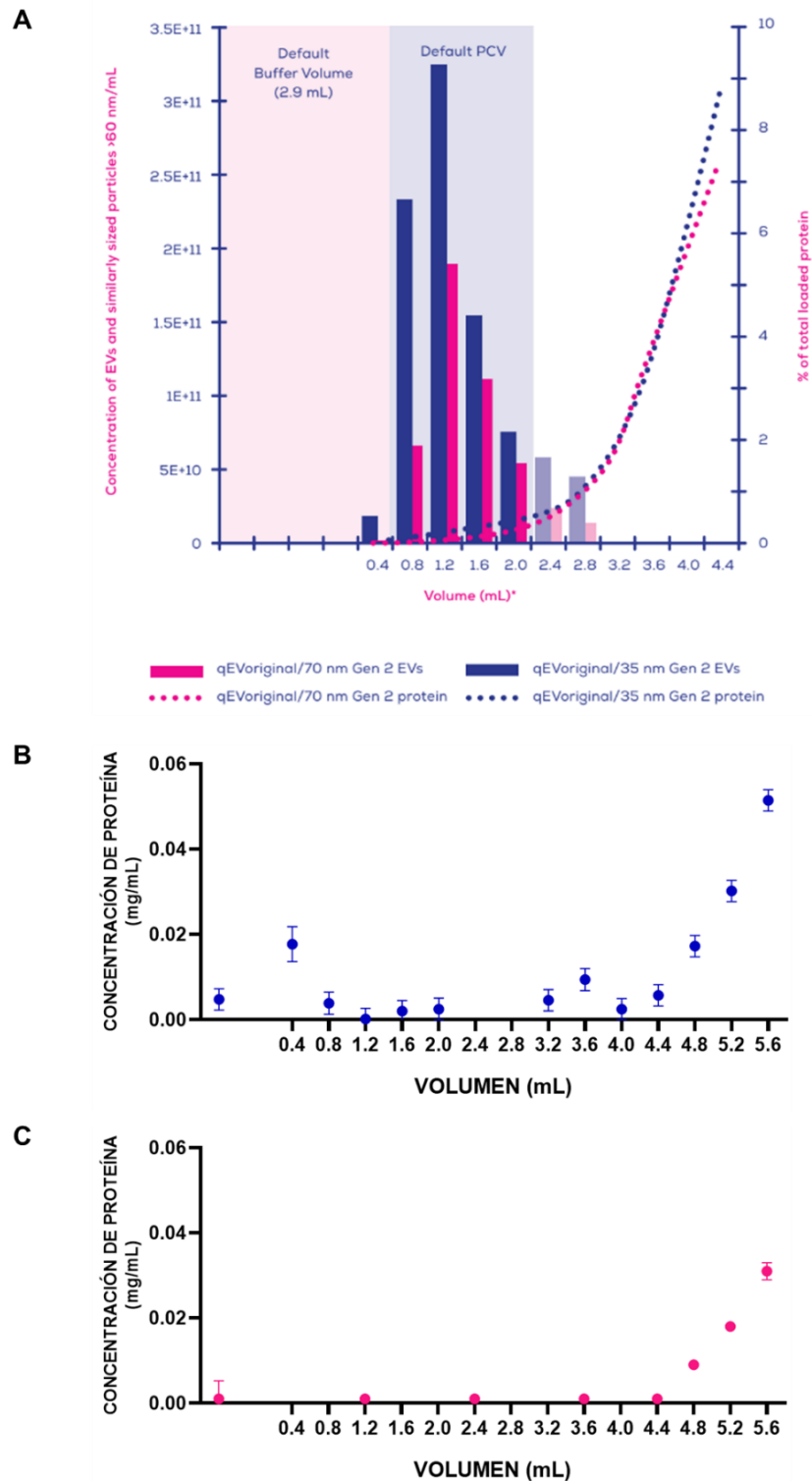
### **qEV 35nm aísla vesículas de la proteína soluble en el medio condicionado**

Siguiendo la recomendación del fabricante se hizo inicialmente una centrifugación a 17000xg con el fin de retirar las vesículas grandes para obtener un mayor rendimiento con las columnas.

La primera purificación usando la columna qEV Original Gen 2 35nm se hizo sembrando 500  $\mu$ L del secretoma 20X libre de vesículas grandes, obteniendo al inicio dos fracciones de volumen muerto (en adelante denominadas -1 y 0) y 14 fracciones de vesículas o proteína purificada (en adelante denominadas 1-14, respectivamente). Como se observa en la Figura 5-7, el perfil de elución de proteína en las columnas cumple con el perfil propuesto por el fabricante (Figura 5-7A), mostrando un incremento de la proteína soluble a partir de la fracción 11 diferente al pico de proteína de la fracción 1, lo que podría deberse a la proteína propia de las vesículas purificadas; el pico de proteína identificado en la fracción -1 se puede deber a la presencia de algunas de las vesículas grandes que permanecieron en el proceso de separación después de la centrifugación a 17000xg (Figura 5-7B).

De igual manera, se usó la columna qEV Original Gen 2 70nm con 500  $\mu$ L de secretoma libre de vesículas grandes y el perfil de elución de proteína libre también se observó a partir de la fracción 11 (Figura 5-7C) con tres picos de proteína probablemente asociadas a otras vesículas.

En ambas separaciones, se observa que el perfil de elución de proteínas sigue un patrón similar al propuesto por el fabricante, lo que permite obtener fracciones enriquecidas en vesículas (fracciones 1 y 2, qEV 35nm), estando libres de proteínas solubles. Este perfil de elución no se replica en la columna de 70nm, ya que el rango de separación de esta es de 70-1000nm, lo que resultaría en un espaciado mayor en las fracciones de elución de los exosomas en comparación con la columna de 35nm, que tiene un rango de separación de 35-350nm. Posteriormente, se lleva a cabo la correlación entre la concentración de proteínas y la presencia de marcadores exosomales (Dot Blot), así como la concentración de partículas (NTA).

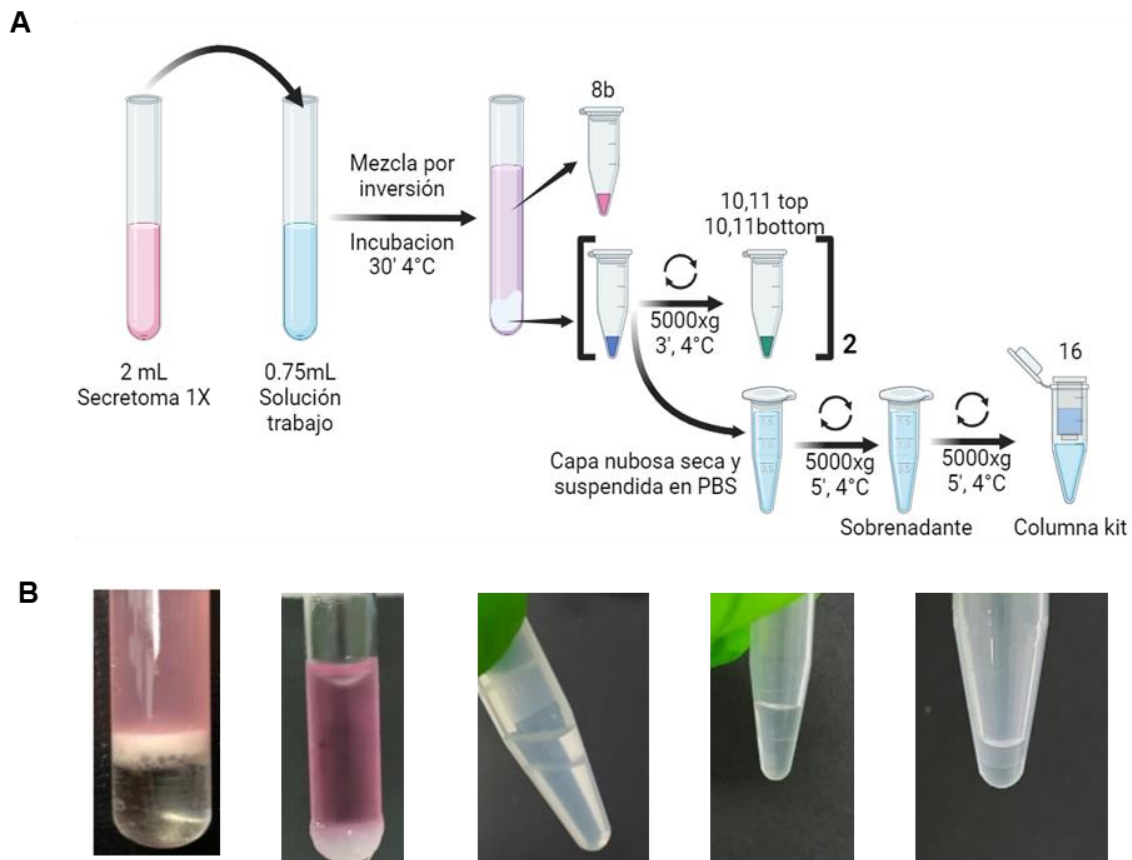


**Figura 5-7 Perfil de elución de proteína usando la columna qEV Original Gen 2 35nm y 70nm.** Se muestra separación cromatográfica de muestras en las columnas qEV (A) según el fabricante, (B) para el secretoma 20X en qEV 35nm y (C) qEV 70nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE.



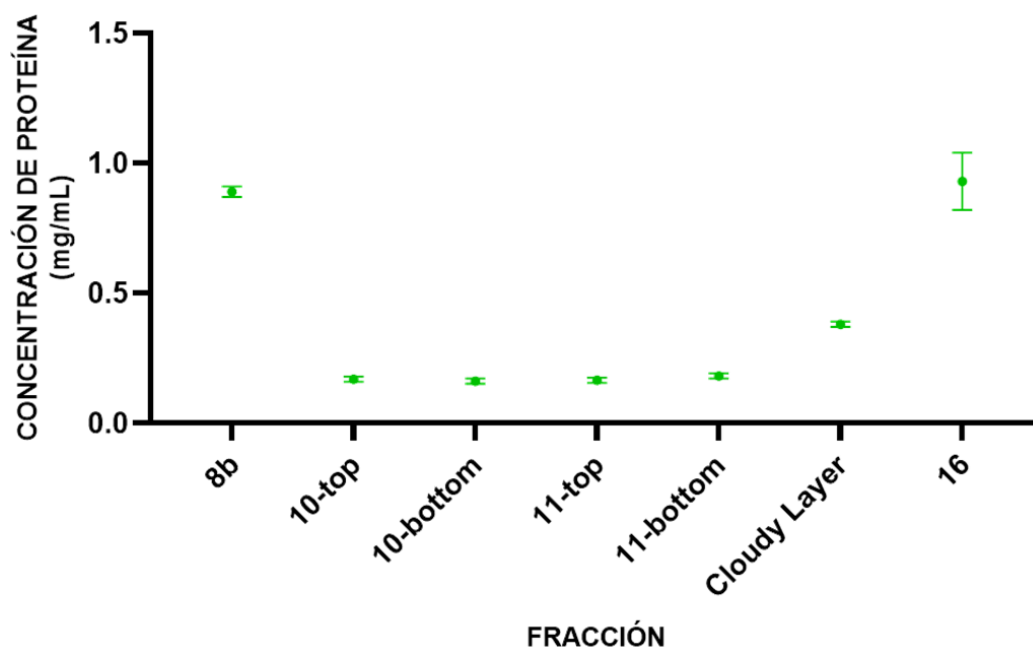
### Separación por filtración dirigida no es automatizable

Se utilizó el kit comercial PureExo de 101Bio, que emplea un filtro de tratamiento para eliminar la proteína soluble o contaminante y aislar vesículas extracelulares tipo exosomas con una pureza del 95% según el fabricante. Se siguieron las especificaciones del kit, utilizando 2mL del secretoma 1X (medio condicionado únicamente filtrado por Steriflip 0,22µm), y llevando a cabo la metodología descrita se obtuvieron las fracciones que se muestran en la Figura 5-8A. Inicialmente, se observó una fase superior sobre la “Cloudly layer”, situación que se prevé en las instrucciones del kit y por tanto se procede según el mismo (Figura 5-8B).



**Figura 5-8 Esquema general para el uso de PureExo Exosome Isolation Kit.** (A) A partir de la adición de la solución de trabajo se continúa con una serie de centrifugaciones que buscan limpiar la capa nubosa y recolectar las fases superior e inferior con respecto a esta. Cada fracción se etiquetó según el paso en que se recolectaron. (B) De izquierda a derecha: Fotografía de la etapa inicial separación y la formación del “Cloudly layer” esperada y reportada por el kit, fases obtenidas para el tratamiento del secretoma 1X con la solución de trabajo, “Cloudly layer” obtenida en cada etapa de centrifugación.

Se procedió a retirar únicamente la fase superior, de acuerdo con los pasos de separación de fases estipulados en las instrucciones de uso del kit. Además, se notó que lo denominado como "Cloudy Layer" no representaba un volumen fácilmente perceptible. Sin embargo, se continuó con el procedimiento según el manual hasta recolectar siete fracciones, denominadas según el paso en el que se obtuvieron. Se cuantificó la concentración de proteína en cada una de estas fracciones, y los resultados mostraron concentraciones similares entre la primera y la última fracción. Esto sugiere que la proteína soluble se purificó desde la fracción 8b, quedándose en la fase acuosa de la mezcla de trabajo. Mientras tanto, los exosomas se retuvieron en la Cloudy Layer a lo largo del proceso y, en el paso 11, fueron extruidos de la misma y purificados de los restos que pudieran quedar, utilizando la columna incluida en el kit. Por lo tanto, se observa una concentración ligeramente más alta en la fracción de la Cloudy Layer en comparación con las fracciones anteriores, debido a los exosomas que podrían haber quedado retenidos (Figura 5-9).

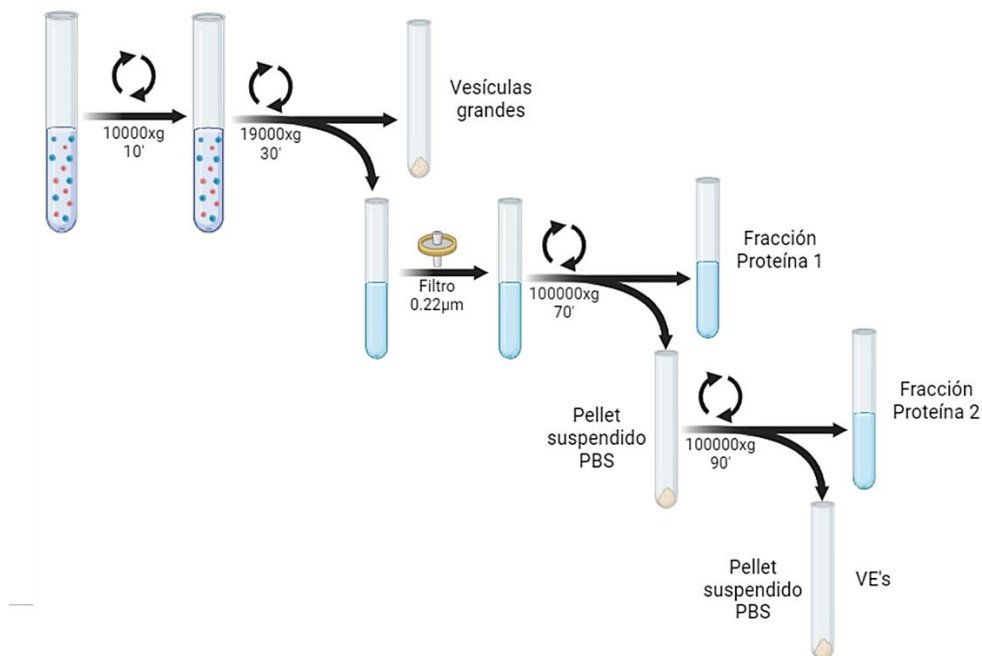


**Figura 5-9 Abundancia de proteína para las fracciones obtenidas usando el kit PureExo 101Bio.** La etiqueta de las fracciones analizadas corresponde a la etapa de purificación de la que se obtuvo; la etiqueta *top* hace referencia a la fase superior de la "Cloudy layer" y *bottom* a la inferior. Las mediciones se realizaron por triplicado usando el método de cuantificación de microBCA. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE.

A partir de esta dificultad técnica, se revisó la concentración del secretoma para seguir la recomendación del fabricante respecto a la cantidad de células por mililitro de medio condicionado. Se optó por utilizar medio condicionado directo, obteniendo los mismos resultados con la formación de una interfase pequeña e imperceptible. Además, se realizó una prueba con SFB, con la que se obtuvo una "Cloudy Layer" representativa y dos fases alrededor de ella. Por lo tanto, se infiere que la formación de la interfase depende de la concentración de vesículas provenientes en la muestra y de la proteína soluble, ya que, si esta última está disminuida, esta no podría interactuar y separarse la fase orgánica de la mezcla de trabajo y, por lo tanto, no formaría fases de mayor volumen.

### Las técnicas comerciales son comparables con la ultracentrifugación diferencial.

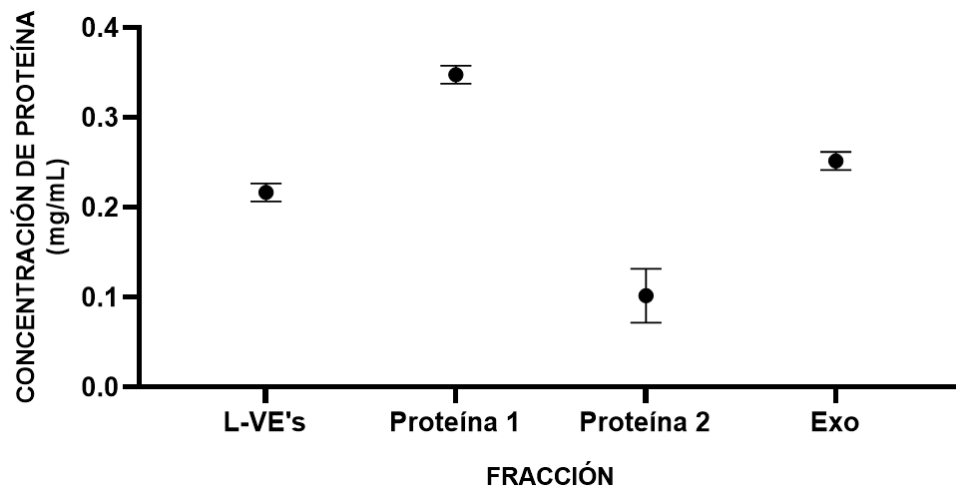
Para realizar una comparación entre las técnicas comerciales evaluadas, se llevó a cabo la ultracentrifugación diferencial, siendo esta la técnica más utilizada en los informes relacionados con vesículas extracelulares. Se adaptó el protocolo utilizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de Salud, como se describe en los métodos (Figura 5-10).



**Figura 5-10** Esquema para la purificación de exosomas por medio de ultracentrifugación diferencial. Se realizan dos ciclos de centrifugación iniciales para

retirar las vesículas extracelulares grandes. Seguidamente se realiza una ultracentrifugación a 100000xg para retirar en el sobrenadante la proteína soluble de la muestra. El pellet es suspendido en PBS y se realiza un segundo ciclo de ultracentrifugación para terminar de retirar la proteína soluble y obtener los exosomas en el botón o pellet.

Del proceso de ultracentrifugación se obtuvieron diferentes fracciones, a las cuales se les cuantificó la proteína mediante el método de microBCA (Figura 5-11). Similar a la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño, se llevó a cabo un primer ciclo de centrifugación a 19,000xg para eliminar las vesículas extracelulares grandes, lo que resultó en una concentración de proteína similar a la obtenida para los exosomas. Sin embargo, este parámetro no permite establecer una comparación en la distribución de las vesículas, ya que el contenido proteico es relativo a su biogénesis. Para ello, se realizó posteriormente una comparación en la concentración de las partículas.



**Figura 5-11 Abundancia de proteína en las fracciones obtenidas a través de la ultracentrifugación diferencial.** La etiqueta de las fracciones analizadas corresponde a la etapa de purificación de la que se obtuvo: *L-EV's* corresponde a las vesículas grandes obtenidas a 10000 y 19000xg, *Proteína 1* a la proteína soluble en el sobrenadante después del primer ciclo de ultracentrifugación a 100000xg, *Proteína 2* a la proteína soluble después del segundo ciclo de ultracentrifugación y *Exo* a los exosomas purificados encontrados en el botón o pellet final. Las mediciones se realizaron por triplicado usando el método de cuantificación de microBCA. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE.

Similar con la técnica de filtración dirigida, la mayor concentración de proteína soluble se purificó en el primer ciclo de ultracentrifugación a 100,000xg y se aproximó a la obtenida para la concentración de proteínas en el pellet de exosomas.

El tamaño aproximado de los exosomas aislados por la técnica de ultracentrifugación diferencial está dentro del rango considerado para exosomas y reportado por Cao, Y., et al (54), lo que permite tener un parámetro de comparación con las técnicas aplicadas, siendo el kit de filtración dirigida el que muestra una cercanía a dicho valor.

















Otros comparativos basados en la identificación de marcadores exosomales y análisis de partículas se realizan posteriormente.

### **CD81, CD63 presentes en las vesículas aisladas**

Se identificaron mediante inmunodetección los marcadores CD81 y CD63, reconocidos como tetraspaninas, y Hsc70, proteínas utilizadas para caracterizar vesículas extracelulares, en particular, los exosomas. La Figura 5-12 muestra que las fracciones purificadas utilizando el Kit PureExo exhiben una señal evidente para el marcador CD81, lo que confirma la presencia de exosomas en las últimas etapas de purificación: 11top, 11bottom y la fracción 16, por lo tanto, se infiere que, dada la falta de contraste, volumen y homogeneidad de la “Cloudy Layer” o resina que debe contener los exosomas, el proceso de retirar las fases superior e inferior lleva parte de la muestra purificada ocasionando la presencia de los exosomas en más de una fracción.

Inicialmente se buscó señal de los marcadores exosomales en las fracciones obtenidas de la purificación del secretoma 20X usando las columnas qEV Original Gen, sin embargo, dada la baja señal obtenida para CD81 se tomó la decisión de concentrar el secretoma 140 veces. Esto se realizó cuidadosamente para evitar una sobrecarga en la concentración de proteína sembrada en la columna, garantizando así el correcto funcionamiento de esta. Como resultado de esta estrategia, se observó una señal más clara y definida en las fracciones 1 y 2 de la columna qEV de 35nm. Esta observación confirma el análisis previo en relación con el perfil de elución de proteínas.

La ausencia de señales en la columna qEV de 70nm (datos no mostrados) refuerza la importancia de la selección de la columna según el rango de tamaño que utiliza para eluir las vesículas (70-1000 nm). Esto hace que los volúmenes o fracciones que contienen los exosomas sean más tardíos en esta columna en comparación con la columna qEV de 35nm (35-350 nm), donde los exosomas eluyen en fracciones más tempranas. Este aspecto es crucial al considerar el tamaño de las vesículas a purificar según las características específicas de cada línea celular productora.

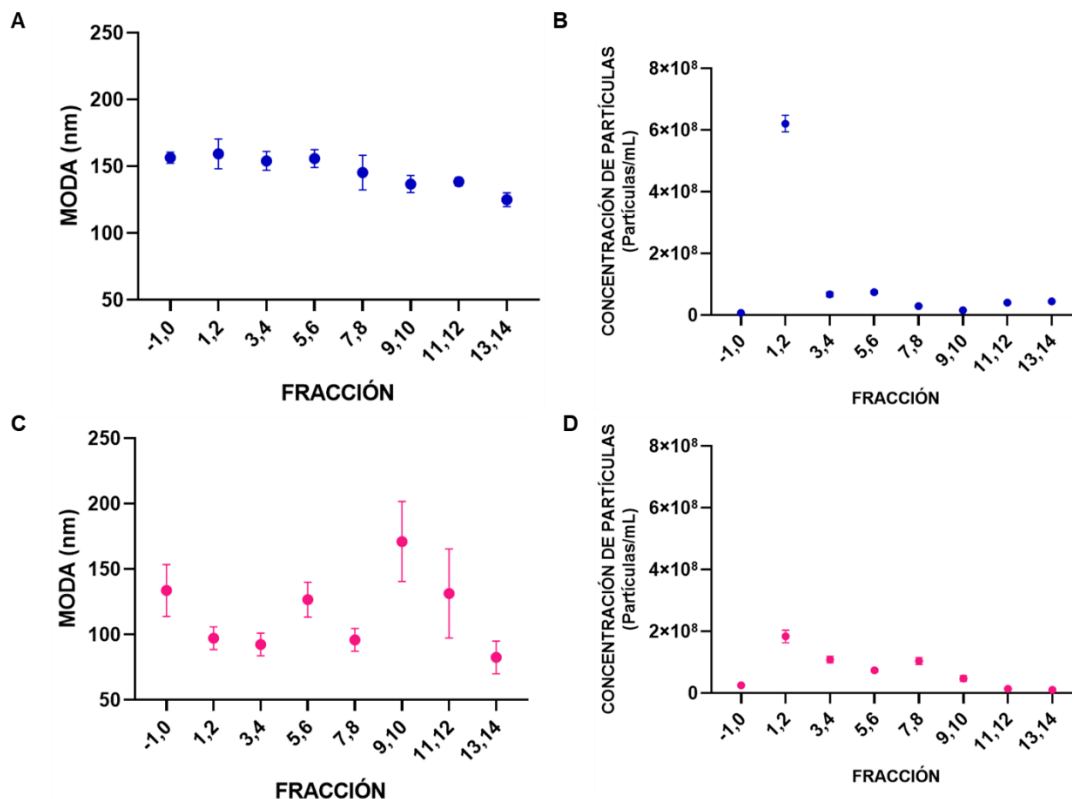
Método	Fracción	Marcadores exosomales					
		CD81		CD63		Hsc70	
qEV 35nm	1		Control positivo  Secretoma 140X		Control positivo  Secretoma 140X		Control positivo  Extracto celular
	2		 Extracto celular	-	 Extracto celular		 Extracto celular
PureExo	11top		Control positivo  Extracto celular				
	11bottom						
	16						
UCd	100.000xg						

**Figura 5-12 Identificación de marcadores proteicos exosomales.** Señal encontrada en fracciones purificadas por qEV Original Gen 2 35nm, PureExo y ultracentrifugación diferencial para la identificación de marcadores exosomales (en paréntesis de detallan los títulos usados): CD81 (1:1000), CD63 (1:1000), Hsc70 (1:1000) acoplados a Anti-mouse (1:30000) por la técnica de Dot Blot.

En este sentido, la detección clara de CD81 en estas fracciones refuerza la confianza en la pureza de los exosomas obtenidos. La presencia de CD63, otro marcador de tetraspanina comúnmente asociado con exosomas, también se verificó, brindando una confirmación adicional de la identificación exitosa de estas vesículas en comparación con la señal obtenida por el método tradicional de ultracentrifugación diferencial. Además, la inclusión de Hsc70 (55) como marcador contribuye a una caracterización más completa, respaldando la autenticidad de las vesículas extracelulares aisladas. Estos resultados contrastados con la señal vista en la purificación por ultracentrifugación fortalecen la validez de la metodología utilizada, a pesar de los desafíos técnicos enfrentados.

### Vesículas aisladas están dentro del rango de tamaño para exosomas

Basándonos en los resultados obtenidos en estas fracciones purificadas, se complementó la información sobre el contenido de cada una de ellas mediante la técnica de análisis de seguimiento de nanopartículas. Se identificó la moda del tamaño de las partículas contenidas en cada fracción y se evaluó la concentración de las partículas, como se muestra en la Figura 5-13.



**Figura 5-13 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) para las fracciones purificadas con qEV.** (A) Moda del tamaño de partículas purificadas con qEV 35nm (B) Concentración de partículas purificadas con qEV 35nm (C) Moda del tamaño de partículas purificadas con qEV 70nm (D) Concentración de partículas purificadas con qEV 70nm. Los datos se presentan normalizados por mililitro de medio condicionado equivalente a  $1 \times 10^6$  de células condicionantes. Las mediciones se realizaron por triplicado y los valores se presentan como media  $\pm$  incertidumbre experimental.

Las partículas purificadas por la columna qEV de 35nm principalmente se eluyeron en las fracciones 1 y 2, alcanzando una concentración de  $6.21 \times 10^8$  partículas/mL. Estas fracciones no solo mostraron la mayor concentración de partículas de este orden de magnitud, sino que también exhibieron la moda más prominente de tamaño:  $159,4 \pm 11,1$

nm (Figura 5-13A y B), concordante con lo observado en figuras anteriores en relación a la concentración de proteína y señal del marcador CD81. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los datos de tamaño no son determinantes para evaluar el grado de purificación, ya que el margen de error en las mediciones es amplio y relativo entre tipos de vesículas extracelulares, y no es un parámetro restrictivo para su clasificación.

Los resultados obtenidos para la columna qEV de 70nm son menos favorables en comparación con los obtenidos con la columna qEV de 35nm. No hay una fracción que presente una concentración de partículas del mismo orden de magnitud, y, además, estos resultados no son contrastables con los obtenidos para la concentración de proteínas por fracciones. Esto podría deberse a que el rango de separación de la columna qEV de 70nm es más amplio haciendo que las vesículas eluyan en fracciones más amplias, inicialmente, deberían eluir las de mayor tamaño, pero siguiendo la recomendación del fabricante se hizo un proceso previo de centrifugación para retirarlas de la muestra.

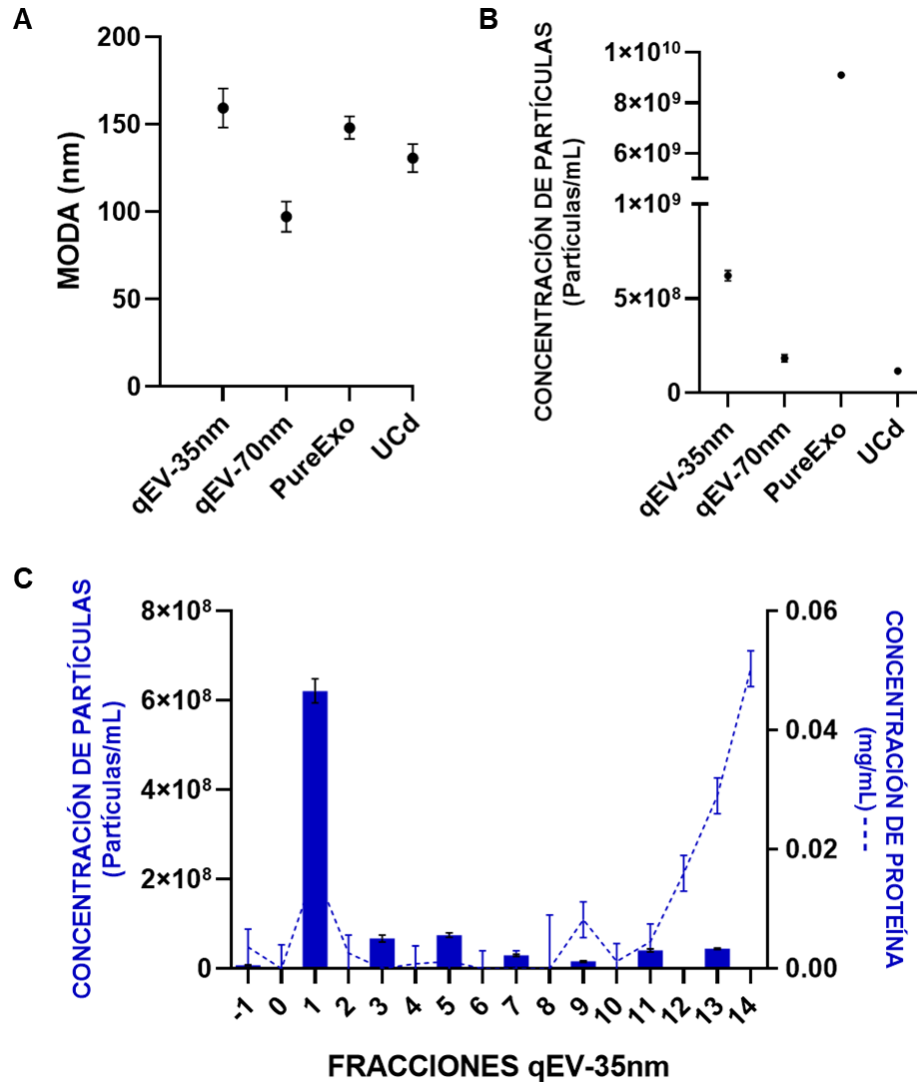
En resumen, al comparar los resultados obtenidos mediante NTA para los tres métodos de purificación evaluados (ver Figura 5-14), se observa que la moda del tamaño de partícula de los tres métodos se encuentra dentro del rango de 40-160 nm, que es el rango contemplado para los exosomas, y esta observación se confirma por la señal de los marcadores exosomales. La concentración de partículas es mayor al usar la columna qEV de 35 nm en comparación con la columna qEV de 70 nm, debido a la diferencia en el rango de tamaño para la purificación.

En el caso del kit PureExo, se observó una alta concentración de vesículas debido a la naturaleza de la técnica, donde se reducen las pérdidas de vesículas al omitir el paso de ultrafiltración para concentrar la muestra y por la eliminación de solventes que facilita la concentración de los exosomas purificados. Sin embargo, además de los problemas técnicos que se pueden presentar por la naturaleza de la muestra y el comportamiento de la mezcla de trabajo, esta técnica implica un mayor costo debido a la relación de muestra procesada y las cantidades disponibles en el kit.

Los resultados para la ultracentrifugación confirman la validez y comparabilidad de las técnicas empleadas, pero ponen de manifiesto las desventajas de esta técnica, como



posibles pérdidas de material en la recuperación de los pellets que contenían los exosomas, la disponibilidad del equipo y los altos tiempos de procesamiento.



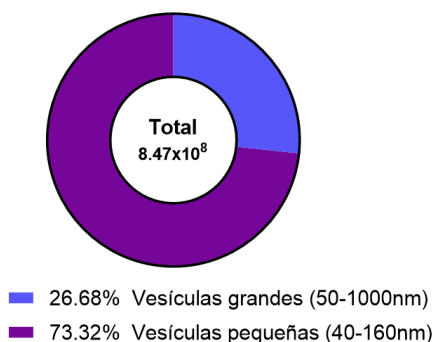
**Figura 5-14 Comparativos de proteína y NTA en vesículas extracelulares purificadas por los métodos probados.** (A) Moda del tamaño de partículas. (B) Concentración de partículas. (C) Comparación entre la concentración de proteína, la concentración de partículas para cada fracción obtenida usando la columna qEV 35nm. (A y B) Los datos se presentan normalizados por mililitro de medio condicionado equivalente a  $1 \times 10^6$  de células condicionantes. Las mediciones se realizaron por triplicado y los valores se presentan como media  $\pm$  incertidumbre experimental. (C) Los datos se presentan como media  $\pm$  DE.

En consecuencia, la columna qEV de 35 nm muestra los mejores resultados de rendimiento para la purificación de vesículas extracelulares tipo exosomas. Esta columna se destaca

por ser una técnica de costo accesible, con posibilidad de reutilización y práctica para el trabajo previsto en la continuidad del proyecto (Tabla 5-1).

Basándonos en estos resultados, se llevó a cabo un análisis de la distribución de las vesículas extracelulares basales producidas a partir de  $1 \times 10^6$  células de la línea celular MCF7, como se ilustra en la Figura 5-15 basada en los parámetros de nomenclatura propuestos por la MISEV 2023 (56). En mayor proporción, la línea celular parece generar vesículas pequeñas, incluyendo las que se consideran del tipo exosoma. Sin embargo, es crucial señalar que estas vesículas son relativamente grandes en tamaño en comparación con las producidas por otras líneas celulares reportadas en la literatura (57-59).

Las vesículas que se clasifican como grandes pueden incluir cuerpos apoptóticos; sin embargo, la tasa de apoptosis encontrada fue baja y en relación con ésta la tasa de cuerpos apoptóticos también lo es. Dado que estas tasas son tan bajas, se puede inferir que las vesículas grandes son propias de microvesículas o ectosomas. Estas vesículas de mayor tamaño se obtuvieron en el paso anterior a la cromatografía de exclusión por tamaño a 17.000xg y en el ciclo de ultracentrifugación a 19.000xg.



**Figura 5-15 Distribución de vesículas producidas por células de la línea MCF7.** De acuerdo con la nomenclatura de la MISEV2023 las vesículas grandes comprenden microvesículas y cuerpos apoptóticos y dentro de las vesículas pequeñas se encuentran los exosomas y partículas extracelulares. Los rangos de tamaño pueden solaparse debido a la naturaleza de las vesículas y el manejo dado.

**Tabla 5-1** Comparativo de las técnicas empleadas para la purificación de vesículas extracelulares de tipo exosoma provenientes de la línea celular de cáncer de mama MCF7.

	SEC <sup>1</sup> qEV 35nm	SEC <sup>1</sup> qEV 70nm	Filtración PureExo	UCd <sup>2</sup>
<b>Vol. de medio condicionado crudo</b>	70 mL	70 mL	2 mL	308 mL
<b>Pretratamiento al medio condicionado</b>	Filtración 0,22µM, Centrifugación 17.000 xg	Filtración 0,22µM, UF 10kDa,	Filtración 0,22µM	Filtración 0,22µM, UF 10kDa
<b>Concentración de medio condicionado</b>	140X	140X	1X	70X
<b>Vol. de medio condicionado concentrado</b>	500 µL	500 µL	2 mL	4,4 mL
<b>Tiempo de purificación</b>	60 min	60 min	60 min	3,3 h
<b>Concentración de vesículas purificadas por mL de medio condicionado</b>	6,21x10 <sup>8</sup> partículas/mL	1,84x10 <sup>8</sup> partículas/mL	9,1x10 <sup>9</sup> partículas/mL	1,17x10 <sup>8</sup> partículas/mL
<b>Tamaño de vesículas purificadas</b>	159,4 nm	97,2 nm	148,1 nm	130,8 nm
<b>Marcadores proteicos positivos</b>	CD81, CD63			

<sup>1</sup>SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño qEV Original Gen 2 IZON

<sup>2</sup>UCd: Ultracentrifugación diferencial

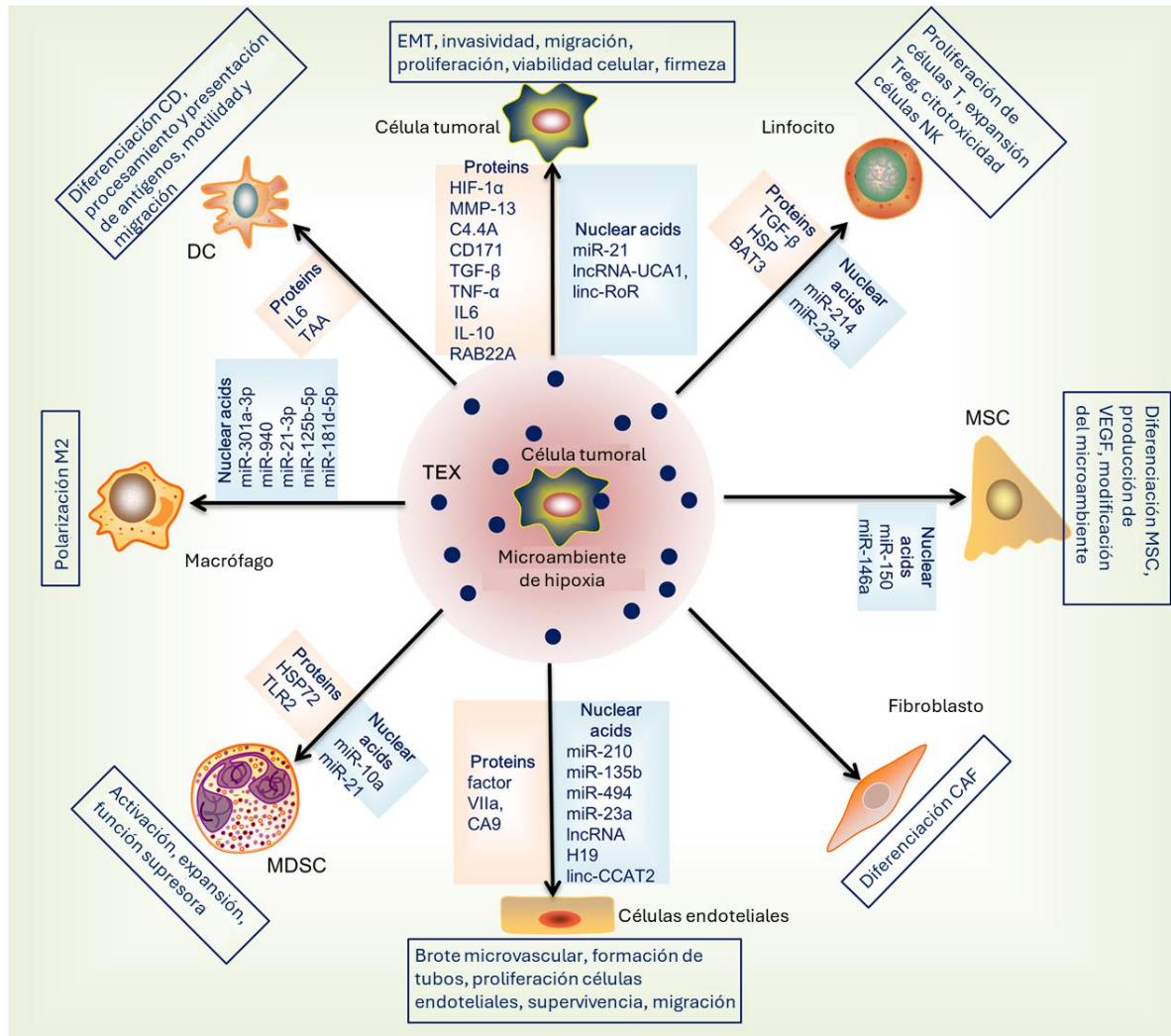
## **6.Exosomas y condiciones de hipoxia**

La hipoxia se define como la falta de oxígeno en un tejido, lo que ocurre en situaciones no fisiológicas, como durante el desarrollo de un tumor. Cada tipo de tejido tiene necesidades específicas de oxígeno debido a sus diferencias en la actividad metabólica y la red de vasos sanguíneos. Por ejemplo, en el tejido mamario en condiciones normales el nivel de oxígeno es en promedio del 8.5%, mientras que, en el cáncer de mama, un nivel del 1.5% se considera un estado de hipoxia. A diferencia de lo que ocurre en un tejido sano expuesto a un proceso de hipoxia moderada, en el cáncer, la hipoxia conduce a una mayor producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), lo que favorece la progresión tumoral (60).

En condiciones de hipoxia, las células tumorales no solo experimentan cambios en sus procesos metabólicos (61), sino que también se ven afectados procesos consecuentes como la producción de exosomas (Figura 6-1). Por ejemplo, en la línea celular MCF7 cultivada en atmósfera con un 1% o 0,1% de O<sub>2</sub>, además del tratamiento con dimetiloxalilglicina, un inhibidor de la hidroxilasa del Factor Inducible por Hipoxia (HIF), se observó un aumento en la producción de exosomas (62).

### **6.1 Inducción de hipoxia**

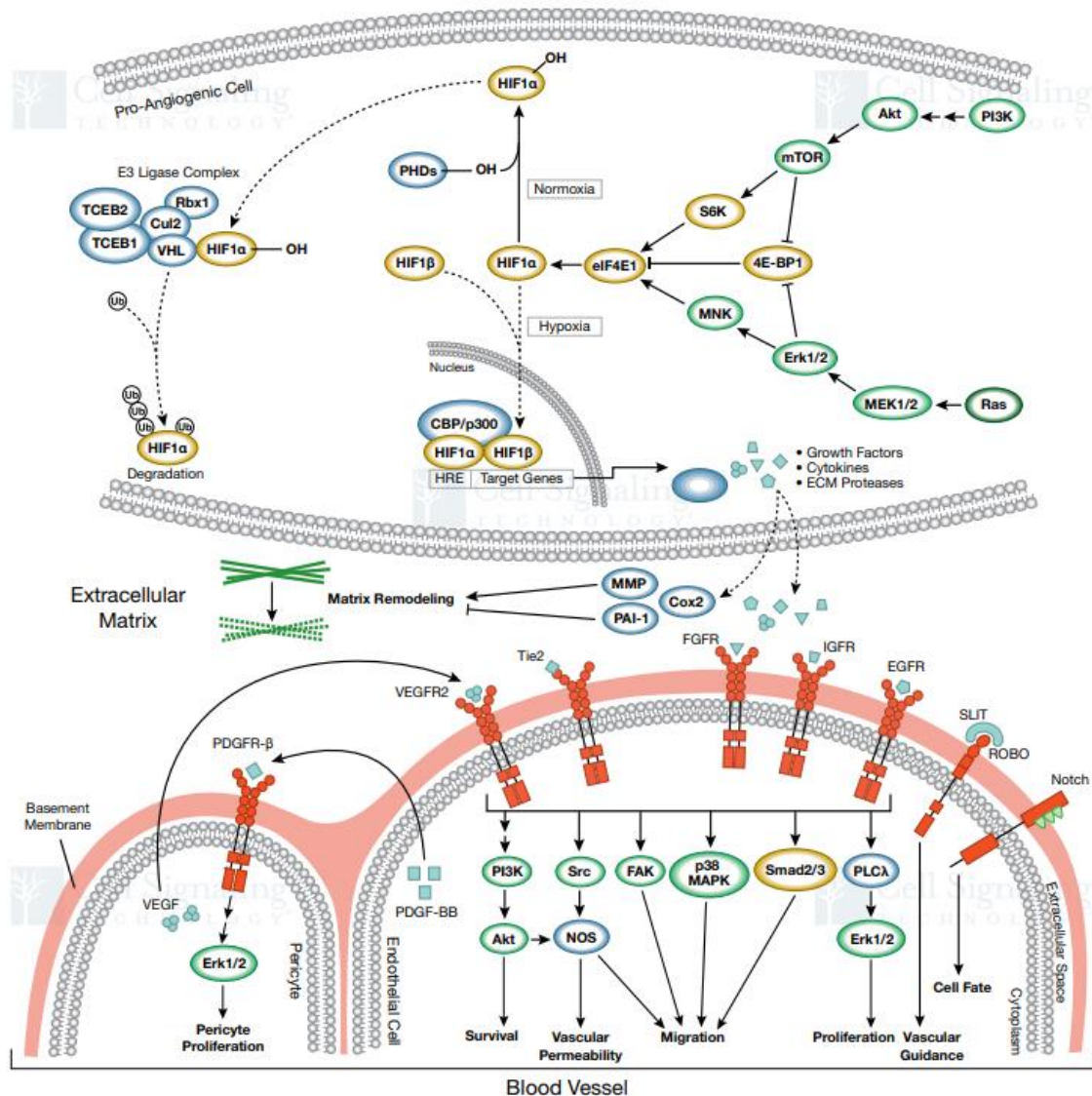
Durante la progresión tumoral, la hipoxia activa vías de señalización intracelulares, como ERK, NFκB y HIF1. Es importante destacar que HIF1 actúa como el punto de convergencia para las dos primeras vías. HIF1 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades, α y β. En particular, HIF1-α se sintetiza en respuesta a las vías de señalización PI3K y MAPK en procesos que no dependen del oxígeno. Sin embargo, la degradación de HIF1-α está asociada a condiciones de oxígeno y es regulada por la hidroxilación de las prolinas 402 y 564 por la enzima HIF1 Prolil-hidroxilasa (HPH). En condiciones de hipoxia, HIF1-α no puede ser hidroxilado, lo que evita su unión a la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (VHL).



**Figura 6-1 Exosomas y su relación con el microambiente tumoral de hipoxia.** Efectos regulados por proteínas (cuadros naranjas) y ácidos nucleicos (cuadros azules) transportados en exosomas tumorales (TEX) producidos en condición de hipoxia a diferentes células diana: Células dendríticas (DC), Células estromales mesenquimales (MSC), Fibroblastos asociados al cáncer (CAF), Células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), Macrófagos de fenotipo 2 (M2), Transición epitelio-mesenquimal. Modificado de Meng, W., et al. (2019) (63).

Como resultado, HIF1- $\alpha$  no puede ser ubiquitinado por la proteína ligasa de ubiquitina E3, lo que a su vez previene su degradación por el proteosoma 26S (64). De esta manera, en condiciones de hipoxia, HIF1- $\alpha$  se regula al alza. En conjunto con NF $\kappa$ B, regula genes oncogénicos de supervivencia, lo que incluye la estimulación de factores como el VEGF y sus receptores (Figura 6-2) (65).

Así, en la investigación del cáncer, se han propuesto diferentes métodos para alcanzar la hipoxia *in vitro*, por ejemplo, regulando el porcentaje de O<sub>2</sub> en la incubación de las células usando cámaras de hipoxia e incubadoras especiales para ello; desarrollando cultivos en tres dimensiones como esferoides o mamografías; o por adición de metales como el Co<sup>2+</sup> (66-68). El CoCl<sub>2</sub> estabiliza el HIF por diferentes mecanismos, siendo el más estudiado en el bloqueo de HPH, sin embargo, hay evidencia que lo puede hacer en el proceso de unión a VHL y/o con la ubiquitina E3 (69-71).



**Figura 6-2 Activación de señal angiogénica mediada por HIF.** En condiciones de hipoxia, las células pro-angiogénicas no pueden hidroxilar, ubiquitinar y degradar HIF1, lo que lleva a la producción de factores de crecimiento como el VEGF en sus diferentes isoformas mediante el splicing alternativo. La célula endotelial receptora de VEGF (de tipo

punta) crea un borde de ataque angiogénico activando las vías Notch-Gridlock, Ephrin-B2/EphB4 y Sonic Hedgehog (SHH), lo que resulta en ramificaciones vasculares. Una vez que los vasos sanguíneos maduran, las células endoteliales (CE) secretan factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-B para reclutar pericitos y células musculares lisas (VSMC), que a su vez producen angiopoyetina-1 (ANG-1), permitiendo que se unan a las CE. Estas células estabilizan el vaso formado mediante la activación del TGF- $\beta$  y la deposición de matriz extracelular. Diversas vías de señalización, como Notch-Gridlock, Ephrin-B2/EphB4 y Sonic Hedgehog, junto con efectores como PI3K, Src, FAK, p38 MAPK, Smad2/3 y PLC $\gamma$ /Erk1/2, regulan la supervivencia, permeabilidad y migración/proliferación celular en CE. Modificado de Technology CS (72).

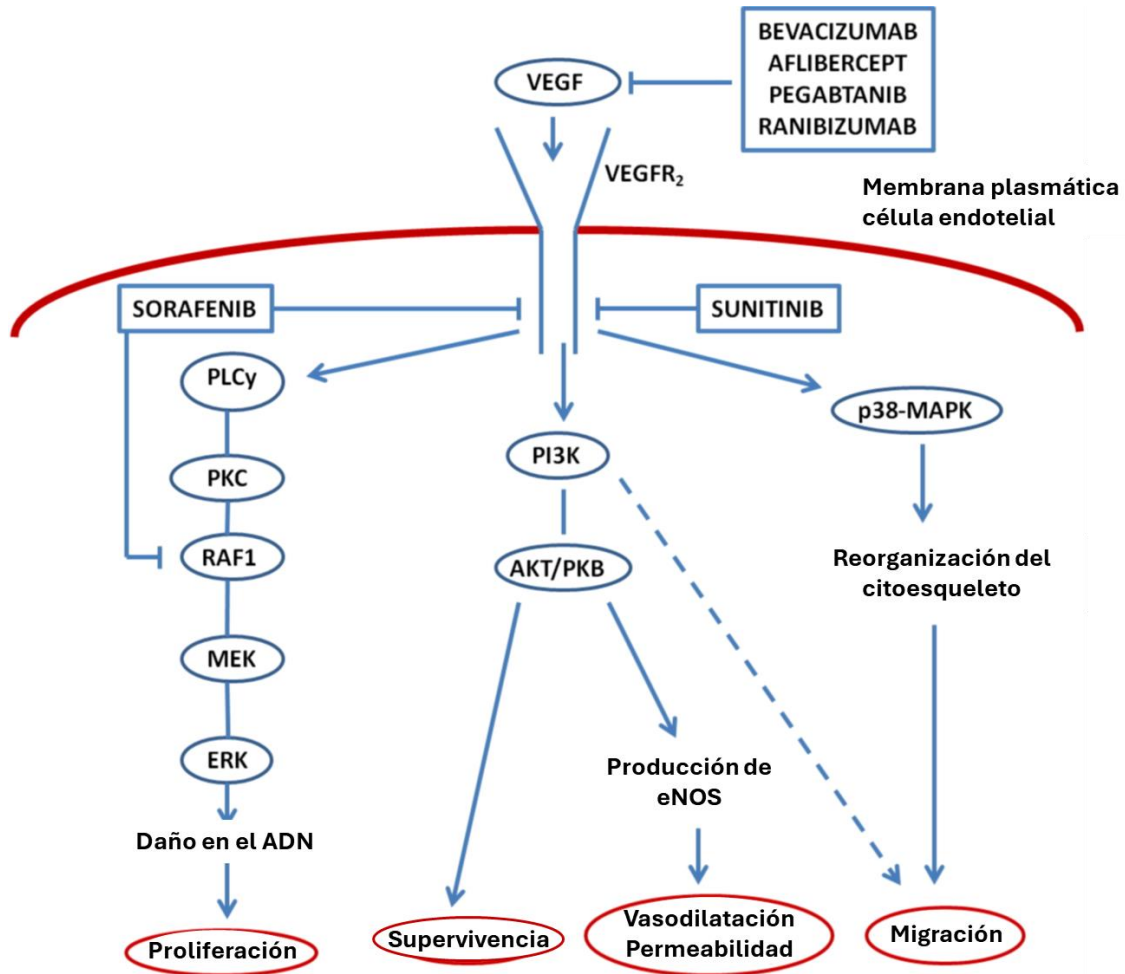
## 6.2 Factor de crecimiento vascular endotelial-VEGF

El proceso angiogénico involucra la producción de numerosas moléculas por parte de las células tumorales. Sin embargo, el VEGF destaca como una molécula central que no solo influye en las células vasculares, sino también en las células circundantes al tumor. El VEGF es una proteína homodimérica que se encuentra en forma soluble y en membranas celulares. Se presenta en varias isoformas, incluyendo A, B, C, D y el Factor de Crecimiento Placentario (PlGF), y se une a receptores con actividad tirosina quinasa, conocidos como VEGFR-1, 2 y 3 (73). El estimulador más importante de la angiogénesis es el VEGF-A, el cual es secretado por células no endoteliales. VEGF-A presenta nueve isoformas diferentes, siendo las más expresadas VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> y VEGF<sub>189</sub>. Este factor tiene la capacidad de unirse a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, siendo su afinidad por VEGFR-1 diez veces mayor y esta unión está mediada por las proteínas NP1 y NP2 (74).

Los niveles de VEGF varían según la condición, desde situaciones normales, como el crecimiento embrionario y la proliferación natural, hasta condiciones patológicas, como la hipoxia y la privación de nutrientes que se observan en entornos tumorales (75). Debido a esta variación, se han investigado y propuesto varios enfoques terapéuticos, incluyendo anticuerpos monoclonales, con el objetivo de neutralizar el VEGF, sus receptores o su actividad citosólica (76), como se representa en la Figura 6-3.

Se ha descubierto que el VEGF no solo es producido por las células tumorales en forma soluble, sino que también es transportado a través de vesículas extracelulares, tanto de forma directa (uniéndose a su receptor en la membrana vesicular) como indirecta (mediante mRNAs como carga que desencadenan la producción de VEGF y otros factores en la célula diana). Estos hallazgos han mostrado efectos pro-angiogénicos (77, 78).

El papel del VEGF transportado por vesículas extracelulares, incluyendo exosomas, ha sido evaluado en diversos tipos de cáncer, tanto en condiciones basales como después de la aplicación de tratamientos antitumorales. Se observó que estos exosomas influyen en el aumento de la cantidad de vesículas producidas por las células y en el contenido de estas, incluyendo el VEGF. Esto a su vez induce la angiogénesis en células endoteliales y promueve la migración en células de cáncer (79, 80).



**Figura 6-3 Inhibidores de VEGF y VEGF-R como terapia anti-angiogénica.** Ejemplos de medicamentos comercializados dirigidos al VEGF y su receptor en la célula diana. Modificado de Melincovici, C., et al. (2018) (74).



## 6.3 Materiales y métodos

### 6.3.1 Inducción de HIF por $\text{CoCl}_2$

Se cultivaron células de la línea celular MCF7 a 5% de  $\text{CO}_2$  con medio DMEM suplementado con SFB 10%, L-Glutamina 2mM, Piruvato de Sodio 1mM, HEPES 10mM y PEST 1X. El cultivo se realizó con cambios de medio cada dos días hasta alcanzar una confluencia del 80%. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo, se hicieron tres lavados con PBS, se adicionó medio DMEM incompleto (libre de SFB) suplementado con  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a diferentes concentraciones incluyendo 100, 150 y 200 $\mu\text{M}$  y se incubó por 24 horas. Pasado este tiempo el medio condicionado se trató como se especifica en el numeral 5.2.1 para la recolección y purificación de vesículas extracelulares. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada concentración de  $\text{CoCl}_2$  evaluada.

### 6.3.2 qPCR

Las células en presencia con  $\text{CoCl}_2$  descritas en el numeral 6.3.1 se trataron con reactivo TRIzol™ con el fin de extraer los ácidos nucleicos. A partir de 1 $\mu\text{g}$  RNA total extraído se sintetizó cDNA usando la enzima retrotranscriptasa M-MLV siguiendo ciclos de retrotranscripción de 5min a 65°C, 3 min a 0°C, 2min a 37°C, 10min a 25°C, 50min a 37°C, 15min a 70°C, 5min a 0°C usando el termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller. Posteriormente se realizó PCR cuantitativa (qPCR) usando el equipo CFX96 de BioRad para los genes HIF-1 $\alpha$  (Secuencia de primers: Forward 5'CAGCAACGACACAGAACTGA3' / Reverse 5'TTGGGTGAGGGGAGCATTAC3', temperatura de anillamiento: 61°C) y VEGF (Secuencia de primers: Forward 5'GGCAGAATCATCACGAAGTGG3' / Reverse 5'GGCAGAATCATCACGAAGTGG3', Temperatura de anillamiento: 61°C), usando como gen de referencia  $\beta$ -actina (Secuencia de primers: Forward 5'TAAGACCTTCAACACCCAG3'/ Reverse 5'GCCATCTATTGCTCGAAGTC3', Temperatura de anillamiento: 56°C). Las mediciones se hicieron por triplicado. Los resultados se presentaron usando el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  normalizados a la expresión del gen de referencia y la condición basal.

### 6.3.3 Purificación y lisis de vesículas extracelulares

El medio condicionado obtenido de las células tratadas con  $\text{CoCl}_2$  se filtró según las indicaciones en el numeral 5.2.2 y las vesículas extracelulares se purificaron mediante las columnas de IZON Gen 2 qEV 35nm, tal como se describe en el procedimiento del numeral 5.2.4. A las fracciones eluidas 1 y 2 se les añadió Dodecil sulfato de sodio (SDS) hasta alcanzar una concentración final del 2%. Luego, se realizaron 3 ciclos de vórtex, seguidos de congelamiento en nitrógeno líquido e inmersión en agua a  $100^\circ\text{C}$  de manera consecutiva. Las muestras lisadas se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior para la cuantificación de proteínas mediante el método de microBCA y la identificación de marcadores a través de Dot Blot.

### 6.3.4 Identificación de VEGF

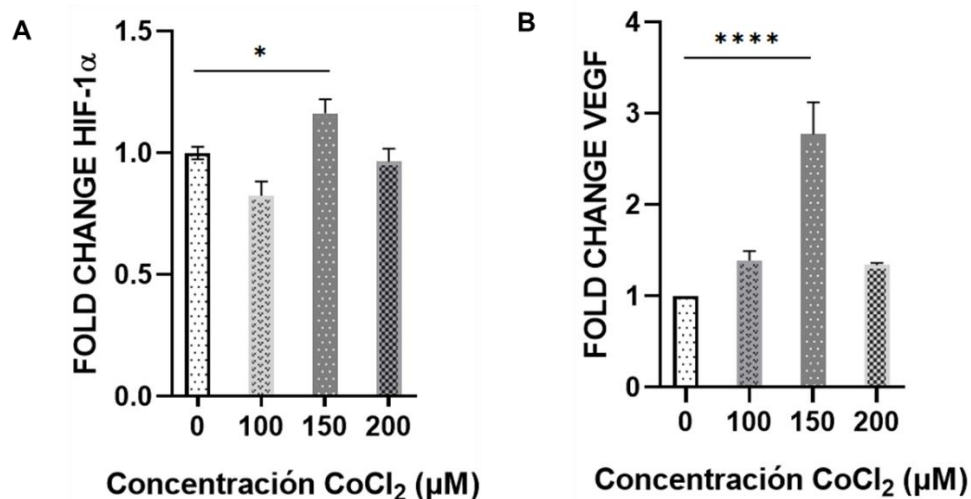
Similar a la identificación de otros marcadores exosomales detallados en el numeral 5.2.7, se buscó la presencia de VEGF mediante Dot Blot utilizando el anticuerpo policlonal AntiVEGF dirigido a la isoforma 165 (Rabbit Polyclonal, Cat: 627501, Biolegend) en un título de 1:2000, seguido de una incubación con anticuerpo secundario Anticonejo (1:30000). Las señales se registraron mediante la reacción ECL (ECL™ Prime Western Blotting System, Cytiva RPN2232). La señal obtenida se comparó con el secretoma concentrado y el extracto celular.

## 6.4 Resultados y discusión

### **CoCl<sub>2</sub> induce hipoxia mimética y la expresión de VEGF en la línea celular MCF7.**

Como resultado del tratamiento del cultivo celular con diferentes concentraciones de  $\text{CoCl}_2$ , se observó un aumento significativo en la expresión de HIF1- $\alpha$  y VEGF en comparación con el estado basal, en la concentración de  $150\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$ , como se ilustra en la Figura 6-4. Este comportamiento es coherente con lo observado en la línea celular MCF7 en estudios previos (81, 82). Vale la pena destacar que se encontró que VEGF mostraba una expresión más elevada que HIF1- $\alpha$ , posiblemente debido a las múltiples vías de señalización que inducen VEGF, manteniendo su expresión al alza (60). Es importante mencionar que se optó por un tiempo de tratamiento de 24 horas, siguiendo las

recomendaciones de investigaciones previas, lo que facilitó las comparaciones con experimentos realizados en condiciones de normoxia.

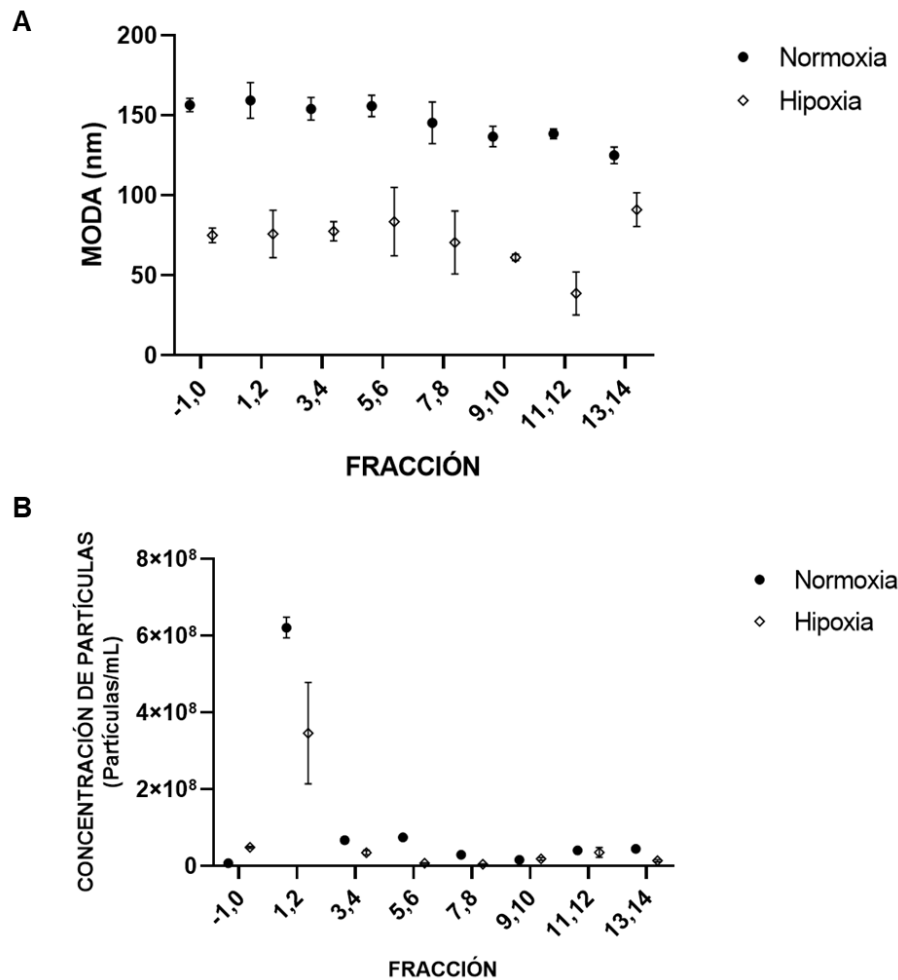


**Figura 6-4 Expresión de genes inducidos por CoCl<sub>2</sub> en la línea celular MCF7.** (A) Expresión de HIF-1α normalizado contra β-actina. (B) Expresión de VEGF normalizado contra β-actina. Se realizaron tres réplicas biológicas y las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos se normalizaron a la condición basal y se presentan como media ± DE. ANOVA de una vía test de comparación múltiple Tukey, \*P<0.02, \*\*\*\*P<0.0001.

### Hipoxia mimética disminuye la producción de exosomas.

Después de la obtención del medio condicionado a través del tratamiento con CoCl<sub>2</sub> a una concentración de 150μM, se procedió a aislar las vesículas extracelulares generadas bajo condiciones de hipoxia utilizando la columna de IZON qEV Gen 2 35nm. Similar a las fracciones eluidas bajo condiciones de normoxia, se obtuvo una purificación de proteínas solubles en las fracciones finales.

Con el objetivo de examinar las modificaciones experimentadas por los exosomas generados en condiciones de hipoxia, se realizó NTA para todas las fracciones eluidas de la columna. Los resultados se presentan en la Figura 6-5. De manera análoga a la condición de normoxia, la mayoría de las partículas (exosomas) se aislaron en las fracciones 1 y 2. La moda, en relación con su tamaño, mostró un comportamiento coherente con lo esperado, con la elución de las vesículas de mayor tamaño en las primeras fracciones.



**Figura 6-5 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) para las fracciones purificadas en condiciones de normoxia e hipoxia.** (A) Moda del tamaño de partículas purificadas con qEV 35nm (B) Concentración de partículas purificadas con qEV 35nm. Los datos se presentan normalizados por mililitro de medio condicionado equivalente a  $1 \times 10^6$  de células condicionantes y el valor se presenta como media  $\pm$  incertidumbre experimental.

La comparación de las características de los exosomas producidos en condiciones de normoxia e hipoxia revela que, bajo hipoxia, las células generan una menor cantidad de exosomas (1.8 veces menor) (Figura 6-5A). Además, estos exosomas son de menor tamaño (Figura 6-5B), un fenómeno que puede asociarse a lo reportado en diferentes procesos patológicos, incluyendo el cáncer de colon, páncreas y próstata. La condición metabólica de las células productoras de exosomas es crucial en este proceso, ya que cuando se ven sometidas a señales de supervivencia, como la privación de nutrientes y la hipoxia, priorizan otros procesos celulares por encima de la producción de vesículas extracelulares (83). La reducción en el tamaño de los exosomas se vincula con la








disminución de la producción de membranas y la variabilidad en el cargo exosomal. Este fenómeno podría funcionar como un mecanismo para aprovechar el menor tamaño de los exosomas y emitir señales a células receptoras más lejanas del microambiente tumoral (84).

En este contexto, el estudio de King, H., et al. (2012) respalda directamente la asociación entre la presencia de SFB como fuente de nutrientes en el medio de cultivo celular y un aumento significativo en la producción de exosomas. Es importante destacar que el DMEM incompleto utilizado en el condicionamiento final de las células solo contenía adición de piruvato sódico y, considerando la expresión de HIF-1, que regula negativamente la enzima piruvato deshidrogenasa, se limita la conversión de piruvato en acetil coenzima A (85).

En consecuencia, las células experimentan una disminución significativa en la disponibilidad de energía, lo que podría estar relacionado con la baja producción de exosomas y las moléculas que estos transportan.

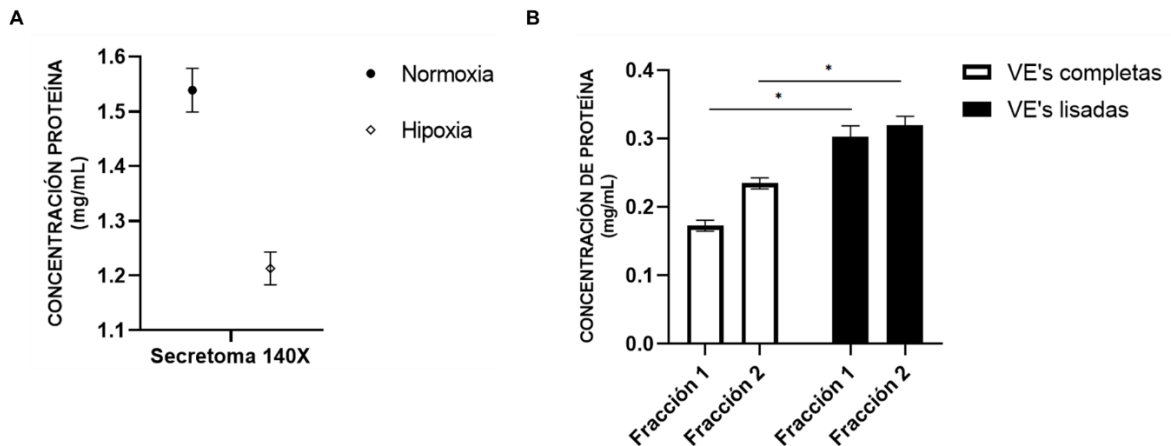
A partir de estos resultados, se buscó obtener evidencia de la activación de la señal pro-angiogénica asociada a los exosomas producidos en condiciones de hipoxia en comparación con la condición de normoxia. Para ello, se llevó a cabo una inmunodetección con el objetivo de identificar la presencia de VEGF, como se detalla en la Tabla 6-1. En este análisis, se constató que el VEGF estaba presente en ambas condiciones, pero su concentración era notablemente mayor en la condición de hipoxia. Es importante destacar que el VEGF no se encontró asociado a ninguna de las fracciones eluidas que contenían exosomas, sino que estaba presente en las últimas fracciones, denominadas como fracciones de proteínas solubles.

**Tabla 6-1 Inmunodetección de VEGF en fracciones de exosomas aislados por SEC.** Imágenes representativas de la señal encontrada por dot blot usando Anti-VEGF 1:2000.

Extracto celular	Secretoma Normoxia	Secretoma Hipoxia	Fracción 11 Hipoxia	Fracción 12 Hipoxia	Fracción 13 Hipoxia	Fracción 14 Hipoxia
						

A diferencia de lo reportado en estudios previos en otras líneas celulares (28, 86) no se detectó la presencia de VEGF anclado a la membrana de los exosomas en las fracciones 1 y 2, comparado con lo reportado para línea celular en los análisis de proteómica en

condiciones de cultivo y purificación de exosomas similares a los aquí estudiados (58, 87). Por lo tanto, se procedió a realizar la lisis de dichos exosomas buscando una asociación de la ubicación de VEGF en las mismas, pero se encontró la misma señal que en los exosomas completos, lo que sugiere que el VEGF tampoco se encuentra en forma de cargo dentro de los exosomas, a pesar de que la concentración de proteína aumenta cuando estos se lisan (Figura 6-6), sino que está soluble en el medio de cultivo, en concordancia con lo reportado por (88). Además, el anticuerpo utilizado tiene mayor afinidad por las isoformas solubles como VEGF 121 y 165, y no por las asociadas a membrana como la 189 y 206, pero no se descarta la posibilidad de la presencia de éstos últimos en la membrana exosomal.



**Figura 6-6 Comparación de concentración de proteína en exosomas producidos en diferentes condiciones.** (A) Concentración de proteína del secretoma en condiciones de normoxia e hipoxia. (B) Concentración de proteína en exosomas lisados y completos en condiciones de hipoxia. Prueba t- Benjamini, Krieger y Yekutieli con  $Q=1\%$ . Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE.

Una hipótesis que puede ser coherente es la propuesta por (28), en la que VEGF en su isoforma VEGF<sub>189</sub> presenta afinidad por proteoglicanos de la membrana exosomal que contienen heparán sulfato. Sin embargo, (89) muestra que la heparanasa juega un papel importante en la escisión de los complejos de heparán sulfato, por ejemplo, Sindécano-1, que conducen a la biosíntesis de los exosomas, pero su actividad enzimática no elimina del todo el heparán sulfato de los proteoglicanos, favoreciendo así la posible interacción con ligandos como el VEGF<sub>189</sub>, aunque esta sea disminuida. El mismo autor muestra que MCF7 expresa bajos niveles de heparanasa endógena, lo que explicaría una síntesis disminuida de los exosomas en condiciones de hipoxia inducida y una baja afinidad del

VEGF por algún receptor en la membrana exosomal. Esto se refleja en la detección de VEGF en el secretoma antes de la purificación, y debido a posibles interacciones durante el proceso de purificación, se disocia y se presenta en las fracciones de proteína libre.

Estos proteoglicanos representan un campo de investigación interesante, ya que se ha descrito que no solo están relacionados con la biosíntesis de los exosomas y la interacción con proteínas de interés, como en este caso, sino que también están implicados en las formas en que las células diana interactúan con los exosomas, como lo describen (90, 91).

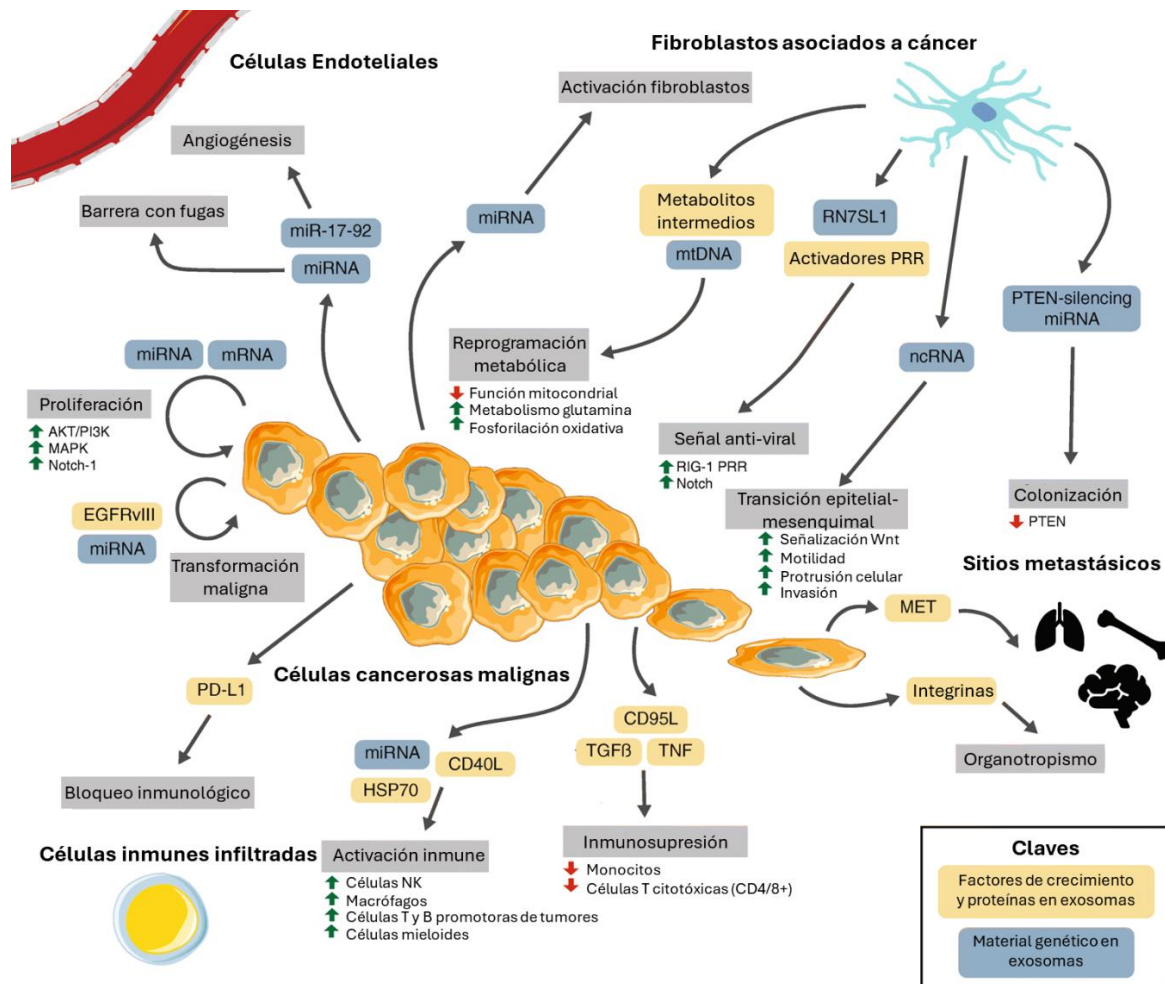
Basándonos en este análisis, se puede establecer una clara diferencia en la producción de exosomas derivados del cultivo en condiciones de normoxia e hipoxia. La hipoxia, siendo una condición de estrés metabólico para las células, no solo presenta niveles bajos de oxígeno, sino que bajo las condiciones de cultivo probadas también hay niveles reducidos de nutrientes, lo que resulta en una producción menor de exosomas y de menor tamaño. Otro resultado distintivo es que en condiciones de hipoxia se generan niveles más elevados de VEGF en forma soluble. Como continuación de estos hallazgos, sería posible identificar ARN en los exosomas de normoxia e hipoxia para establecer una diferencia en su contenido, información que sería adicional a lo observado en su caracterización física. Además, esto proporcionaría un marcador positivo de ácido nucleico complementario según las directrices MISEV, permitiendo así asociar estas diferencias a procesos biológicos dentro del microambiente tumoral, como la angiogénesis.

## **7.Efecto de exosomas en el microambiente tumoral**

El microambiente tumoral se configura como un espacio dinámico, compuesto por una variedad de células, entre ellas células cancerosas, fibroblastos asociados al cáncer (CAF), células madre mesenquimales, endoteliales y células hematopoyéticas (macrófagos, linfocitos B, células NK, células T, células dendríticas, neutrófilos). Estas células desempeñan un papel clave al producir diversos factores como factores de crecimiento, citoquinas, quinasas, factores de transcripción, radicales libres y proteínas de la matriz extracelular. Estas moléculas tienen la capacidad de remodelar el microambiente tumoral, influenciando distintos estados de la progresión tumoral (92). Este entorno presenta una acentuación de procesos metabólicos, tales como acidosis extracelular y niveles elevados de lactato y ácidos grasos. Al mismo tiempo, muestra características disminuidas como la concentración de oxígeno y nutrientes, instigando cambios en las células que lo componen para favorecer la proliferación y evitar procesos como la apoptosis (93). Este panorama proporciona un entendimiento crucial del microambiente tumoral, fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas y efectivas.

Los exosomas, al transportar diversas moléculas bioactivas, tienen la capacidad de generar efectos autocrinos y paracrinos sobre las células en el microambiente tumoral. Este proceso puede remodelar tanto las células cancerosas como las células circundantes, contribuyendo a la progresión del cáncer. Los exosomas pueden influir en varios aspectos, como la activación de oncogenes, la remodelación de la matriz extracelular, la modulación del sistema inmunológico, y también pueden tener efectos más allá del microambiente tumoral, como la inducción de migración, metástasis, angiogénesis, entre otros (Figura 7-1). Este fenómeno destaca la importancia de comprender el papel de los exosomas en la comunicación intercelular y cómo pueden afectar la dinámica del cáncer (94).





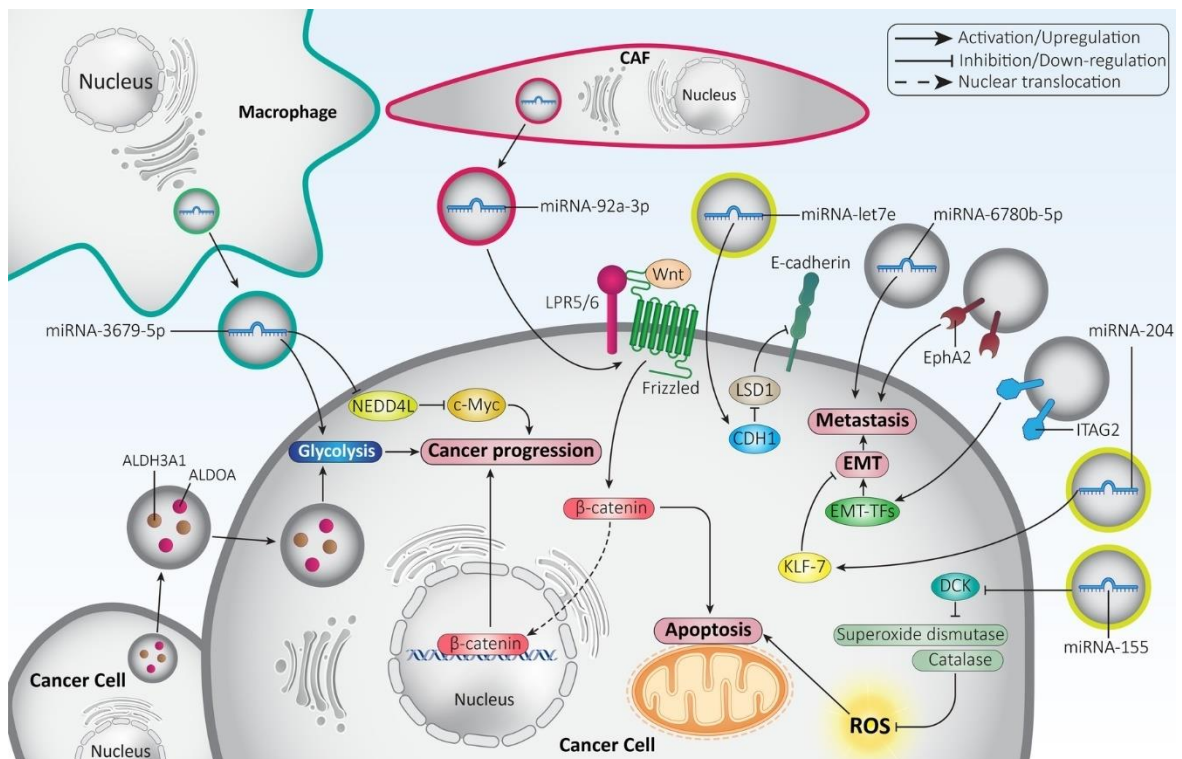
**Figura 7-1 Interacciones de las células presentes en el microambiente tumoral mediadas por exosomas.** Los exosomas producidos por células tumorales transportan proteínas (cuadros amarillos) y ácidos nucleicos (cuadros azules) que generan efectos activadores (flechas verdes) o supresores (flechas rojas) sobre células presentes en el microambiente tumoral dentro de las que se encuentran las señales angiogénicas, reprogramación metabólica, colonización metastásica y modulación del sistema inmune. Modificado de Li, I., et al. (2019).

## 7.1 Proliferación y metástasis

En la progresión tumoral, las células cancerosas regulan procesos metabólicos para sostener una alta proliferación y evadir la apoptosis. Uno de los procesos metabólicos clave es el aumento de la tasa de glicólisis anaeróbica con respecto a la fosforilación oxidativa, adaptación utilizada por las células cancerosas conocido como “efecto Warburg” (95). Se ha mostrado, por ejemplo, que los exosomas presentes en el microambiente tumoral del cáncer de pulmón, producidos por macrófagos, afectan la glicólisis en las células

tumorales, promoviendo una mayor tasa de energía que favorece la división celular (Figura 7-2) (93).

La metástasis ocurre cuando las células, después de mantener una alta tasa de proliferación, pueden migrar hacia nichos que favorecen su supervivencia, según la teoría "Semillas y Suelo". En este proceso, los exosomas desempeñan un papel crucial al migrar hacia posibles nichos pre metastásicos, liberando su carga molecular y generando condiciones favorables para que las células cancerosas migren y formen micrometástasis en el órgano receptor. Durante la micrometástasis, las células cancerosas crean un nuevo microambiente tumoral reclutando células y generando condiciones óptimas para salir de su período de latencia e iniciar el proceso de macrometástasis (96). Por ejemplo, las células de cáncer de mama han demostrado producir exosomas con contenido muy heterogéneo en proteínas y miRNA (97) capaces de inducir organotropismo metastásico en el hígado, pulmón, cerebro y hueso, lo que podría conducir a diferentes mecanismos que conllevan a la metástasis (98).



**Figura 7-2 Procesos metabólicos y progresión tumoral mediada por exosomas.** Exosomas producidos por las células tumorales (color gris) pueden contener enzimas que regulan la glicólisis y por tanto la progresión tumoral, otros exosomas contienen miRNA asociados a la transición epitelial-mesenquimal (EMT) favoreciendo la invasión. Exosomas

producidos por macrófagos (color verde) contienen miRNA que afectan el estado metabólico de las células tumorales por regulación de la glicólisis. Modificado de Paskeh, M., et al (2022).

## 7.2 Angiogénesis

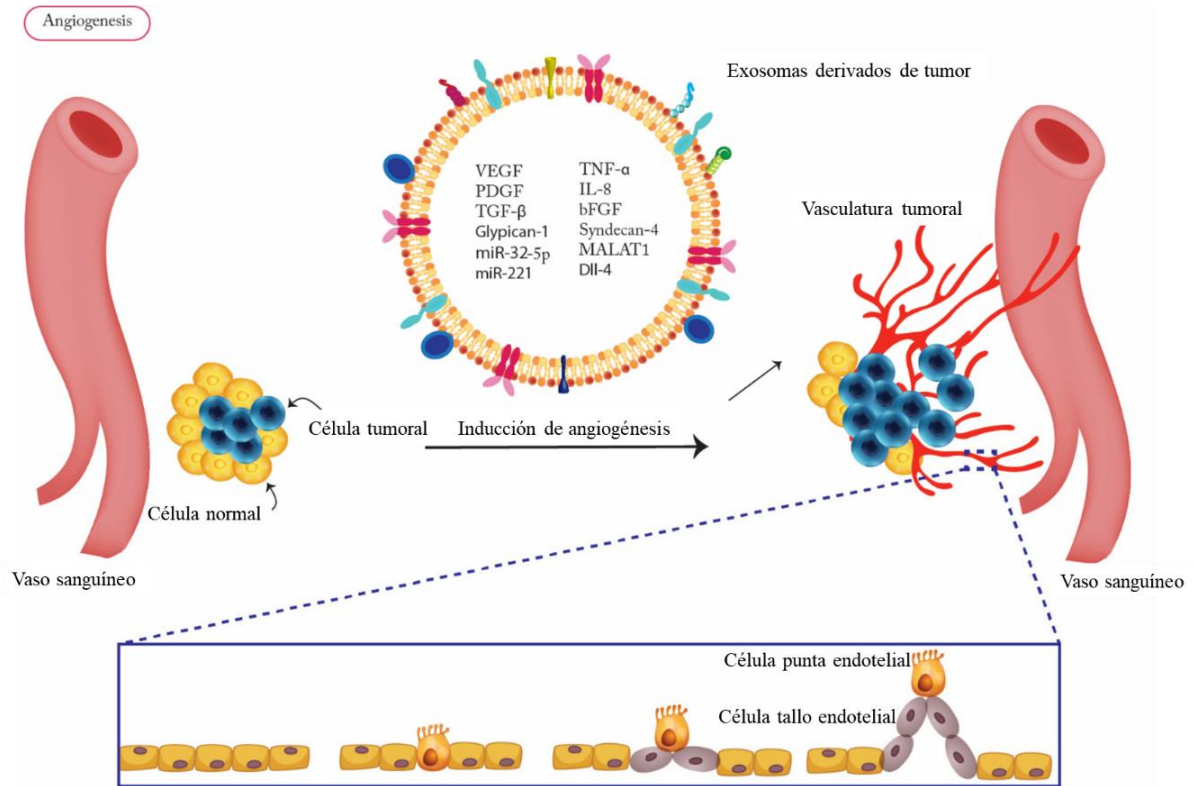
La formación de nuevos vasos sanguíneos puede ocurrir a través de diversos procesos, como la angiogénesis, la neovascularización, la intususcepción, el mimetismo vascular o la cooptación de arterias. La angiogénesis, a diferencia de la vasculogénesis, se inicia en células inmersas en un proceso tumorigénico. Cuando estas células forman nódulos tumorales, superando un volumen de 1 mm<sup>3</sup>, comienzan a emitir señales pro-angiogénicas, siendo el VEGF-A el factor más significativo que contrarresta las señales anti-angiogénicas provenientes de la inmunidad, las mutaciones y las deficiencias metabólicas en el microambiente tumoral. Estas señales perturban el equilibrio entre la proliferación y la apoptosis, estimulando la formación de nuevos vasos sanguíneos para suministrar oxígeno y nutrientes suficientes para mantener el crecimiento del tumor (Figura 7-3) (99).

Las etapas involucradas en la formación de nuevos vasos sanguíneos mediada por exosomas tumorales, que incluyen:

- Producción de moléculas, principalmente factores de crecimiento y metaloproteinasas de matriz que emiten señales a las células circundantes y a las células vasculares cercanas.
- Pérdida de polaridad, en las células vasculares cercanas o plexos vasculares, que abarcan tanto células endoteliales como pericitos.
- Disminución de adhesión de pericitos, permitiendo que se vuelvan móviles y provocando una remodelación de los vasos sanguíneos (100).
- Generación de brotes vasculares, que pueden hacer conexión (anastomosis) con otros vasos circundantes. Las células endoteliales producen glicoproteínas cargadas negativamente que facilitan la apertura del lumen vascular (101).
- Entrada en estado quiescente de las células endoteliales una vez la perfusión vascular se ha normalizado.

Este proceso de angiogénesis da como resultado la formación de vasos sanguíneos con irregularidades en términos de forma, tamaño y permeabilidad. Estas irregularidades

favorecen la rápida y descontrolada entrega de nutrientes al tumor, pero también facilitan la migración de células tumorales hacia otras regiones (102).



**Figura 7-3 Esquema del proceso angiogénico tumoral mediado por exosomas.** Los exosomas tumorales transportan Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-8 (IL-8) que van dirigidos a las células endoteliales para promover la angiogénesis. Las células punta endoteliales (las células líderes en las puntas de los brotes vasculares) producen altos niveles de proteína tipo delta-4 (Dll-4) que activa la vía Notch dentro de las células endoteliales microvasculares vecinas (tallo endotelial), lo que resulta en la inducción de brotes capilares. Modificado de Mashouri. L., et al. (2019) (103).

## 7.3 Materiales y métodos

### 7.3.1 Ensayo de migración celular

Se cultivaron células MCF7 en una placa de 24 pozos usando DMEM suplementado con SFB al 10%, L-Glutamina 2mM, Piruvato de Sodio 1mM, HEPES 10mM y PEST 1X en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Cuando las células alcanzaron un 95% de confluencia,

se realizó una herida a la monocapa celular usando una punta de 200 $\mu$ L. Posteriormente, se retiró el medio, se hicieron tres lavados suaves con PBS y se retiró el exceso de líquido. A continuación, se añadió DMEM incompleto (libre de SFB), y se agregó una concentración de exosomas de normoxia, hipoxia y VEGF obtenidos en los numerales 5.2.4 y 6.3.1 equivalentes entre la cantidad de células productoras y la cantidad de células a tratar. Se realizaron tres replicas experimentales.

Las células se incubaron durante 24 horas con revisiones en el microscopio Invitrogen™ EVOS™ M5000 Imaging System a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Las imágenes se procesaron utilizando el programa ImageJ (104) empleando el plugin “MRI wound healing tool”.

### **7.3.2 Ensayo de formación de tubos**

Las células HUVEC (ATCC PCS-100-013) se cultivaron en cajas de cultivo T-25 utilizando medio basal de crecimiento para células endoteliales EMB™ (Lonza™, Cat: CC-3121) suplementado con el kit Single Quots Lonza™ EGM™ (hEGF 0,1%, hidrocortisona 0,1%, gentamicina/anfotericina B 0,1%, extracto de cerebro bovino 0,4%, ácido ascórbico 0,1%, SFB 2%), en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Cuando alcanzaron una confluencia del 80%, se trataron con tripsina al 0,25%-EDTA 0,5M hasta el desprendimiento de la superficie de cultivo. La suspensión celular resultante se centrifugó a 300xg durante 5 minutos, y el pellet celular se suspendió en PBS. Se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer para repetir el proceso de siembra por dos pases adicionales.

En una placa de 96 pozos pre-enfriada a 4°C, se añadieron 32  $\mu$ L de Geltrex™ Gibco™ por pozo, evitando la formación de burbujas y conservando la temperatura. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos hasta confirmar la gelificación.

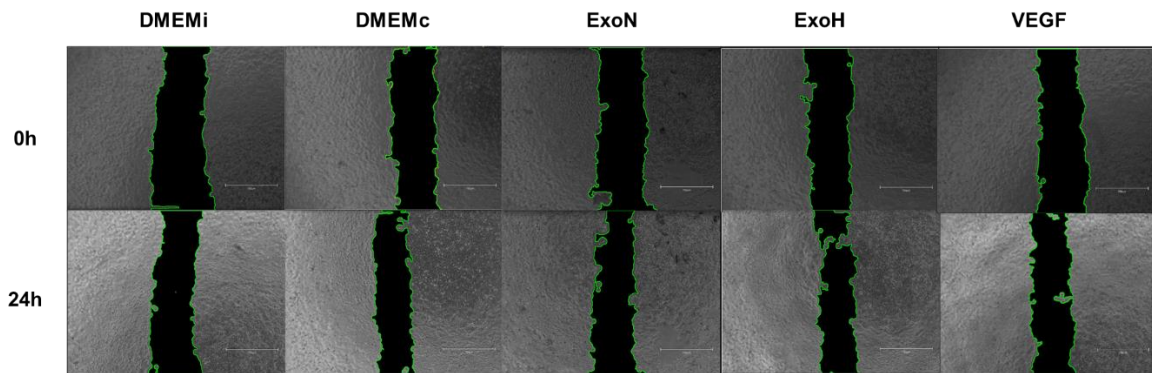
Se sembraron 4x10<sup>4</sup> células y se sembraron en cada pozo de la placa tratada con Geltrex. En cada pozo se añadió medio EMB suplementado con EGM a la mitad de la concentración usada para el cultivo basal, y se agregó una concentración de exosomas de normoxia, hipoxia y VEGF obtenidos en los numerales 5.2.4 y 6.3.1 equivalentes entre la cantidad de células productoras y la cantidad de células a tratar. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, realizando revisiones a las 4, 12 y 24 horas en el Invitrogen™ EVOS™ M5000

Imaging System. Las imágenes se procesaron utilizando el programa ImageJ (104) empleando el plugin “angiogenesis analyzer”.

## 7.4 Resultados y discusión

### Exosomas producidos en hipoxia mimética promueven migración celular en MCF7.

Para evaluar los efectos de los exosomas aislados en las secciones 5.3 y 6.4 en la migración de células tumorales, se llevó a cabo un ensayo de cierre de herida en un cultivo celular MCF7 (Figura 7-4).

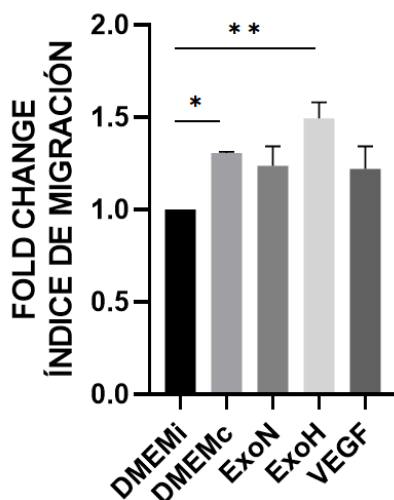


**Figura 7-4 Ensayo de cierre de herida sobre línea celular MCF7.** Tratamiento con exosomas aislados de condiciones en normoxia (ExoN), hipoxia mimética (ExoH) y VEGF proveniente de la hipoxia mimética (VEGF). Las vesículas del medio de cultivo completo (DMEMc) se analizan como control positivo del ensayo. Las imágenes son representativas de tres réplicas tomadas a las 24 horas de tratamiento. Escala 750µm.

Como se observa en la Figura 7-5, el tratamiento con exosomas de hipoxia tuvo un efecto sobre la velocidad de migración de las células tratadas, en comparación con las células cultivadas en medio sin vesículas provenientes del SFB. Sin embargo, los exosomas de normoxia y el VEGF no representan un cambio en la velocidad de migración significativo con respecto al control. Los exosomas de hipoxia generan una velocidad de migración mayor con respecto al control.

En la literatura se han descrito varias moléculas de los exosomas tumorales que serían las encargados de activar señales tumorigénicas como la migración celular (105, 106). Por ejemplo, diversos RNA como miR-1246, miR-19a, miR-340-5p, miR-93-5p, miR-105, miR-

130 promueven la migración, invasión y metástasis a través de señales dirigidas a las mismas células tumorales de cáncer de mama como los fibroblastos asociados a cáncer (107-112). Por tanto, el notorio efecto de los exosomas de hipoxia probados sobre la línea celular MCF7 podría deberse al efecto del contenido de su cargo, como los miRNA, a su estado metabólico y de supervivencia en los que fueron producidos en comparación con los producidos en condición de normoxia. De igual manera, la respuesta de la migración dada por la adición del VEGF obtenido, no representa un cambio en la índice de migración, puesto que la principal célula diana de este factor de crecimiento son las células endoteliales



**Figura 7-5 Índice de migración de la línea celular MCF7.** Tratamiento con exosomas aislados de condiciones en normoxia (ExoN), hipoxia mimética (ExoH) y VEGF proveniente de la hipoxia mimética (VEGF). Los datos se presentan normalizados a la condición basal (DMEMi) y las vesículas del medio de cultivo completo (DMEMc) se analizan como control positivo del ensayo. ANOVA de una vía, test de comparación múltiple Dunnett, \*P=0.0376, \*\*P=0.0052.

### **Exosomas producidos en hipoxia mimética promueven la angiogénesis en células HUVEC.**

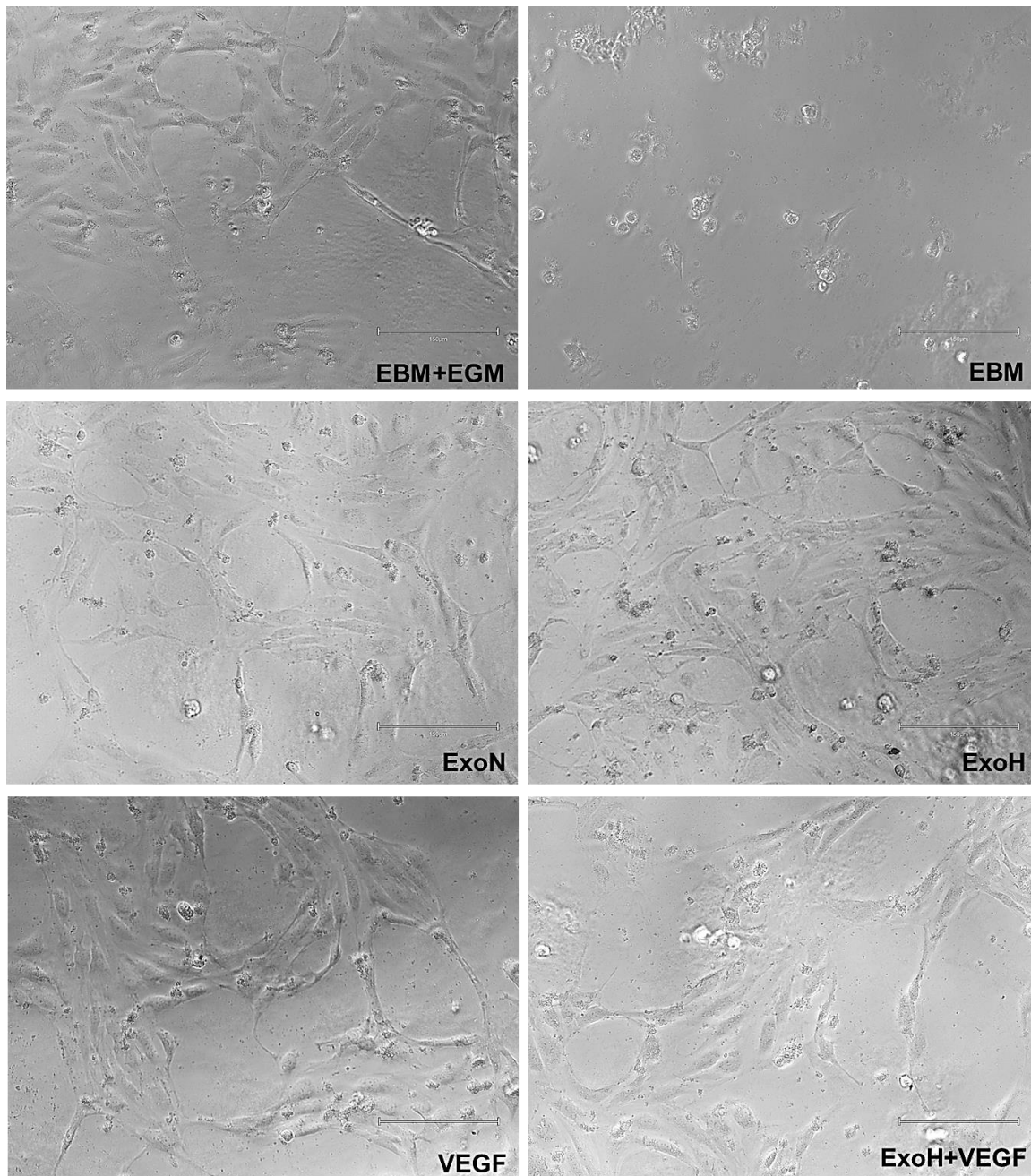
Para evaluar la angiogénesis inducida por los exosomas purificados, se llevó a cabo un ensayo de formación de tubos utilizando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se analizaron diversas características del proceso, como la aparición de extremos, nodos, uniones, segmentos, mallas y ramas, como se ilustra en la Figura 7-6.

Los resultados indican que los exosomas producidos en condiciones de hipoxia promueven la formación de extremos o filopodios, que son fundamentales para el reconocimiento de células endoteliales de tipo "punta" quienes son las encargadas de iniciar el proceso angiogénico dentro de los plexos vasculares y orientarán a las células endoteliales de tipo "tallos" para prolongar el vaso sanguíneo. Además, con este tratamiento, se observa un aumento significativo en la formación de ramas, lo que favorece la creación de brotes vasculares y a su vez una posible anastomosis de estos favoreciendo una remodelación vascular más avanzada (Figura 7-7).

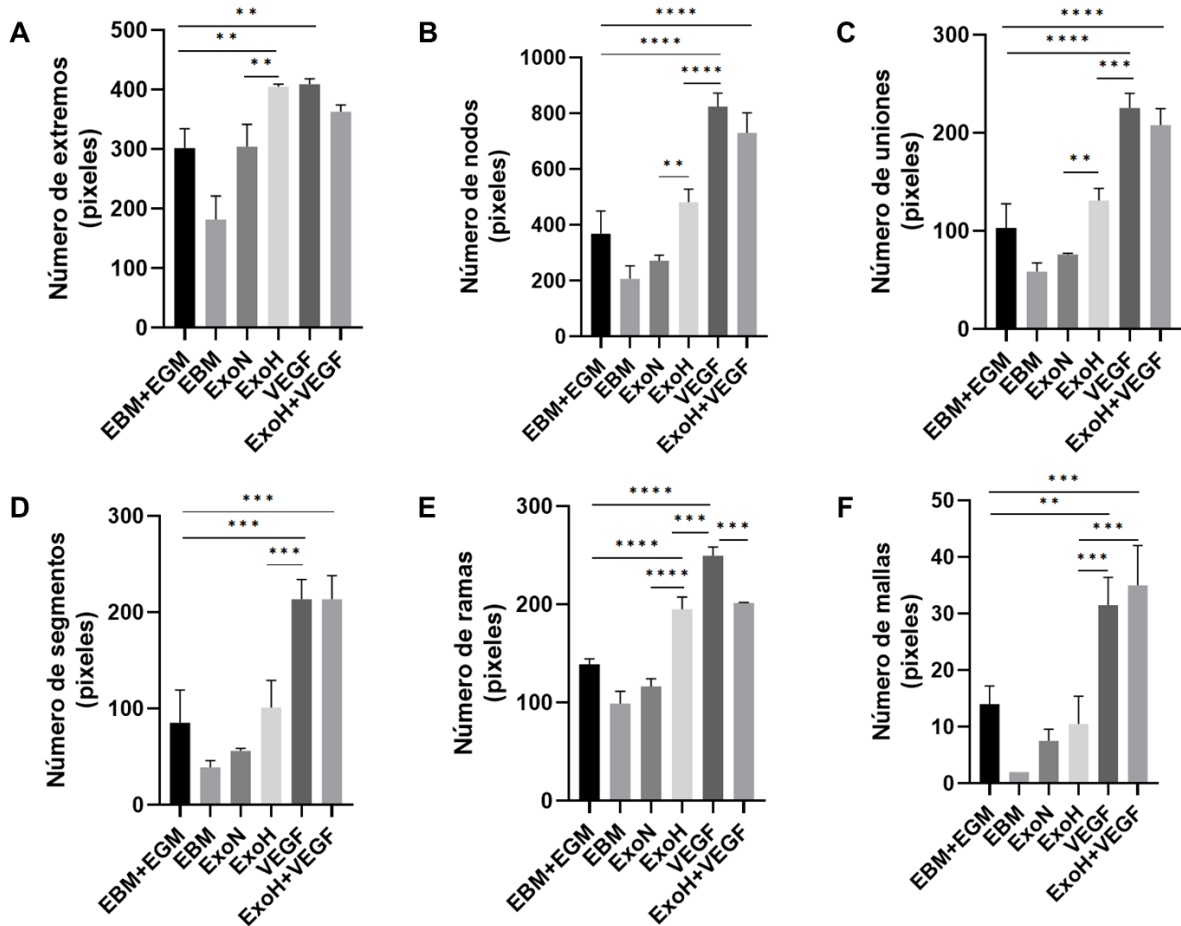
Como se discutió en la sección anterior, las moléculas presentes en la carga de los exosomas generados en hipoxia, como los RNAs, podrían ser responsables de promover la señal angiogénica, y no estar necesariamente asociadas al posible VEGF presente en los exosomas. Esto se evidencia dado que la señal, en la mayoría de las características evaluadas, no se amplifica cuando se utilizan conjuntamente el VEGF soluble y los exosomas de hipoxia, lo que apuntaría a señales de diferente naturaleza, por ejemplo, proteica y de ácidos nucleicos, con efectos diferentes. Las características angiogénicas observadas con el VEGF confirman su importancia para el proceso angiogénico y sirven como control positivo del ensayo.

De esta manera, se abre una oportunidad de estudio para explorar las diferencias en el contenido entre los exosomas producidos en normoxia y los producidos en hipoxia, así como el efecto de estas moléculas en el microambiente tumoral.





**Figura 7-6 Ensayo de formación de tubos en la línea celular HUVEC.** Tratamiento con exosomas aislados de condiciones en normoxia (ExoN), hipoxia mimética (ExoH) y VEGF proveniente de la hipoxia mimética (VEGF). Las imágenes son representativas de tres réplicas tomadas las 24 horas de tratamiento. Escala 150µm.



**Figura 7-7 Promoción de angiogénesis en células HUVEC.** Tratamiento con exosomas aislados de condiciones en normoxia (ExoN), hipoxia mimética (ExoH) y VEGF proveniente de la hipoxia mimética (VEGF). VEGF se toma como control positivo siendo el principal precursor de angiogénesis. Análisis de tres réplicas tomadas las 24 horas de tratamiento. ANOVA de una vía, test de comparación múltiple Tukey, (A)  $**P < 0.006$ , (B)  $**P < 0.007$ ,  $****P < 0.0001$ , (C)  $**P \leq 0.0075$ ,  $***P \leq 0.0008$ ,  $****P < 0.0001$ , (D)  $***P \leq 0.0006$ , (E)  $***P \leq 0.0004$ ,  $****P < 0.0001$ , (F)  $**P < 0.004$ ,  $***P \leq 0.0008$ .

Para establecer una conexión vinculante entre los apartados previamente desarrollados, es esencial iniciar con la discusión sobre el proceso de caracterización de vesículas extracelulares siguiendo las directrices de MISEV (Welsh, J; et al., 2023). Según estas directrices, la selección adecuada y conveniente de los métodos de purificación es crucial para obtener una muestra enriquecida en el tipo vesicular de interés, lo cual es fundamental para los pasos subsecuentes. En el capítulo 5, los métodos de purificación de vesículas extracelulares probados nos permiten identificar las ventajas y desventajas en el proceso de purificación de exosomas, particularmente considerando la muestra de partida y la distribución de sus vesículas.

Inicialmente, se realizan varios ciclos de centrifugación para eliminar restos celulares del medio condicionado de cultivo. Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de filtración y ultrafiltración para asegurar el enriquecimiento de la muestra en vesículas extracelulares y moléculas secretadas por las células. Aunque estos pasos previos a la purificación de las vesículas de interés pueden involucrar una pequeña pérdida de muestra y en variaciones debido a la aglutinación, son necesarios para evitar la contaminación por otras estructuras presentes en el medio. De este modo, se reduce la presencia de posibles contaminantes, dejando únicamente vesículas extracelulares y proteínas solubles en la muestra.

De igual manera, realizar una centrifugación a 17000xg permite purificar la muestra de vesículas extracelulares grandes, aumentando la probabilidad de enriquecimiento en exosomas. Esta centrifugación es práctica, ya que estas fuerzas pueden alcanzarse con un equipo de mayor disposición en los laboratorios, y las pérdidas de exosomas son despreciables dado que no se alcanzan las fuerzas necesarias para que estos sedimenten.

Los tres métodos probados permiten separar una considerable cantidad de proteínas solubles debido a su naturaleza, ya sea por retención en matrices o sedimentación. Los exosomas son separados de las proteínas solubles y sus posibles agregados. Sin embargo, los métodos de ultracentrifugación diferencial y el kit PureExo no cuentan con una barrera limitante clara que permita retirar manualmente la fase acuosa que contiene las proteínas solubles sin llevarse parte del pellet o la matriz que contiene los exosomas, lo que podría reducir el rendimiento de purificación de exosomas.

A pesar de esto, el kit PureExo presenta la mayor concentración de partículas purificadas según el NTA. Sin embargo, esto no garantiza que sean exclusivamente exosomas, ya que

el principio del método favorece la captación de cualquier tipo de vesícula en la matriz formada. Dado que el medio utilizado como partida en este kit no ha sido centrifugado para eliminar vesículas extracelulares grandes, estas podrían quedar contenidas junto con los exosomas. Esto se puede observar en la señal obtenida por Dot blot para los marcadores exosomales, que no resulta ser más intensa en comparación con los otros métodos probados.

En este contexto, la cromatografía de exclusión por tamaño representa un método más seguro para la purificación de los exosomas de las proteínas solubles, ya que su perfil de concentración de partículas muestra fracciones limitantes de elución, lo que facilita una separación más precisa.

La combinación de ultrafiltración para el intercambio de buffer y la concentración del medio condicionado, seguida de una centrifugación a 17000xg para eliminar vesículas extracelulares grandes, y la cromatografía de exclusión por tamaño, resulta ser la estrategia más adecuada para la purificación de exosomas provenientes de la línea celular MCF7. Adicionalmente, se podría realizar una ultrafiltración final para concentrar cada fracción purificada por la columna, mejorando así la preparación de las muestras para la identificación de marcadores proteicos mediante técnicas como el Western blot.

Con respecto a la línea celular propuesta para la caracterización de vesículas extracelulares en un modelo de cáncer de mama, se observa que la línea MCF7, derivada de un adenocarcinoma de tejido mamario humano, se comporta conforme a lo esperado bajo las condiciones de cultivo evaluadas. En términos de morfología, las células MCF7 forman una monocapa sobre la superficie de cultivo y, una vez alcanzada la confluencia de trabajo recomendada, comienzan a formar pseudo mamosferas, una característica natural de este tipo de células.

Esta propiedad nos proporciona una visión más precisa del comportamiento de la línea celular MCF7 como modelo de estudio del cáncer de mama. La formación de pseudo mamosferas indica que estas células pueden adoptar una disposición tridimensional similar a la de un tumor, lo que resulta en un centro tumoral hipóxico. Esto es relevante para estudiar y comprender cómo esta línea celular responde a condiciones hipóxicas y angiogénicas, ofreciendo un valioso acercamiento al comportamiento del cáncer de mama en un entorno experimental.

El cultivo de esta línea celular bajo las condiciones propuestas, que incluyeron la privación de suero fetal bovino por 24 horas para evitar la contaminación por vesículas del suero y la necesidad de procesos complicados de depleción mediante ultracentrifugación diferencial, permitió obtener un medio condicionado con vesículas extracelulares producidas por las células con una baja tasa de apoptosis y, por lo tanto, una baja cantidad de cuerpos apoptóticos. Esto resultó en un medio condicionado enriquecido en microvesículas y exosomas, los cuales fueron posteriormente purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Según la distribución de las vesículas obtenidas y purificadas de esta línea celular, y siguiendo la nomenclatura propuesta por Welsh et al. (2023), se encontró que el 26.28% correspondía a vesículas grandes (incluyendo microvesículas), mientras que el 73.32% eran vesículas pequeñas (incluyendo exosomas). La última actualización de MISEV establece que, para concluir que una muestra está enriquecida en exosomas, se debe proporcionar evidencia de su origen subcelular. En este caso, se puede considerar que las fracciones purificadas estaban enriquecidas en exosomas debido a la presencia de los marcadores proteicos exosomales CD81 y CD63, que siguen una ruta endosomal, tal como se describe en la Figura 5-1.

Al evaluar la producción de exosomas en condiciones de normoxia e hipoxia mimética (inducida por  $\text{CoCl}_2$ ), se observaron disminuciones en el tamaño, concentración y producción de moléculas asociadas, como marcadores proteicos y VEGF, cuando los exosomas se generaban bajo condiciones de hipoxia. Esto sugiere una relación entre las condiciones de cultivo (privación de nutrientes e hipoxia inducida) y las respuestas de supervivencia de las células, indicando que otros mecanismos, distintos a los mediados por los exosomas, podrían prevalecer en estas condiciones. Esto resulta relevante, ya que sería valioso evaluar otras formas de suplementación del medio de cultivo y su relación con la producción de exosomas, para determinar si las variaciones en la producción de exosomas dependen únicamente de la variable nutricional, de la hipoxia, o de ambas. Además, sería útil examinar el estado metabólico de las células productoras y la disponibilidad de lípidos necesarios para la producción de exosomas. Esto es crucial, ya que, además de estudiar la composición proteica y de ácidos nucleicos de las vesículas extracelulares, la composición de los lípidos es fundamental para su formación, como lo describe Donoso, J., et al., 2021 (113).

Las células MCF7 al presentar un carácter metastásico (proveniente de derrame pleural), son adecuadas para estudiar la producción de exosomas relacionados con los procesos angiogénicos, migratorios y proliferativos que promueven la supervivencia del tumor y la evolución de nichos pre-metastásicos mediados por los exosomas. Al evaluar el efecto inductor de la migración en la misma línea celular MCF7, se observó que los exosomas producidos en condiciones de hipoxia aumentaban la velocidad de migración. Aunque estos presentaron características disminuidas con respecto a los producidos en condiciones de normoxia (como se explicó en el párrafo anterior), esto abre una ventana para explorar la composición más amplia de estos exosomas, por ejemplo, en ácidos nucleicos como el miRNA, que posiblemente sean los responsables de generar este efecto. Además, aunque complejo, valdría la pena evaluar el efecto de estos sobre los otros tipos de células que hacen parte del microambiente tumoral como, por ejemplo, fibroblastos asociados a cáncer, células del sistema inmune e incluso, la relación con las remodelación de las proteínas de matriz extracelular que permitan establecer una asociación con el proceso de migración celular.

Al revisar el efecto de estos exosomas en la formación de tubos como modelo del proceso angiogénico sobre las células HUVEC, encontramos que los exosomas producidos en condiciones de hipoxia generan un aumento en las características evaluadas para este ensayo, incluso en comparación con el control positivo usando VEGF producido al mismo tiempo que los exosomas de hipoxia. Esto podría implicar que este efecto no es mediado únicamente por el VEGF, sino que pueden estar implicadas otras moléculas exosomales. Por lo tanto, se considera una limitante, pero también una oportunidad de estudio, la composición más amplia de los exosomas, como se mencionó anteriormente.

Dado que la evaluación del VEGF asociado a los exosomas mostró que la isoforma 165 no estaba presente, se puede considerar una limitante del estudio de esta proteína como marcador asociado al cáncer de mama. Sin embargo, esto también brinda una oportunidad de exploración sobre la forma en que las células MCF7 producen la isoforma conveniente a su estado metabólico y tumoral, así como su asociación con los exosomas producidos por estas células. Con un panorama más claro sobre la composición molecular de los exosomas producidos por esta línea celular, se podría realizar una correlación entre estos y el VEGF que las mismas células producen, estableciendo si hay un efecto amplificador o atenuante sobre fenómenos como la angiogénesis.

## 7.5 Recomendaciones

Estudiar las isoformas de VEGF y el contenido de ARN presentes en las fracciones purificadas de exosomas facilitará el establecimiento de una relación más precisa entre estas vesículas y el microambiente tumoral, particularmente en lo que respecta al proceso angiogénico.

## 7.6 Perspectivas

Como complemento de la caracterización de los exosomas producidos por esta línea celular, se podría realizar un análisis del contenido de ácidos nucleicos, específicamente miRNA, de forma diferencial en condiciones de normoxia e hipoxia mimética, con el fin de establecer los posibles efectos que estos tienen en las células diana (propias del microambiente tumoral o en posibles nichos pre-metastásicos). Asociado a ello, se podría llevar a cabo un análisis proteómico diferencial para establecer una relación más concreta entre los exosomas producidos en las diferentes condiciones. Además, podría realizarse un análisis transcriptómico y proteómico de las células productoras para establecer una relación entre su estado metabólico y la información compartida a través de los exosomas producidos.

Como parte final de la caracterización, se podría realizar un rastreo de su biogénesis utilizando microscopía de fluorescencia dirigida a marcadores proteicos como tetraspaninas, Rab25, Rab27b y SNARE.

A partir de la caracterización de estos exosomas, se podría proponer el uso de estos como vehículos para la entrega de tratamientos basados en terapias anti-angiogénicas, anti-estrógeno, entre otras.

## 8. Conclusiones

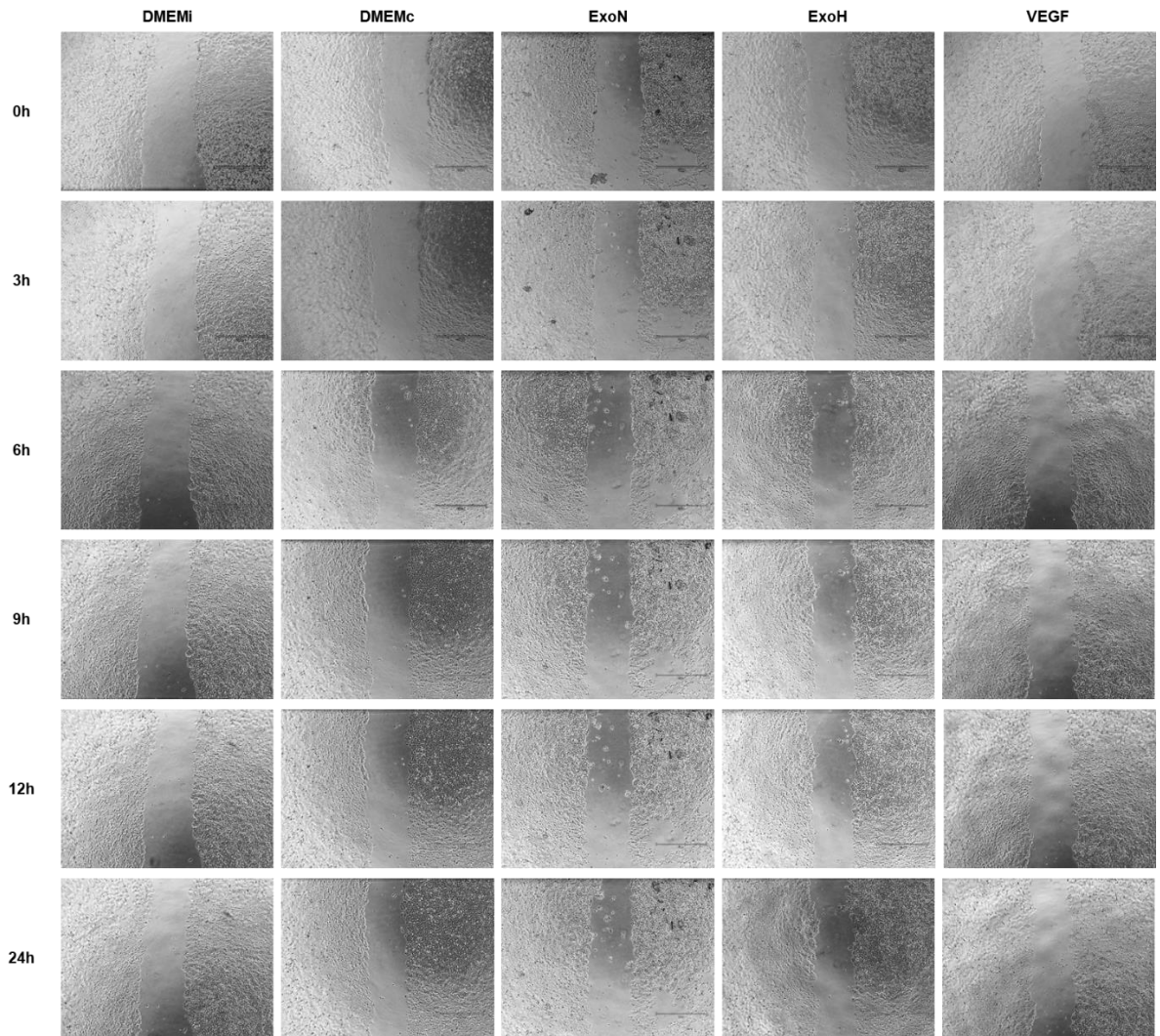
1. El esquema de cultivo probado para la producción de exosomas, que incluye un medio libre de SFB durante 24 horas, genera vesículas extracelulares con una baja tasa de cuerpos apoptóticos y una proporción elevada de vesículas tipo exosomas.
2. La técnica que mejor se ajusta a las dinámicas experimentales empleadas es la cromatografía de exclusión por tamaño utilizando la columna Original Gen 2 de 35 nm de IZON, lo que posibilitó la purificación de exosomas con un rendimiento de  $6.21 \times 10^8$  vesículas por  $1 \times 10^6$  de células condicionantes, y con un tamaño similar al obtenido mediante la técnica convencional de ultracentrifugación diferencial (159.4 nm). Esta técnica resulta más accesible que la ultracentrifugación.
3. El cultivo de células MCF7 con  $\text{CoCl}_2$  a una concentración de 150  $\mu\text{M}$  logra una hipoxia mimética que provoca una disminución en la producción de exosomas, los cuales presentan un tamaño menor que los producidos en condiciones de normoxia.
4. Los exosomas producidos en condiciones de hipoxia mimética promueven una mayor migración en células MCF7 y favorecen la presencia de características angiogénicas en células HUVEC en comparación con las condiciones basales de estas.



## **9. Producción**

Parte de este estudio se llevó a cabo durante una pasantía de investigación en el Laboratorio de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de Salud. Los resultados se presentaron en el XVIII Encuentro Científico 2023 del Instituto Nacional de Salud, y los detalles se encuentran disponibles en las memorias publicadas en la Revista Biomédica 2023, Vol. 43, Supl. 2.

# A. Anexo: Ensayo de cierre de herida



## Bibliografía

1. Cancer IAfRo. Global Cancer Observatory Lyon, France: IARC; 2023 [cited 2023. Available from: <https://gco.iarc.fr/>.
2. (INC) INdC. Anuario Estadístico 2021. Instituto Nacional de Cancerología (INC); 2022.
3. Lötval J, Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles Co-Action Publishing*. 2014;3.
4. Couch Y, Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lötval, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Théry, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(14).
5. Poupardin R, Wolf, M., & Strunk, D. Adherence to minimal experimental requirements for defining extracellular vesicles and their functions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;176.
6. Witwer KW, Goberdhan, D. C., O'Driscoll, L., Théry, C., Welsh, J. A., Blenkiron, C., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fu, Q. L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lötval, J., Nieuwland, R., Ochiya, T., Rome, S., Sahoo, S., & Zheng, L. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017;6.
7. Novoa-Herrán S. Challenges and opportunities in the study of extracellular vesicles: global institutional context and national state of the art. *Biomedica*. 2021;41(4):2-69.
8. Witwer KW, Goberdhan, D. C., O'Driscoll, L., Théry, C., Welsh, J. A., Blenkiron, C., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fu, Q. L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lötval, J., Nieuwland, R., Ochiya, T., Rome, S., Sahoo, S., & Zheng, L. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2021;10.
9. Ahmadi M, & Rezaie, J. Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: Possible therapeutic implications. 2020.
10. Li I, Nabet, B.Y. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Molecular Cancer*. 2019;18(32).
11. Pei-peí H, Hang-zi, Chen. Extracellular vesicles in the tumor immune microenvironment. *Cancer Letters*. 2021;516:48-56.
12. Xie QH, Zheng, J. Q., Ding, J. Y., Wu, Y. F., Liu, L., Yu, Z. L., & Chen, G. Exosome-Mediated Immunosuppression in Tumor Microenvironments. *Cells*. 2022;11(12).
13. Rincón-Riveros A, Lopez, L., Villegas, E. V., & Antonia Rodríguez, J. . Regulation of antitumor immune responses by exosomes derived from tumor and immune cells. *Cancers*. 2021;13(4):1-22.

14. Li SJ, Chen, J. X., & Sun, Z. J. Improving antitumor immunity using antiangiogenic agents: Mechanistic insights, current progress, and clinical challenges. *Cancer Communications*. 2021;41(9):830-50.
15. Ludwig N, & Whiteside, T. L. Potential roles of tumor-derived exosomes in angiogenesis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2018;22(5):409-17.
16. Gurunathan S, Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 2019;8(4).
17. Abhange K, Makler, A., Wen, Y., Ramnauth, N., Mao, W., Asghar, W., & Wan, Y. Small extracellular vesicles in cancer. *Bioactive materials*. 2021;6(11):3705-43.
18. Herrmann IK, Wood, M.J.A. & Fuhrmann, G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*. 2021;16:748-59.
19. Nguyen SL, Ahn, S. H., Greenberg, J. W., Collaer, B. W., Agnew, D. W., Arora, R., & Petroff, M. G. Integrins mediate placental extracellular vesicle trafficking to lung and liver in vivo. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
20. Pachane BC, Nunes, A. C. C., Cataldi, T. R., Micocci, K. C., Moreira, B. C., Labate, C. A., Selistre-de-Araujo, H. S., & Altei, W. F. . Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20).
21. Grisard E, Lescure, A., Nevo, N., Corbé, M., Jouve, M., Lavieu, G., Joliot, A., Nery, E. D., Martin-Jaular, L., & Théry, C. Homosalate boosts the release of tumor-derived Extracellular Vesicles with anti-anoikis properties. *bioRxiv*. 2021.
22. Vardaki I, Ceder, S., Rutishauser, D., Baltatzis, G., Foukakis, T., & Panaretakis, T. Periostin is identified as a putative metastatic marker in breast cancer-derived exosomes. *Oncotarget*. 2016;7(46):74966-78.
23. Ngo NH, Chang, Y. H., Vuong, C. K., Yamashita, T., Obata-Yasuoka, M., Hamada, H., Osaka, M., Hiramatsu, Y., & Ohneda, O. Transformed extracellular vesicles with high angiogenic ability as therapeutics of distal ischemic tissues. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10.
24. Olejarz W, Kubiak-Tomaszewska, G., Chrzanowska, A., & Lorenc, T. Exosomes in angiogenesis and anti-angiogenic therapy in cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16):1-25.
25. Hosaka K, Yang, Y., Seki, T. et al. Therapeutic paradigm of dual targeting VEGF and PDGF for effectively treating FGF-2 off-target tumors. *Nature Communications*. 2020;11.
26. Kut C, Mac Gabhann, F., & Popel, A. S. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *British Journal of Cancer*. 2007;97(7):978-85.
27. Itatani Y, Kawada, K., Yamamoto, T., & Sakai, Y. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4).
28. Ko SY, Lee, W., Kenny, H. A., Dang, L. H., Ellis, L. M., Jonasch, E., Lengyel, E., & Naora, H. Cancer-derived small extracellular vesicles promote angiogenesis by heparin-bound, bevacizumab-insensitive VEGF, independent of vesicle uptake. *Communications Biology*. 2019;2(386).
29. Tirpe A, Gulei, D., Tirpe, G. R., Nutu, A., Irimie, A., Campomenosi, P., Pop, L. A., & Berindan-Neagoe, I. Beyond conventional: The new horizon of anti-angiogenic micrnas in non-small cell lung cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):1-22.
30. Rosenberger L, Ezquer, M., Lillo-Vera, F., Pedraza, P. L., Ortúzar, M. I., González, P. L., Figueroa-Valdés, A. I., Cuenca, J., Ezquer, F., Khoury, M., & Alcayaga-Miranda, F.

- Stem cell exosomes inhibit angiogenesis and tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
31. Kase Y, Uzawa, K., Wagai, S., Yoshimura, S., Yamamoto, J. I., Toeda, Y., Okubo, M., Eizuka, K., Ando, T., Nobuchi, T., Kawasaki, K., Saito, T., Iyoda, M., Nakashima, D., Kasamatsu, A., & Tanzawa, H. Engineered exosomes delivering specific tumor-suppressive RNAi attenuate oral cancer progression. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
  32. García E, Luengo-Gil, G., de la Morena Barrios, P., Ayala de la Peña, F. Microvesículas en cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar*. 2016;29(3):125-31.
  33. Gupta D ZA, El Andaloussi S. Dosing extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;178.
  34. Richter M, Vader, P., & Fuhrmann, G. Approaches to surface engineering of extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;173:416-26.
  35. Mathieu M, Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17.
  36. Akers JC, Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*. 2013;113(1):1-11.
  37. Latifkar A, Hur, Y. H., Sanchez, J. C., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *J Cell Sci*. 2019;132(13).
  38. Pegtel D, Gould, S. Exosomes. *Annual Review of Biochemistry* 2019;88(1):487-514.
  39. Ghossoub R, Lembo, F., Rubio, A. et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*. 2014;5.
  40. Vidal M. Exosomes: Revisiting their role as “garbage bags.” *Traffic*. 2019;20(11):815-28.
  41. Record M, Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Wakelam, M. J. O. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *Journal of lipid research*. 2018;59(8):1316-24.
  42. Kobayashi T, Beuchat, M. H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J. M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, T., & Gruenberg, J. Separation and Characterization of Late Endosomal Membrane Domains. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(35):32157-64.
  43. Perrin P, Janssen, L., Janssen, H., van den Broek, B., Voortman, L. M., van Elsland, D., Berlin, I., & Neefjes, J. Retrofusion of intraluminal MVB membranes parallels viral infection and coexists with exosome release. *Current biology*. 2021;31(17):3884-93.
  44. Kalluri R, & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367.
  45. Cocozza F, Grisard, E., Martin-Jaular, L., Mathieu, M., Théry, C. SnapShot: Extracellular vesicles. *Cell* 2020;182(1):262.
  46. Doyle LM, & Wang, M. Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7).
  47. Coumans FAW, Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., van der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., Siljander, P. R. M., ... Nieuwland, R. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation research*. 2017;120(10).

48. Patel GK, Khan, M.A., Zubair, H. et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep.* 2019;9.
49. Martínez-Greene JA, Hernández-Ortega, K., Quiroz-Baez, R., Resendis-Antonio, O., Pichardo-Casas, I., Sinclair, D. A., Budnik, B., Hidalgo-Miranda, A., Uribe-Querol, E., Ramos-Godínez, M. D. P., & Martínez-Martínez, E. Quantitative proteomic analysis of extracellular vesicle subgroups isolated by an optimized method combining polymer-based precipitation and size exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(6).
50. Keerthikumar S, Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., & Mathivanan, S. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of Molecular Biology.* 2016;428(4).
51. Poupardin R, Wolf, M., & Strunk, D. Adherence to minimal experimental requirements for defining extracellular vesicles and their functions: a systematic review. *bioRxiv.* 2021.
52. Lai J, Chau, Z., Chen, SY., Hill, J, Korpany, K., Liang, NW., Lin, LH., Lin, YH., Liu, J., Liu, YC., Lunde, R., Shen, WT. Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. *Adv Sci (Weinh).* 2022;9(15).
53. Bio-Rad. Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus Instruction Manual, Rev D <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1706542.pdf>: Bio-Rad;
54. Cao Y, Yu, X., Zeng, T., Fu, Z., Zhao, Y., Nie, B., Zhao, Y., Yin, Y., Li, G. Molecular Characterization of Exosomes for Subtype-Based Diagnosis of Breast Cancer. *Journal of the American Chemical Society.* 2022;144(30):13475-86.
55. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. *Cell Stress and Chaperones.* 2011;16(3):235-49.
56. Welsh JA, Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., ... Witwer, K. W. . Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2024;13.
57. Hoshino A, Kim, H. S., Bojmar, L., Gyan, K. E., Cioffi, M., Hernandez, J., Zambirinis, C. P., Rodrigues, G., Molina, H., Heissel, S., Mark, M. T., Steiner, L., Benito-Martin, A., Lucotti, S., Di Giannatale, A., Offer, K., Nakajima, M., Williams, C., Nogués, L., Pelissier Vatter, F. A., ... Lyden, D. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell.* 2020;182(4):1044-61.
58. Kruger S, Abd Elmageed, Z. Y., Hawke, D. H., Wörner, P. M., Jansen, D. A., Abdel-Mageed, A. B., Alt, E. U., & Izadpanah, R. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014;14(44).
59. Wen SW, Lima, L. G., Lobb, R. J., Norris, E. L., Hastie, M. L., Krumeich, S., & Möller, A. Breast Cancer-Derived Exosomes Reflect the Cell-of-Origin Phenotype. *Proteomics.* 2019;19(8).
60. Muz B, de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 2015;3:83-92.
61. Jiang H, Zhao, H., Zhang, M., He, Y., Li, X., Xu, Y., & Liu, X. Hypoxia Induced Changes of Exosome Cargo and Subsequent Biological Effects. *Front Immunol.* 2022;13.

62. King HW, Michael, M.Z. & Gleadle, J.M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012;12(421).
63. Meng W, Hao, Y., He, C. et al. Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2019;18(57).
64. Semenza G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-32.
65. Pugh CW, & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*. 2003;9(6):677-84.
66. Malda J, Klein, T. J., & Upton, Z. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng*. 2007;13(9):2153-62.
67. Godet I, Doctorman, S., Wu, F., & Gilkes, D. M. Detection of Hypoxia in Cancer Models: Significance, Challenges, and Advances. *Cells*. 2022;11(4):686.
68. Ray SK, & Mukherjee, S. Imitating Hypoxia and Tumor Microenvironment with Immune Evasion by Employing Three Dimensional In vitro Cellular Models: Impressive Tool in Drug Discovery. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2022;17(1):80-91.
69. Muñoz J, Chánez-Cárdenas, M. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*. 2019;39(4):556-70.
70. Gao XX, Liu, C. H., Hu, Z. L., Li, H. Y., Chang, X., Li, Y. Y., Zhang, Y. Y., Zhai, Y., & Li, C. Q. The biological effect of cobalt chloride mimetic-hypoxia on nucleus pulposus cells and the comparability with physical hypoxia in vitro. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021;26(10):799-812.
71. Kaczmarek M, Cachau, R. E., Topol, I. A., Kasprzak, K. S., Ghio, A., & Salnikow, K. Metal ions-stimulated iron oxidation in hydroxylases facilitates stabilization of HIF-1 alpha protein. *Toxicol Sci*. 2009;107(2):394-403.
72. Technology CS. Angiogenesis. Angiogenesis Pathways. <https://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis-pathway2018>.
73. Apte RS, Chen, D. S., & Ferrara, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-64.
74. Melincovici CS, Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2).
75. Schubert A, & Boutros, M. Extracellular vesicles and oncogenic signaling. *Mol Oncol*. 2021;15(1):3-26.
76. Sia D, Alsinet, C., Newell, P., & Villanueva, A. VEGF Signaling in Cancer Treatment, Current Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design*. 2014;20(17):2834-42.
77. Ren W, Hou, J., Yang, C., Wang, H., Wu, S., Wu, Y., Zhao, X., & Lu, C. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1).
78. Conley A, Minciacci, V. R., Lee, D. H., Knudsen, B. S., Karlan, B. Y., Citrigno, L., Viglietto, G., Tewari, M., Freeman, M. R., Demichelis, F., & Di Vizio, D. High-throughput sequencing of two populations of extracellular vesicles provides an mRNA signature that can be detected in the circulation of breast cancer patients. *RNA Biology*. 2017;14(3):305-16.
79. Vera N, Acuña-Gallardo, S., Grünenwald, F., Caceres-Verschae, A., Realini, O., Acuña, R., Lladser, A., Illanes, S. E., & Varas-Godoy, M. Small extracellular vesicles released from ovarian cancer spheroids in response to cisplatin promote the pro-

- tumorigenic activity of mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(20).
80. Wang CA, Chang, I. H., Hou, P. C., Tai, Y. J., Li, W. N., Hsu, P. L., Wu, S. R., Chiu, W. T., Li, C. F., Shan, Y. S., & Tsai, S. J. DUSP2 regulates extracellular vesicle-VEGF-C secretion and pancreatic cancer early dissemination. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2020;9(1).
  81. Rana NK, Singh, P., & Koch, B. CoCl<sub>2</sub> simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biological research*. 2019;52(1).
  82. Li Q, Ma, R., & Zhang, M. CoCl<sub>2</sub> increases the expression of hypoxic markers HIF-1 $\alpha$ , VEGF and CXCR4 in breast cancer MCF-7 cells. *Oncology letters*. 2018;15(1):1119-24.
  83. He G, Peng, X., Wei, S. et al. Exosomes in the hypoxic TME: from release, uptake and biofunctions to clinical applications. *Mol Cancer*. 2022;21(19).
  84. To KKW, & Cho, W. C. S. Exosome secretion from hypoxic cancer cells reshapes the tumor microenvironment and mediates drug resistance. *Cancer Drug Resist*. 2022;5(3):577-94.
  85. Tan S, Yang, Y., Yang, W. et al. Exosomal cargos-mediated metabolic reprogramming in tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023;42(59).
  86. Ko SY, Lee, W., Kenny, H.A. et al. Cancer-derived small extracellular vesicles promote angiogenesis by heparin-bound, bevacizumab-insensitive VEGF, independent of vesicle uptake. *Commun Biol*. 2019;2.
  87. Fan Y, Pionneau, C., Coccozza, F., Boëlle, P. Y., Chardonnet, S., Charrin, S., Théry, C., Zimmermann, P., & Rubinstein, E. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2023;12(8).
  88. Treps L, Perret, R., Edmond, S., Ricard, D., Gavard, J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017;6(1).
  89. Roucourt B, Meeussen, S., Bao, J., Zimmermann, P., & David, G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Res*. 2015;25(4):412-28.
  90. Christianson HC, Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P., & Belting, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43).
  91. Mulcahy L, Pink, R., Carter, D. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3.
  92. Najafi M, Goradel, N. H., Farhood, B., Salehi, E., Solhjoo, S., Toolee, H., Kharazinejad, E., & Mortezaee, K. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5700–21.
  93. Paskeh MDA, Entezari, M., Mirzaei, S., Zabolian, A., Saleki, H., Naghdi, M. J., Sabet, S., Khoshbakht, M. A., Hashemi, M., Hushmandi, K., Sethi, G., Zarrabi, A., Kumar, A. P., Tan, S. C., Papadakis, M., Alexiou, A., Islam, M. A., Mostafavi, E., & Ashrafizadeh, M. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1).
  94. Liu Q, Peng, F., & Chen, J. The Role of Exosomal MicroRNAs in the Tumor Microenvironment of Breast Cancer. *Int J Mol Ciencia*. 2019;20(16).
  95. Yang E, Wang, X., Gong, Z., Yu, M., Wu, H., & Zhang, D. Exosome-mediated metabolic reprogramming: the emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1).



96. Liu T, Hooda, J., Atkinson, J. M., Whiteside, T. L., Oesterreich, S., & Lee, A. V. Exosomes in Breast Cancer - Mechanisms of Action and Clinical Potential. *Mol Cancer Res.* 2021;19(6):935-45.
97. Fridrichova I, & Zmetakova, I. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. *Cells.* 2019;8(11).
98. Huang S, Dong, M., & Chen, Q. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Breast Cancer Metastasis. *International journal of molecular sciences.* 2022;23(22).
99. Ghalehbandi S, Yuzugulen, J., Pranjol, M. Z. I., & Pourgholami, M. H. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol.* 2023;949.
100. Jakobsson L, Franco, C., Bentley, K. et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* 2010;12:943–53.
101. Martín LC. Modelos celulares de interés biomédico para el estudio de la angiogénesis. España: Universidad de León; 2020.
102. Birbrair A, Zhang, T., Wang, Z. M., Messi, M. L., Olson, J. D., Mintz, A., & Delbono, O. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;307(1).
103. Mashouri L, Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. M., Molaei, F., & Alahari, S. K. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* 2019;18(1).
104. Rasband WS. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA1997-2018.
105. Zhang J, Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13(1):17-24.
106. Shao C, Yang, F., Miao, S., Liu, W., Wang, C., Shu, Y., & Shen, H. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Mol Cancer.* 2018;17(1).
107. Zhang C, Ji, Q., Yang, Y., Li, Q., & Wang, Z. Exosome: Function and Role in Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Technol Cancer Res Treat.* 2018.
108. Tang Q, Xiao, X., Li, R., He, H., Li, S., & Ma, C. Recent Advances in Detection for Breast-Cancer-Derived Exosomes. *Molecules* 2022;27(19).
109. Yan W, Wu, X., Zhou, W., Fong, M. Y., Cao, M., Liu, J., Liu, X., Chen, C. H., Fadare, O., Pizzo, D. P., Wu, J., Liu, L., Liu, X., Chin, A. R., Ren, X., Chen, Y., Locasale, J. W., & Wang, S. E. Cancer-cell-secreted exosomal miR-105 promotes tumour growth through the MYC-dependent metabolic reprogramming of stromal cells. *Nat Cell Biol.* 2018;20(5).
110. Luga V, Zhang, L., Vilorio-Petit, A. M., Ogunjimi, A. A., Inanlou, M. R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A. N., Basik, M., & Wrana, J. L. Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell.* 2012;151(7):1542–56.
111. Li XJ, Ren, Z. J., Tang, J. H., & Yu, Q. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;44(5):1741–8.
112. Sueta A, Yamamoto, Y., Tomiguchi, M., Takeshita, T., Yamamoto-Ibusuki, M., & Iwase, H. Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence. *Oncotarget.* 2017;8(41):69934-44.
113. Donoso J A, S., González, J. The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications. *Traffic.* 2021;22(7):204-20.