

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Puesta a punto de la metodología de obtención de exosomas

Erik Briffault del Castillo

Junio de 2021

Tutor: Dra. Araceli Delgado Hernández

Cotutor: Dra. Patricia Díaz Rodríguez

Resumen

Los exosomas son vesículas extracelulares de pequeño tamaño con un aparente gran potencial para su aplicación en el diagnóstico y tratamiento de diversos procesos patológicos, puesto que son producidos por muchos tipos celulares y juegan un importante papel en la comunicación celular. Sin embargo, para su utilización es necesario desarrollar métodos que permitan su aislamiento. Debido a su origen biológico y a la gran variabilidad que esto supone, no existe a día de hoy un protocolo universal para ello, pese a que no son pocos los medios y esfuerzos dedicados a su búsqueda. En este trabajo se lleva a cabo el aislamiento de exosomas mediante algunos de los métodos más utilizados en la bibliografía (precipitación, ultracentrifugación y cromatografía de exclusión de tamaño) para posteriormente cuantificar y caracterizar los exosomas, de forma que puedan compararse los resultados y establecer un método como más adecuado para futuros trabajos.

Los resultados muestran que, efectivamente, no es posible seleccionar un método estándar para el aislamiento. Las distintas técnicas ensayadas ofrecen diferentes resultados en cuanto a pureza y cantidad de exosomas obtenidos, de forma que la elección de un método u otro dependerá de cuál de los dos aspectos se priorice. No obstante, sigue siendo necesaria una puesta a punto más exhaustiva para obtener conclusiones más claras.

Abstract

Exosomes are small extracellular vesicles with apparently great potential for application in diagnosis and treatment of different pathological processes, as they are produced by many cell types and play an important role in intercellular communication. However, their use requires the development of methods allowing for exosome isolation. Due to their biological origin and the great associated variability, there is no universal protocol to do so, although big effort and resources have been used towards this goal. In this project, exosome isolation is carried out by some of the most used isolation methods (precipitation, ultrafiltration and size exclusion chromatography), so that exosomes can be separated, quantified and characterized, allowing for the comparison of the obtained results to try to set the most suitable method for further projects.

Results show that, indeed, it is not possible to establish one single method for exosome isolation. All techniques yield different results regarding purity and quantity of the resulting exosomes. Therefore, choosing one or another of the assayed methods would depend on which of these aspects is to prioritize. Nevertheless, further research and set up are mandatory for obtaining clearer conclusions.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Exosomas: origen, función e interés	1
1.2. Métodos de aislamiento de exosomas	2
1.2.1. Ultracentrifugación	2
1.2.2. Ultrafiltración	3
1.2.3. Cromatografía de exclusión de tamaño	3
1.2.4. Métodos comerciales de aislamiento de exosomas	4
2. Objetivos	5
3. Materiales y métodos	6
3.1. Materiales y equipos	6
3.2. Aislamiento de exosomas	6
3.2.1. Aislamiento por precipitación	7
3.2.2. Aislamiento por ultrafiltración	7
3.2.3. Aislamiento por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	7
3.3. Caracterización de exosomas	8
3.3.1. Determinación de tamaño	8
3.3.2. Cuantificación	8
4. Resultados y discusión	9
4.1. Determinación de tamaño	9
4.2. Cuantificación	11
5. Conclusiones	13
6. Referencias	14

1. Introducción

1.1. Exosomas: origen, función e interés

Los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares de origen endocítico producidas por prácticamente todos los tipos celulares [1]. El término «exosoma» se utilizó inicialmente para referirse a vesículas de tamaños variados (hasta 1 μm), aunque posteriormente estas fueron clasificándose según su tamaño y origen en distintas clases, quedando el término restringido a aquellas de 30-160 nm provenientes de endosomas multivesiculares [2-4].

Al contrario que la gran mayoría de vesículas extracelulares, los exosomas presentan un origen endosómico. Durante el proceso de formación y maduración de los endosomas, pueden ocurrir procesos de invaginación de la membrana hacia el interior de los mismos, apareciendo vesículas con contenido citoplasmático en su interior (futuros exosomas) y dando lugar a los endosomas multivesiculares (EMVs). La fusión de estos con la membrana celular produce la liberación de su contenido al medio extracelular, lo que lleva a la secreción de exosomas [3,4]. De esta manera, la liberación de exosomas no es progresiva (como cabría esperar si su formación fuese por exocitosis), sino que ocurre por fenómenos de *burst* por la salida simultánea de múltiples vesículas [1].

Por tanto, los exosomas son altamente heterogéneos en cuanto a su estructura y composición, variando según las células de las que provengan, puesto que su membrana y contenido reflejan los de sus células de origen [5] (**figura 1**).

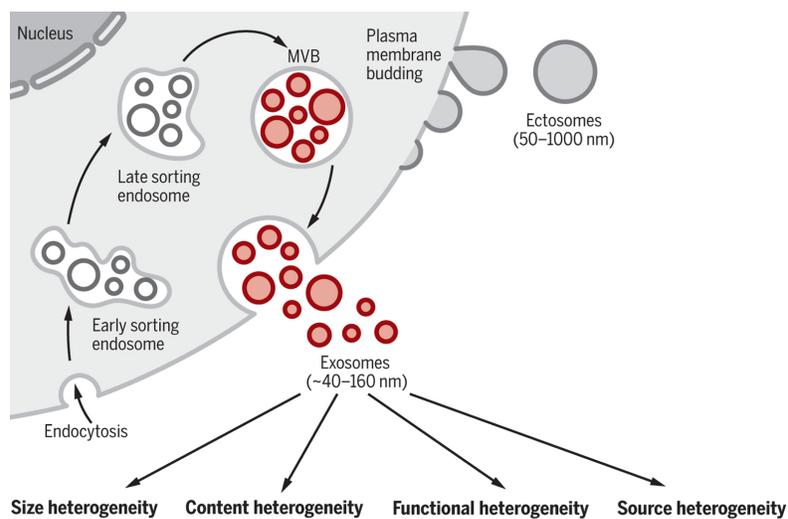


Figura 1. Proceso de biogénesis de exosomas. Los endosomas se forman por invaginación de la membrana plasmática y pueden dar lugar posteriormente a EMVs (o MVB, del inglés, *multivesicular bodies*), que liberarán exosomas al medio, previa fusión con la membrana plasmática. Adaptado de Kalluri et al., 2020 [4].

En cuanto a su función, parecen jugar un importante papel en la comunicación celular [4]. Se ha observado que los exosomas modulan el comportamiento de células cercanas mediante el transporte de moléculas bioactivas como receptores de membrana, miRNAs, factores de transcripción, proteínas y otras moléculas de señalización [1,3,6], así como mRNAs que pueden ser traducidos por las células receptoras [1,7].

Debido a esto, los exosomas pueden ser una potencial plataforma para aplicaciones biomédicas, administración de fármacos, terapia génica, diagnóstico, desarrollo de vacunas y regeneración de tejidos. Dentro de esta última, una de sus posibles aplicaciones es incrementar la regeneración ósea a partir de exosomas de células madre mesenquimales (MSCs). Se ha observado que las MSCs son capaces de promover la regeneración ósea [8], fenómeno que se hace extensible a sus exosomas, planteándose su uso como posible terapia en regeneración ósea al ser estructuras menos inmunogénicas, más estables y más fáciles de almacenar y administrar que las propias MSCs [9,10]. Pese a esto, su aplicación práctica presenta importantes limitaciones, empezando por el propio aislamiento, lo que suscita el interés en desarrollar nuevas técnicas de obtención de exosomas, o bien, en la optimización de las ya existentes [11], como es el caso de este trabajo.

1.2. Métodos de aislamiento de exosomas

Existe interés en establecer un protocolo universal para el aislamiento de exosomas, pero no existe un consenso sobre qué método es el más adecuado debido, en gran medida, a que las diferentes muestras presentan características propias y únicas relacionadas con el origen de los mismos [12]. Así, debe considerarse cada experimento (condiciones experimentales y tipos celulares determinados) de forma individual teniendo en cuenta el análisis posterior al que se sometan las muestras (caracterización física, cuantificación/identificación de su contenido, etc.) a la hora de seleccionar un método de aislamiento u otro [13]. Es decir, para cada tipo celular y condiciones experimentales habrá un método más adecuado, no pudiendo, *a priori*, establecerse un *gold standard*. Actualmente las técnicas más utilizadas para el aislamiento de exosomas son técnicas físicas [10], principalmente ultracentrifugación (UC), ultrafiltración (UF) y cromatografía de exclusión de tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), así como métodos comerciales diseñados específicamente para ello.

1.2.1. Ultracentrifugación

La ultracentrifugación es uno de los métodos más utilizados para el aislamiento de exosomas, basado en su tamaño y densidad. De forma general, se llevan a cabo varias series de centrifugación con fuerzas centrífugas crecientes (300 g, 2000 g, 10.000 g) [6] para eliminar progresivamente partículas de mayor tamaño (células, grandes vesículas extracelulares...) y terminar precipitando los

exosomas con un ciclo de centrifugación a alta velocidad (≥ 100.000 g) durante al menos una hora. Este método logra aislar exosomas con gran rendimiento, aunque no está exento de problemas [14].

Pese a ser ampliamente utilizada, la UC presenta ciertas desventajas. Destaca el tiempo necesario para llevar a cabo la técnica, la elevada cantidad de volumen de muestra necesario, la dificultad para analizar gran cantidad de muestras al mismo tiempo y la propia necesidad de acceder a una ultracentrífuga. Además, el procedimiento no permite una separación eficiente de los exosomas por tamaño, puesto que según sea el contenido de las vesículas, así será su densidad, lo que influirá en la precipitación. También, junto con los exosomas podrán precipitar sustancias como agregados de proteínas, contaminantes y otras vesículas extracelulares de densidad similar. En cuanto a la calidad de los exosomas obtenidos, la UC puede llevar a la agregación o ruptura de las vesículas, disminuyendo el potencial rendimiento [15].

1.2.2. Ultrafiltración

El aislamiento por ultrafiltración se basa en el tamaño de partícula. Esta técnica permite concentrar los exosomas de las muestras mediante el uso de filtros con tamaño de poro nanométrico (normalmente dado en función del peso molecular, 10-100 kDa) al someterlas a centrifugación en condiciones diversas (3.000-4.000 g, 10-55 min) [14,16,17]. La filtración utilizando filtros con tamaño de poro mayor no permite concentrar los exosomas [18] y únicamente logra su pérdida. De esta manera, la cantidad de exosomas recuperados depende del tipo de filtro (material y tamaño de poro), siendo los más eficaces los filtros de celulosa con un tamaño de poro de 10 kDa [17].

Este método aparece en una importante parte de la literatura relativa a este tema [17], bien como técnica complementaria a otras, bien como técnica de aislamiento *per se* [19-21], y presenta como principales ventajas su rapidez y la utilización de equipos no demasiado específicos ni caros. No obstante, la UF como única técnica da lugar a muestras con gran cantidad de proteína residual, lo que resulta en aislados con baja pureza de exosomas y dificulta el posterior análisis proteico [22]. Además, parte de los exosomas pueden quedar retenidos en la membrana del filtro [20,21].

1.2.3. Cromatografía de exclusión de tamaño

La cromatografía de exclusión de tamaño, ampliamente utilizada en diversos campos, es una técnica que permite separar moléculas y partículas en base a su tamaño y que puede ser útil en la separación de exosomas de otros componentes de las muestras. Si bien puede utilizarse como un método de separación por sí solo, lo más habitual es que se combine con otras técnicas, como la ultracentrifugación [23] o la ultrafiltración [24,25], que sirvan como pretratamiento para disminuir la contaminación proteica y de vesículas extracelulares de otros tamaños [21].

Se trata de un método rápido y sencillo que, sin embargo, presenta bajo rendimiento en cuanto a cantidad de exosomas aislados y requiere de material relativamente caro. Asimismo, las fracciones obtenidas suelen estar bastante diluidas y requieren una posterior concentración [21].

1.2.4. Métodos comerciales de aislamiento de exosomas

Debido al auge que ha tenido la investigación en el campo de los exosomas y la ya mencionada problemática en cuanto a la búsqueda de métodos estandarizados para su aislamiento, han aparecido en el mercado diversos productos que buscan lograr un aislamiento eficaz, con elevado rendimiento, pureza y reproducibilidad. Estos métodos se basan en distintos principios como son precipitación, exclusión de tamaño, afinidad, etc. [1].

2. Objetivos

Se pretende poner a punto varios métodos para el aislamiento de exosomas de células mesenquimales procedentes de médula ósea de conejo. De esta manera, los objetivos del trabajo son:

1. Evaluar y comparar los métodos de ultrafiltración, cromatografía de exclusión de tamaño y precipitación (mediante un reactivo comercial) en cuanto a cantidad de exosomas aislados y pureza de los mismos.
2. En base a los resultados, seleccionar el método más adecuado según los citados criterios.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y equipos

Material/equipo	Casa comercial	Lugar de Origen
Cultivo celular		
Tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS)	BioWhittaker, Lonza	Verviers, Bélgica
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	BioWhittaker, Lonza	Walkersville, MD, EEUU
Suero fetal bovino (FBS) (LINU-S00GE1)	Linus	'South America Origin'
Penicilina-estreptomicina (10K/10K)	BioWhittaker, Lonza	Verviers, Bélgica
L-glutamina (200mM)	BioWhittaker, Lonza	Verviers, Bélgica
Aislamiento de exosomas		
Filtros de centrifuga Amicon® Ultra-15 10K	Merck Millipore	Cork, Irlanda
Filtros de centrifuga Amicon® Ultra-15 100K	Merck Millipore	Cork, Irlanda
Filtros de centrifuga Amicon® Ultra-0.5 100K	Merck Millipore	Cork, Irlanda
Reactivo Total Exosome Isolation®	Invitrogen, Thermo Fisher	Vilna, Lituania
Columnas Izon® qEVoriginal/70nm	Izon Science	Christchurch, NZ
Caracterización		
Dodecilsulfato sódico (SDS), aprox. 99 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Alemania
Seroalbúmina bovina (BSA), mín. 98 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Alemania
Kit de cuantificación de proteínas Micro BCA®	Thermo Scientific	Rockford, IL, EEUU
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments	Malvern, Reino Unido
Lector de placas Gen5 Microplate Reader	BioTek Instruments	Winooski, VT, EEUU

Tabla 1. Materiales y equipos utilizados.

3.2. Aislamiento de exosomas

Para aplicar los citados métodos de aislamiento de exosomas (UF, SEC y precipitación) es necesaria inicialmente una suspensión de exosomas de la que poder extraerlos. Para obtener esta suspensión se extrajeron células mesenquimales procedentes de médula ósea de conejo (rbMSCs) según Reyes et al. [26] y se cultivaron en frascos de poliestireno con medio DMEM suplementado con 10 % FBS, 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % l-glutamina hasta pase tres. En este punto, al ~70 % de confluencia se cambió el medio de cultivo por DMEM suplementado con 10 % FBS sin exosomas, 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % l-glutamina.

Para obtener el FBS sin exosomas, el FBS fue sometido a ultrafiltración a través de filtros Amicon® Ultra-15 de peso molecular de corte de 10 kDa o 100 kDa, centrifugando a 3.000g durante 55 minutos [16,27] para eliminar los posibles exosomas y proteínas presentes en el mismo y evitar que estas puedan dificultar los análisis posteriores. La eficiencia de ambos protocolos para eliminar los exosomas del FBS fue evaluada analizando su contenido en exosomas por DLS (ver sección 4.1.). El nuevo medio fue posteriormente filtrado a través de filtros de 0,22 μm para eliminar posible contaminación bacteriana. Las células se cultivaron en este último medio durante 48 horas con el objetivo de que se secretasen exosomas al mismo.

Pasadas las 48 horas de incubación, se retiró el medio conteniendo los exosomas secretados (a partir de ahora, “suspensión de exosomas”) y se sometió a centrifugación a 2.000g, 30 minutos para eliminar células y contaminantes de gran tamaño, tomando finalmente el sobrenadante. Las células se contaron ($4,6 \times 10^6$ rbMSCs) y se congelaron.

3.2.1. Aislamiento por precipitación

Para el aislamiento por precipitación se utilizó el reactivo comercial Total Exosome Isolation específico para medio de cultivo celular. El método se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: se tomaron 10 ml de la suspensión de exosomas y se añadió el reactivo pertinente en proporción 1:0,5 (5 ml), se dejó incubar 18 horas a 4°C y se centrifugó a 10.000g, 1 hora a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de DPBS. La muestra se almacenó a 4°C durante no más de una semana.

3.2.2. Aislamiento por ultrafiltración

El aislamiento por ultrafiltración se llevó a cabo utilizando filtros Amicon® Ultra-15 de celulosa regenerada y tamaño de poro de 10 kDa, al ser los que logran recuperar un mayor número de partículas [17]. Se filtraron 10 ml de la suspensión de exosomas centrifugándolos a 3.000g, 55 min. Tras este primer paso, se realizó una segunda ronda en las mismas condiciones tras hacer un lavado con 10 ml DPBS. Finalmente se recogió el concentrado ($\sim 200 \mu\text{l}$) y se llevó a un volumen final de 1 ml con DPBS. La muestra se almacenó a 4°C durante no más de una semana.

3.2.3. Aislamiento por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

La SEC se realizó utilizando columnas qEVoriginal. Se siguieron las indicaciones del fabricante en cuanto a la preparación de la columna. En lo referente a la preparación de la muestra, siguiendo el protocolo del producto, se concentraron 10 ml de la suspensión de exosomas utilizando filtros Amicon® Ultra-15 100k (en las mismas condiciones descritas anteriormente). El concentrado se llevó a 1 ml con DPBS. Este volumen se eluyó en la columna con DPBS y se recogió la fracción

que, según el fabricante, debería de contener los exosomas (1,5 ml tras un volumen inicial de 3 ml que debía descartarse). Posteriormente se llevó a cabo otra concentración de la misma manera que la primera y se llevó el concentrado a 1 ml con DPBS. La muestra se almacenó a 4°C durante no más de una semana.

3.3. Caracterización de exosomas

Las muestras obtenidas tras el aislamiento de exosomas se caracterizaron en función del tamaño y número de exosomas. El contenido en proteínas de los exosomas puede emplearse como un indicativo del número de los mismos, por lo que la cantidad de exosomas se determinó de forma relativa entre las diferentes técnicas mediante la cuantificación de proteína total contenida en los mismos.

3.3.1. Determinación de tamaño

La determinación de tamaño de los exosomas aislados se llevó a cabo por un método de dispersión de luz como es el DLS (*dynamic light scattering*) utilizando el instrumento Zetasizer Nano ZS. De forma general, se tomaron 200 μ l de muestra y se llevaron a 1 ml con DPBS para realizar las mediciones.

3.3.2. Cuantificación

Para la cuantificación se recurrió a la determinación de proteínas contenidas en los exosomas por Micro BCA[®], método colorimétrico que permite la determinación de proteína total. La cantidad de proteína en exosomas se calculó por diferencia entre la detectada antes y después de un proceso de lisis con DPBS-SDS 0,2% p/v [17]. Para ello, las muestras se diluyeron 1:25 con el medio de lisis, se incubaron 5 minutos a 90°C y se sometieron a 6 ciclos de sonicación de 30 s en baño de hielo [28]. Se elaboraron dos rectas de calibrado empleando BSA: una en DPBS, otra en DPBS-SDS.

El método de cuantificación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante: en una placa de 96 pocillos se colocaron las muestras a medir (150 μ l de muestra por pocillo) y se añadió el reactivo correspondiente en proporción 1:1 (150 μ l por pocillo). Se homogeneizó y se dejó incubar a 37°C durante dos horas. Tras ese tiempo se dejó enfriar la placa y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación de tamaño

La **figura 2** representa los resultados de la eliminación de exosomas del FBS utilizado para suplementar el medio de cultivo. Se aprecia la ausencia de partículas en el rango de interés para las muestras filtradas a través del filtro de 10 kDa, por lo que fue el método seleccionado.

En la **figura 3** se observan las distribuciones de tamaño de las muestras analizadas por DLS. Cabe destacar que las distribuciones en intensidad son sensibles a las partículas de mayor tamaño, mientras que las distribuciones en número lo son a las de menor tamaño.

Los resultados reflejan cómo el método que logra separar exosomas de forma más eficaz, dando lugar a una sola población dentro de un rango de tamaños esperable, es la SEC (**figura 3C**, con un diámetro en torno a los 100 nm). Además, esta población se observa igual tanto en la distribución en número como en intensidad, por lo que son las únicas partículas presentes en la muestra: el método es capaz de disminuir de forma satisfactoria la cantidad de partículas no deseadas de pequeño y gran tamaño hasta el punto en que ni las primeras aparecen en la distribución en número, ni las segundas, en la distribución en intensidad.

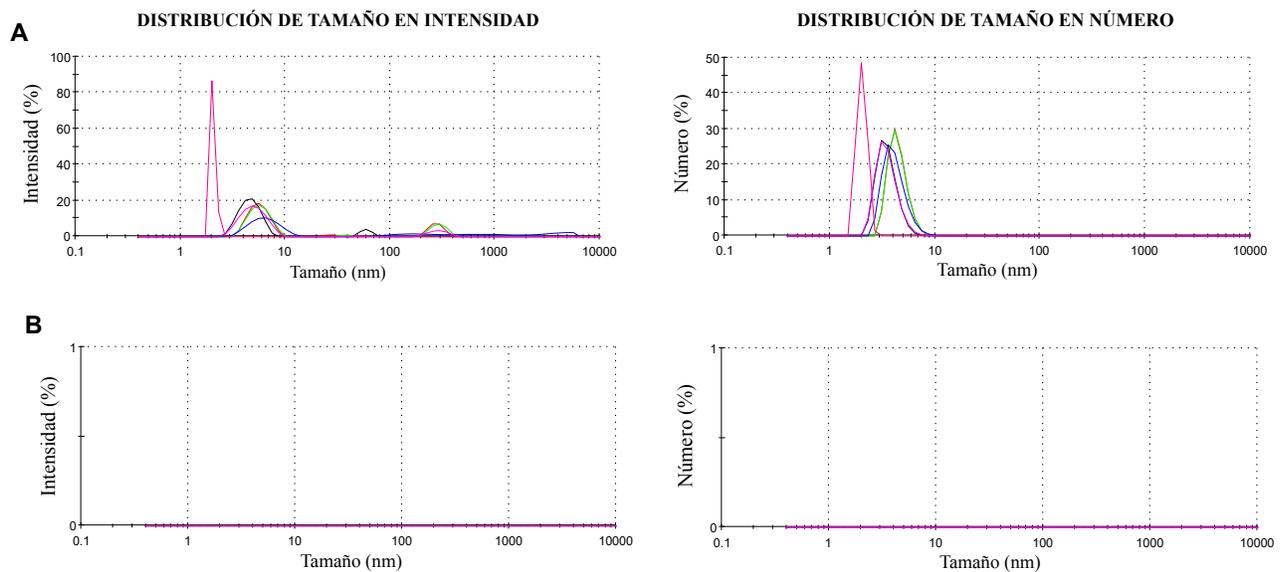


Figura 2. Distribuciones de tamaño en intensidad y número de las partículas presentes en el FBS ‘sin exosomas’, obtenidas por DLS. Distribución de tamaño en intensidad (izq.) y número (dcha.) de las partículas de las muestras filtradas por 100 kDa (A) y 10 kDa (B). Se analizaron dos replicados por muestra y las mediciones se realizaron por triplicado. Cada línea coloreada representa una lectura del instrumento (las líneas roja, verde y azul corresponden a un replicado; las líneas rosas y negra, al otro). El tamaño está dado como diámetro de las partículas (nm).

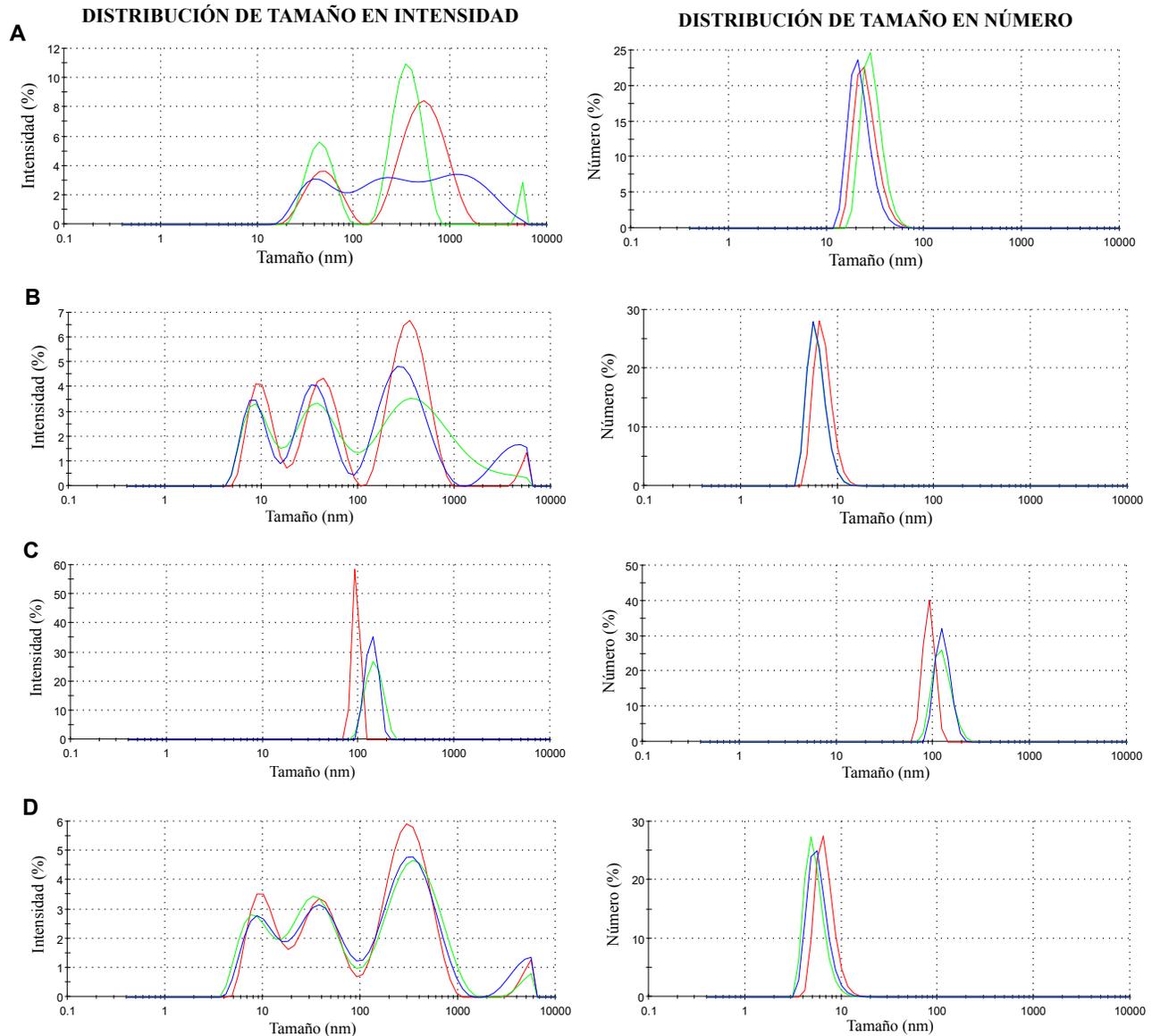


Figura 3. Distribuciones de tamaño en intensidad y número de las partículas presentes en las muestras evaluadas por DLS. Distribución de tamaño en intensidad (izq.) y número (dcha.) de las partículas del aislado por precipitación (A), por ultrafiltración (B) y por SEC (C), y de la suspensión de exosomas inicial (D). Las mediciones se realizaron por triplicado. Cada línea coloreada representa una lectura del instrumento. El tamaño está dado como diámetro de las partículas (nm).

Los otros dos métodos dan lugar a distribuciones con más de una población de partículas. La precipitación (**figura 3A**) resulta en un aislado con dos poblaciones claramente diferenciadas en la distribución en intensidad: una en torno a 45 nm y otra en torno a 500 nm, si bien por las limitaciones de la técnica no puede excluirse la posibilidad de que haya partículas de tamaño intermedio. La población más pequeña podría corresponderse con el rango de tamaños más pequeño descrito para exosomas (~30 nm), o bien ser partículas no exosómicas. La población de ~500 nm podría estar formada por vesículas extracelulares de mayor tamaño que no se han logrado separar. En la

distribución en número, esta última población es minoritaria hasta el punto de ni si quiera aparecer representada. Por otro lado, la ultrafiltración (**figura 3B**) muestra distribuciones prácticamente iguales a la suspensión inicial (**figura 3D**), por lo que se muestra únicamente útil como técnica de concentración, pero no como método de separación o purificación.

4.2. Cuantificación

Las proteínas de las muestras se cuantificaron en muestras sin lisar (proteínas no provenientes de exosomas) y muestras lisadas con SDS (proteínas provenientes y no provenientes de exosomas) mediante la interpolación de las absorbancias en dos rectas de calibrado con BSA, una en DPBS y otra en DPBS-SDS (**figura 4**). Los valores de R^2 obtenidos indican una dependencia lineal de las absorbancias con la concentración.

En la **figura 5** se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas por Micro BCA[®]. A este respecto, el método de aislamiento que demostró mayor rendimiento en base a la cantidad de proteína estimada en el interior de los exosomas fue la ultrafiltración, con una diferencia de 2,588 mg/ml; seguido de precipitación (1,462 mg/ml) y SEC (con un máximo de 0,187 mg/ml).

También se pone de manifiesto qué métodos logran una mayor pureza en el aislamiento de los exosomas (menor cantidad de proteínas contaminantes), siendo la ultrafiltración el método que ofrece una muestra significativamente más “contaminada” y la SEC, el que da lugar a una muestra con menor contenido en proteínas residuales.

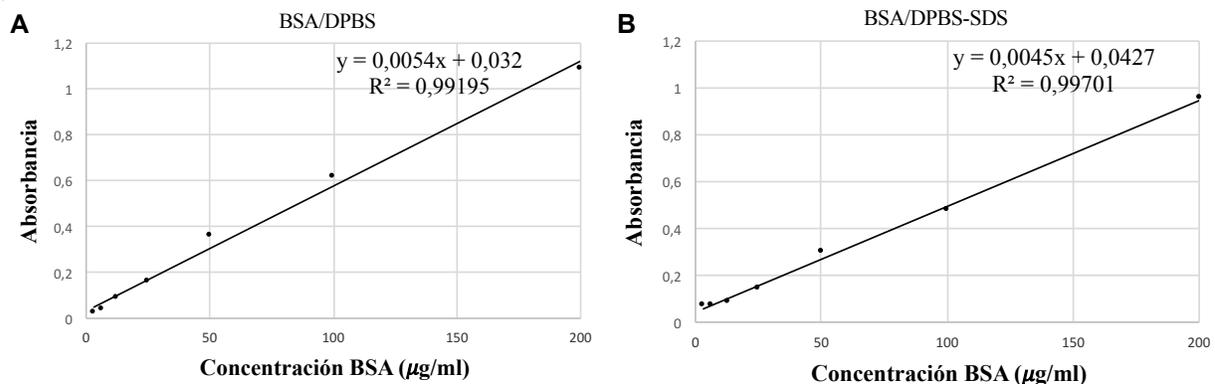


Figura 4. Rectas de calibrado para la cuantificación de proteína total por Micro BCA[®]. Las rectas se realizaron por duplicado, correspondiendo los puntos a las medias de las absorbancias. **A)** Recta de calibrado de BSA/DPBS para la cuantificación en muestras no sometidas a lisis. **B)** Recta de calibrado de BSA/DPBS-SDS para la cuantificación en muestras sometidas a lisis.

	Sin lisar		Lisados	
	Media (mg/ml)	SD (mg/ml)	Media (mg/ml)	SD (mg/ml)
Precipitación	0,111	0,039	1,573	0,126
UF	13,593	0,301	16,451	0,55
SEC	ND		0,187	0,24

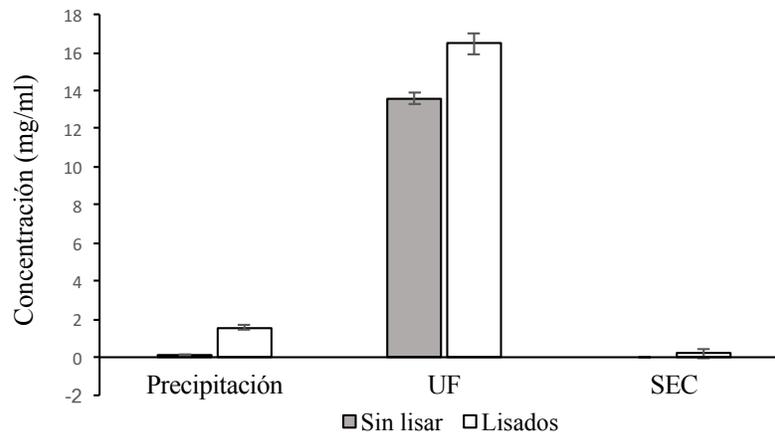


Figura 5. Resultados de la cuantificación de proteína total por Micro BCA®. Se analizaron dos replicados de cada muestra. ND: no detectado.

5. Conclusiones

De acuerdo con este estudio preliminar, no es posible establecer un método universal para el aislamiento de exosomas. A modo de conclusiones:

1. Ningún método logra buenos resultados atendiendo conjuntamente a la cantidad de exosomas obtenidos y a la pureza de los aislados.
2. La SEC parece eficaz para purificar los exosomas, pero no ofrece un buen rendimiento en cuanto a la cantidad de los mismos que es capaz de aislar.
3. La ultrafiltración resulta poco útil en lo que a purificación se refiere, pero permite concentrar mayor cantidad de partículas. Puede servir como método de concentración y como parte de protocolos de aislamiento combinado con otros métodos.
4. La precipitación con el reactivo comercial, pese a lograr aislar un mayor número de exosomas que la SEC y una menor “contaminación” proteica que la UF, no logra una distribución de tamaños monodispersa ni situar ninguna población en el rango de tamaños *a priori* esperado.

6. Referencias

1. Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman M, Singh S, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep.* 2019;9(1):5335.
2. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.
3. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PS. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol.* 2017;232(7):1587-90.
4. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020;367(6478):eaau6977.
5. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1208-15.
6. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med.* 2015;36(1):11-7.
7. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
8. Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, Kobayashi T. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. *PLoS One.* 2019;14(11):e0225472.
9. Zhang Y, Chopp M, Meng Y, Katakowski M, Xin H, Mahmood A, et al. Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2015;122(4):856-67.
10. Liu Y, Ma Y, Zhang J, Yuan Y, Wang J. Exosomes: A Novel Therapeutic Agent for Cartilage and Bone Tissue Regeneration. *Dose Response.* 2019;17(4):1559325819892702.
11. Jafari D, Malih S, Eini M, Jafari R, Gholipourmalekabadi M, Sadeghizadeh M, et al. Improvement, scaling-up, and downstream analysis of exosome production. *Crit Rev Biotechnol.* 2020;40(8):1098-112.
12. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):E1153.
13. Serrano-Pertierra E, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Oliva P, Villafani J, Navarro A, et al. Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study. *Bioengineering (Basel).* 2019;6(1):E8.

14. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4142-57.
15. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for exosome investigation. *Methods.* 2015;87:31-45.
16. Kornilov R, Puhka M, Mannerström B, Hiidenmaa H, Peltoniemi H, Siljander P, et al. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1422674.
17. Vergauwen G, Dhondt B, Van Deun J, De Smedt E, Berx G, Timmerman E, et al. Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Sci Rep.* 2017;7(1):2704.
18. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
19. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):F1657-61.
20. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):E6466.
21. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8545347.
22. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 2019;8(4):E307.
23. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
24. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, Mäger I, Johansson HJ, Heusermann W, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine.* 2015;11(4):879-83.
25. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods.* 2014;411:55-65.
26. Reyes R, Pec MK, Sánchez E, del Rosario C, Delgado A, Évora C. Comparative, osteochondral defect repair: stem cells versus chondrocytes versus bone morphogenetic protein-2, solely or in combination. *Eur Cell Mater.* 2013;25:351-65; discussion 365.
27. Lehrich BM, Liang Y, Fiandaca MS. Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(3):e12061.

28. Subedi P, Schneider M, Philipp J, Azimzadeh O, Metzger F, Moertl S, et al. Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Anal Biochem.* 2019;584:113390.