

Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares derivadas de células de cáncer de próstata LNCaP.

Rebeca Sandoica Expósito^a, Alicia Bort Bueno, Belén Sánchez Gómez, Pedro A. Mateos Gómez, Inés Díaz-Laviada, Nieves Rodríguez Henche

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. rebecca.sandoica@gmail.com

Palabras clave: VEs; exosomas; aislamiento; caracterización; cáncer próstata

Resumen

La comunicación entre células mediante secreción de vesículas ha tenido un interés creciente en las últimas décadas. Los exosomas son VEs pequeñas secretadas por las células de forma fisiológica y patológica. En el cáncer de próstata, los exosomas liberados por las células tumorales contienen un conjunto de moléculas específicas relacionadas con el tumor. Por ello, los exosomas han aparecido como una nueva fuente de biomarcadores de cáncer. El objetivo principal de este trabajo es la optimización del protocolo de aislamiento de exosomas de células de cáncer de próstata, y la caracterización de los mismos. Los resultados indicaron que, a pesar de haber conseguido mejoras en el método de aislamiento, la obtención de exosomas puede resultar en el co-aislamiento con otras VEs de tamaño similar no exosómicas. No obstante, el enriquecimiento de marcadores específicos de exosomas en las VEs aisladas indicó la presencia de estas vesículas. De entre todos los marcadores de cáncer de próstata, PSMA podría considerarse un biomarcador exosómico para el diagnóstico del cáncer de próstata. De cualquier manera, los biomarcadores exosómicos se encuentran todavía en etapa de descubrimiento, pero su potencial en el diagnóstico clínico espera ser explotado por completo. Por ello, es necesario un refinamiento de la purificación y el análisis de los subtipos de VEs.

Cita: Sandoica Expósito, Rebeca; Bort Bueno, Alicia; Sánchez Gómez, Belén; Mateos Gómez, Pedro A.; Díaz-Laviada, Inés; Rodríguez Henche, Nieves (2018) Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares derivadas de células de cáncer de próstata LNCaP. *dianas* 7 (2): e20180902. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e20180902. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Sandoica-Expósito R, Bort-Bueno A, Sánchez-Gómez B, Mateos-Gómez PA, Díaz-Laviada I, Rodríguez-Henche N. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La comunicación entre células mediante secreción de vesículas ha tenido un interés creciente en las últimas décadas. Las células secretan una gran variedad de vesículas, llamadas vesículas extracelulares (VEs). El término VE abarca un amplio rango de vesículas compuestas de una bicapa lipídica con proteínas, lípidos, metabolitos y ácidos nucleicos. No obstante, la composición concreta de las distintas poblaciones de VEs es aún desconocida [1]. Las VEs presentan una gran heterogeneidad en cuanto a su contenido, tamaño e incluso origen intracelular. Además, son muchos los tipos celulares que secretan VEs [2].

Tradicionalmente las VEs se han clasificado en dos grandes grupos en función de su origen intracelular: microvesículas y exosomas. Las microvesículas provienen de evaginaciones de la membrana plasmática de las células y tienen un rango de tamaño desde nanómetros hasta micrómetros. Por el contrario, los exosomas, son generados en el interior de cuerpos multivesiculares (CMVs), por lo que se propuso su origen endosomal [3]. Sin embargo, numerosos estudios han revelado que esta clasificación podría estar demasiado simplificada, ya que las poblaciones aisladas son heterogéneas y tienen propiedades que se solapan, incluido el tamaño, la densidad y las proteínas que sirven como marcadores moleculares. Por ello, actualmente se diferencian las vesículas en VEs grandes y VEs pequeñas [4].

Los exosomas son VEs pequeñas, con un diámetro de 30 a 100 nm, o incluso 150 nm en el caso de algunas líneas celulares, incluidas las de cáncer de próstata. Los estudios proteómicos revelan que los exosomas tienen un contenido constitutivo de proteínas de transporte y fusión de membrana asociadas a exosomas (flotilina-2, anexinas, LAMP2), proteínas del Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte, ESCRT (TSG101) y moléculas de adhesión de la familia de las tetraspaninas (CD63, CD9) [5, 6]. Sin embargo, carecen de proteínas asociadas a orgánulos intracelulares como las mitocondrias (Citocromo C) o el retículo endoplásmico (GP96). Esto lleva a pensar que la biogénesis de los exosomas sigue una vía específica. Por otro lado, contienen un subconjunto de proteínas que dependen del tipo celular que los secreta [7]. Además, están enriquecidos en colesterol,

esfingomielina, ceramida y derivados [8]. Los exosomas también transportan ácidos nucleicos como mRNA, lncRNA (RNA no codificante largo) y miRNA (Figura 1) [9].

A pesar de que los exosomas están enriquecidos en componentes endosomales, citosólicos y de membrana, aún no se han encontrado proteínas que sirvan como biomarcadores universales, en parte debido a la falta de estandarización de los protocolos de aislamiento, por lo que es necesario un refinamiento de la purificación y el análisis de los subtipos de VEs [10].

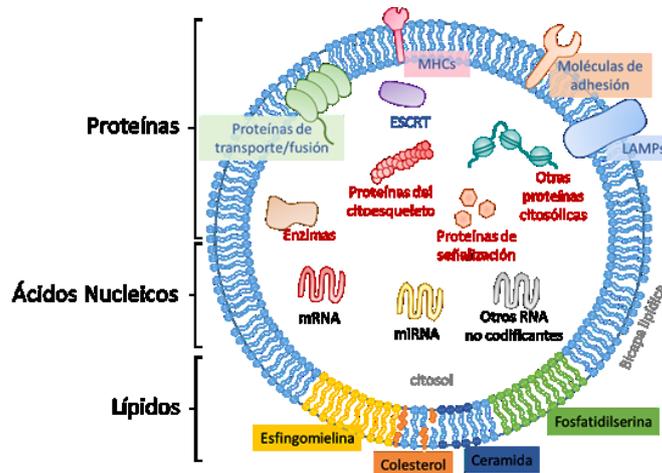


Figura 1.- Representación esquemática de la composición general de las VEs. Algunas proteínas de transporte y fusión son las tetraspaninas CD63, CD81 y CD9. Estos componentes pueden encontrarse en algunos subtipos de VEs y no en otros. ESCRT: endosomal sorting complex required for transport; LAMP: lysosome-associated membrane protein; MHC: mayor histocompatibility complex. Modificado de Raposo et al., 2014.

La formación de los exosomas ocurre por el sistema de endomembranas. Los endosomas tempranos maduran en endosomas tardíos, también conocidos como cuerpos multivesiculares (CMVs), y durante este proceso acumulan vesículas intraluminales (VILs) en su interior, que posteriormente darán lugar a las VEs. La maquinaria del ESCRT está implicada en este proceso. El ESCRT es un complejo de cuatro proteínas diferentes denominadas ESCRT-0, -I, -II, -III y proteínas asociadas (ALIX). Cada uno de estos complejos tiene una función concreta en la formación de los exosomas [11]. Sin embargo, en numerosos estudios se ha sugerido que la formación de los exosomas también puede tener lugar por mecanismos independientes del ESCRT (Figura 2). Se han visto implicados lípidos, tetraspaninas e incluso proteínas de choque térmico [12]. Pese a todo, si estos mecanismos actúan de forma simultánea en un mismo CMV o actúan en CMVs distintos, aún se desconoce [13].

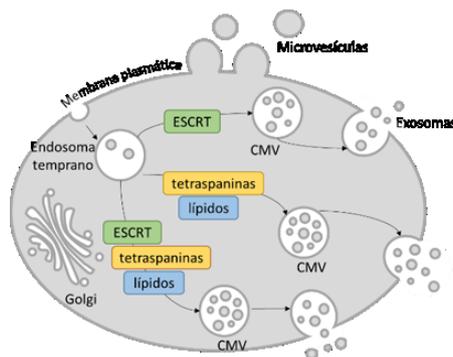


Figura 2.- Mecanismos de formación de VEs. Las microvesículas se forman a partir de evaginaciones de la membrana plasmática de las células. La formación de los cuerpos multivesiculares (CMVs) y, por tanto, de los exosomas, puede darse lugar por múltiples maquinarias. Se ha descrito el complejo de clasificación endosomal requerido para transporte (ESCRT), tetraspaninas y lípidos. Modificado de Raposo et al., 2014.

Durante la formación de los tumores primarios, las células tumorales requieren una comunicación activa con las células adyacentes y el microambiente. Las VEs secretadas por células tumorales se han visto implicadas en múltiples etapas del proceso de invasión tumoral y probablemente en la metástasis [14]. El microambiente tumoral podría incrementar la producción de VEs tumorales. El cáncer de próstata se sitúa en segundo lugar entre los tipos de cáncer más diagnosticados en hombres. Su diagnóstico se basa en la cuantificación de biomarcadores como el antígeno prostático específico (PSA) [15]. Sin embargo, actualmente se están buscando nuevos y mejores biomarcadores para su diagnóstico. En el cáncer de próstata, los exosomas liberados por las células tumorales contienen un conjunto de moléculas específicas relacionadas con el tumor. Por ello, recientemente los exosomas han aparecido como una nueva fuente de

biomarcadores de cáncer y, en consecuencia, podrían establecerse como un nuevo método diagnóstico [16].

Una de las características del cáncer de próstata avanzado es la adquisición de un fenotipo neuroendocrino. El cáncer de próstata neuroendocrino (NE) se ha visto como un mecanismo de adaptación de las células tumorales a la terapia por ablación de andrógenos [17]. Una de las líneas celulares más habitualmente utilizadas para el estudio del cáncer de próstata es LNCaP, derivada de metástasis en un ganglio linfático. Estas células expresan el receptor de andrógenos y, por tanto, son sensibles a estos. En nuestro laboratorio se está estudiando cómo las células LNCaP sufren una diferenciación neuroendocrina al crecer en medios de cultivo deprivados de andrógenos, una técnica parecida a la terapia clínica. La deprivación de andrógenos en el medio de cultivo se consigue por ausencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo o por tratamiento del suero con carbón activo cubierto de dextrano. Se ha observado que, en las células de cáncer de próstata inducidas a un fenotipo neuroendocrino, LNCaP neuroendocrinas (LNCaP NE), aumenta la expresión de moléculas como enolasa específica de neuronas (NSE) y tubulina- β III (β III Tub). Estas proteínas podrían utilizarse como biomarcadores de la diferenciación neuroendocrina en el cáncer de próstata [18].

El objetivo principal de este trabajo es la optimización del protocolo de aislamiento de VEs procedentes del medio de cultivo de células de cáncer de próstata LNCaP, y la caracterización de las mismas. Para la caracterización de las VEs, por un lado, se analizará la concentración y tamaño de las partículas aisladas y se determinará la concentración de proteína de las VEs aisladas. Por otro lado, se hará un análisis de los marcadores específicos de exosomas en las VEs. Con el fin de determinar si las VEs generadas por las células LNCaP y las células LNCaP NE tienen propiedades diferentes, se aislarán VEs procedentes de células LNCaP neuroendocrinas (NE) y se caracterizarán. Adicionalmente, se compararán los diferentes marcadores de cáncer de próstata y marcadores de diferenciación neuroendocrina en las VEs aisladas a fin de observar la presencia de biomarcadores en éstas.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular de cáncer de próstata LNCaP (ATCC CRL-1740) sensible a andrógenos. Las células se cultivaron de manera rutinaria en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS: *fetal bovine serum*) y 1% de solución de antibiótico (penicilina G 100 UI/ml, sulfato de estreptomycin 100 μ g/ml y anfotericina B 0,25 μ g/ml), todo de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA). El suero utilizado en los experimentos de aislamiento de VEs fue previamente desprovisto de VEs mediante ultracentrifugación a 110.000 x g durante 16 horas a 4°C. La eliminación de VEs del suero se realizó para evitar las interferencias que pudieran causar las vesículas presentes en el suero con las VEs producidas por las células.

Para los experimentos de aislamiento de VEs las células LNCaP se sembraron en placas de 150 mm de diámetro y se mantuvieron 48 h en medio RPMI completo (10% FBS, 1% antibiótico). A continuación, se retiró el medio RPMI completo y se incubaron durante 6 u 8 días. Se establecieron tres condiciones experimentales: las células LNCaP control (LNCaP C) se cultivaron durante 8 días en medio con suero libre de VEs; las células LNCaP NE_{CSS} que fueron inducidas a diferenciación neuroendocrina (NE) por la retirada de andrógenos del suero (CSS: *charcoal stripped serum*), se cultivaron durante 8 días en medio con suero libre de VEs y sin andrógenos; las células LNCaP NE_{-FBS} inducidas a diferenciación NE por retirada del suero se cultivaron con medio sin suero durante 6 días. Pasado el tiempo de incubación correspondiente, se recogieron los medios de cultivo condicionados y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Las células se recuperaron por centrifugación y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Aislamiento de VEs

Las VEs se aislaron mediante ultracentrifugación diferencial (UCD) siguiendo protocolos previamente descritos [19, 20]. Para comenzar, 80 ml de medio de cultivo condicionado se centrifugaron a 300 x g durante 10 min a 4°C para eliminar las células. El sobrenadante obtenido se trasvasó a filtros Amicon® Ultra-15 Ultracel®-100K (Millipore, UFC910008), y se centrifugó a 2.000 x g durante 20 min a 4°C con el fin de concentrar las muestras. El sobrenadante concentrado se centrifugó a 10.000 x g durante 40 min a 4°C para obtener VEs grandes o microvesículas (pellet 10K). Por último, el sobrenadante resultante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 90 min a 4°C para obtener las VEs pequeñas o exosomas (pellet 100K). Los pellets fueron lavados con PBS y re-centrifugados en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en un volumen de 100 μ L de PBS y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

El protocolo descrito anteriormente fue modificado con el fin de mejorar el rendimiento y pureza de las VEs obtenidas. Tras la centrifugación a 300 x g, se introdujo una centrifugación a 2.000 x g durante 20 minutos a 4°C para eliminar debris celulares y VEs grandes (pellet 2K).

Determinación de tamaño y concentración de VEs: análisis NTA

La concentración y el tamaño de las VEs purificadas se determinaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*) con un equipo NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Amesbury, UK) provisto con láser rojo de 638 nm y una cámara CCD. El equipo se calibró con un estándar de nanopartículas de poliestireno de 100 nm proporcionado por el fabricante. Se definieron las concentraciones adecuadas de VEs aisladas y se mantuvieron todos los ajustes constantes para cada medición. Las preparaciones de VEs fueron homogeneizadas mediante vórtex y diluidas 1/20 en PBS. Los resultados de las medidas se procesaron con el software NTA 3.1 (Nanosight Ltd.). Este análisis se realizó en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPaz).

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de las muestras de lisados celulares se evaluó mediante el ensayo de Bradford (BioRad Protein Assay, número de catálogo #5000006). La concentración de proteína de las muestras de VEs purificadas se determinó mediante el ensayo de ácido bicinonínico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, número de catálogo: 23225).

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blot

Se cargaron 5 μ L o 5 μ g de VEs, y 5 o 20 μ g de proteína de los lisados celulares. Las muestras se diluyeron en tampón de carga Laemmli y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles del 10-18% de acrilamida/bisacrilamida y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de condiciones desnaturizantes por SDS (SDS-PAGE). Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF de BioRad (Richmond, CA, USA) aplicando un campo eléctrico de 100 V durante 120 minutos a 4°C. A continuación, se realizó la técnica de Western Blot siguiendo un protocolo previamente descrito [18].

Los anticuerpos primarios utilizados para caracterizar las VEs fueron: anti-TSG101 (monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology sc-7964), anti-CD63 (monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology sc-5275), anti-CD9 (monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology sc-13118), anti-Flotilina2 (monoclonal de ratón, BD Biosciences 610383), anti-LAMP2 (monoclonal de ratón, Abcam ab25631), anti-Citocromo C (monoclonal de ratón, BD Pharmingen 556433), anti-PSMA (monoclonal de conejo, Cell Signaling 12815S), anti-FASN (monoclonal de conejo, Cell Signaling 3180), anti-human AR (monoclonal de ratón, BD Biosciences 554225), anti-NSE (monoclonal de ratón, Dako m0873) y anti- β III Tubulina (policlonal de conejo, Covance PRB-435P).

Resultados

Puesta a punto del aislamiento de VEs por ultracentrifugación diferencial y análisis por NTA

En primer lugar, se aislaron VEs procedentes de células LNCaP a partir de 80 ml de sobrenadante mediante ultracentrifugación diferencial (Figura 4A). El pellet 100K, que contiene las VEs pequeñas, se resuspendió en PBS y se estudió por análisis de seguimiento de partículas (NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*). Esta técnica permite determinar la concentración y el tamaño de partículas en suspensión en el rango de 10 a 1000 nm en función de cómo dispersan la luz. Un rayo láser se pasa a través de la muestra y las partículas en suspensión pueden ser visualizadas al microscopio moviéndose rápidamente como consecuencia de su movimiento browniano. Una cámara acoplada realiza tres capturas, de un minuto cada una, de las partículas en movimiento. Al mismo tiempo, el programa identifica y sigue individual y simultáneamente el centro de cada partícula a lo largo de su recorrido. Así, obtiene un rango de tamaños y la concentración de partículas, lo cual permite establecer una distribución de tamaños.

Con el fin de calibrar el equipo, se analizó un estándar de nanopartículas de poliestireno de 100 nm. El estándar se diluyó 1/20 en PBS previamente a la medición. El análisis de los resultados proporcionó un perfil de distribución de tamaños homogéneo con una sola población y una concentración media de $1,52 \cdot 10^8$ partículas/ml (Figura 3A). El tamaño medio de la población fue de $104,00 \pm 0,40$ nm, similar al valor de la moda ($105,2 \pm 1,7$ nm), y el percentil D90 (90% de las partículas con un tamaño inferior o igual al indicado), que fue de $103,0 \pm 1,30$ nm (Figura 3B).

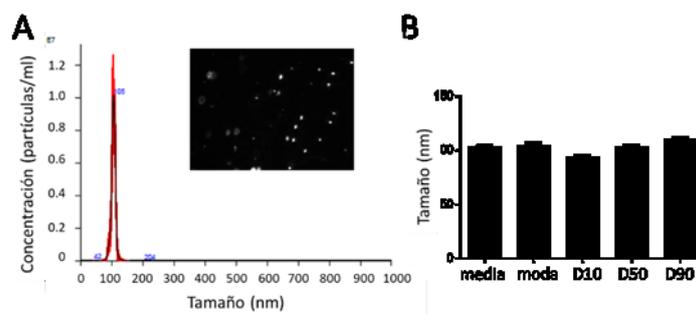


Figura 3.- Distribución de tamaños de un estándar de poliestireno. (A) Perfil de distribución de tamaños de las nanopartículas de 100 nm. El gráfico de distribución de tamaños muestra la concentración (partículas/ml) en el eje Y y el tamaño (nm) en el eje X (media de tres capturas). A la derecha, imagen de las partículas en suspensión. (B) Análisis estadístico del tamaño de las VEs. Se muestran los valores de media, moda y percentiles (D10, D50, D90). D10=10% de las partículas están por debajo del tamaño indicado; D50= 50% de las partículas están por debajo del tamaño indicado; D90=90% de las partículas están por debajo del tamaño indicado.

A continuación, se analizó la fracción 100K procedente de células LNCaP control (Figura 4A). Se utilizaron 25 μ L de suspensión de partículas diluidas 1/20 en PBS. Se obtuvo un perfil heterogéneo, indicativo de la presencia de varias subpoblaciones de VEs con distinto tamaño, y una concentración media de $1,69 \cdot 10^8$ partículas/ml (Figura 4B). El análisis indicó un tamaño medio de $233,1 \pm 15,8$ nm, aunque la moda indicó una población principal de tamaño inferior ($174,6 \pm 51,4$ nm). El percentil D90 mostró que el 90% de las partículas tenían un tamaño inferior a $366,0 \pm 27,9$ nm (Figura 4C), tamaño considerablemente superior al esperado para los exosomas.

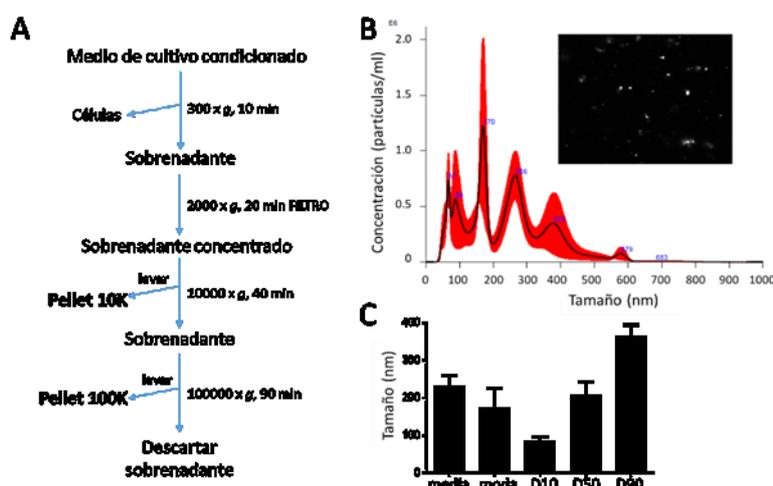


Figura 4.- Distribución de tamaños de VEs de células LNCaP control. (A) Esquema del protocolo de aislamiento de VEs por UCD a partir de 80 ml de medio de cultivo condicionado. (B) Perfil de distribución de tamaños de la fracción 100K. A la derecha, imagen de las partículas en suspensión. (C) Análisis estadístico del tamaño de la población de VEs. Se muestran los valores de media, moda y percentiles (D10, D50, D90).

En vista de los resultados obtenidos, se modificó el protocolo de aislamiento de VEs, con el fin de mejorar el rendimiento y pureza de las VEs obtenidas. Para ello, se incorporó una centrifugación de 2000 x g antes de concentrar el sobrenadante, para eliminar las debris celulares y VEs grandes (pellet 2K) (Figura 5A). Posteriormente, el pellet 100K se analizó mediante NTA. Los resultados sugirieron que el aislamiento de VEs se optimizó ligeramente, puesto que en la fracción analizada se detectó un menor contenido de VEs, aunque la concentración ($1,43 \cdot 10^8$ partículas/ml) no incrementó (Figura 5B). El análisis mostró una ligera disminución de tamaños de partículas de la población, siendo el tamaño medio de $218,2 \pm 12,5$ nm y el valor D90 de $304,1 \pm 15,1$ (Figura 5C). Por tanto, se adoptó este protocolo de aislamiento para realizar los experimentos posteriores. Por otro lado, la concentración de partículas de la muestra es un factor determinante en el análisis de tamaños. Si la muestra está muy diluida, los resultados no son estadísticamente significativos porque es insuficiente el número de partículas rastreadas. Si, por el contrario, está muy concentrada, las partículas tienden a agregar y no pueden ser resueltas de manera individual. Por ello, y con el fin de determinar si diluir la muestra mejoraba los resultados de tamaño, se analizó un pellet 100K 20 veces más diluido. El tamaño medio se redujo a 185 ± 5 nm y, el valor lo D90 que pasó a ser $253 \pm 9,6$ nm (Figura 6A). Tras obtener estos resultados, se decidió continuar el estudio introduciendo esta dilución adicional.

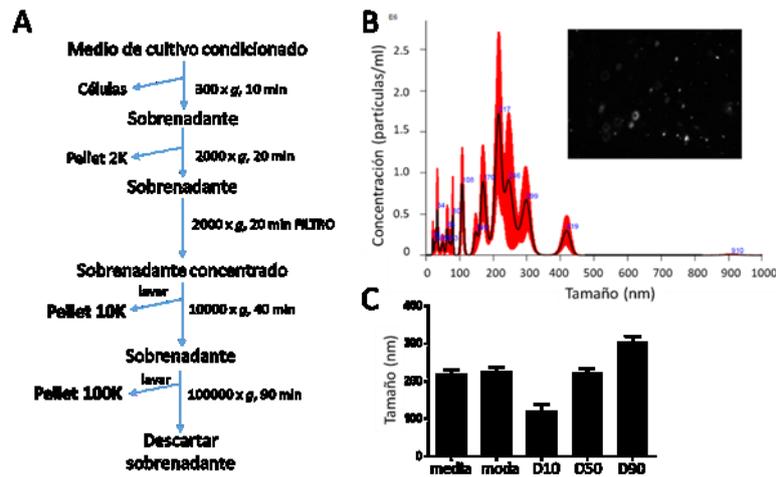


Figura 5.- Optimización del protocolo de aislamiento de VEs. (A) Esquema del protocolo de aislamiento de VEs por UCD modificado a partir de 80 ml de medio de cultivo condicionado. Se introdujo una centrifugación adicional de 2000 x g para eliminar el pellet 2K (debris celulares y VEs grandes). (B) Perfil de distribución de tamaños de la fracción 100K. A la derecha, imagen de las partículas en suspensión. (C) Análisis estadístico del tamaño de la población de VEs. Se muestran los valores de media, moda y percentiles (D10, D50, D90).

Determinación del tamaño de las VEs de LNCaP NE

A fin de comparar el tamaño y la concentración de las VEs generadas por las células LNCaP que han experimentado diferenciación neuroendocrina (LNCaP NE_{CSS} y LNCaP-_{FBS}), se aislaron VEs procedentes del medio de cultivo de las tres condiciones experimentales y se analizaron los pellets 100K mediante NTA (Figura 6). Los perfiles fueron ligeramente más homogéneos, con una población principal de aproximadamente 200 nm, como lo indica el valor similar de la moda en las (Figura 6D). Sin embargo, el tamaño medio de las VEs procedentes de células LNCaP NE fue significativamente mayor. Esto lo indicó, por un lado, el valor de la media, siendo 216,23±7,0 nm en las VEs obtenidas de LNCaP NE_{CSS}, y 268,0±13,4 nm en las VEs de LNCaP NE-_{FBS}; y, por otro lado, el valor del percentil D90, que fue de 335,97 ±21,31 nm en las VEs de LNCaP NE_{CSS} y de 403,44±25,80 nm en las de LNCaP NE-_{FBS}.

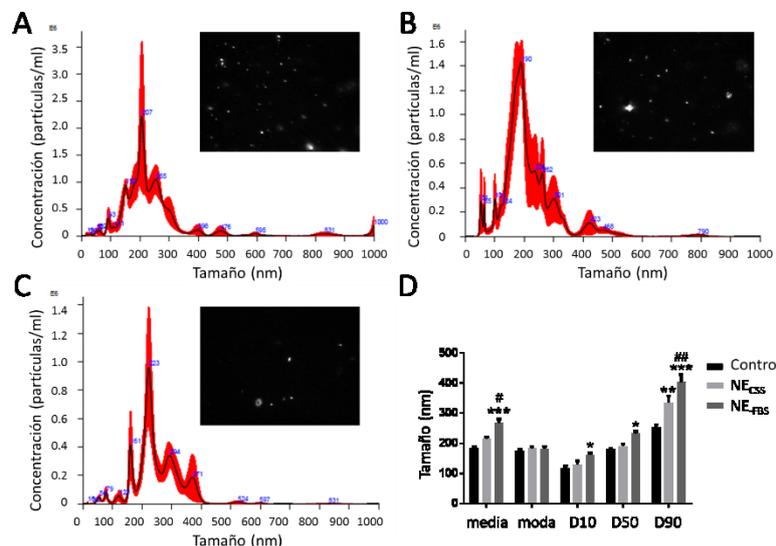


Figura 6.- Distribución de tamaños de VEs procedentes de células LNCaP control y LNCaP NE. Perfil de distribución de tamaños del pellet 100K de (A) LNCaP control, (B) LNCaP_{CSS} y (C) LNCaP-_{FBS}. Al lado de cada perfil, imagen de las partículas en suspensión. (D) Análisis estadístico del tamaño de las VEs. Se muestran los valores de media±SEM, moda y percentiles (D10, D50, D90) de dos experimentos independientes. Diferencias analizadas con prueba t de Student. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 respecto al control; # p<0,05, ## p<0,01 respecto a NE_{CSS}.

Rendimiento y contenido en proteína de las VEs aisladas

Con el objetivo de determinar el rendimiento de VEs en cada condición experimental, se normalizó la cantidad de partículas aisladas en función de los millones de células obtenidas al final de cada experimento. El rendimiento de VEs de las células LNCaP fue $1,57 \cdot 10^8$ partículas/ 10^6 células, similar al

de y las células LNCaP NE_{CSS} que fue de $1,08 \cdot 10^8$ partículas/ 10^6 células. Sin embargo, se advirtió mayor rendimiento de en las células LNCaP NE_{FBS} ($2,07 \cdot 10^8$ partículas/ 10^6 células). No obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la gran variabilidad entre los replicados de las preparaciones de VEs (Figura 7A). Sería necesario realizar más experimentos para determinar con mayor precisión la cantidad de vesículas producidas por las células LNCaP en las condiciones experimentales estudiadas.

Por otro lado, se determinó la cantidad de proteína presente en cada preparación de VEs. Se determinaron los nanogramos (ng) de proteína en función de los millones de partículas obtenidas en cada condición experimental. Los resultados revelaron que las VEs derivadas de células LNCaP NE_{FBS} contenían menos cantidad de proteína que las VEs derivadas de las células LNCaP NE_{CSS}. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 7B).

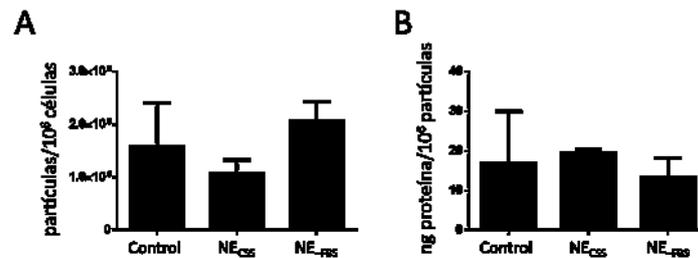


Figura 7.- Rendimiento de VEs y contenido total de proteínas. (A) Representación del número de partículas aisladas por 10^6 células en cada condición experimental. (B) Representación de la cantidad de proteína obtenida por 10^6 partículas aisladas en cada condición experimental. Los datos representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Composición proteica de las VEs aisladas

El estudio se continuó caracterizando molecularmente la composición en proteínas de las VEs aisladas. Se analizó la presencia de varios marcadores específicos de exosomas mediante Western Blot en las fracciones 10K y 100K. Como control, se comparó la composición de las VEs con la de los lisados celulares (LC). Se observó que los marcadores tumor susceptibility gene 101 (TSG101) y las tetraspaninas CD63 y CD9 estaban presentes en el pellet de 100K, indicativo de la presencia de exosomas en esta fracción y, curiosamente, en mayor cantidad que en los lisados celulares. Por otro lado, la proteína Flotilina-2 se detectó tanto en el pellet 10K como en el 100K, aunque se vio enriquecida en exosomas, y la proteína de membrana asociada a lisosomas 2 (LAMP2) se observó, aunque en cantidad limitada, en la fracción 100K. La proteína mitocondrial Citocromo C, clásicamente excluida de exosomas y, por tanto, utilizada como marcador de contaminación en VEs, no se detectó en las fracciones 10K y 100K, pero sí fue abundante en los lisados celulares. Asimismo, se analizó la presencia de marcadores de cáncer de próstata. Los resultados mostraron que el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) se encontraba en todas las VEs, aunque principalmente en el pellet 100K, y la ácido graso sintasa (FASN) se vio enriquecida en el pellet 100K. Por el contrario, el receptor de andrógenos (AR) no se detectó en ninguna de las VEs aisladas.

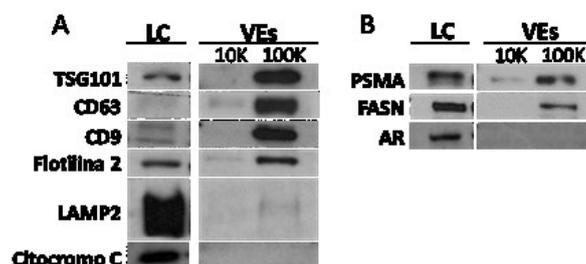


Figura 8.- Composición proteica de las VEs derivadas de LNCaP control analizada por Western Blot. Se cargaron 20 μ g de proteína en los lisados celulares y 5 μ L de pellets 10K y 100K. (A) Marcadores clásicos de exosomas TSG101, CD63 y CD9, proteínas Flotilina-2 y LAMP2 y proteína mitocondrial Citocromo C (control negativo). (B) Marcadores de cáncer de próstata PSMA, FASN y AR. Imágenes representativas de 5 experimentos.

A continuación, se examinó el contenido de las VEs aisladas a partir de células LNCaP NE. Para ello, se caracterizaron las VEs aisladas de cada condición experimental de forma conjunta. En general, los marcadores de exosomas TSG101, CD63 y CD9 (Figura 9A) estaban presentes en los pellets 100K. Curiosamente, CD63 también se detectó en la fracción 10K. Sin embargo, de forma sorprendente, las VEs de LNCaP NE_{FBS} no dieron señal para CD63. La Flotilina-2 se encontró en la mayoría de las VEs aisladas, especialmente en las células LNCaP NE_{FBS}. No obstante, su presencia fue más notable en los

pellets 100K. Por su parte, LAMP2 está muy expresado en los lisados celulares y, comparativamente, solo se detecta en la fracción 100K. Este resultado concuerda con lo observado previamente por nuestro grupo de investigación, sobre la sobreexpresión de LAMP2 en LNCaP NE-FBS [18].

En cuanto a los marcadores de cáncer de próstata, se observó expresión de PSMA en los pellets 100K, en especial en el procedente de LNCaP NE_{CSS}. Al contrario de lo observado al analizar 5 µl de VEs (Figura 8), la proteína FASN sólo se detectó en el pellet 100K de las células LNCaP NE-FBS, lo que sugiere que 5 µg de proteína son insuficientes para detectar FASN en los otros pellets 100K. Por otra parte, AR no se detectó en las VEs aisladas. Finalmente, se investigó la presencia de marcadores de diferenciación neuroendocrina (NE), y los resultados indicaron presencia de NSE en el pellet 100K de LNCaP control y LNCaP NE_{CSS}, pero no en el pellet 100K de LNCaP NE-FBS. Este último resultado parece contradictorio y, por tanto, deberá ser más. Por su parte, la βIII Tub no se detectó en VEs.

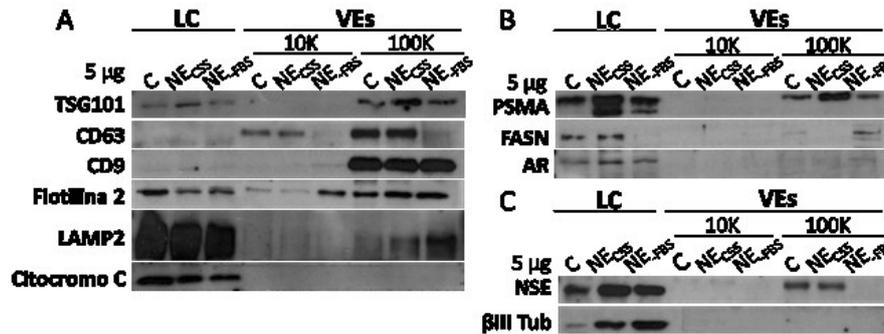


Figura 9.- Composición proteica de las VEs derivadas de LNCaP control y LNCaP NE analizada por Western Blot. En todos los casos se cargaron 5 µg de proteína. (A) Marcadores clásicos de exosomas TSG101, CD63 y CD9, proteínas Flotilina-2 y LAMP2 y proteína mitocondrial Citocromo C (control negativo). (B) Marcadores de cáncer de próstata. PSMA, FASN y AR. (C) Marcadores de diferenciación neuroendocrina NSE y βIII Tub.

Discusión

Los exosomas han emergido como potentes biomarcadores no invasivos en diferentes enfermedades, entre las que se encuentra en cáncer de próstata. Además, su tamaño de nanopartículas y su capacidad para interaccionar y transferir su contenido a células diana los convierte en potenciales agentes terapéuticos. El desarrollo de estas aplicaciones clínicas pasa por desentrañar la biología de este potente sistema de comunicación celular, para lo que se requiere implementar técnicas fiables y robustas de aislamiento y caracterización de exosomas.

Hasta el momento, la comunidad científica no ha logrado encontrar un método de aislamiento de vesículas extracelulares (VEs) estandarizado. La ultracentrifugación diferencial (UCD) es el método de purificación de exosomas más ampliamente adoptado, y, durante mucho tiempo, se ha considerado el estándar de aislamiento. Sin embargo, este proceso es prolongado y, a menudo, ofrece resultados muy variables. A pesar de esto, tiene ciertas ventajas, ya que es una técnica económica, fácil de realizar y, además, proporciona un alto rendimiento de VEs. En este trabajo hemos establecido un protocolo de aislamiento de exosomas por UCD que ha permitido obtener un alto rendimiento de VEs al haber partido de un volumen grande de medio de cultivo condicionado. Esto se consiguió introduciendo un paso de concentración de la muestra mediante filtros.

La técnica NTA está tomando una gran importancia en la caracterización de VEs, de hecho, el NTA es uno de los requisitos experimentales necesarios para definir el tamaño y concentración de las VEs. En el protocolo ya establecido se añadió una centrifugación con la que se eliminan VEs grandes y debris celulares. Este paso extra mejoró ligeramente la pureza de las preparaciones de VEs aisladas, reduciendo el número de VEs de tamaño más grande que los exosomas. A pesar de esto, se siguió observando heterogeneidad notable en la distribución de tamaños. El hecho de obtener perfiles de distribución anchos en los análisis NTA no es de extrañar, puesto que el aislamiento de exosomas por UCD puede resultar en el co-aislamiento con otras VEs pequeñas, dando lugar a una población heterogénea. Esta heterogeneidad ya ha sido descrita anteriormente [21], mostrando la presencia de VEs pequeñas con características diferentes a los exosomas. A pesar de que la técnica NTA está tomando una gran importancia en la determinación del tamaño de poblaciones de VEs aisladas, la concentración de partículas de la muestra es un factor determinante en el análisis de tamaños. Existen estudios [22] que demuestran que, la obtención de perfiles de distribución de tamaños con múltiples picos y valores de tamaño medio más altos de lo normal, puede ser la consecuencia de la formación de agregados de exosomas cuando éstos están a concentraciones muy altas. Esto ocurre cuando la densidad de células en el momento de cambiarlas al medio sin VEs es muy alta. Por esta razón, nos planteamos que esta fuera la razón del aumento del

tamaño medio de las VEs procedentes de células LNCaP NE, en especial, de las LNCaP NE-FBS, aunque éste sigue siendo un punto a analizar en más profundidad.

Para evaluar el método de aislamiento de exosomas, además de analizar el tamaño de las partículas, es necesaria la combinación de un análisis de la concentración de VEs aisladas y la concentración de proteína. En cuanto al rendimiento de VEs, la cantidad de partículas obtenidas ha sido comparable a la obtenida en otros estudios. Por ejemplo, el número de partículas/10⁶ células producidas por las células dendríticas es similar al obtenido por las células LNCaP en este estudio [2]. Sin embargo, las células troncales mesenquimáticas producen una mayor cantidad de vesículas [23]. Por otro lado, la cantidad de proteína total contenida en las VEs derivadas de LNCaP control y LNCaP NE_{CS} fue similar, sin embargo, fue inferior en las derivadas de LNCaP NE-FBS. Esto podría explicarse porque los pasos repetidos de ultracentrifugación pueden causar daños sobre las partículas aisladas, haciendo que éstas pierdan algo de carga proteica. Por ello, sería imprescindible optimizar los tiempos de ultracentrifugación [24].

En paralelo con los análisis de tamaño y concentración, para demostrar que se está trabajando con exosomas, es necesario analizar los marcadores específicos de exosomas. Debe haber al menos una proteína transmembrana (las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81) ya que están enriquecidas de manera particular en los exosomas; al menos una proteína citosólica (TSG101); y debe demostrarse la ausencia de proteínas intracelulares (citocromo C, GP96), ya que están ausentes o insuficientemente representadas en los exosomas [25]. La presencia de CD63 en varias subpoblaciones de VEs no es atípica, ya que las tetraspaninas están ampliamente distribuidas en la membrana plasmática, por lo que pueden estar presentes en otras vesículas. En varios estudios se ha demostrado que los marcadores clásicos de exosomas como CD9 y CD63 también se encuentran en VEs grandes, por lo que, actualmente, se está planteando su universalidad [26]. Por otro lado, la ausencia de CD63 en exosomas no es de extrañar, ya que se ha demostrado en estudios de microscopía electrónica que, dentro de las poblaciones heterogéneas de exosomas, aproximadamente sólo el 50% de ellos presentaba este anticuerpo [1]. Otras proteínas que clásicamente se han descrito en exosomas, como Flotilina-2 y LAMP2 no pueden ser consideradas marcadores de exosomas, ya que no son proteínas encontradas exclusivamente en estas VEs.

En muchos estudios se ha demostrado la utilidad biomédica de los exosomas como biomarcadores en el diagnóstico clínico, ya que su contenido molecular refleja la composición de las células de origen. La proteína PSMA podría considerarse un biomarcador exosómico con una gran sensibilidad para el diagnóstico del cáncer de próstata. No así es el caso de otras proteínas como FASN generalmente sobreexpresadas en varios tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de próstata. Por otro lado, el análisis de marcadores de diferenciación neuroendocrina en las VEs aisladas también nos dio una idea del contenido proteico de los exosomas tras ser aislados mediante UCD. El distinto patrón de NSE en las VEs procedentes de las células LNCaP NE nos ha sorprendido, y será objeto de posteriores estudios.

De cualquier manera, los biomarcadores exosómicos se encuentran todavía en etapa de descubrimiento, pero su potencial en el diagnóstico clínico espera ser explotado por completo. Por ello, es necesario un refinamiento de la purificación y el análisis de los subtipos de VEs.

Referencias

1. Soekmadji, C., Russell, P. J., & Nelson, C. C. 2013. Exosomes in prostate cancer: putting together the pieces of a puzzle. *Cancers*, 5(4):1522-44.
2. Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., ... & Théry, C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201521230.
3. Soekmadji, C., Corcoran, N. M., Oleinikova, I., Jovanovic, L., Australian Prostate Cancer Collaboration BioResource, Ramm, G. A., ... & Russell, P. J. 2017. Extracellular vesicles for personalized therapy decision support in advanced metastatic cancers and its potential impact for prostate cancer. *The Prostate*, 77(14): 1416-23.
4. Valkonen, S., Van der Pol, E., Böing, A., Yuana, Y., Yliperttula, M., Nieuwland, R., ... & Siljander, P. R. M. 2017. Biological reference materials for extracellular vesicle studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98: 4-16.
5. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., & Simpson, R. J. 2011. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic acids research*, 40(D1): D1241-44.
6. Tanase, C. P., Codrici, E., Popescu, I. D., Mihai, S., Enciu, A. M., Necula, L. G., ... & Albuлесcu, R. 2017. Prostate cancer proteomics: Current trends and future perspectives for biomarker discovery. *Oncotarget*, 8(11): 18497.
7. Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X. M., ... & Wang, X. Z. 2015. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *The scientific world journal*, 2015.

8. Li, W., Li, C., Zhou, T., Liu, X., Liu, X., Li, X., & Chen, D. 2017. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Molecular cancer*, 16(1): 145.
9. van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4): 213.
10. Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. 2014. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*, 29: 116-25.
11. Hessvik, N. P., & Llorente, A. 2017. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-16.
12. Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30: 255-89.
13. Maas, S. L., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. 2017. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. *Trends in cell biology*, 27(3): 172-88.
14. Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. 2016. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer cell*, 30(6): 836-48.
15. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(1): 5-29.
16. Wang, L., Skotland, T., Berge, V., Sandvig, K., & Llorente, A. 2017. Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: from mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98: 80-5.
17. Beltran, H., Tomlins, S. A., Aparicio, A. M., Arora, V. K., Rickman, D. S., Ayala, G. E., ... & Logothetis, C. J. 2014. Aggressive Variants of Castration Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, clincanres-3309.
18. Morell, C., Bort, A., Vara-Ciruelos, D., Ramos-Torres, Á., Altamirano-Dimas, M., Díaz-Laviada, I., & Rodríguez-Henche, N. 2016. Up-regulated expression of LAMP2 and autophagy activity during neuroendocrine differentiation of prostate cancer LNCaP cells. *PloS one*, 11(9): e0162977.
19. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, 30(1): 3-22.
20. Tkach, M., Kowal, J., & Théry, C. 2018. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 373(1737): 20160479.
21. Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S., Wiegmanns, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. 2015. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1): 27031.
22. Improve isolated exosome purity and yield with Capturem technology. 2017. www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=136533
23. de Godoy, M. A., Saraiva, L. M., Carvalho, L. R., Vasconcelos-dos-Santos, A., Beiral, H. J., Ramos, A. B., ... & de Araujo-Silva, C. A. 2017. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M117.
24. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. 2017. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3): 789.
25. Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in immunology*, 5: 442.
26. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., ... & Zimmermann, P. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology*, 14(7): 677.
27. Caradec, J., Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Adomat, H., Gleave, M., & Guns, E. 2014. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clinical biochemistry*, 47(13-14): 1286-92.