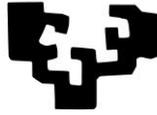


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología

Aplicación clínica de las vesículas extracelulares en la esclerosis múltiple

TESIS DOCTORAL

MATÍAS SÁENZ CUESTA

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universidad del País Vasco

Dirigida por: Dr. David Otaegui Bichot

Donostia, diciembre de 2015

PREFACIO

El contenido de la presente tesis es la síntesis de 4 años de trabajo desarrollados en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia – Hospital Universitario Donostia de la ciudad de San Sebastián, España, bajo la dirección del Dr. David Otaegui Bichot y con el soporte económico de: i) proyecto GV-2011111028 concedido por el Dep. de Educación del Gobierno Vasco, ii) contrato Río Hortega del Instituto de Salud Carlos III (CM14/00006) y iii) Novartis.

Se presenta en formato de 4 capítulos, correspondientes al desarrollo de los objetivos planteados, más una introducción y discusión generales.

AGRADECIMIENTOS

Muchas veces pensé qué escribiría en este momento, mientras recordaba una infinita lista de personas con las que he compartido tanto. Los agradecimientos de un eterno aprendiz como el que creo que soy, son como una recta, sin principio ni final, perpetuados a no terminar más allá de unas breves líneas. Aquí traigo solo un segmento inexacto de esa infinita recta:

A mis padres, **María Elena y Jorge**, quienes casi sin darse cuenta, me introdujeron el germen de la exploración y sobre todo estimularon a los incipientes *por qué* de mi niñez, siguiendo con ese espíritu hasta el día de hoy. Y del mismo hogar, a mis hermanos (y a la vez amigos) **Gargui y Bariya**, con quienes comparto inquietudes y pasiones y de quienes recibo día a día un inmensurable apoyo y cariño, aún cuando hemos estado a miles de km, a solo a 450 km o durmiendo en la misma habitación.

A **Galu**, aquel joven residente de 1º año de pediatría con quien hice mis primeros contactos con pacientes y me demostró que la medicina podía convertirse en una apasionante opción de vida.

A mis amigos cosechados durante el instituto y la facultad, **Javier, Fede, Mauro, Luis y Lucho** con quienes compartimos un período de nuestras vidas en que el hombro del compañero es el mejor bastón para avanzar. A **Seba**, debo agradecerle de manera especial por ser ese amigo-hermano con el que basta una mirada para comprenderlo todo.

A la **gente (pacientes y vecinos) de los pueblos de la Patagonia** donde he vivido, de quienes aprendí los *por qué* de las enfermedades de la pobreza. A mis compañeros de residencia de allí, **Lisandro, Lía, Martín** y otros tantos, con quienes creamos un utópico lugar llamado Kimiwisky donde las inclemencias de la vida real no existían y nos servía de motor para seguir adelante.

Al **laboratorio de inmunología del Hospital Donostia**, tanto a las técnicas como a los adjuntos y residentes. De cada uno de ellos recibí un aprendizaje, una enseñanza. Hago mención especial a **Cipi**; con ella aprendí mucho sobre cómo manejar esa máquina extraña que llena de puntitos la pantalla.

A esa **familia** llamada **Biodonostia**, que crece cada día y hace que las jornadas sean un deleite entre risas, desayunos y comidas. De cada uno he recibido algo, tanto en lo profesional como en lo personal, desde el primer día que me asomé a ver qué era eso de la investigación. Y hablando de esos tiempos (2009, 2010) no puedo dejar de agradecer especialmente a **Aias**, la primera integrante que conocí de esa familia, por su incondicional ayuda en los inicios de este andar, por

sus charlas de investigador a investigador, de amatxo a aitaxo pero sobre todo de amiga a amigo. Tampoco pasaré por alto a **Jose**, ese tipo mezcla de rock y literatura que lo hace único de su especie en esta jungla sanitaria, tático maestro de ceremonias, de quien estoy feliz de tener cerca para poder debatir todo lo que sea debatible y más.

Y de esa gran familia debo agradecer muy especialmente a mi pequeña familia cercana de la Unidad de Esclerosis Múltiple. Empezando por mis hermanos en la ciencia, **Cuerdo Haritz-Mendi y Iron W Boss**, mis compañeros iniciales de la UEM, por aguantarme las largas jornadas de desorientación al comienzo (¡y luego también!), por su enorme generosidad. A los hermanos menores, **Iñaki y Ahinoa**, que fueron renovando ideas y ayudándome en los últimos períodos de este trabajo dado un impulso fundamental para que esta tesis se cerrara. Con todos ellos he aprendido a resolver varios *por qué* pero sobre todo a preguntarme muchos nuevos *por qué* más. Si las pizarras hablaran... A las violet girls, las técnico de oro **Lucía y Amaia**, que son parte fundamental en esta tesis y de las que siempre recibí ayuda incondicional, pero sobre todo con sonrisas a toda hora. También mis agradecimientos más profundos a la otra media naranja de esta UEM, la sección clínica. A **Javier**, quien lleva en sus hombros el manejo de más de 700 pacientes de EM, manteniendo una relación exquisita con todos ellos y a la vez quien procura el bienestar de toda la unidad. A **Ioana e Itziar** por su velocidad de respuesta a cada uno de mis pedidos y por enseñarme ese otro lado de la investigación, el de los EECC. A **Maialen y Tami**, por sus explicaciones y visión clínica cada vez que necesité refrescar conocimientos y su comprensión en mis años de residente.

A David, padre científico, compañero de mates, tipo completo, excepcional guía, experto copiloto de tesis, y sobre todo un amigo de este lado del charco. Mi agradecimiento va más allá de haberme guiado en estos 5 años (y los que quedan!!!), más allá de aprender a llevar un cuaderno de laboratorio, de enseñarme cómo planificar el trabajo en días, meses y años, escribir, exponer, lidiar con las dificultades... Sobre todo te agradezco la herramienta más valiosa: la pregunta. Y tu forma para encender esa llama, tanto en mi como en cualquiera que te rodee, con una generosidad sin límite y alimentando el buen ambiente allí donde vayas. Gracias loco!!!

Y si David es mi padre científico, Adolfo es mi abuelo, ¡lasai, no por edad!, sino por sabiduría. Este nieto te agradece tu visión holística, tu capacidad de aportar nuevas ideas en los momentos en que creía que ya no había más que cambiar y sobre todo por tu apoyo en mi formación como médico investigador.

A los compañeros de ruta que fui conociendo en este campo de las vesículas extracelulares y la neuroinmunología: a Maripaz López, por su paciencia para setear el citómetro al inicio de este recorrido, a JuanMa Falcón y todo su equipo por brindarnos la oportunidad de utilizar sus instrumentos y aprender de gente experimentada, a Manolo Comabella, por recibirme en mi estancia en Barcelona donde pude participar en la dinámica de un grupo de referencia en EM y a May Villar, por las muestras cedidas y su disposición a ayudarnos en cada consulta que hemos hecho.

Al tribunal de esta tesis, por su aporte de excelencia en la última instancia que comprende esta presentación académica.

A Toñi, la contratapa de este trabajo, el sustento emocional, temporal y objetivo de todo este período. Imposible llegar a escribir estas líneas sin su vital apoyo diario, sin sus incansables ánimos en los días más extenuantes y sin la armonía que hace reinar en el hogar. ¡¡A vos mis más sinceras gracias!! Y a Zoe, por sus extra-dosis de dulzura, el sentido de mi vida y por darme una nueva visión del mundo con sus estrenados “por qué”.

Para finalizar, a los pacientes que tuve la oportunidad de acompañar, de quienes guardo un bagaje de lecciones, de un lado como del otro del océano, por ellos tiene sentido este humilde trabajo. Esta tesis está especialmente dedicada a aquellos que padecen EM, por su silenciosa lucha y su valentía diaria.

RESUMEN

Dentro del mecanismo de comunicación celular indirecta, se ha incluido en la última década al mediado por las vesículas extracelulares (VE) las cuales son partículas cubiertas de membrana celular originadas en el interior de la célula emisora o por evaginación de su membrana plasmática excretadas al medio extracelular y captadas posteriormente por células receptoras (cerca o a distancia). Las VE y su condición de transportadores de información intercelular han sido objeto de estudio en el campo biomédico, emergiendo así interesantes líneas de investigación. Los objetivos principales de dichas investigaciones son la búsqueda de nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas candidatos a ser utilizados en la práctica clínica. Sin embargo, queda un recorrido importante por completar entre la investigación básica en VE y su utilización práctica en beneficio de los pacientes.

Así pues, en esta tesis se ha investigado la biología de estas VE en relación a la esclerosis múltiple, una enfermedad del sistema nervioso central, desmielinizante y con un claro componente autoinmune como base patogénica. Hemos encontrado variaciones en la concentración y el contenido molecular de las VE según el estadio clínico de la EM, así como tras el empleo habitual de terapias inmunomoduladoras. Hemos analizado también la función reguladora del sistema inmune que poseen estas VE. Con la intención de aplicar en un entorno clínico hospitalario el estudio de VE como biomarcadores, hemos comparado distintos métodos de aislamiento y análisis de VE y proponemos un protocolo idóneo para su aplicación en la rutina de un hospital.

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. Vesículas extracelulares | 3 |
| 1.1. Comunicación celular | 3 |
| 1.2. Breve reseña histórica..... | 4 |
| 1.3. Características biológicas | 6 |
| 1.3.1. Biogénesis..... | 6 |
| 1.3.2. Origen celular | 7 |
| 1.4. Relación con el sistema inmune | 8 |
| 1.5. El cargo de las VE no es azaroso..... | 8 |
| 1.6. Inhibición versus activación | 9 |
| 1.7. Métodos de aislamiento y caracterización | 11 |
| 1.7.1. Aislamiento..... | 11 |
| 1.7.2. Caracterización..... | 13 |
| 1.8. Aplicación clínica | 16 |
| 1.9. Vesículas extracelulares en el sistema nervioso central | 19 |
| 2. Esclerosis múltiple..... | 20 |
| 2.1. Epidemiología..... | 20 |
| 2.2. Etiopatología inmune | 21 |
| 2.3. Características clínicas..... | 25 |
| 2.4. Diagnóstico y biomarcadores | 27 |
| 2.5. Tratamientos | 30 |
| 3. Vesículas extracelulares en la esclerosis múltiple..... | 33 |
| 3.1. Promoción de la migración celular a través de la barrera hemato-encefálica | 34 |
| 3.2. Diseminación de la inflamación en el parénquima nervioso | 35 |
| 3.3. Funciones de las VE descritas en la encefalitis autoinmune experimental | 36 |
| 3.4. ¿Son las VE biomarcadores fidedignos de la esclerosis múltiple? | 36 |
| 3.4.1. Concentración de VE y estadio clínico | 37 |
| 3.4.2. VE como biomarcadores para la monitorización de terapias | 39 |
| 3.5. VE como posibles vehículos terapéuticos | 40 |
| HIPOTESIS Y OBJETIVOS..... | 43 |
| Hipótesis..... | 45 |
| Objetivos | 45 |
| MATERIALES Y MÉTODOS COMUNES..... | 47 |
| 1. Aislamiento de vesículas extracelulares..... | 49 |

| | | |
|--|--|----|
| 1.1. | Extracción de sangre para aislamiento de vesículas extracelulares..... | 49 |
| 1.2. | Aislamiento de vesículas extracelulares con el método “centri2500” | 49 |
| 1.3. | Aislamiento de vesículas extracelulares con el método “centri13000” | 49 |
| 2. | Caracterización de vesículas extracelulares | 50 |
| 2.1. | Análisis del origen celular de VE mediante citometría de flujo | 50 |
| 2.2. | Medición de la concentración de VE con <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA) | 52 |
| 2.3. | Caracterización morfológica de las VE mediante crio-microscopía electrónica (ME).. | 53 |
| 3. | Aislamiento de RNA de las VE (RNA _{VE}) | 53 |
| CAPITULO 1..... | | 55 |
| Vesículas extracelulares según el estadio clínico de pacientes de esclerosis múltiple..... | | 55 |
| 1. | Introducción | 57 |
| 2. | Objetivos | 58 |
| 3. | Materiales y métodos..... | 59 |
| 3.1. | Pacientes | 59 |
| 3.2. | Recolección de muestras y aislamiento de VE | 59 |
| 3.3. | Citometría de flujo..... | 59 |
| 3.4. | Análisis estadístico | 59 |
| 4. | Resultados | 60 |
| 4.1. | Población de estudio | 60 |
| 4.2. | Diferencias en las VE entre pacientes EM no tratados y controles sanos..... | 60 |
| 4.3. | Diferencias de VE basadas en el estadio clínico de EM..... | 61 |
| 4.4. | Efecto del tratamiento de EM en las VE..... | 62 |
| 5. | Discusión | 64 |
| CAPITULO 2..... | | 67 |
| Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en un entorno hospitalario | | 67 |
| 1. | Introducción | 69 |
| 2. | Objetivos | 69 |
| 3. | Materiales y métodos..... | 70 |
| 3.1. | Muestras de pacientes | 70 |
| 3.1.1. | Sangre..... | 71 |
| 3.1.2. | Orina | 72 |
| 3.2. | Protocolos de aislamiento de VE..... | 73 |
| 3.2.1. | Centri2500 | 74 |
| 3.2.2. | Centri13000 | 74 |
| 3.2.3. | Exoquick..... | 74 |
| 3.2.4. | Precipitación salina (salting out) | 74 |

| | | |
|--|--|-----|
| 3.2.5. | Estándar..... | 75 |
| 3.3. | Métodos de detección de VE | 75 |
| 3.3.1. | Citometría de flujo (CMF)..... | 75 |
| 3.3.2. | Análisis por seguimiento de partículas [Nanoparticle tracking analysis (NTA)]..... | 76 |
| 3.3.3. | Western blot (WB)..... | 76 |
| 3.3.4. | Crio-microscopía electrónica (ME)..... | 76 |
| 3.4. | Aislamiento de RNA de VE..... | 76 |
| 3.5. | Análisis estadístico | 76 |
| 4. | Resultados | 78 |
| 4.1. | Sangre..... | 78 |
| 4.1.1. | Concentración de VE | 78 |
| 4.1.1.1. | NTA..... | 78 |
| 4.1.1.2. | CMF | 80 |
| 4.1.2. | Tamaño de las VE | 80 |
| 4.1.3. | Concentración de RNA _{VE} | 80 |
| 4.1.4. | Western blot..... | 81 |
| 4.2. | Orina..... | 82 |
| 4.2.1. | Concentración de VE | 82 |
| 4.2.2. | Tamaño de las VE | 82 |
| 4.2.3. | Concentración de RNA _{VE} | 82 |
| 4.2.4. | WB..... | 82 |
| 4.3. | Correlaciones con parámetros de laboratorio | 83 |
| 5. | Discusión | 85 |
| 5.1. | Aislamiento de VE | 85 |
| 5.2. | Detección y caracterización de VE | 87 |
| 5.3. | VE del laboratorio al paciente | 89 |
| CAPITULO 3 | | 93 |
| Análisis del cargo de las vesículas extracelulares de pacientes de esclerosis múltiple | | 93 |
| 1. | Introducción | 95 |
| 2. | Objetivos | 97 |
| 3. | Materiales y métodos | 98 |
| 3.1. | Muestras de pacientes y controles sanos | 98 |
| 3.2. | Aislamiento de VE | 99 |
| 3.3. | Análisis por espectrometría de masas | 99 |
| 3.4. | Análisis diferencial de datos..... | 101 |
| 3.5. | ELISA para detección del factor de von Willebrand | 102 |

| | | |
|--|--|-----|
| 3.6. | Ensayo multiplexado de detección de citoquinas (tecnología Luminex®) | 103 |
| 3.7. | Secuenciación | 103 |
| 3.8. | Análisis informático | 103 |
| 3.9. | Análisis estadístico | 104 |
| 4. | Resultados | 105 |
| 4.1. | Proteómica | 105 |
| 4.1.1. | 70% de proteínas no identificadas previamente en bases de datos de VE..... | 105 |
| 4.1.2. | Las proteínas identificadas están involucradas en hemostasia y transporte de lipoproteínas | 105 |
| 4.1.3. | Validación del factor de von Willebrand | 109 |
| 4.2. | Citoquinas..... | 109 |
| 4.3. | Transcriptómica..... | 109 |
| 4.3.1. | Control de calidad (QC) y limpieza de los datos..... | 109 |
| 4.3.2. | Alineamiento y mapeado | 110 |
| 4.3.3. | Expresión diferencial del cargo de RNA | 110 |
| 5. | Discusión | 112 |
| CAPITULO 4..... | | 117 |
| Efecto del fingolimod sobre las vesículas extracelulares | | 117 |
| 1. | Introducción | 119 |
| 2. | Objetivos | 119 |
| 3. | Materiales y métodos..... | 121 |
| 3.1. | Muestras de pacientes y controles | 121 |
| 3.2. | Calendario de extracciones en pacientes tratados con FGM..... | 122 |
| 3.3. | Aislamiento de VE..... | 122 |
| 3.4. | Caracterización de VE..... | 122 |
| 3.5. | Arrays de small non-coding RNA..... | 122 |
| 3.6. | Producción de VE enriquecidas en mir-155 | 124 |
| 3.7. | Aislamiento de RNA de las VE (RNA _{VE}) y cuantificación del cargo de miR-155 | 124 |
| 3.8. | Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con VE..... | 125 |
| 3.8.1. | Ajuste de concentración de PHA para cultivo de PBMC | 125 |
| 3.8.2. | Ajuste de la concentración de VE a añadir en cultivo de PBMC..... | 125 |
| 3.8.3. | Ensayo funcional del efecto de las VE sobre la activación de PBMC | 126 |
| 3.9. | Análisis estadístico | 127 |
| 4. | Resultados | 128 |
| 4.1. | Caracterización de vesículas extracelulares circulantes..... | 128 |
| 4.2. | FMG afecta a la concentración de VE en las primeras horas | 129 |

| | | |
|------------------------|--|-----|
| 4.3. | Descripción de los arrays de sncRNA | 129 |
| 4.4. | Redes de interacción de miRNA-genes dianas y estudios ontológicos..... | 131 |
| 4.5. | FGM modula el cargo de sncRNA en las primeras 5 horas de tratamiento | 136 |
| 4.6. | FGM afecta en 5 h la funcional reguladora de las EV circulantes | 137 |
| 4.7. | Caracterización de VE enriquecidas en miR-155..... | 138 |
| 4.8. | EV enriquecidas en miR-155 inhiben la activación linfocitaria | 139 |
| 5. | Discusión | 141 |
| DISCUSIÓN GENERAL..... | | 145 |
| 1. | Interpretar la información..... | 148 |
| 2. | Verificar su utilidad | 150 |
| 3. | Aplicarla en forma simple | 151 |
| CONCLUSIONES | | 153 |
| PUBLICACIONES..... | | 157 |
| BIBLIOGRAFIA..... | | 161 |
| ANEXOS | | 181 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Evolución de la publicación de artículos sobre VE y MP/MV..... | 5 |
| Figura 2: Clasificación de VE según su biogénesis. Comparativa de tamaños de subtipos de VE..... | 7 |
| Figura 3: Funciones de inhibición y activación de las VE sobre células del sistema inmune..... | 10 |
| Figura 4: Comparativa de resoluciones de citómetros para el análisis de VE..... | 14 |
| Figura 5: imágenes de VE captadas mediante microscopía electrónica..... | 15 |
| Figura 6: Factores implicados en el desarrollo de una enfermedad autoinmune..... | 22 |
| Figura 7: Posibles mecanismos de lesión y reparación en la esclerosis múltiple..... | 23 |
| Figura 8: Formas evolutivas de la EM..... | 27 |
| Figura 9: Biomarcadores asociados a las diferentes fases clínicas de la EM..... | 29 |
| Figura 10: Representación esquemática del proceso de desarrollo de los biomarcadores..... | 29 |
| Figura 11: Progresión de la discapacidad en esclerosis múltiple evaluada con la escala EDSS..... | 30 |
| Figura 12: Funciones patogénicas de las VE en la EM..... | 35 |
| Figura 13: Protocolo de aislamiento de VE mediante centrifugación diferencial “centri1300”..... | 50 |
| Figura 14: Imagen de las distintas fases obtenidas tras el aislamiento de VE por centrifugación diferencial..... | 50 |
| Figura 15: Estrategia de ventana para el análisis por citometría de flujo de VE..... | 52 |
| Figura 16: Concentración de VE de pacientes no tratados y controles sanos..... | 61 |
| Figura 17: Concentración de VE según el estadio clínico de EM..... | 62 |
| Figura 18: Efecto de los tratamientos de EM sobre la concentración de VE..... | 63 |
| Figura 19: Comparación de 5 protocolos de aislamiento de VE..... | 71 |
| Figura 20: Procesamiento de las muestras de sangre..... | 72 |
| Figura 21: Procesamiento de las muestras de orina..... | 73 |
| Figura 22: Resultados de la comparación de 5 protocolos de aislamiento de VE..... | 79 |
| Figura 23: Caracterización de VE mediante microscopía electrónica..... | 81 |
| Figura 24: Concentraciones de VE en plasma y orina obtenidas con cada método..... | 83 |
| Figura 25: Flujo de trabajo propuesto para el estudio de las VE en un entorno hospitalario..... | 90 |
| Figura 26: Experimentos realizados para el análisis del cargo de VE..... | 97 |
| Figura 27: Esquema del procedimiento para el estudio proteómico..... | 101 |
| Figura 28: Flujo de trabajo realizado en el estudio de secuenciación de VE..... | 104 |
| Figura 29: Análisis ontológicos de las proteínas coexpresadas y diferencialmente expresadas en CS y NoT..... | 106 |
| Figura 30: Imagen de la red de proteínas obtenidas en el análisis mediante la herramienta STRING de la lista de proteínas co-expresadas y diferencialmente expresadas entre CS y NoT..... | 108 |
| Figura 31: Concentraciones de citoquinas en VE..... | 109 |
| Figura 32: Procesos biológicos en que participan los genes del cargo de VE..... | 112 |
| Figura 33: Ajuste de concentración de PHA para cultivo de PBMC..... | 125 |
| Figura 34: Ajuste de concentración de VE a añadir en cultivo de PBMC..... | 126 |
| Figura 35: Caracterización de VE circulantes de pacientes de EM tratados con FGM..... | 128 |
| Figura 36: Serie temporal de la concentración de VE durante un año de tratamiento con FGM.. | 129 |
| Figura 37: Distribución por grupo de cantidad de sondas de sncRNA presentes en VE..... | 130 |
| Figura 38: Red y estudio ontológico para la comparación 2..... | 132 |
| Figura 39: Red y estudio ontológico para la comparación 3..... | 133 |
| Figura 40: Red y estudio ontológico para la comparación 5..... | 134 |

| | |
|---|-----|
| Figura 41: Red y estudio ontológico para la comparación 6 | 135 |
| Figura 42: Redes de las comparaciones de arrays | 136 |
| Figura 43: Las VE inhiben la activación linfocitaria | 138 |
| Figura 44: Caracterización de VE enriquecidas en miR-155..... | 139 |
| Figura 45: Fingolimod modula la liberación y función reguladora de las VE circulantes..... | 143 |
| Figura 46: Disminución relativa del tamaño del mundo con el incremento en la rapidez de las comunicaciones..... | 147 |
| Figura 47: Desafíos al estudiar las VE con una aplicación clínica..... | 148 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Biomarcadores establecido y potenciales para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la EM. | 28 |
| Tabla 2: Terapias modificadoras de la enfermedad..... | 32 |
| Tabla 3: Características de controles sanos y pacientes EM..... | 60 |
| Tabla 4: Parámetros de laboratorio analizados en las muestras de sangre y orina de los 10 donantes sanos. | 73 |
| Tabla 5: Métodos de aislamiento de VE comparados en este capítulo. | 75 |
| Tabla 6: Significancia estadística de las comparaciones entre NTA y CMF..... | 80 |
| Tabla 7: Características generales de pacientes no tratados y controles sanos para el estudio de proteómica. | 98 |
| Tabla 8: Proteínas diferencialmente expresadas entre CS y NoT. | 105 |
| Tabla 9: Resumen de los alineamientos por agrupamiento de muestras..... | 110 |
| Tabla 10: Resumen de resultados de los test de expresión diferencial..... | 110 |
| Tabla 11: Distribución por tipo de secuencia en cada experimento..... | 111 |
| Tabla 12: Características clínicas de los individuos estudiados con microarrays de miRNA. | 121 |
| Tabla 13: Número de sncRNA presente en cada condición y diferencialmente expresados entre cada comparación. | 130 |
| Tabla 14: Distribución de tipo de sncRNA para cada array..... | 131 |
| Tabla 15: Número de miRNA y genes dianas en cada comparación de arrays..... | 131 |

SIGLAS

| | |
|-------------|--|
| BHE | barrera hemato-encefálica |
| CMF | citometría de flujo |
| CPA | célula presentadora de antígenos |
| CS | control sano |
| EAE | encefalitis autoinmune experimental |
| EDSS | <i>expanded disability status scale</i> (escala ampliada del estado de discapacidad) |
| EM | esclerosis múltiple |
| EMRR | EM recurrente recidivante |
| EMSP | EM secundariamente progresiva |
| FGM | fingolimod |
| INF β | interferón beta |
| ISEV | <i>International Society for Extracellular Vesicles</i> |
| LCR | líquido cefalorraquídeo |
| ME | microscopía electrónica |
| miRNA | microRNA |
| MP/MV | micropartícula/microvesícula |
| MSSS | <i>multiple sclerosis severity scale</i> (escala de severidad de esclerosis múltiple) |
| NoT | no tratado (paciente de EM) |
| NTA | <i>nanoparticle tracking analysis</i> (análisis por seguimiento de nanopartícula) |
| NTZ | natalizumab |
| OLC | orina libre de células |
| OLD | orina libre de <i>debries</i> |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares de sangre periférica) |
| PLP | plasma libre de plaquetas |
| PPP | plasma pobre en plaquetas |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico) |
| SNC | sistema nervioso central |
| sncRNA | <i>small non-coding RNA</i> (RNA pequeño no codificante) |
| VE | vesícula extracelular |
| VE155 | VE enriquecida en miR-155 |
| VEscr | VE enriquecida en secuencia <i>scramble</i> (aleatoria, sin diana) |
| VEE | VE derivada de células endoteliales |
| VEL | VE derivada de leucocitos |
| VEM | VE derivada de monocitos |

| | |
|------|--------------------------|
| VEMi | VE derivada de microglía |
| VEP | VE derivada de plaquetas |

INTRODUCCIÓN

1. Vesículas extracelulares

1.1. Comunicación celular

La supervivencia de las células está condicionada, entre otros factores, por su capacidad de intercambiar mensajes con el medio ambiente. Esto pone de manifiesto la relevancia de un funcionamiento adecuado de la maquinaria celular para emitir y procesar mensajes. En concreto, cuando el medio ambiente es otra célula, hablamos de *comunicación celular*. Los mecanismos que posee la célula para asegurar su comunicación celular son diversos y pueden distinguirse dos subgrupos¹:

a) directo: en donde el mensaje se transmite por contacto célula-célula pudiendo ser la célula receptora:

- distinta a la emisora (comunicación justacrina, incluye también a la señal sináptica)
- la misma célula emisora (comunicación autocrina)

b) indirecto: en el cual el mensaje es excretado por la célula emisora al medio ambiente extracelular y es captado en un siguiente paso por:

- una o varias células cercanas (comunicación paracrina)
- una o varias células a distancia (comunicación endocrina, aunque este término se acota a la comunicación mediante hormonas)

Dentro del mecanismo de comunicación celular indirecta, se ha incluido a partir de la última década (tomando como referencia el trabajo de Valadi *et al*²) el mediado por vesículas extracelulares (VE) definidas como partículas cubiertas de membrana celular originadas en el interior de la célula emisora o por evaginación de su membrana plasmática y excretadas al medio extracelular para ser captadas posteriormente por células receptoras (cercanas o a distancia). Desde entonces, las VE y su condición de transportadores de información intercelular han sido objeto de estudio en el campo biomédico, emergiendo así interesantes líneas de investigación. Los objetivos principales de dichas investigaciones son la búsqueda de nuevos biomarcadores y posibles dianas terapéuticas candidatos a ser utilizados en la práctica clínica. Sin embargo, solo contadas investigaciones han dado lugar a aplicaciones clínicas válidas, quedando un recorrido importante por completar entre la investigación básica en VE y su utilización práctica en beneficio de los pacientes.

1.2. Breve reseña histórica

El estudio sobre VE tuvo su génesis en 1946 cuando el célebre Dr. Chargaff, de la Universidad de Columbia (USA), conocido por sus investigaciones sobre las bases nitrogenadas del ADN, observó que los precipitados de plasma libre de plaquetas obtenidos tras una centrifugación a alta velocidad (31000 g), mantenían actividad procoagulante³. Cerca de 20 años más tarde, en 1967, el Dr. Wolf distinguió en sus imágenes de microscopia electrónica que el plasma depletado de células aún conservaba estructuras electrónicamente densas que denominó “polvo de plaquetas” (*platelet dust*) y eran las responsables de la actividad procoagulante descrita por Chargaff⁴. Durante las siguientes dos décadas, investigaciones aisladas hacen referencias a estructuras vesiculares halladas en diferentes muestras: líquido seminal, suero bovino, adenoma rectal, etc. Pero hasta entonces, además de la búsqueda de funciones procoagulantes para estas muestras “libres de células”, no se había profundizado en otras características funcionales, siendo incluso consideradas las encargadas de eliminar el material de desecho de las células⁵.

A principios de la década del 80, Trams y colaboradores denominaron *exosomas* a las vesículas derivadas de una línea tumoral que poseían capacidad 5' nucleotidasa⁶. Un par de años más tarde, en el contexto de estudios sobre el tráfico vesicular intracelular, Johnstone describió la formación de cuerpos multivesiculares, que contenían receptores de transferrina, y su capacidad de unirse a la membrana celular para liberarse al medio exterior⁷. En el año 1987 el mismo grupo de Johnstone y colaboradores hacen referencia a la posibilidad de aislar estas vesículas mediante ultracentrifugación a 100000 g. Una posterior revolución en este campo fue gracias al aporte de la Dra. Raposo, quien describió la capacidad de dichos exosomas formados en cuerpos multivesiculares de presentar antígenos y activar linfocitos T a través de las moléculas de HLA presentes en su superficie⁸. Diez años más tarde, el grupo liderado por Jan Lötvall descubrió el contenido de miRNA en las VE y la posibilidad de ser captado por la célula diana, abriendo un nuevo horizonte en el campo de la comunicación celular⁹. Desde ese momento, el número de publicaciones describiendo nuevas funciones y orígenes celulares de las VE se ha incrementado sustancialmente, cuadruplicándose en la última década ([Figura 1](#)).

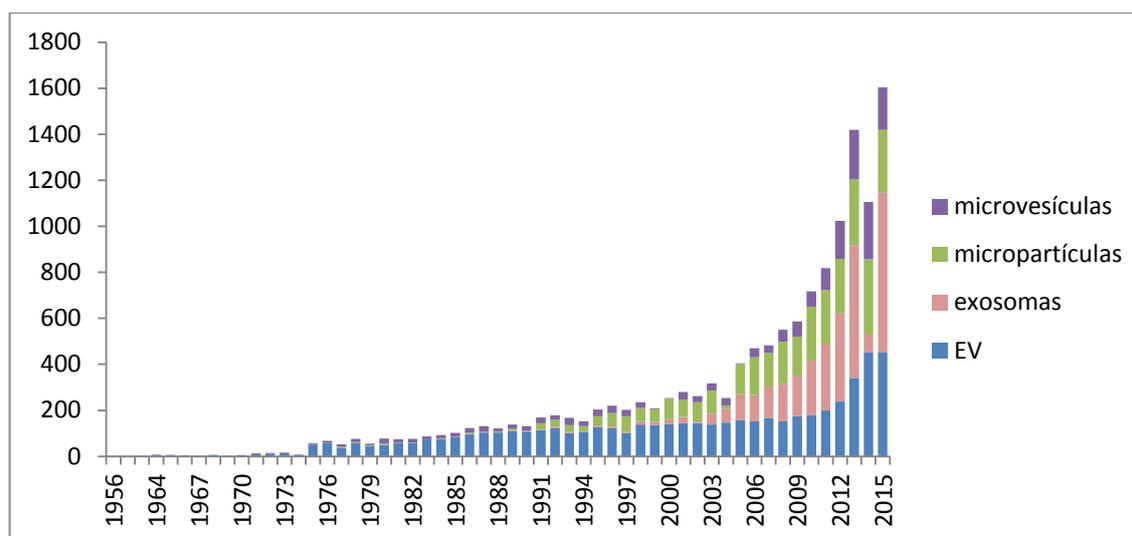


Figura 1: Evolución de artículos indexados en Pubmed con los términos (en inglés) “vesículas extracelulares”, “exosomas”, “micropartículas” y “microvesículas” al día 7 de septiembre de 2015.

Podríamos resumir lo antedicho diciendo que hubo 5 hitos que revolucionaron el conocimiento sobre lo que actualmente denominamos VE: remanencia funcional del plasma libre de plaquetas; visualización de vesículas mediante microscopía electrónica; formación de exosomas desde cuerpos multivesiculares; capacidad de presentar antígenos funcionales y caracterización de miRNA contenidos en su interior.

Dentro de esta cronología histórica, en la última década las líneas de investigación en VE han sido claramente dos: las que se apoyan en la caracterización múltiple que permite la citometría de flujo (CMF) sobre el origen celular de las VE, centrando su estudio en las vesículas más grandes, denominadas micropartículas, microvesículas, o ectosomas; y por otro lado las que tienen como objeto las partículas más pequeñas o exosomas, ahondando en el estudio de su contenido y la función de este. En la mayoría de estudios sobre micropartículas, estas han sido aisladas de fluidos corporales y analizadas en directo, mientras que los estudios de exosomas fueron en su mayoría basados en experimentación *in vitro*. Actualmente, gracias a la colaboración internacional de grupos pioneros en ambos tipos de trabajos, se ha formado la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV, <http://isev.org/>) con el objetivo de unificar criterios, metodología y garantizar calidad en la investigación sobre VE. Fue en las reuniones iniciales de esta sociedad donde se optó por el actual término VE para englobar tanto exosomas y micropartículas, como también a los cuerpos apoptóticos¹⁰.

1.3. Características biológicas

Las VE son partículas rodeadas de membrana plasmática provenientes del interior de la célula o formadas directamente desde su membrana y excretadas al medio extracelular. Llevan información desde la célula de origen a la célula diana¹¹, participando en numerosas funciones biológicas como por ejemplo presentación de antígenos sin contacto celular¹², modificación del microambiente y “educación” celular a distancia¹³, funciones que han sido agrupadas bajo el término “comunicación celular sin contacto directo” (comunicación celular indirecta). A su vez, estos roles biológicos han sido relacionados a una amplia variedad de procesos fisiopatológicos siendo estudiados con mayor profundidad en cáncer enfermedades mediadas por el sistema inmune¹⁴ y enfermedades cardiovasculares¹⁵. Se ha visto que tanto en condiciones patológicas como fisiológicas, estas vesículas pueden ser liberadas tras la activación, apoptosis o estrés celular¹⁶.

Específicamente, las VE pueden transportar proteínas, lípidos, glucolípidos y material genético como DNA y RNA mediante los que producirá modificaciones fenotípicas¹⁷ y genotípicas¹⁸ en las células receptoras. Este proceso está facilitado por las moléculas en la superficie de la membrana vesicular que le permite ser identificada y captada por la célula diana e interactuar con ella¹⁹.

1.3.1. Biogénesis

Aunque hay varias formas de clasificar las VE, la principal división en la nomenclatura está basada en su biogénesis. Así se describen 3 tipos de VE (Figura 2):

- Aquellas formadas dentro de los cuerpos multivesiculares y excretados extracelularmente luego de la fusión de estos cuerpos con la membrana plasmática son denominados exosomas. Su principal característica es tener un tamaño uniforme en un rango comprendido entre 30 a 150 nm, siendo las VE más pequeñas²⁰.
- Por otro lado, las vesículas denominadas micropartículas (MP), microvesículas (MV) o ectosomas (resumidas aquí como MP/MV), derivan de la modificación de la membrana celular luego de recibir un estímulo externo o interno que conduce al reblandecimiento de las estructuras adyacentes de la membrana permitiendo la evaginación y formación de la vesícula hasta su desprendimiento completo²¹. Estas MP/MV varían ampliamente en tamaño desde 300 a 1000 nm de diámetro.
- Por último, los cuerpos apoptóticos están incluidos dentro de la categoría de VE, siendo los de mayor tamaño (hasta 5 μm) y más diversos respecto a morfología, tamaño y composición aunque los menos estudiados dentro del conjunto de VE²².

A pesar de esta clasificación biológica, en términos prácticos cuando se aíslan VE según su tamaño, se observa un solapamiento entre los 3 tipos, encontrándose por ejemplo gran cantidad de MP/MV con tamaños alrededor de 150 nm así como pequeños cuerpos apoptóticos que rondan los 500 nm y son indistinguibles de las MP/MV²³. Debido a esto entre otros factores, la tendencia actual es denominar el conjunto entero como VE, término acuñado por la ISEV¹⁰. En esta tesis, seguimos esta denominación para referirnos a las vesículas aisladas mediante nuestros protocolos.

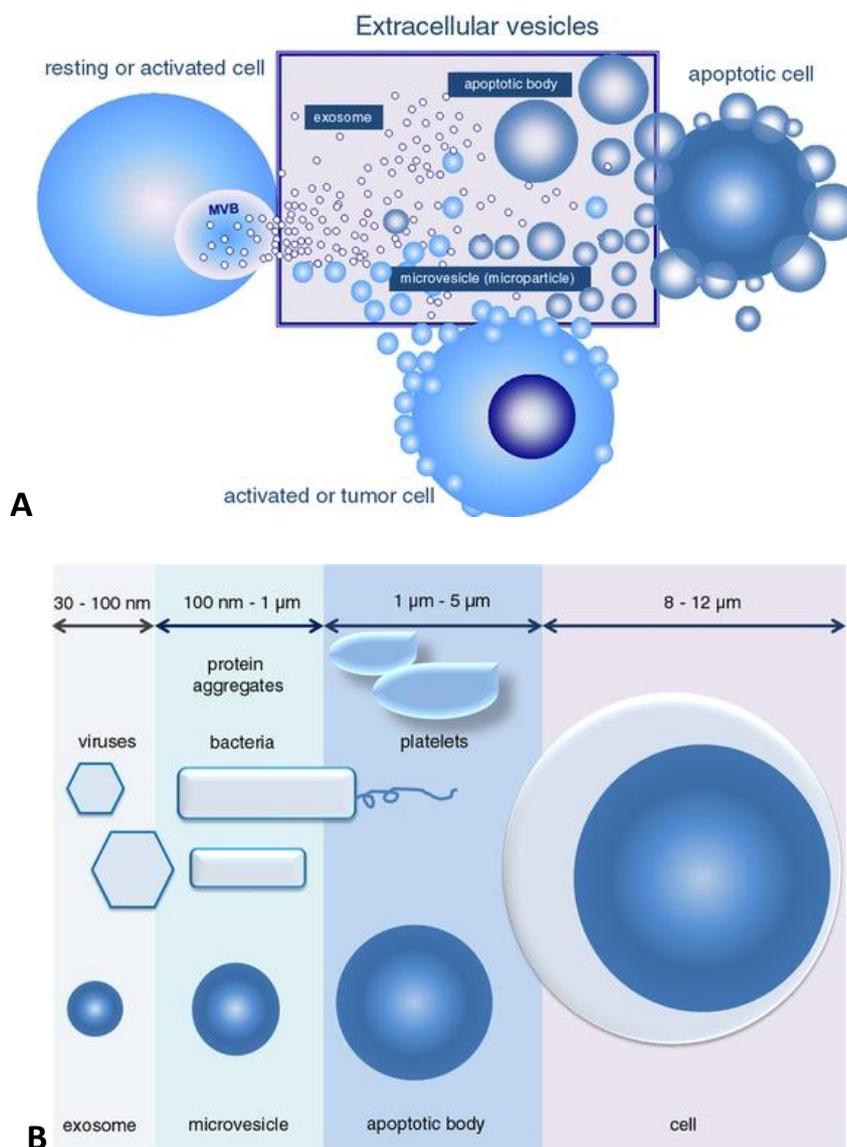


Figura 2: A) clasificación de VE según su biogénesis. B) comparativa de tamaños de subtipos de VE. Tomado de²⁴.

1.3.2. Origen celular

Las VE han sido clasificadas también en función del origen celular de la cual es excretada. Vale aclarar que esta clasificación se emplea mayoritariamente en las VE tipo MP/MV las que debido a

su biogénesis poseen marcadores en su superficie provenientes de la célula de origen y esto es aprovechado tecnológicamente para identificarlas y clasificarlas. Los exosomas por ser formados en el cuerpo multivesicular no llevan en su membrana marcadores de origen celular, aunque en cambio presentan tetraspaninas (CD63, CD9, CD81, etc.), en su composición, lo que es utilizado como marcador general de este subtipo de VE.

Podríamos afirmar que todas, o casi todas las células son capaces de liberar VE de forma constitutiva o en consecuencia a una estimulación específica. Aún así, con fines de aplicación clínica, las más estudiadas han sido las circulantes en sangre, derivadas de células presentes en el torrente, como por ejemplo plaquetas, leucocitos, eritrocitos y células endoteliales^{25,26}. También se han identificado VE en otros fluidos biológicos como líquido sinovial, líquido ascítico, saliva, orina, leche materna, líquido cefalorraquídeo (LCR), con marcadores celulares presentes en cada tejido.

1.4. Relación con el sistema inmune

Veámos en el apartado sobre las características biológicas de las VE, que uno de los roles más estudiados era en referencia al sistema inmune. La doctora Clotilde Théry, en el año 2009, publicó una completa revisión sobre las funciones inmunológicas conocidas hasta aquel entonces²⁷, las cuales han sido ampliadas y enriquecidas recientemente en la revisión de los Dr. Robbins y Morelli¹⁴. No pretenderemos en este apartado hacer una revisión exhaustiva del tema, sino por el contrario exponer una serie de conceptos básicos acerca de la regulación mediada por las VE sobre el sistema inmune, con especial hincapié en los procesos que puedan tener un rol en el desarrollo de la EM, como veremos más adelante.

1.5. El cargo de las VE no es azaroso

La idea original de que las VE, específicamente el subtipo exosomas, llevaban en su interior una mezcla azarosa de lo que el citoplasma de la célula presentaba ha sido refutada tras el excepcional trabajo del grupo del Dr. Lötvall, en el que demostró la presencia de miRNA en el interior de los exosomas y que muchos de estos no estaban presentes en el citoplasma de la célula de origen. Esto sucede aún en las células que secretan VE de forma constitutiva, como es el caso de algunas presentadoras de antígeno (CPA -linfocitos B⁸, células dendríticas¹² o macrófagos²⁸-). Los mecanismos que intervienen en la selección y enriquecimiento del cargo son diversos pudiendo ser dependientes o no de ESCRT (del inglés: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) -maquinaria encargada de la formación de cuerpos multivesiculares y la escisión de este al espacio extracelular- tal como fue demostrado por Mittelbrunn y

colaboradores en su trabajo sobre las VE en la sinapsis inmune entre linfocitos T y CPA²⁹. Podríamos afirmar entonces que el material englobado en el interior de las VE, lejos de ser el “resumen” del repertorio que normalmente expresa la célula, es el resultado de una selección enriquecida específicamente y dirigida por varios mecanismos celulares.

1.6. Inhibición versus activación

Aunque el escenario real probablemente sea más complejo, las modulaciones del sistema inmune se resumen en dos grupos: inhibición y activación. Esta manera simplificada de entender al sistema inmune se trasladó lógicamente al ámbito de las VE por lo que se suele dividir sus funciones en inhibidoras/reguladoras y activadoras del sistema inmune ([Figura 3](#)). Sin embargo, tal como sucede en cualquier sistema complejo, un mismo tipo de VE puede comportarse en forma opuesta según el microambiente en que se encuentre.

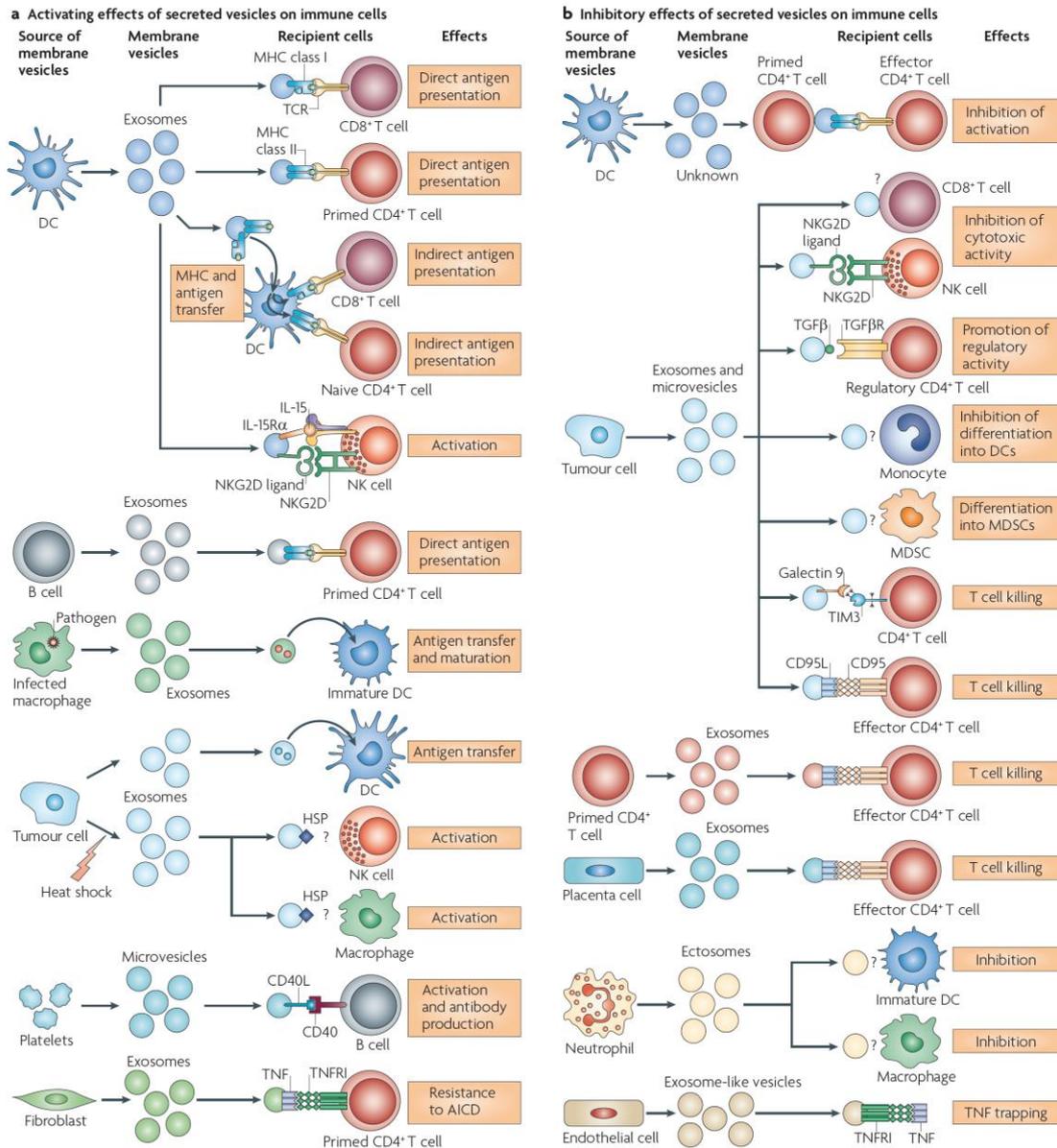


Figura 3: Funciones de inhibición y activación de las VE sobre células del sistema inmune. **a)** Las vesículas secretadas de varias fuentes celulares tienen numerosos efectos activadores sobre las células inmunes, incluyendo la presentación de complejos péptido-CMH en forma directa a las células T y la presentación indirecta de antígenos y/o complejos péptido-CMH transferidos a las células dendríticas (DCs) lo que conduce a la activación de células NK, macrófagos y células B y la maduración de DCs, entre otras funciones. **b)** Funciones inhibitorias de vesículas derivadas de diversas fuentes celulares incluyen: inhibición de la activación de las células T, inhibición de la función citotóxica de las NK y linfocitos T CD8+, promoción de células T reguladoras (Treg), promoción de la diferenciación de los monocitos en células supresoras mieloides (MDSCs), inducción de apoptosis en linfocitos T a través de CD95L. HSP: proteína de choque térmico; IL-15R α : cadena α del receptor de IL-15; NKG2D: grupo 2 D de NK; TGF β R: receptor del factor de crecimiento transformante β ; TNFRI: superfamilia de receptores de TNF, miembro I. Tomado de ²⁷.

Hemos visto que las VE pueden presentar antígenos asociados a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en forma indirecta mediante procesamiento por CPA o en forma directa desde virtualmente cualquier célula. Por ambas vías, estas VE presentadoras de antígenos tienen capacidad activadora de linfocitos T ³⁰, B ³¹, NK ³² o macrófagos ²⁸.

Por el contrario, se han descrito funciones reguladoras o inhibitoras de las VE sobre células del sistema inmune. Las células dianas más estudiadas han sido los linfocitos T, así se demostró por ejemplo, la capacidad de inhibir la activación de estos mediante VE derivadas de la leche materna³³ o *in vitro* a través de VE positivas para CD39 y CD73³⁴. Un estudio comprobó que VE derivadas de líneas tumorales eran capaces de estimular células T reguladoras (Treg) siendo esta una vía indirecta de promover la inhibición del sistema inmune³⁵. El mismo estudio concluía que estas VE también podían inhibir la proliferación linfocitaria actuando directamente sobre sus células diana (sin mediar las Treg). También se analizaron los efectos sobre otras células diana del sistema inmune como son las NK, habiéndose confirmado que VE derivadas de un tumor pueden, mediante la inhibición de las funciones de células NK promover el crecimiento tumoral³⁶. Por último, dentro de las funciones inhibitorias de las VE se considera la inducción de la apoptosis, efecto demostrado sobre linfocitos T mediante VE transportadoras de FasL³⁷.

Otro de las funciones descritas sobre la modulación de las VE ejercida sobre sistema inmune es la promoción de la diferenciación celular, la que dependiendo del cargo que la VE transporte, inducirá cambios fenotípicos hacia un tipo celular específico³⁸.

Lógicamente, cada uno de estos roles identificados son objeto de posibles aplicaciones terapéuticas en modelos *in vivo*, fundamentalmente como terapias coadyuvantes (vacunas autólogas, antimicrobianos, etc.) aplicables en enfermedades donde el sistema inmune juega un papel fundamental en su desarrollo (infecciones, cáncer, enfermedades autoinmunes, entre otras)^{14,39}.

1.7. Métodos de aislamiento y caracterización

1.7.1. Aislamiento

Los pasos principales para estudiar VE y aplicar sus resultados engloba la obtención de muestra (sangre, orina, saliva, LCR, leche, líquido ascítico, etc.) y aislamiento de VE desde ella, para luego caracterizarlas y dar paso al análisis de su cargo, obteniendo finalmente una posible interpretación y aplicación clínica.

Respecto a los primeros pasos, la obtención de muestras y parámetros preanalíticos han sido estudiados ampliamente y están próximos a conseguir un consenso^{40,41}. Sin embargo, el aislamiento de VE es un paso crítico debido a varias razones. Primero, los métodos de aislamiento de fluidos humanos o medio de cultivos son actualmente muy diversos (revisado en^{42,43}) y dependiendo de cuál es utilizado los resultados pueden ser considerablemente distintos, aun habiendo partido de la misma muestra.

Hasta ahora, la mayoría de estos métodos están basados en la densidad de las VE, incluyendo centrifugación diferencial desde velocidades bajas (1500g) hasta ultracentrifugación (>100000g), combinadas o no con la realización de un gradiente de densidad y/o filtración. Dependiendo de la cantidad de pasos completados, se obtienen distintas purezas. Resumidamente los pasos consisten en una primera centrifugación a baja velocidad (200 a 300 g) para separar células del fluido que contiene las VE, el cual puede seguir siendo purificado o directamente precipitado para obtener VE. Para una purificación mayor, una segunda centrifugación debe llevarse a cabo (entre 2000 y 10000g, dependiendo del fluido o la fracción de VE requerida). Por otra parte, las VE pueden ser directamente precipitadas del primer sobrenadante centrifugando a velocidades de 10000 hasta 100000 g. Aunque hay muchas variantes entre los autores, la aproximación inicial para analizar VE está usualmente basada en los pasos mencionados. Como protocolo alternativo para obtener una fracción de VE más pura, estos pasos de centrifugación se pueden combinar con un gradiente de sucrosa.

El uso de polímeros o aglutinación por inmutioafinidad como sistema de precipitación también es usado ampliamente, siendo *exoquick* (System Biosciences) el más conocido. La principal ventaja de esta aproximación es el rápido procesamiento de la muestra. Sin embargo, la baja pureza obtenida con estos métodos y mezcla de diferentes subtipos de VE hace difícil la interpretación de los resultados.

La extracción de VE mediante el paso de la muestra a través de un filtro es un método fácil y económico, que puede ser aplicado en combinación o no con la centrifugación diferencial. Hay también un riesgo de contaminación con partículas distintas a VE pero del mismo tamaño que estas.

Recientemente se han añadido al resto de métodos la cromatografía por exclusión de tamaño⁴⁴ y un dispositivo en chip⁴⁵ con resultados prometedores.

Todos estos métodos, tanto solos como en combinación, permiten la obtención de una solución enriquecida en VE en distinta medida. Por último, dependiendo de varios factores como consumo de tiempo, costos, facilidad de manipulación y reproducibilidad, estos métodos son más susceptibles de ser aplicados en una rutina clínica diaria.

Sin embargo y a pesar del creciente número de publicaciones tras ese objetivo, no existe un consenso claro en qué método es el más adecuado para cada situación⁴⁶ poniendo de manifiesto la urgente necesidad de protocolos estandarizados apropiados para su aplicación clínica.

1.7.2. Caracterización

La caracterización de VE se basa en la descripción complementaria de morfología, tamaño, marcadores de su origen celular, marcadores de tipo de vesícula (exosoma o MP/MV) y marcadores de contenido o cargo vesicular. Para cada una de estas caracterizaciones hay disponibles tecnologías que según su complejidad, hacen factible en mayor o menor medida su adecuación a un entorno sanitario.

Dentro de estas tecnologías, el análisis por citometría de flujo (CMF) es probablemente la forma más extendida para caracterizar las VE, posibilitando el uso de múltiples parámetros para identificar la misma vesícula. Es una herramienta con un gran poder de caracterización, con un procesamiento rápido y los resultados pueden ser cuantitativos además de cualitativos.

Su mayor limitación es la baja discriminación de VE menores a 300 o 400 nm. Sin embargo, los nuevos citómetros de alta resolución permiten detectar partículas de hasta 100 nm (Figura 4). El límite de detección de los citómetros más habituales en el uso clínico ha sido tema de estudio por parte de las jóvenes sociedades científicas de VE destacándose en su labor el trabajo realizado por la *Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis* (ISTH SCC) liderado por el Dr. Lamarie Lacroix y la Dra. Françoise Dignat George^{40,41,47}. En la reciente formada ISEV también se está discutiendo acerca de la capacidad de los distintos citómetros de uso más frecuente como el caso del CANTO II o el FC500 de Beckman Coulter y de aquellos que permiten una manipulación mayor de sus parámetros como es el Influx (BD), para la caracterización de VE y su contabilización. Las coordinadoras de esa área son las Dras. Esther Nolte-t Hoen y Marca Wauben⁴⁸⁻⁵⁰. Prueba del trabajo colaborativo de estas sociedades científicas es el creciente número de publicaciones específicamente en el área de VE y la citometría de flujo. Actualmente se está conformando un grupo de estudio sobre protocolización de citometría aplicada a las VE conformado por miembros de las dos sociedades nombradas.

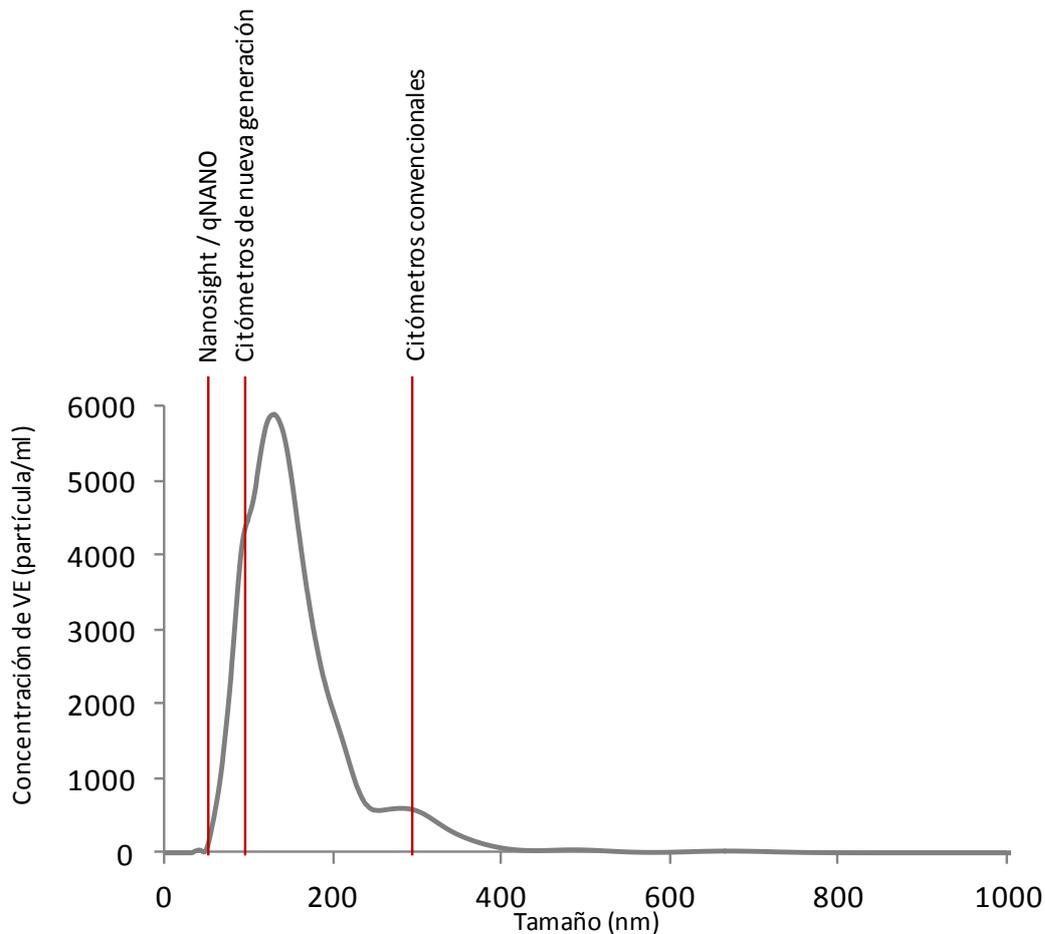


Figura 4: Comparativa de resoluciones de citómetros para el análisis de VE. La mayoría de las VE tienen un tamaño menor a 200 nm, por lo que quedan fuera del análisis de citómetros convencionales. Los citómetros de nueva generación permiten la distinción de partículas de 100 nm acercándose en mayor medida al rango analizado por las técnicas de seguimiento de partículas como Nanosight o qNANO.

Prosiguiendo con otras plataformas utilizadas para la caracterización vesicular, dos nuevas herramientas han sido incorporadas recientemente al mercado cuyo fin es la caracterización individualizada de nanopartículas en tamaño y concentración a alta resolución. Una mide las partículas basándose en su paso a través de un poro de una membrana sintética cambiando el flujo de corriente iónico, lo que se traduce digitalmente al volumen y tamaño de la partícula y concentración en el fluido de suspensión (qNANO, IZON Science)⁵¹. Tiene la ventaja de ser sensible a los diferentes tamaños de partículas en muestras complejas como las de fluidos humanos. La otra herramienta denominada Nanosight (Malvern) se basa en el movimiento browniano de las partículas suspendidas en su medio, detectado mediante la dispersión generada al incidir un láser sobre estas⁵². El grado de movimiento está relacionado a la viscosidad del líquido, al tamaño de la partícula y la temperatura de la muestra. Las partículas son seguidas durante un tiempo (30 a 60 segundos) grabándose un video que posteriormente es analizado por un software, transformando la imagen a datos de concentración y distribución de tamaño. El

análisis se denomina “seguimiento de nanopartículas” o NTA, del inglés: *Nanoparticle Tracking Analysis*. El fácil manejo y entorno informático sencillo para operadores no especializados más el amplio rango de medición que proveen estas dos plataformas anuncian una nueva era en el análisis de las VE.

Hasta el momento, el método para caracterizar con más detalle la morfología de las VE sigue siendo indudablemente la microscopía electrónica (ME), ya sea por criofractura, transmisión o barrido, a su vez, proporcionando evidencia directa de la presencia de VE en el medio de estudio (Figura 5). Además, permite la identificación de moléculas tanto superficiales como internas mediante marcajes con metales conjugados con anticuerpos. Usualmente la ME se combina con alguna de las técnicas mencionadas anteriormente (CMF, NTA). Por otro lado, el costoso y complejo procesamiento de la muestra limita su uso.

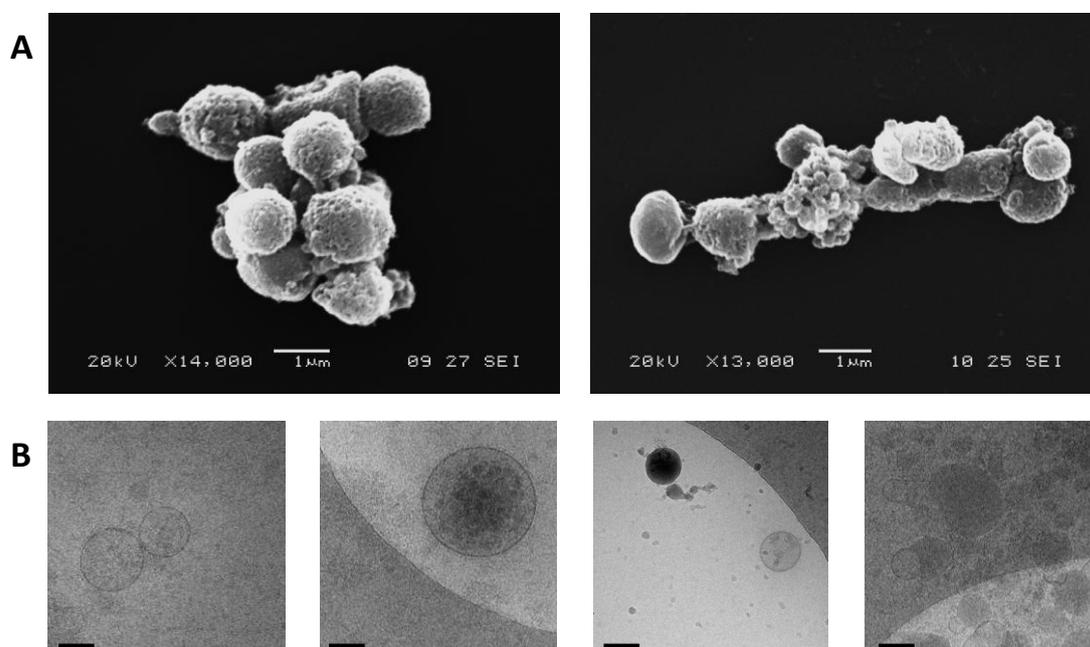


Figura 5: imágenes de VE captadas mediante microscopía electrónica A) de barrido donde se observan agregados de VE obtenidas de plasma. Nótese la forma redondeada y el aspecto de su superficie idéntico al de la membrana celular. Las barras representan 1 µm. B) por criofractura, donde puede apreciarse la bicapa lipídica de la membrana de las VE. Las barras representan 100 nm.

La microscopía fluorescente, en particular la confocal, es especialmente utilizada para analizar funciones de las VE *in vitro*, así como localizar VE en tejidos y estudiar el proceso de germinación vesicular.

Adicionalmente, el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*) y los ensayos de *western blot* (WB) han sido empleados para

estudiar alguna proteína marcadora de VE, aunque la primera está cayendo en desuso debido a la pobre caracterización que provee. La desventaja del WB es la dificultad para la cuantificación.

En la actualidad se acepta a la cuantificación de proteínas de una muestra de VE como la medida de dosificación en ensayos funcionales que incluyan VE. Usualmente se emplea la técnica de Bradford o similares.

Respecto a la caracterización del contenido o cargo, las técnicas de secuenciación de nueva generación están en una notable expansión en el campo de las VE específicamente en el cargo genético o “genómica”. Esta tecnología exige una cierta especialización en el manejo masivo de datos para un correcto análisis y posterior interpretación de resultados. Lo mismo sucede con los estudios de cargo de proteínas o “proteómica”, llevados a cabo por espectrometría de masas o en electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones (conocida como 2D-PAGE) combinadas o no al fraccionamiento de la muestra mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). También, se utilizan para ambas ómicas los microarrays con ventajas y desventajas (cuya discusión queda fuera del alcance de esta tesis) respecto a los estudios de secuenciación. Otras ómicas también fueron empleadas para conocer el cargo de las VE, como por ejemplo: lipídica⁵³, metabolómica⁵⁴, glucómica⁵⁵, entre las más destacadas, aunque menos extendidas que las recién mencionadas en el ámbito de las VE.

1.8. Aplicación clínica

Una situación que nos preocupa a la comunidad científica biomédica es la brecha entre la investigación básica desarrollada en los laboratorios y el entorno clínico asistencial en donde cada conocimiento biológico debería tener su impacto directo. Muchos investigadores han dirigido sus esfuerzos en reducir esta brecha mediante caminos que aseguren la traducción de los hallazgos de la ciencia básica en soluciones clínicas, en pro de la investigación traslacional.

Esta investigación traslacional no es ajena al campo de las VE ya que actualmente el conocimiento sobre las VE, mayoritariamente desarrollado *in vitro* -enfocado a la caracterización, identificación de mecanismos de acción o profundizar en el conocimiento biológico de estas- ha sido propuesto para aplicarse en el entorno de una rutina diaria hospitalaria para dar respuestas a preguntas específicas sanitarias^{24,56-60}. Para ello además, es necesario que todo ese conocimiento acuñado sea verificado en modelos *in vivo*, siendo en última instancia el paciente el “modelo” a evaluar. Pero, ¿están preparados los hospitales tecnológicamente y poseen el recurso humano para afrontar el uso y/o estudio de VE rutinariamente? ¿Existe un consenso sobre los pasos mínimos a dar para un correcto estudio clínico de VE?

Las posibles aplicaciones clínicas que se vislumbran en la actualidad se dividen en dos grandes grupos, según el objetivo sea:

- como biomarcador (diagnósticos y pronósticos de enfermedades e incluso la monitorización de terapias)
- como tratamiento (las mismas VE *per se* como tratamiento, vacunas desarrolladas en células dendríticas estimuladas con VE, vesículas sintéticas “a la carta”, etc.).

Pasaremos entonces a desglosar las principales aplicaciones clínicas conseguidas hasta la actualidad y algunos ejemplos de cada una de ellas.

Comenzando con las aplicaciones con un objetivo biomarcador, nos encontramos con dos tipos de estudios. Por un lado, los que proponen la concentración de algún subtipo de VE normalmente derivadas de células propias del tejido que padece la enfermedad y por otro los que utilizan el nivel de expresión de alguna molécula, sea de la membrana de la VE o contenida en su interior. Ambos tipos de estudio correlacionan los hallazgos con presencia o ausencia de enfermedad (diagnóstico), el estadio y evolución de la enfermedad (pronóstico) o respuesta a determinados fármacos (monitorización de terapias). Algunos ejemplos sobre concentración de VE son los estudios en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide⁶¹, lupus sistémico o síndrome de Sjögren donde se encontraron niveles elevados de VE en relación a la actividad de la enfermedad en pacientes respecto a controles⁶². En el caso de diabetes, un estudio demostró la concentración de VE circulantes totales, derivadas de plaquetas y derivadas de endotelio estaban elevadas en pacientes con diabetes tipo 1, pero solo las VE totales, sin correlación con los subtipos plaquetarios o endoteliales se encontraban elevadas en pacientes con diabetes tipo 2⁶³. Otro grupo de trabajos está relacionado con afecciones cardiovasculares y la elevación de VE específicas en cada tipo de dolencia, como por ejemplo la presencia de trombosis y elevación de VE transportadoras de factor tisular⁶⁴ o el aumento de VE endoteliales circulantes como valor predictivo de mortalidad cardiovascular en fallo renal⁶⁵ o riesgo cardiometabólico⁶⁶. Del mismo modo, enfermedades que comprometen las vías urinarias han sido relacionadas con aumento de VE sobre todo las derivadas del endotelio, como por ejemplo el estudio de Huang y colaboradores que observan una correlación de este subtipo de VE con la presencia de microalbuminuria en pacientes con hipertensión renal⁶⁷.

Las investigaciones centradas en la expresión de un tipo o grupo molecular también han sido trasladadas a la aplicación clínica como es el caso de los microRNA (miRNA) en numerosas enfermedades. Por citar algunos ejemplos, las distrofias musculares presentan patrones diferenciados de miRNA vesiculares⁶⁸, aunque hay controversia si estos miRNA viajan

encapsulados en VE o asociados a complejos lipoprotéicos, ya que un estudio en distrofia de Duchenne asegura que solo la minoría de los miRNA propuestos pueden ser identificados dentro de las VE⁶⁹. Otras moléculas contenidas en las VE y que están siendo estudiadas cada vez con mayor detenimiento son las proteínas. Existen algunos ejemplos de su intento de aplicación clínica como es el caso de la propuesta de monitorizar tumores de la vía urinaria como el cáncer de vejiga a través del análisis proteómico de las VE de orina^{70,71}. Dejamos en manos del lector la posibilidad de ahondar en los estudios de proteómica y otras moléculas de VE urinarias como fuente de biomarcadores examinando la completa revisión realizada por Gámez-Valero y colaboradores⁷². Para culminar con los ejemplos de estudios que proponen moléculas de VE para su aplicación como biomarcadores citamos el artículo de Del Boccio *et al* que propone que la composición lipídica de las VE obtenidas de pacientes con cáncer renal es distinguible de la de controles sanos⁷³.

Pasando al bloque de las aplicaciones clínicas de las VE con un objetivo terapéutico, debemos de forma inicial, distinguir entre la aplicación directa de VE aisladas de alguna línea celular específica, fundamentalmente tumoral, de aquella indirecta en la que las VE son utilizadas como antígeno para inducir una respuesta en células dendríticas que luego obrarán como terapia final (vacunas de VE)^{74,75,76}. Incluso hay estudios que comparan el efecto entre los dos tipos de tratamientos directo e indirecto consiguiendo mejores resultados con el último, a través del uso de células dendríticas⁷⁷. Probablemente el grupo pionero en investigar esta aplicación indirecta fue el dirigido por la Dra. Laurence Zitvogel, de Paris, quien en el año 1998 propuso el uso de exosomas derivados de células dendríticas para el tratamiento de tumores en ratones¹². Posterior a este trabajo pionero se han sucedido estudios similares utilizando como fuente de VE numerosas líneas tumorales⁷⁶. Sin embargo, de los muchos esfuerzos llevados a cabo en la búsqueda de nuevos tratamientos con VE muy pocos han llegado a fases avanzadas y entre estos solo un par se están probando en un ensayo clínico. Fue justamente el mismo grupo de Zitvogel quien condujo el primer ensayo clínico utilizando exosomas de células dendríticas autólogas pre activadas con antígenos de exosomas tumorales en pacientes con melanoma en estadio III/IV⁷⁸. Otro ejemplo es el estudio en fase I conducido por Morse *et al* donde aplican exosomas en pacientes con cáncer de pulmón⁷⁹.

Notablemente, el campo donde más se desarrollaron investigaciones sobre VE es el de la oncología, sin embargo también encontramos referencias de aplicación de VE en enfermedades inmunomediadas como por ejemplo en artritis reumatoide. En un trabajo se aplicaron exosomas derivados de células dendríticas que transportan IL10 al modelo en ratón de esta enfermedad observándose una supresión de la hipersensibilidad retardada y reducción de la actividad de la

enfermedad⁸⁰. Otro ejemplo similar se experimentó con el uso de exosomas portadores de FasL como terapia para afecciones cardiovasculares⁸¹.

1.9. Vesículas extracelulares en el sistema nervioso central

La secreción de vesículas y la transferencia de material cargado en su interior, en condiciones fisiológicas del SNC, fue descrita varias décadas atrás⁸², siendo el ejemplo clásico la presencia de vesículas funcionales en la sinapsis neuronal⁸³. Sin embargo, los mecanismos involucrados y la modulación sobre la sinapsis ejercida por los astrocitos a través de la liberación de sus propias vesículas en el espacio sináptico no ha sido adecuadamente comprendida hasta estos últimos años⁸⁴.

Las VE han sido implicadas no solo en la propagación de señales, sino también en el control de la neurogénesis mediante exosomas que regulan la biogénesis de la membrana de mielina^{85,86} y en la reparación de neuronas dañadas⁸⁷. Además, un estudio reciente identificó un nuevo mecanismo de regulación de la integridad axonal mediado por VE derivadas de oligodendrocitos transferidos a neuronas⁸⁸. Respecto al origen celular de las VE dentro del parénquima nervioso central, se han descrito VE liberadas por células neurales, oligodendrocitos, neuronas, microglía, astrocitos y por células de Schwann en el sistema nervioso periférico (revisado por Lai C y Breakefield⁸⁹, Frühbeis *et al*⁹⁰ y Rajendran *et al*⁹¹). Todos estos datos demuestran que las VE desarrollan funciones necesarias para el crecimiento y función normal del sistema nervioso.

Por otro lado, las VE están implicadas en procesos ocurridos en enfermedades del SNC, transportando cargos o contenidos moleculares patológicos específicos o desarrollando funciones que producen daño potencial⁸⁹. Varios estudios han encontrado variaciones en la concentración y función de las VE circulantes en sangre periférica en enfermedades del SNC incluyendo demencia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, daño cerebral por trauma, malaria, accidente cerebrovascular, y tumores (principalmente glioblastoma) entre otros (revisado por Lai C y Breakefield⁸⁹ y Doeuvre *et al*⁹²). Para explorar estas funciones, la mayoría de los estudios enfrentan líneas primarias celulares cultivadas a suspensiones de VE analizando así los efectos de estas sobre las células, como pueden ser cambios morfológicos, proceso de fusión VE-célula, inducción de proliferación y apoptosis. Otro abordaje es analizar las VE obtenidas directamente de fluidos humanos. Para ello, la sangre periférica y el LCR son las muestras más frecuentemente estudiadas. Sin embargo, muy pocos estudios han explorado si las variaciones observadas en VE aisladas del LCR reflejan directamente la fisiopatología del SNC⁹³⁻⁹⁹ y solo un par han examinado VE derivadas de células cerebrales obtenidas en el LCR como un marcador subrogado de lo que ocurre en el SNC^{98,99}. Más allá de este conocimiento, y exceptuando las modelizaciones *in vitro*,

aún no se ha elucidado si las VE son capaces (o no) de migrar desde la sangre a través de la barrera hemato-encefálica (BHE) al SNC y viceversa¹⁰⁰. Se necesitarán más estudios para asegurar si existe un canal de comunicación mediado por VE entre los sistemas nervioso y cardiovascular.

2. Esclerosis múltiple

Las enfermedades que afectan a la mielina integran una amplia lista cuyo común denominador es la destrucción excesiva de esta o la falla en su formación. La esclerosis múltiple (EM) es el prototipo de estas enfermedades, caracterizada por la destrucción de la mielina mediada por un ataque autoinmune desplegado en el SNC y que compromete principalmente a adultos jóvenes.

La temática de esta tesis se centra en las VE y su posible aplicación clínica, tomando a la EM como eje conductor de la misma. Por lo tanto, daremos paso a una descripción actualizada de la enfermedad de manera que el lector tenga las herramientas necesarias para comprender el desarrollo de los capítulos siguientes.

2.1. Epidemiología

Se estima que hay 2,5 millones de personas que padecen EM en el mundo, siendo más de 40000 los afectados en el estado español. En Europa, la prevalencia es en torno al 0,1-0,2% de la población, esto quiere decir que hay unos 100 a 200 casos por 100000 habitantes y, la incidencia es aproximadamente de 4 a 6 cada 100000 habitantes por año, según autores^{101,102}. Como muchas de las enfermedades autoinmunes la afección es mayor en mujeres, con un ratio mujer/varón de 2,6:1¹⁰³. Su presentación clínica rara vez es antes de los 10 años de edad y luego de los 60 años, siendo en la mayoría de los casos entre los 25 y 30 años de edad¹⁰⁴.

La distribución geográfica de la EM sigue un patrón particular con un gradiente de mayor a menor incidencia desde los polos hacia el ecuador. Diversos factores se han postulado como posibles causas de este gradiente de latitud de la enfermedad, entre ellos la dieta, el estilo de vida, las infecciones, el clima, la exposición a la luz solar y el consumo de vitamina D, siendo estos dos últimos los que presentan mayor evidencia¹⁰⁵.

Es controvertido si la mortalidad está aumentada en pacientes con EM respecto a la población general. Existen varios factores que intervienen a la hora de evaluar la mortalidad en EM que según en qué medida son tenidos en cuenta, pueden generar esta falta de concordancia entre autores. Como ejemplo de estos factores citamos i) el período o “era” de tratamiento en que las

diferentes cohortes seguidas han sido analizadas (años atrás los tratamientos presentaban menor efectividad que en la actualidad) y, ii) la existencia de una mayor tasa de suicidios en la población afectada por EM (mortalidad no relacionada directamente a la EM). Aún así, de acuerdo con el estudio realizado por Sadovnick y colaboradores (en Canadá), los pacientes de EM presentan una expectativa de vida de solo 6 a 7 años menor que la población control ¹⁰⁶. Lógicamente, estas conclusiones deben ser constantemente revisadas conforme los tratamientos, cambios de estilo de vida, dieta y demás factores intervinientes modifican con rapidez la expectativa de vida.

2.2. Etiopatología inmune

La EM es una enfermedad con una compleja red de mecanismos que intervienen en su desarrollo. Por un lado hay factores predisponentes genéticos, cuyo mayor exponente es el alelo HLA clase II DRB1*15:01 con una razón de riesgo de 3,08¹⁰⁷. Además, la comunidad científica ha ido invirtiendo grandes esfuerzos en encontrar nuevos genes causales o asociados a la enfermedad, encontrándose más de 100, muchos de ellos relacionados con vías inmunológicas, pero ninguno con la fuerza que presenta el alelo de HLA citado¹⁰⁸. Por otro lado, existen factores ambientales asociados a la enfermedad que podrían actuar como disparadores en pacientes con una predisposición genética. Los que mayor fuerza de asociación presentan son la infección con el virus Epstein Barr¹⁰⁹, exposición al tabaco¹¹⁰, situación geográfica en latitudes bajas, escasa exposición solar y bajos niveles de vitamina D¹⁰⁵. Estos tres últimos factores presentan una interrelación ya que en latitudes bajas la exposición solar es menor por lo tanto la síntesis endógena de vitamina D está disminuida. Los factores ambientales podrían actuar sobre individuos con predisposición genética poniendo en marcha una reacción inmune anormal. Esta sería la tercera capa de complejidad que consiste en la desregulación del sistema inmune caracterizado por una falla en la tolerancia mediada por los linfocitos T y por una sobreproducción de autoanticuerpos, aunque en el caso de la EM aún no se haya identificado un antígeno causal (Figura 6).

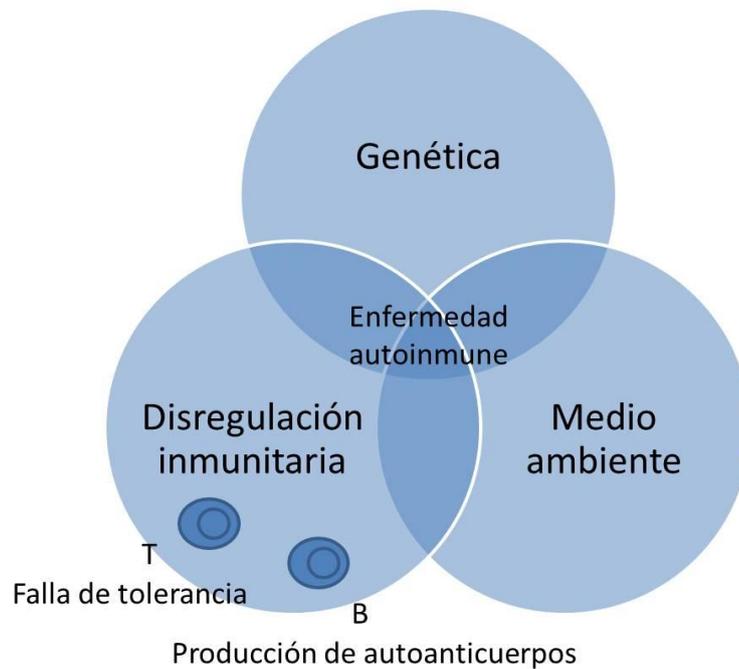


Figura 6: Factores implicados en el desarrollo de una enfermedad autoinmune. La esclerosis múltiple, aunque no posea un autoantígeno causal identificado, es considerada de causa autoinmune ya que en su patogenia intervienen factores genéticos predisponentes con desencadenantes medioambientales sobre una base de disregulación del sistema inmune.

Se alternan 3 hipótesis acerca de los mecanismos inmunitarios involucrados en la EM¹¹¹. La primera plantea la persistencia de virus latentes que, como sucede en otras enfermedades del SNC, puedan desarrollar la EM. Quizá es la que menor fuerza tiene ya que aún no se han podido aislar los virus propuestos como causales en el parénquima del SNC de pacientes y muchos de estos han sido aislados en individuos sanos que nunca desarrollaron EM¹¹². La siguiente describe el mimetismo molecular entre antígenos virales y proteínas de la mielina. Y la última sostiene que la pérdida de tolerancia hacia los antígenos de la mielina desencadenaría una respuesta autoinmune que daría lugar al daño de la mielina. Probablemente una suma de estas últimas dos pueda explicar, de manera simplificada, lo que sucede durante el desarrollo de la EM.

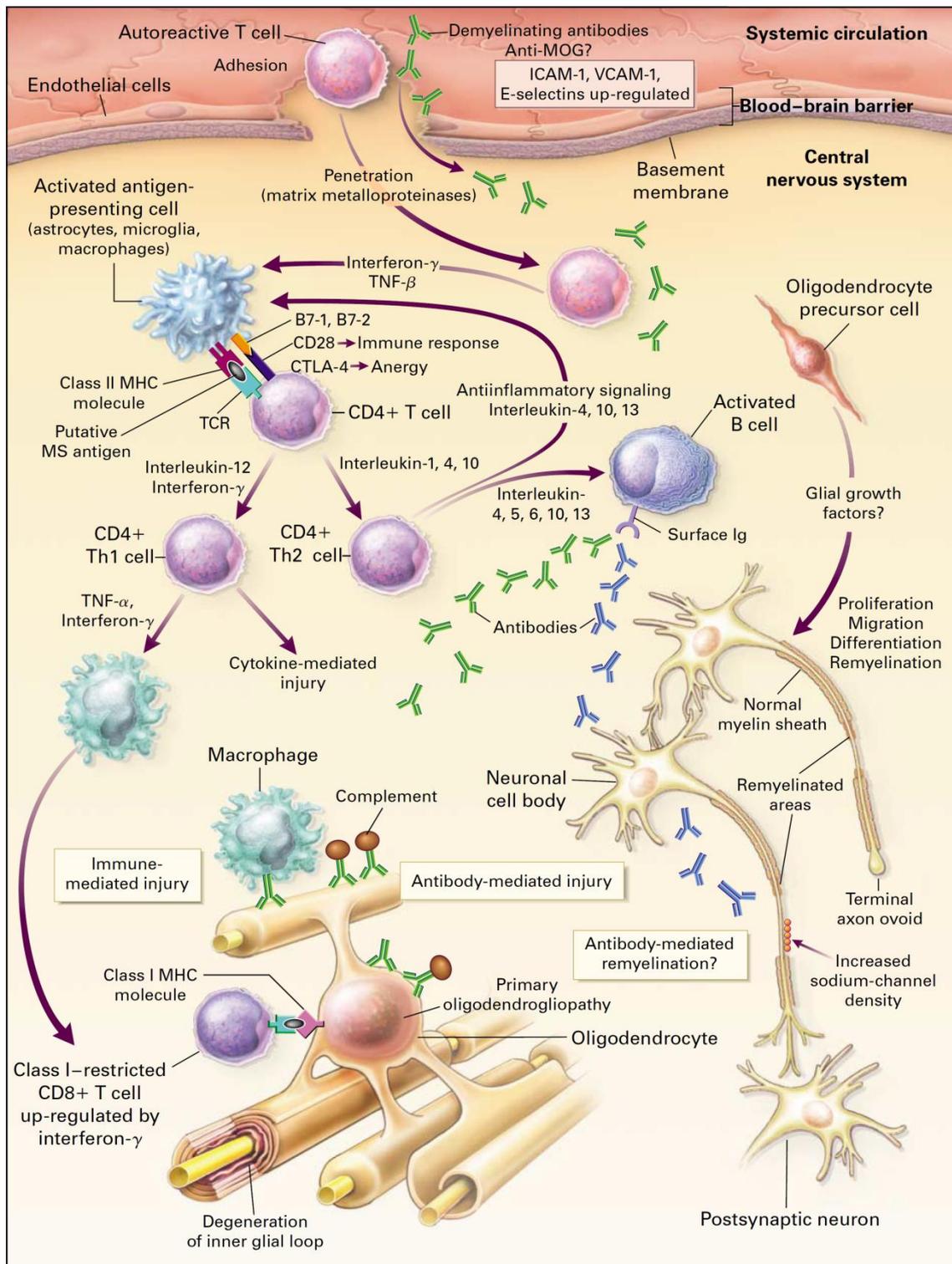


Figura 7: Posibles mecanismos de lesión y reparación en la esclerosis múltiple. Tomado de ¹¹³.

El elemento indispensable para producirse la respuesta inflamatoria autoinmune que da lugar al daño de la mielina es la migración a través de la BHE de linfocitos T autoreactivos (Figura 7). Para que esto ocurra, previamente estos linfocitos autoreactivos CD4+, que han escapado de la delección clonal del timo y presentan memoria contra antígenos de mielina, son activados fuera

del SNC, en los ganglios linfáticos, debido a reconocimiento de antígenos expresados en su superficie con patrones similares a proteínas de mielina o, por mecanismos mediados por otros linfocitos T¹¹⁴. Esta activación conlleva a una expansión clonal y producción de citoquinas que estimularan la expresión en la propia superficie del linfocito de moléculas de adhesión (VLA4, LFA1) e integrinas. Estas moléculas son las que le permite al linfocito interactuar con receptores de las células endoteliales (VCAM, ICAM) de la BHE y permitir el paso a través de ella hacia el parénquima nervioso. Los linfocitos CD8+ también cumplen un rol en esta fase, produciéndose igualmente una expansión clonal dentro del SNC, fundamentalmente en las placas de desmielinización, liberando factores quimiotácticos para atraer más linfocitos CD4+ e induciendo apoptosis a través de Fas, de neuronas y oligodendrocitos. Las proteasas, incluyendo metaloproteinasas de la matriz, producidas por macrófagos y microglía, pueden mejorar aún más la migración de células inmunes autorreactivas mediante la degradación de las macromoléculas de la matriz extracelular así como también producir daño directo a la mielina y el axón. Las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células T activadas, como IFN γ y TNF β promueven la expresión de moléculas de superficie celular en los linfocitos vecinos y CPA¹¹³. Como veremos luego, las VE participan también en el proceso de migración celular hacia el interior del SNC, probablemente como mecanismo complementario al de las citoquinas. Solo los linfocitos activados que encuentran una CPA y son entonces reactivados, serán capaces de desencadenar esta cascada de inflamación.

Dependiendo del microambiente que rodee a la sinapsis inmune entre la CPA y el linfocito CD4+, podrá conducir a la anergia por ejemplo por falta de moléculas coestimuladoras y consiguiente efecto antiinflamatorio (vía IL10) o, a una respuesta inmune aún mayor contra el antígeno unido, que es lo que sucede en el caso de desarrollarse EM. Entonces serán las citoquinas proinflamatorias (como ejemplo IL17, IL1 β , IFN γ) que desencadenarán una cascada de eventos, que resulta en la proliferación de linfocitos CD4+ T helper de tipo 1 (Th1) proinflamatorios finalizando en la lesión de la mielina y oligodendrocitos mediada inmunológicamente.

Los mecanismos de lesión de la mielina descritos son múltiples: por daño directo por citoquinas, digestión enzimática por macrófagos activados a través de citoquinas, citotoxicidad mediada por anticuerpos (a su vez estos anticuerpos pueden presentar antígenos en los centros germinales y activar otros linfocitos T perpetuando la inflamación)¹¹⁵, lesión mediada por el complemento o citotoxicidad directa mediante linfocitos CD8+¹¹⁶. La lesión acarreada sobre la vaina de mielina deja los axones al descubierto entorpeciendo la conducción nerviosa lo que resulta en la aparición de síntomas.

Sin embargo, se postula que los mismos factores presentes en el proceso de inflamación pueden ser beneficiosos para producir las señales de reparación. Además, durante la lesión se liberan factores neurotróficos como GDNF y BDNF y quimiotácticos de precursores de oligodendrocitos. No está claro cómo se produce el agotamiento de los mecanismos de reparación aunque se plantean posibilidades como pérdida de factores tróficos desde la vaina de mielina y/o consumo de precursores de oligodendrocitos. En esta etapa el daño axonal, que venía produciéndose desde el inicio de la enfermedad es ahora la característica principal de la lesión y conduce a una progresión degenerativa, que se evidenciará clínicamente como un deterioro cada vez mayor en ausencia de períodos de recuperación.

2.3. Características clínicas

Al día de hoy, la historia clínica minuciosa sigue siendo la herramienta principal para definir la EM y dividirla en sus subtipos. Recabar datos sobre inicio, forma y evolución de los síntomas, historia familiar, enfermedades (fundamentalmente autoinmunes) asociadas, es fundamental cuando estamos frente al estudio de un paciente con sospecha de padecer EM.

El cuadro clínico es muy variable, debido a la localización diversa de las lesiones dentro del SNC, aunque son más frecuentes las paraventriculares, los de la vía óptica, tronco encefálico y luego médula. Estas lesiones pueden dar origen a síntomas muy diversos, como veremos luego, pero deben cumplir el criterio de diseminación en tiempo -más de un episodio de disfunción neurológica- y espacio -más de una lesión en zonas distintas del SNC- para considerar su diagnóstico, siempre después de haber descartado otras enfermedades. A su vez, la evolución de la enfermedad se caracteriza por presentar exacerbaciones de los síntomas, llamados brotes, seguidos de períodos de aparente normalidad, al menos con evidencia clínica, llamada remisión. Los brotes se consideran a los síntomas (excluyendo fiebre o los derivados de trastornos metabólicos) que duran más de 24 h y se pueden evidenciar sin métodos auxiliares, y para objetivar dos brotes, estos deben estar separados entre sí por lo menos en un mes. Por otro lado puede existir evidencia de una lesión sin llegar a ser manifestada clínicamente, observándose mediante resonancia magnética o potenciales evocados.

Al inicio de la sintomatología se observan alteraciones sensitivas (presentes en el 45%) tales como parestesias o hipoestusias y motoras (presente en el 40%) que van desde pérdida de fuerza, fundamentalmente distal de extremidades hasta paresias francas o hemiplejías¹¹⁷. Sin embargo, un 25 % de los pacientes comienzan con afecciones ópticas, en forma de neuritis, con dolor y pérdida de la agudeza visual central, de rápida evolución hacia la pérdida parcial o total de la visión. A las dos semanas del inicio de los síntomas comienza la etapa de recuperación, en la que

disminuye gradualmente la sintomatología hasta desaparecer por completo o quedando a veces secuelas. También la EM puede iniciarse con compromiso medular en forma de mielitis transversa aguda o cuadros de inestabilidad de la marcha (ataxia) que reflejan el compromiso cerebeloso. Aquellos que presentan afección del tronco cerebral pueden manifestarse con diplopía por parálisis del músculo recto interno del ojo (compromiso del III par craneal), disartria o disfagia (pares IX, X y XII). Otro síntoma común al inicio y presente en forma recurrente en el curso natural de la EM es la fatiga, que se exacerba con el calor o cambios bruscos de temperatura. Suele acompañar al período del diagnóstico de la enfermedad un estado de depresión que puede extenderse variablemente con el curso de la enfermedad. También son frecuentes los signos de afección cognitiva¹¹⁸.

Los pacientes que solo manifiestan un brote clínicamente demostrado sin objetivarse nuevos episodios, denominados “síndrome clínico aislado”, no se consideran afectados de EM hasta no evidenciarse un segundo brote, una progresión continua y crónica de su enfermedad o soporte en imagen de diseminación temporal. Según el último estudio publicado en 2015, que analiza la cohorte más grande de pacientes con síndrome clínico aislado, un 60 % de estos se convierten a EM¹¹⁹.

La evolución de la EM es variable y según el patrón que presente se clasifica en 4 formas¹¹⁸(Figura 8):

- Recurrente remitente (EMRR): el 80-90% de los pacientes presentan esta forma, caracterizada por aparición de brotes separados por períodos de remisión que pueden ser de pocos meses a años. La discapacidad remanente luego de cada brote es poca debido a que aún existen mecanismos de reparación del daño de la mielina. La frecuencia de los brotes se considera de 0,9/año.
- Secundaria progresiva (EMSP): tras un período variable, entre 10 a 15 años, un 50% de los pacientes EMRR pueden pasar a una etapa progresiva, caracterizada por un incremento continuo en la discapacidad, debido a una degeneración axonal.
- Primaria progresiva (EMPP): un grupo menor de pacientes (10-20%) presenta desde el inicio una evolución tórpida, con avance rápido de la discapacidad en forma continua, durante al menos 6 meses (o 12 meses según autores), sin identificarse brotes agregados, ni momentos de remisión. Puede haber períodos de estabilización. Esta forma suele darse en pacientes que debutan con la enfermedad a mayor edad, cercano a los 40 años.
- Progresiva recurrente (EMPR): esta forma (5%) se caracteriza por la progresión desde el comienzo de la enfermedad, sobre la cual se superponen brotes agudos, con posterior

recuperación de estos, pero es característica la progresión continua durante los períodos de remisión inter brotes.

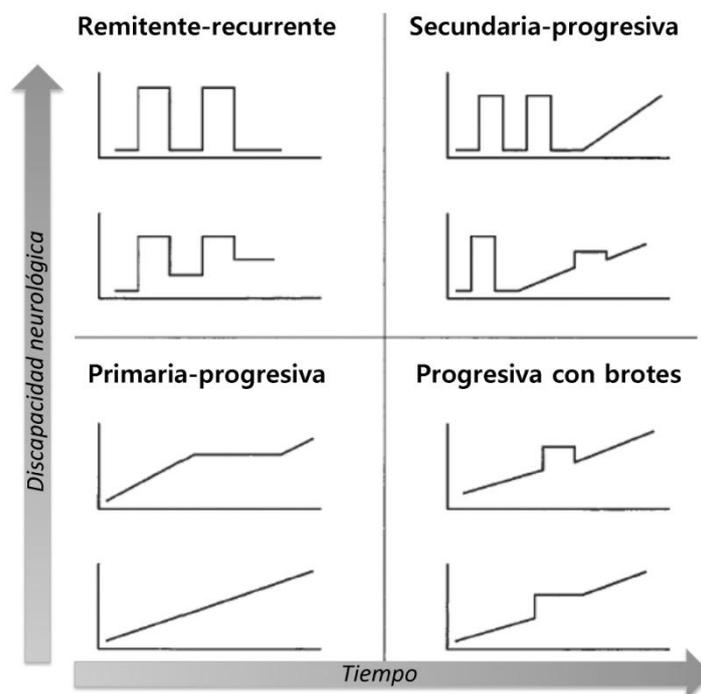


Figura 8: Formas evolutivas de la EM.

Algunos autores sostienen que la clasificación presentada arriba no provee adecuada información temporal sobre el curso que tiene la enfermedad. En su lugar, proponen otro tipo de clasificación basada en la tasa de brotes y observaciones en la resonancia, definiendo enfermedad activa versus no activa, progresiva versus no progresiva y empeoramiento de la enfermedad¹²⁰.

Con el curso de la enfermedad, las manifestaciones clínicas más frecuentes pasan a ser las motoras (90%) seguidas de las sensitivas (77%) y cerebelosas (75%), manteniéndose en forma variable los demás síntomas (cognitivos, depresión, dolor, fatiga, etc.)¹¹⁷.

2.4. Diagnóstico y biomarcadores

El diagnóstico de la EM es clínico con ayuda de pruebas complementarias con lo que se han creado unos criterios diagnósticos denominados de Mc Donald, como guía consenso¹²¹. Las pruebas complementarias comprenden la resonancia magnética, en la que deben observarse imágenes con captación de gadolinio, los potenciales evocados y el estudio de las bandas oligoclonales (BOC). Este último, además de considerarse dentro de los criterios diagnósticos,

también se ha postulado como biomarcador pronóstico, debido a que los pacientes con el subtipo IgM positivo se han relacionado con una evolución más agresiva que aquellos con el subtipo IgM negativo¹²². La dificultad para realizar el diagnóstico es tal que puede demorarse hasta 4 a 5 años para establecerlo. Asimismo esto se pone de manifiesto en que los criterios diagnósticos están en constante revisión¹²⁰. Los criterios buscan la evidencia de la diseminación de las lesiones tanto en tiempo como en espacio, combinando los hallazgos clínicos con los resultados positivos de resonancia magnética, la presencia de BOC y potenciales evocados alterados. Comentábamos anteriormente que antes de certificar la afección de un paciente con EM se deben descartar otras enfermedades que puedan dar similares síntomas, sean de causa desmielinizante o no, o que dan imágenes semejantes en la resonancia magnética, así como las que pueden dar BOC positivas.

Con el objetivo de mejorar la velocidad y precisión en el diagnóstico, una importante línea de investigación en la EM se centra en la búsqueda de biomarcadores novedosos, tanto diagnósticos como pronósticos. Las características de un buen biomarcador son: específico, robusto, reproducible y preciso. En el año 2012, Derfuss revisó aquellos biomarcadores para la EM que permitan un manejo más personalizado de la enfermedad, clasificándolos según su utilidad diagnóstica, pronóstico o para monitorización de tratamientos y por otro lado en establecidos y potenciales (Tabla 1)¹²³. Como conclusión, el autor hacía especial hincapié en la necesidad de nuevos biomarcadores más específicos.

Tabla 1: Biomarcadores establecido y potenciales para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la EM.

| Established biomarkers | Diagnosis | Prognosis | Treatment response/side effects |
|---|-----------|-----------|---------------------------------|
| Cerebral spinal fluid-specific oligoclonal bands | + | (+) | - |
| Intrathecal immunoglobulin production | + | (+) | - |
| Intrathecal anti-viral immunoglobulin production | + | - | - |
| Magnetic resonance imaging | + | (+) | (+) |
| Neutralizing antibodies against beta-interferon | - | - | (+) |
| Neutralizing antibodies against natalizumab | - | - | + |
| Antibodies against JC virus | - | - | + |
| Aquaporin 4 antibodies | + | (+) | (+) |
| Potential biomarkers | | | |
| CD56 bright natural killer cells | - | - | (+) |
| Cytokines/chemokines | - | - | (+) |
| Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies | (+) | - | - |
| Intrathecal/oligoclonal immunoglobulin M production | - | (+) | - |
| Transcriptomics | - | - | (+) |
| Genetics | (+) | (+) | (+) |

+ valid biomarker that is used in clinical practice; (+) there is experimental and clinical evidence for this biomarker, but the need for more clinical data; - there is no clear evidence.

Tomado de ¹²³.

En el año 2015, Teunissen y colaboradores publicaron una revisión separando del mismo modo a los biomarcadores por diagnóstico, pronóstico, progresión a EMSP y EMPP, monitorización de tratamiento, diagnóstico diferencial entre EM y neuromielitis óptica¹²⁴. Las tablas presentadas se

solapan parcialmente con la de Derfuss, aunque en esta versión más actualizada se incluyen algunos nuevos biomarcadores (Figura 9).

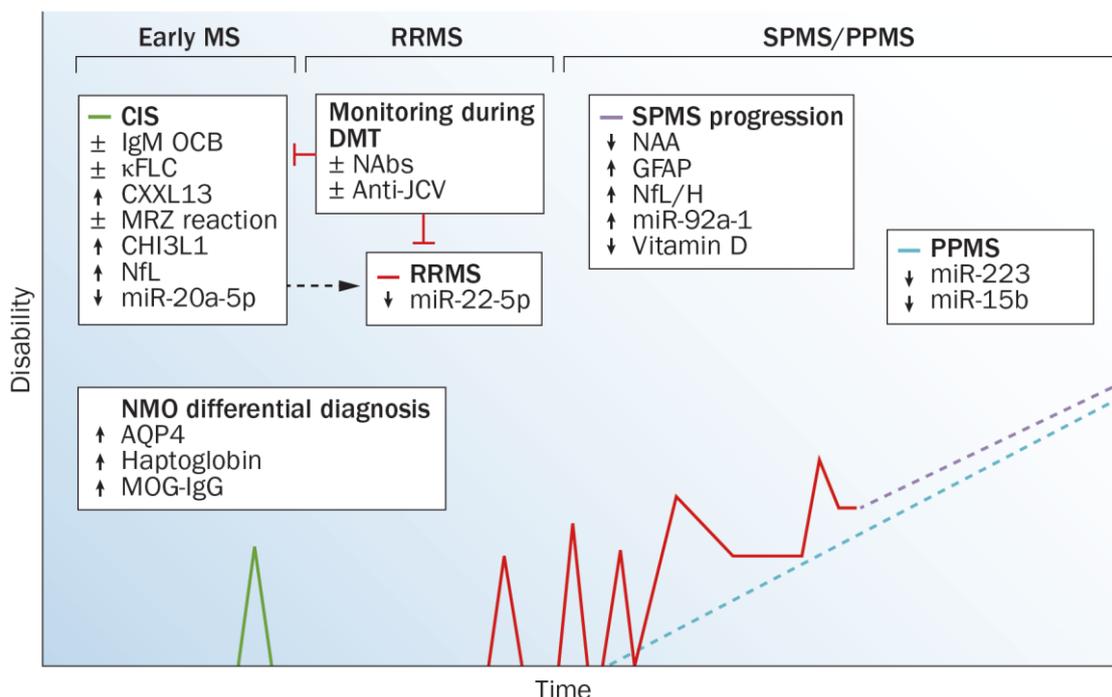


Figura 9: Biomarcadores asociados a las diferentes fases clínicas de la EM. Esta visión general muestra como los biomarcadores analizados en la revisión realizada por Teunissen se relacionan con estadios clínicos específicos de la EM. Las flechas indican los cambios de expresión en la EM. ± indica que el anticuerpo puede estar tanto presente como ausente. Abreviaturas: κFLC, cadenas ligeras libres κ; AQP4, aquaporina 4; CHI3L1, proteína tipo quitinasa 3 1; CIS, síndrome clínicamente aislado; CXCL13, quimioquina de motivo C-X-C 13; DMT, terapia modificadora de la enfermedad; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; KIR4.1, canal de potasio; miR, microARN; MOG-IgG, IgG contra la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos; MS, esclerosis múltiple; MRZ, sarampión-rubéola-varicela zoster; NAA, N-acetil aspartato; NAbs, anticuerpos neutralizantes (contra IFN-β o natalizumab); NfL / H, neurofilamentos de cadena liviana/pesada; NMO, neuromielitis óptica; OCB, bandas oligoclonales; PPMS, EM primariamente progresiva; EMRR, EM remitente-recurrente; EMSP, EM secundaria progresiva. Tomado de¹²⁴.

La lista de biomarcadores en EM está en continuo crecimiento aunque durante el proceso de validación (Figura 10) muchos de estos terminan siendo desechados por no cumplir de alguna u otra forma, las características mencionadas anteriormente.

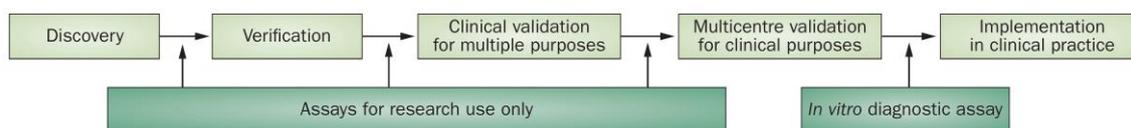


Figura 10: Representación esquemática del proceso de desarrollo de los biomarcadores. Las cajas de color verde claro indican los pasos a seguir, las cajas de color verde oscuro indican el tipo (y calidad) de los ensayos que se utilizan normalmente. Los tres primeros pasos se pueden realizar rápidamente (en un par de años), pero el proceso completo de aplicación clínica lleva generalmente más de 20 años. Tomado de¹²⁴.

Finalmente, otra herramienta de monitorización, en este caso, del pronóstico, es la aplicación de la escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS, del inglés: *Expanded Disability Status Scale*) la cual evalúa las capacidades del paciente en 8 áreas neurológicas (piramidal, cerebral, cerebelar, ocular, etc.) dando una puntuación desde cero, que equivale a un paciente asintomático hasta diez, que refiere a muerte por EM (Figura 11). Esta escala combinada mediante un algoritmo matemático, con la duración de la enfermedad dio lugar a la escala de severidad de EM (MSSS, del inglés: *MS Severity Scale*) la que permite evaluar la progresión de la enfermedad¹²⁵.

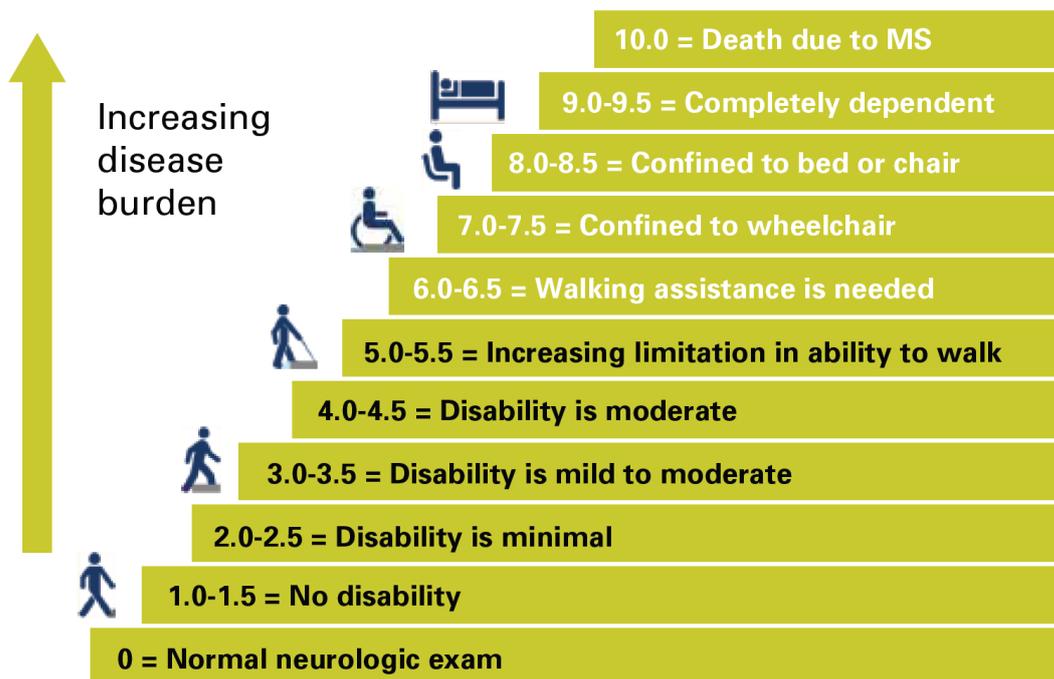


Figura 11: Progresión de la discapacidad en esclerosis múltiple, evaluada con la escala EDSS. Tomado de ¹²⁶.

2.5. Tratamientos

El tratamiento de la EM comprende 3 grupos de terapias:

- La específica para los brotes: aunque no todas las exacerbaciones requieren tratamiento, hay evidencia de que los síntomas se resuelven más rápido y en forma más completa con el uso de corticoides intravenosos (preferentemente metilprednisolona) o vía oral (prednisona) durante 3 a 5 días, con posterior pauta descendente durante 2 a 3 semanas¹²⁷.
- La sintomática: esta incluye el soporte fisioterapéutico y kinesiológico así como el uso de fármacos para combatir la fatiga, espasticidad, depresión, dolor, problemas cognitivos, disfunción vesical y sexual, entre otros. Estos síntomas no se modifican con la terapia

modificadora de la enfermedad por lo que su persistencia provoca finalmente un importante impacto en la calidad de vida ¹²⁶. En el año 2010, la *Food and Drug Administration* aprobó el uso de dalfampridina (o fampridina), siendo un fármaco seguro y con buenos resultados en la mejoría de la marcha, que es uno de los síntomas que más discomfort produce al paciente ¹²⁸.

- La modificadora de la enfermedad (conocida por sus siglas en inglés DMT o DMD: *Disease Modifying Therapy o Drug*): Este grupo de fármacos se subdivide en i) inmunosupresores, destinados a las fases progresivas o EMRR agresivas, aunque su uso es cada vez más limitado sobre todo por sus significativos efectos no deseados e ii) inmunomoduladores, cuyos efectos secundarios son menos perjudiciales. La producción de nuevos fármacos inmunomoduladores es probablemente en la actualidad la línea de investigación con más presencia en forma global en la EM.

El principal objetivo de las terapias inmunomoduladoras en la EM es la desaparición de los brotes o exacerbaciones. El grupo comprende fármacos ya aprobados y en uso comercial, como los dos tipos de IFN β (1a y 1b), acetato de glatirámero, natalizumab, fingolimod y teriflunamida y nuevos candidatos en diversas fases de experimentación, destacándose el alemtuzumab, daclizumba, laquinimod, ocrelizumab y dimetil fumarato. La [Tabla 2](#), muestra las principales características de las terapias modificadoras de la enfermedad, actualizada al año 2013. Alguno de estos fármacos están a su vez siendo estudiados para fases progresivas de la EM, como el caso de ocrelizumab para EMPP y fingolimod para EMSP ¹²⁹. Además de los citados en la tabla, en este par de años se han sumado algunos fármacos más (todos anticuerpos monoclonales) que ya están en fase II, como vatelizumab (anti VLA-2), BIIB033 (anti LINGO-1), secukinumab (anti IL17A), ofatumumab (anti CD20) y otro en fase III, siponimod (anti esfingosina 1-posfato)¹²⁹.

Tabla 2: Terapias modificadoras de la enfermedad.

| Agent | Mechanism | Dose/Route | Frequency | Adverse Effects (most common and concerning) | Place in Therapy |
|----------------------------|---|---|--|---|---|
| Approved by the FDA | | | | | |
| Interferon beta-1a | Decreases MHC-II expression, upregulates IL-10, and decreases Th1 and Th17 production | 30 mcg, IM | Once weekly | Flu-like symptoms, depression, thyroid dysfunction, liver enzyme abnormalities | First-line therapy for RRMS, SPMS, PRMS, and CIS; slow/delay disability |
| Interferon beta-1a | Decreases MHC-II expression, upregulates IL-10, and decreases Th1 and Th17 production | 44 mcg, SC; typical dose | Three times per week | Skin site reactions, flu-like symptoms, depression, thyroid dysfunction, liver enzyme abnormalities | First-line therapy for RRMS, SPMS, PRMS; slow/delay disability |
| Interferon beta-1b | Decreases MHC-II expression, upregulates IL-10, and decreases Th1 and Th17 production | 250 mcg, SC; typical dose | Every other day | Skin site reactions, flu-like symptoms, depression, thyroid dysfunction, liver enzyme abnormalities | First-line therapy for RRMS, SPMS, PRMS, and CIS |
| Glatiramer acetate | Consists of antigen-presenting cells, which present to lymphocytes, and limits ability of lymphocytes to respond to myelin basic protein | 20 mg, SC | Daily | Skin site reactions, immediate post-injection reaction, lipatrophy | First-line therapy for RRMS and CIS |
| Fingolimod | Sphingosine 1-phosphate receptor modulator, retains lymphocytes in the lymph nodes, preventing them from crossing the blood-brain barrier into the central nervous system and causing consequent damage | 0.5 mg, oral | Daily | First degree AV block with first dose (rare), bradycardia, macular edema, shingles, pulmonary dysfunction, skin cancer, back pain | First- or second-line therapy for RRMS, SPMS, and PRMS |
| Mitoxantrone | Inhibits topoisomerase II to prevent lymphocyte proliferation | 12 mg/m ² , IV; typical dose | Every 3 months, up to 140 mg/m ² cumulative lifetime dose | Hair loss, cardiotoxicity, leukemia, infertility, infection risk, leucopenia, anemia, nausea, vomiting, thrombocytopenia | Second-line therapy for SPMS, PRMS, and worsening RRMS |
| Natalizumab | Blocks α 4 integrins, which inhibits adhesion and migration of leukocytes into the brain | 300 mg, IV | Every 4 weeks | Transient headache, fatigue, recurrent UTIs, PML, hypersensitivity | Second-line therapy for RRMS, SPMS, and PRMS |
| Teriflunomide | Pyrimidine synthesis inhibitor, inhibits a key enzyme in lymphocytes—which reduces the proliferation of T and B cells, and T cell messaging. | 7 mg or 14 mg, oral | Once daily | Nasopharyngitis, headache, diarrhea, fatigue, back pain, influenza, hair thinning, LFT elevation, nausea, UTI | Second-line therapy for RRMS and SPMS |
| Investigational | | | | | |
| Alemtuzumab | Humanized monoclonal antibody that binds to CD52 on lymphocytes and monocytes and results in prolonged T-cell depletion | 12 mg, IV | Daily for 5 consecutive days, followed by daily for 3 consecutive days 12 months later | Immune thrombocytopenic purpura, autoimmune thyroid problems, headache, flushing | Phase 3 studies |
| Daclizumab | Humanized monoclonal antibody that binds to CD25 and increases CD56 bright natural killer cells, which target activated immune cells | 150 mg, SC | Every 2 weeks | Infusion reaction, skin rash, lymphadenopathy, LFT abnormalities, diarrhea, constipation | Phase 3 studies |
| Dimethyl fumarate (BG-12) | Anti-inflammatory and potential neuro-protective properties mediated through the Nrf2 pathway | 240 mg, oral | Two times daily | Diarrhea, cramps, LFT elevation, nausea, flushing | Phase 3 studies |
| Laquinimod | Reduces inflammation, demyelination, and axonal loss | 0.6 mg, oral | Daily | LFT elevation | Phase 3 studies |
| Ocrelizumab | Humanized anti-CD20 monoclonal antibody that results in B-cell depletion | 600 mg, IV | Every 24 weeks | Systemic inflammatory response, infusion reactions | Phase 3 studies |

AV indicates atrioventricular; CIS, clinically isolated syndrome; FDA, US Food and Drug Administration; IL, interleukin; IM, intramuscular; IV, intravenous; LFT, liver function test; MHC, major histocompatibility complex; MS, multiple sclerosis; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy; PRMS, progressive-relapsing MS; RRMS, relapsing-remitting MS; SC, subcutaneous; SPMS, secondary-progressive MS; TH, T helper; UTI, urinary tract infection.

Actualizado al año 2013. Tomado de ¹²⁷.

Haremos una breve explicación del mecanismo de acción de dos de los últimos inmunomoduladores aprobados, dado que serán luego estudiados en relación a las VE.

En el año 2006 se aprobó el uso de natalizumab para la EM, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante. Actúa como inhibidor selectivo de moléculas de adhesión uniéndose a la subunidad α 4 de las integrinas humanas que están abundantemente expresadas en la superficie de todos los leucocitos, excepto los neutrófilos. En particular, se une a la α 4- β 1

integrina, bloqueando la interacción con su receptor análogo, la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1). La alteración de estas interacciones moleculares evita la migración de leucocitos mononucleares a través del endotelio hacia el tejido inflamado del parénquima¹³⁰.

El siguiente es fingolimod (FGM), el primer inmunomodulador oral para la EM aprobado en el año 2010 por la *Food and Drug Administration* (en Europa se aprobó al año siguiente y solo se emplea como fármaco de segunda línea). Su mecanismo de acción es bloquear la salida de los linfocitos T vírgenes y memoria central desde los ganglios linfáticos, quedándose arrestados sin posibilidad de salir a la circulación. Por lo tanto, FGM disminuye la presencia de estos linfocitos con capacidad autoreactiva en el SNC, siendo un mecanismo crucial para frenar el proceso inflamatorio de la EM. Es particularmente llamativo su efecto inmediato en la redistribución de estos subtipos de linfocitos en los primeros días e incluso horas¹³¹. Aparte de los efectos mencionados anteriormente, FGM es un inhibidor específico de la esfingomielinasa, que como veremos luego, es una enzima que controla la producción de vesículas¹³².

La acción del fármaco se produce por la internalización de 4 de los 5 receptores de esfingosina 1-fosfato, mediada por la unión del FGM a ellos. Estos receptores también están presentes en otros tejidos aparte de los linfocitos nombrados, con una densidad importante en cardiomiocitos por lo que uno de sus efectos adversos manifestado en forma de bradicardias que pueden llegar hasta bloqueos auriculo-ventriculares se debe justamente a la unión de FGM a los receptores de esfingosina allí presentes. Para ello tras la ingesta de la primera dosis, es necesaria la monitorización cardíaca en cuidados intensivos durante al menos 6 horas.

En forma alternativa a este tipo de fármacos inmunomoduladores, y con un objetivo centrado en la recuperación de la capacidad de remielinización, se están investigando tratamientos basados en células madre¹³³, depleción de linfocitos de memoria¹³⁴ o encapsulamiento de diversas moléculas (incluyendo miRNA) con efectos direccionados hacia el tejido nervioso, como veremos al final de esta introducción.

3. Vesículas extracelulares en la esclerosis múltiple

Mencionábamos en el apartado de aplicación clínica que la concentración de VE se ha relacionado con el nivel inflamatorio en algunas enfermedades autoinmunes, renales y cardiovasculares entre otras. La EM como enfermedad autoinmune también ha sido motivo de análisis demostrándose cambios en las VE circulantes según su estadio clínico y se han propuesto hipótesis de su rol en la migración a través de la BHE, mediante modelización *in vitro*. Los objetivos que han movido este

tipo de investigación en EM han sido por un lado comprender con más profundidad las vías inmunológicas implicadas en la enfermedad y en los efectos del tratamiento, así como avanzar en la búsqueda de posibles biomarcadores clínicos y de tratamiento.

3.1. Promoción de la migración celular a través de la barrera hemato-encefálica

Uno de los procesos necesarios para el establecimiento de la EM es la migración transendotelial de los leucocitos al SNC a través de la BHE. Esta migración se ve favorecida por un debilitamiento de la barrera. El hecho de que este mecanismo es fundamental para la patogénesis de la MS se demuestra por los beneficios observados con natalizumab, que bloquea la entrada de leucocitos en el SNC¹³⁵. Algunas citoquinas proinflamatorias tales como TNF α , IFN γ e IL1 β , liberadas por las células inflamatorias, median en la ruptura de la BHE regulando positivamente la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, E-selectina, y PECAM-1)¹³⁶, promoviendo la pérdida de integridad de las uniones intercelulares¹³⁷ y facilitando la liberación de VE derivadas de células endoteliales (VEE)¹³⁸. Estas VEE de células endoteliales de la BHE y otras VE liberadas de células del microambiente (leucocitos [VEL], plaquetas [VEP], microglía [VEMi] y astrocitos) son vectores de numerosos agentes transportados en el interior de estas vesículas o unidos a su membrana plasmática. La presencia de metaloproteasas en el cargo de las VE sugiere que pueden participar en la degradación de la matriz extracelular implicada en la disrupción de la BHE^{139,140}. Por otra parte, se ha demostrado que la caspasa 1 transportada por VE secretadas por monocitos y microglía regula la actividad proteolítica de las metaloproteasas en las células endoteliales^{141,142}.

Minagar *et al* hipotetizaron que el plasma de pacientes con EM contiene factores que pueden inducir la activación endotelial, como se sugiere por la liberación de VEE CD31+ EEV del cultivo de células endoteliales microvasculares –un modelo de BHE- tratado con plasma de pacientes tanto en brote como en remisión¹³⁸. Después de este estudio inaugural, Jy *et al* demostraron que las VEE aisladas de plasma de pacientes son capaces de interactuar y formar complejos con monocitos e inducir su activación¹⁴³. Estos monocitos activados expresan la integrina Mac-1, que es un receptor de ICAM-1. La unión de Mac-1 de monocitos con ICAM-1 de las células endoteliales desempeña un papel importante en la migración transendotelial de estas células. Además, los linfocitos T activados liberan VE que contienen la quimiocina CCL5 y ácido araquidónico, responsables de promover el reclutamiento de monocitos y de la regulación positiva de ICAM-1 en las células endoteliales y LFA1 y Mac-1 en monocitos¹⁴⁴. En resumen, estos datos sugieren que las VEE liberadas por células endoteliales activadas en pacientes con EM promueve la migración de monocitos y linfocitos a través de la BHE y ayuda a la formación de lesiones desmielinizantes. Una validación de esta hipótesis se realizó en un elegante experimento realizado por Jiménez *et*

a/: los autores investigaron la migración transendotelial de los monocitos utilizando el modelo de BHE señalado anteriormente, añadiendo plasma de pacientes con EM en remisión o brote y de controles, encontrando que sólo el plasma de pacientes en brote promovía en forma significativa la migración transendotelial ¹⁴⁵. La **Figura 12** ofrece un resumen gráfico de este apartado.

En cuanto a las VEP en EM, se observó que la P-selectina contenida en este subtipo de VE era capaz de unirse a las moléculas de PSGL-1 y PECAM-1 de linfocitos mediante el aumento de la expresión de integrinas tales como $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), promoviendo la unión de estas células al endotelio ¹⁴⁶. Curiosamente, este epítipo es la diana de natalizumab, una de las terapias inmunomoduladoras para la EM remitente recidivante.

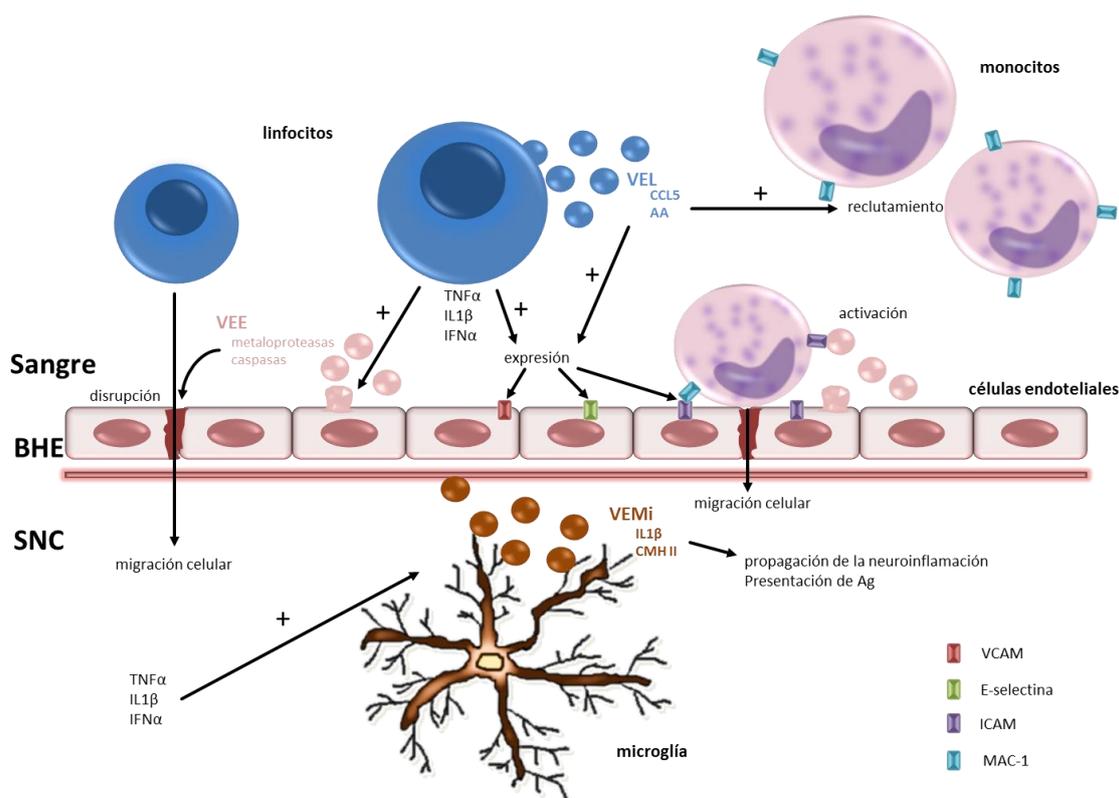


Figura 12: Funciones patológicas de las VE en la EM. Las VE están implicadas en la migración transendotelial de linfocitos y monocitos y la propagación de la neuroinflamación. Las metaloproteasas transportadas por VE derivadas de endotelio (VEE) promueven la disrupción de la BHE. La liberación de citoquinas proinflamatorias a partir de linfocitos aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales lo que facilitan la adhesión celular. En el compartimento del sistema nervioso central (SNC), la microglía juega un papel clave en la propagación la neuroinflamación, a través de la liberación de sus VE (VEMi) cargadas con IL1b y CMH II. BHE: barrera hematoencefálica; AA: ácido araquidónico; VEL: VE derivada de leucocitos.

3.2. Diseminación de la inflamación en el parénquima nervioso

En el año 2012, un interesante artículo publicado por Verderio y colaboradores identificaron VE de origen neural analizando en profundidad el LCR de humanos y ratones, tanto sanos como de EM/EAE ⁹⁹. Existen varios tipos de células cerebrales incluyendo neuronas, astrocitos y células

microgliales que son capaces de liberar VE. Los macrófagos periféricos están prácticamente ausentes en el parénquima cerebral sano lo que sugiere que las VEM obtenidas en el LCR derivan de la microglía residente en el cerebro normal. Este grupo también reveló que células de la microglía acumulan y liberan VE que contienen IL1 β y CMH-II por lo que concluyen que las VE producidas a partir de células mieloides reactivas pueden propagar la neuroinflamación y proporcionar una ruta eficiente para la rápida difusión y presentación de antígenos.

3.3. Funciones de las VE descritas en la encefalitis autoinmune experimental

Con el propósito de esclarecer más el rol de las VE en un sistema complejo que se asemeje a lo ocurrido en un paciente, estudios recientes se han volcado a investigar las VE en el modelo animal de la EM, llamado encefalitis autoinmune experimental (EAE). El primero de estos estudios publicado por Gatson *et al* analizaron las VE (exosomas en este caso) en ratones con EAE a finales de la gestación y lo comparó con los ratones vírgenes EAE¹⁴⁷. Los resultados mostraron que la concentración de VE obtenidas de suero de los ratones al final de la gestación era mayor que la de aquellos aislados de ratones EAE vírgenes. También se exploró la proliferación de linfocitos T derivados de esplenocitos en presencia de suero completo, VE purificadas y suero depletado de VE. Las tres fases derivadas de ratones EAE preñadas fueron significativamente más supresoras de la proliferación de células T que las VE procedentes de animales vírgenes o células cultivadas sin ningún tipo de VE. Sobre la base de estos hallazgos, los autores concluyeron que las VE son responsables de la modulación inmune durante la gestación en el modelo EAE. Un estudio posterior por el mismo grupo analizó esta modulación inmune demostrando una reducción en la producción de IFN γ y en la expresión de Tbet (factor de transcripción para el cambio hacia linfocitos Th1) en células T expuestas a VE aisladas de ratones en gestación. Adicionalmente, estos investigadores demostraron el efecto de las VE de ratones en gestación sobre la migración de las células precursoras de oligodendrocitos a áreas de lesión en la EAE y su posterior maduración¹⁴⁸. Esta es la primera publicación que denota un papel protector de las VE en la EM/EAE.

Toda esta evidencia respalda la idea de que las VE están involucradas en la EM cumpliendo un rol patológico, actuando como agentes inmunomoduladores en la disrupción de la BHE y la propagación de la inflamación del parénquima, pero que, por otra parte, según el contexto o ambiente pueden contribuir a la reparación de lesiones desmielinizantes.

3.4. ¿Son las VE biomarcadores fidedignos de la esclerosis múltiple?

Como se señaló anteriormente, la asociación entre la concentración de VE y la condición patológica de los pacientes con EM está claramente establecida. El siguiente reto es desarrollar la

aplicación de la VE como biomarcadores útiles: además de proveer información relevante sobre la enfermedad, las VE son fáciles de procesar y a un bajo costo, por lo tanto su uso podría extenderse a grandes poblaciones de estudio. Sin embargo, claramente, la adopción de las VE como biomarcadores debe basarse en una evaluación objetiva de su potencial diagnóstico y/o de seguimiento de la enfermedad. En el caso de la EM, las mediciones de VE deben correlacionarse con el juicio clínico del neurólogo, con las escalas establecidas y con los resultados de otras pruebas complementarias como la resonancia magnética. Varios estudios expuestos en los párrafos que siguen se han ocupado de estas cuestiones, pero debemos señalar que los resultados son variados, a veces inconsistentes, dependiendo del tipo de VE (MP/MV o exosomas), su origen celular, los métodos empleados y los análisis realizados.

3.4.1. Concentración de VE y estadio clínico

La relación entre los recuentos de VE en el plasma y el estado de EM fue propuesto por primera vez por Minagar *et al* hace más de una década ¹³⁸. Sus resultados revelaron que las concentraciones de VEE CD51+ estaban elevadas tanto en brote y remisión, mientras que las VEE CD31+ sólo se incrementaban durante el brote, en comparación con los controles sanos. Los autores propusieron que el aumento de VEE CD51+ estaba relacionado con la inflamación crónica debido a la erosión endotelial y posterior exposición de la matriz subendotelial, y que las VEE CD31+ reflejan el daño endotelial agudo. Esto se probó *in vitro* reproduciendo los resultados sólo parcialmente. En conjunto, los datos apuntaban a la existencia de factores presentes en el plasma de pacientes con EM pero ausentes en el modelo *in vitro*, tales como leucocitos activados atraídos durante las exacerbaciones, que eran capaces de regular la liberación de VEE. Los autores también describieron una concordancia entre la concentración de VEE CD31+ y las lesiones gadolinio positivas halladas en las resonancias. Afirmaron que estas vesículas eran tan sensibles como las imágenes gadolinio positivas para detectar la actividad de la enfermedad, y también que una disminución en el recuento de las vesículas podrían preceder a una negativización de hallazgos de la resonancia. Sin embargo, esto fue criticado por ser una especulación prematura y no apoyada por pruebas suficientes ¹⁴⁹.

En la misma línea de investigación, tres años más tarde Jy *et al* exploraron si las VEE CD54+ y CD62E+ podían unirse a leucocitos tanto *in vitro* como en sangre completa de pacientes con EM y controles ¹⁴³. Su principal conclusión fue que las VEE CD54+ forman complejos con los monocitos en un ambiente de TNF α y a su vez los activan. Los complejos VEE CD62E+-monocitos eran más numerosos durante las exacerbaciones que en remisión mientras que el número de complejos de VEE CD54+-monocitos se mantenían sin cambios, lo que sugería que el primero sería un marcador

más sensible para el seguimiento de la EM. Además los autores propusieron que la medición de ambos complejos de VEE-monocitos tomados como una sola fracción compleja de VEE-monocitos parecía ser más sensibles a los brotes de EM que las lesiones gadolinio positivas en resonancia, e incluso más sensible que el análisis de VEE CD31+ estudiado en su trabajo anterior. Por último, las VEE circulantes libres (no unidas a las células) que llevan CD62E permitieron una mejor discriminación de la actividad de la enfermedad (pacientes en brotes vs. remisión) que las VEE CD54+, pero no en comparación con las reportadas previamente CD31+.

Por el contrario, un año después, Jiménez *et al* explorado las VEE circulantes libres CD54+ y CD62E+ *in vitro* demostró un aumento en ambos marcadores durante el brote y valores normales, similares a controles sanos, en remisión¹⁴⁵. El análisis de VEE solamente en pacientes en brote, mostró un aumento significativo de la concentración de los fenotipos CD54+ y CD62E + comparado con el fenotipo CD31+, indicando que eran más sensibles (*in vitro*) para la identificación del estadio de EM.

Tal como se discute en el artículo referencial de la ISEV de Witwer *et al*, actualmente los estudios de EV son muy heterogéneos, siendo atribuible a la falta de métodos estandarizados⁴³. Posiblemente esto subyace en los resultados variados descritos aquí, sobre todo con respecto al trabajo anterior de Jy y colaboradores.

Además de VEE, se han explorado VE de otros orígenes celulares incluyendo las derivadas de plaquetas (VEP), leucocitos y monocitos. La activación plaquetaria en pacientes con EM puede ser secundaria al daño endotelial lo que conduce a niveles elevados de CD62P (P-selectina, marcador de actividad plaquetaria)¹⁴⁶. Así pues, se ha investigado la concentración de VEP CD41+, observándose un incremento de dos veces en pacientes con EM en comparación a los controles sanos, y además se demostró la propiedad anticoagulante de estas vesículas¹⁴⁶.

En el único estudio que analiza LCR humano, centrado en las VE derivadas de microglía (VEMi) la concentración de estas también se ha visto incrementada en pacientes comparada con controles sanos⁹⁹. La fase aguda de la enfermedad se asoció con un mayor número de VEMi comparado con las fases estables o crónicas. Además, los recuentos VEM correlacionan linealmente con las imágenes positivas para gadolinio en resonancia magnética. En línea con esto, la concentración de VEM aisladas de LCR de ratones EAE reflejó el curso y la gravedad de la EAE. Específicamente, los números absolutos de VEMi de LCR de ratón estaban estrechamente asociados con el curso de la enfermedad, alcanzando un máximo en el inicio y durante las recaídas clínicas y disminuyendo en la fase estable así como en la fase crónica de la enfermedad. En este trabajo, los autores también exploraron el potencial de VEMi como un posible biomarcador en la EM mediante el análisis con

curvas ROC, obteniendo una sensibilidad del 85% y especificidad de 100% para distinguir entre pacientes con síndrome clínicamente aislado de controles sanos, y una sensibilidad de 82% y especificidad del 82% para diferenciar pacientes estables (sin recaída) de pacientes en brote.

Uniendo los conceptos aquí desarrollados podemos concluir que la actual hipótesis es que las VE tanto circulantes como de LCR reflejan el estado de la enfermedad con una mayor liberación de estas durante los períodos inflamatorios como son los brotes y volviendo a niveles basales durante la fase de recuperación.

3.4.2. VE como biomarcadores para la monitorización de terapias

La terapia actual para la EM se basa en la modulación del sistema inmune mediante el uso de una amplia gama de medicamentos. El más extendido es sin dudas el IFN β incorporado en la década de 1980 al entonces limitado arsenal terapéutico. Aunque se conoce el efecto antiviral del IFN β y su capacidad inmunorreguladora mediada por su interacción con receptores celulares superficiales de las células, el mecanismo exacto de la acción en la EM todavía está bajo investigación. Hasta el momento, se sabe que el IFN β reduce la permeabilidad de la BHE inhibiendo la migración de leucocitos al SNC posiblemente interfiriendo en la adhesión endotelial¹⁵⁰, modificando el balance de citoquinas desde el tipo Th1 hacia el tipo Th2 y aumentando la expresión de ocludina en las uniones estrechas del endotelio¹⁵¹.

El efecto de IFN β 1b sobre las VE se exploró por primera vez en el modelo *in vitro* de la BHE donde se observó un efecto inhibitorio del fármaco sobre la producción de VEE inducida tras el agregado de plasma de pacientes en brote¹⁴⁵. Por otra parte, los autores demostraron que la formación de complejos de monocitos-VEE y la migración transendotelial era entorpecida después de la exposición IFN β 1b.

Un primer estudio prospectivo en una cohorte de pacientes EMRR reveló una reducción en el número de VEE CD31+ en el plasma tras 12 semanas de tratamiento con IFN β 1a¹⁵². Por el contrario, no se encontró correlación con las imágenes de resonancia magnética, aunque no había datos suficientes para extraer conclusiones definitivas y los autores no discuten este resultado. Los hallazgos en una segunda cohorte tratada con altas dosis de IFN β 1a y seguidos durante un año sugieren que la concentración de VEE CD54+ circulantes representa un marcador más sensible del efecto del tratamiento que las VEE CD31+ o CD146+, mientras que los resultados mostraron una correlación de ambos subtipos de VEE CD31+ y CD54+ con los hallazgos en resonancias potenciadas en T1 (la relación con las VEE CD146+ no alcanzó significación estadística)¹⁵³. Los autores especularon que la disminución que observaron en vesículas de

plasma con la terapia de IFN β pone de manifiesto una reducción en la interacción entre las células T CD4+ y el endotelio y, en consecuencia, menor migración celular a través de la BHE restaurada por el fármaco.

Fingolimod es un nuevo fármaco inmunomodulador de administración oral aprobado para la forma recurrente-remitente de EM. Se une e induce la internalización de los receptores de esfingosina 1-fosfato presentes en los linfocitos regulando su salida de los tejidos linfoides a la circulación. De esa manera, el fármaco reduce la infiltración de linfocitos autoagresivos en el SNC¹⁵⁴. La enzima esfingomielinasa ácida controla la producción de VE¹⁵⁵ y por otro lado es inhibida por fingolimod¹⁵⁶. Estas observaciones llevaron a Verderio *et al* a teorizar acerca de que el uso de fingolimod podría inhibir la liberación de VEMi reactiva y también la infiltración de macrófagos en el SNC. Sus experimentos en EAE confirmaron que tras la administración de fingolimod, la concentración de VEMi disminuía a niveles basales en el LCR correlacionándose con un descenso de la clínica. Por lo tanto, un nuevo efecto de fingolimod se postuló, a saber, que limita la propagación de la señal inflamatoria mediante la disminución de la producción de VEMi⁹⁹. A pesar de estas conclusiones, hasta el momento no se han registrado informes que evalúen el efecto de fingolimod en VE en seres humanos, ni tampoco en subtipos de VE derivados de células del sistema inmune circulante, probablemente porque lleva poco tiempo desde que está disponible en el mercado.

3.5. VE como posibles vehículos terapéuticos

Aparte de proponerse a las VE como biomarcador de la respuesta al tratamiento, se ha postulado que VE formuladas sintéticamente en un laboratorio pueden cargarse con compuestos exógenos y suministrarse a pacientes con fines terapéuticos, ampliando la posibilidad de una novedosa aplicación clínica de las VE. Los estudios preliminares con exosomas se han llevado a cabo en algunos tipos de cáncer¹⁵⁷. Particularmente en la EM, un estudio publicado recientemente exploró la capacidad de los exosomas en cuyo cargo se encontraba el miR-219 demostrando un aumento significativo en la mielinización, reducción del estrés oxidativo y mejora en la remielinización en cultivos organotípicos de hipocampo¹⁵⁸. En un paso más hacia la aplicación clínica de estas terapias, se han realizado experimentos en el modelo EAE inyectando liposomas cargados con diversas moléculas, con resultados prometedores. Uno de estos estudios comprobó que los péptidos de proteína básica de mielina⁴⁶⁻⁶² encapsulados en liposomas redujeron los síntomas del primer brote y disminuye los niveles de marcadores inflamatorios¹⁵⁹. Otro estudio, publicado en el año 2014, demostró que el uso de vacunación subcutánea inversa (tolerogénica) con partículas de PLGA (sigla derivada del inglés del término: *polymeric biodegradable lactic-*

glycolic) cargadas con un péptido MOG e IL-10 disminuye la gravedad de la EAE¹⁶⁰. EL último estudio, de junio de 2015, propone el uso de nanopartículas poliméricas cargadas con un péptido funcionalizado para la orientación activa hacia tejido dañado EAE, que siendo administradas en forma sistémica se dirigen a la zona de daño tisular¹⁶¹.

Estos ensayos basados en este tipo de aproximación terapéutica deben investigarse aún en mayor profundidad para poder más tarde evaluarse en un ensayo clínico y finalmente ser utilizados en la práctica clínica como terapia complementaria.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Las **vesículas extracelulares** (VE) han sido propuestas como un mecanismo de comunicación celular, con funciones relevantes sobre la **regulación del sistema inmune**, desde presentación de antígenos hasta propagación a distancia de factores proinflamatorios, y en consecuencia, sobre el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

La **concentración y composición** de las **VE circulantes** en sangre **puede modificarse durante las diferentes fases del desarrollo de una enfermedad autoinmune** como la esclerosis múltiple (EM) así **como por el uso de tratamientos** para combatirla. Investigar esta relación podría llegar a permitir la identificación de posibles **biomarcadores** tanto del estadio clínico como de la efectividad de los tratamientos, derivados del estudio de las VE. A su vez, la capacidad de las VE de producir cambios genotípicos y fenotípicos en las células receptoras, podría ser aprovechada para potenciar tratamientos coadyuvantes a los ya establecidos en el uso clínico.

Objetivos

1. Establecer una relación entre la EM en sus distintos estadios clínicos y las VE circulantes en sangre como una futura fuente de biomarcadores de fácil acceso.
2. Analizar la metodología actual para el estudio de VE y proponer protocolos acordes a la aplicación clínica diaria.
3. Describir el contenido de las VE circulantes y de LCR y analizar tanto posibles biomarcadores candidatos como moléculas que puedan ser utilizadas como terapia coadyuvante debido a su implicancia en la EM. A su vez, mediante el estudio del cargo de VE intentar comprender cuales son los mensajes preponderantes en los distintos estadios clínicos de la EM.
4. Profundizar en el efecto inmunomodulador de los tratamientos nuevos sobre las VE y estudiar la capacidad funcional de las mismas frente al sistema inmune.

Estos objetivos principales nos han llevado a desarrollar esta tesis en 4 capítulos, uno por cada objetivo, manteniendo la cohesión entre ellos mediante el objetivo superlativo o conductor de esta tesis que es estudiar las VE de pacientes con EM

MATERIALES Y MÉTODOS COMUNES

La presente tesis está dividida en capítulos, cada uno de ellos con una breve introducción al tema a desarrollarse, materiales y métodos específicos del capítulo, resultados y discusión. Sin embargo, aquellos procedimientos y materiales comunes a todos los capítulos están detallados en este apartado y solo se hace mención de ellos en los capítulos donde hayan sido empleados. Por el contrario, los materiales y métodos específicos de cada capítulo solo estarán desarrollados en dicho capítulo.

1. Aislamiento de vesículas extracelulares

1.1. Extracción de sangre para aislamiento de vesículas extracelulares

Las extracciones de sangre periférica se realizaron con aguja de 21 G en venas del antebrazo, colectándose en un tubo con citrato de 3,8 ml para posterior uso en citometría de flujo y en tubos con EDTA de 4 ml para el resto de estudios, manteniéndolos en todo momento en posición vertical. Las muestras se procesaron siempre dentro de la primera hora posterior a la extracción.

1.2. Aislamiento de vesículas extracelulares con el método “centri2500”

Este método está basado el protocolo publicado por Lacroix et al ⁴⁰. Brevemente, la sangre recolectada en los tubos de citrato o EDTA (Becton Dickinson) es centrifugada a 2500 g durante 15 a temperatura ambiente. Se descarta el pellet dejando 1 cm de plasma sobre la masa celular con el objetivo de no arrastrar plaquetas en el sobrenadante. 1,3 ml de este sobrenadante, denominado plasma pobre en plaquetas (PPP) o 9,5 ml de orina libre de células para el caso de muestras de orina (solo en capítulo 2), se vuelve a centrifugar a 2500 g, 15 minutos, a temperatura ambiente, para extraer un sobrenadante de 1 ml de plasma libre de plaquetas (PLP) o 9 ml de orina libre de *debries* (OLD), descartando el pellet. El ml de PLP o 9 ml de OLD se congela a -80 °C hasta su posterior uso. Cuando es requerido, se descongela en hielo el PLP u OLD y se centrifuga a 20000 g durante 20 minutos para sedimentar las VE, descartando 900 µl de sobrenadante, siguiendo los protocolos descritos por Ashcroft *et al* ¹⁶² y Jayachandran *et al* ¹⁶³. El pellet de 100 µl de VE se resuspende en 100 µl de PBS (GIBCO, Life Technology) filtrado dos veces a través de un filtro de 0,22 µm.

1.3. Aislamiento de vesículas extracelulares con el método “centri13000”

Este método está basado en el protocolo publicado por Dey-Hazra *et al* ¹⁶⁴ y Dignat-George *et al* ¹⁶⁵. En resumen, es una modificación del anterior en donde a 1,3 ml de PPP obtenido de la primera

centrifugación se le realiza una segunda centrifugación pero a 13000 g durante 2 minutos para obtener PLP u OLD. El resto del protocolo es igual al anterior (Figura 13).

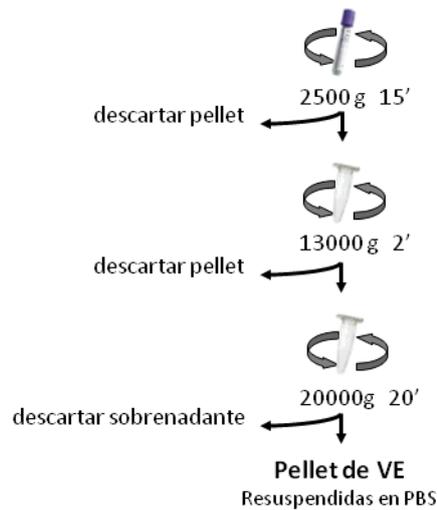


Figura 13: Protocolo de aislamiento de VE mediante centrifugación diferencial "centri1300".

En ambos protocolos *centri2500* y *centri13000*, debemos tener la precaución de aspirar una fina capa blanquecina situada en la parte superior de la muestra tras la última centrifugación a 20000 g (Figura 14). Probablemente esta capa se trate de lípidos y/o triglicéridos ya que se ve aumentada en individuos que han hecho alguna ingesta horas antes de la extracción de sangre. Por ello también se procura siempre analizar VE de muestras de individuos que hayan hecho un ayuno de al menos 8 horas previo a la extracción.

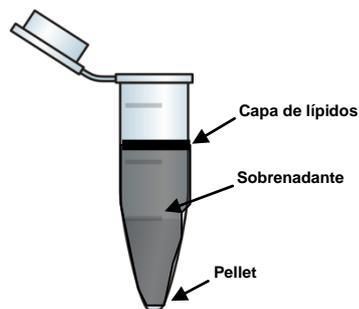


Figura 14: Imagen de las distintas fases obtenidas tras el aislamiento de VE por centrifugación diferencial

2. Caracterización de vesículas extracelulares

2.1. Análisis del origen celular de VE mediante citometría de flujo

Se realiza en un citómetro Becton Dickinson (BD) modelo CANTO II, facilitado por el laboratorio de inmunología del Hospital Universitario Donostia. Este citómetro tiene un límite de detección de

300 nm aproximadamente. Posee 2 láseres (488 nm –azul-; 633 nm –rojo-) por lo que permite una amplia combinación de fluorocromos en un mismo tubo aunque, con muestras de VE, la combinación de fluorocromos no ha arrojado resultados satisfactorios. Por este motivo se prefirió el marcaje simple utilizando un tubo para cada fluorocromo.

En esta tesis analizamos el origen celular de las VE utilizando anticuerpos monoclonales anti-humano contra: CD61 para las derivadas de plaquetas, CD45 para las derivadas de leucocitos y CD14 para aquellas derivadas de monocitos. Debido a la baja densidad antigénica en la superficie de las VE de las moléculas nombradas, se escogió el fluorocromo ficoeritrina (PE, del inglés *phycoerythrin*) por ser uno de los más brillantes para estudios de citometría de flujo. Los fluorocromos utilizados fueron entonces: CD61-PE clon PM6/13, CD14-PE clon 47-3D6 (ambos de Cytgonos) y CD45-PE clon HI30 (BD). Todos los anticuerpos fueron titulados y previo a su uso se centrifugaron para precipitar posibles agregados proteicos que interfieran en el análisis.

El procedimiento consiste en marcar 40µl del pellet resuspendido de VE con 4µl de cada anticuerpo correspondiente dejando en incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se realiza un lavado con 500 µl de PBS filtrado dos veces y se resuspende el pellet de VE en 200µl de PBS filtrado.

La adquisición y análisis citométrico se realizó con el programa DIVA (BD). La estrategia de ventana utilizada fue crear un diagrama con *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC), ambos en escala logarítmica, con un umbral de 300 para cada parámetro para evitar adquirir ruido electrónico. En este diagrama se creó una ventana donde adquirir las VE totales ubicando el límite superior con la señal dada por esferas de látex de 1 µm Sigma-Aldrich y el límite inferior inmediatamente por encima de la señal dada por PBS filtrado. Los eventos incluidos en esta región fueron analizados para el marcaje específico de origen celular de las VE en otro diagrama enfrentando SSC y PE. El límite entre positivo y negativo en este diagrama se definió con la adquisición del control de isotipo de PE correspondiente (Citognos y BD) (Figura 15).

La adquisición de las muestras se realizó en tubos Trucount (BD) los que permiten el cálculo de concentración absoluta. En nuestro análisis calculamos la concentración de VE totales y VE específicas (de un origen celular) mediante la siguiente fórmula provista por el fabricante:

$$\frac{\text{eventos en la ventana de VE (totales o específicas)}}{\text{eventos en la ventana de bolitas Trucount}} \times \frac{\text{número de bolitas Trucount por tubo}}{\text{volumen del tubo}} \\ = \text{contaje de VE absoluto}/\mu\text{l de PLP}$$

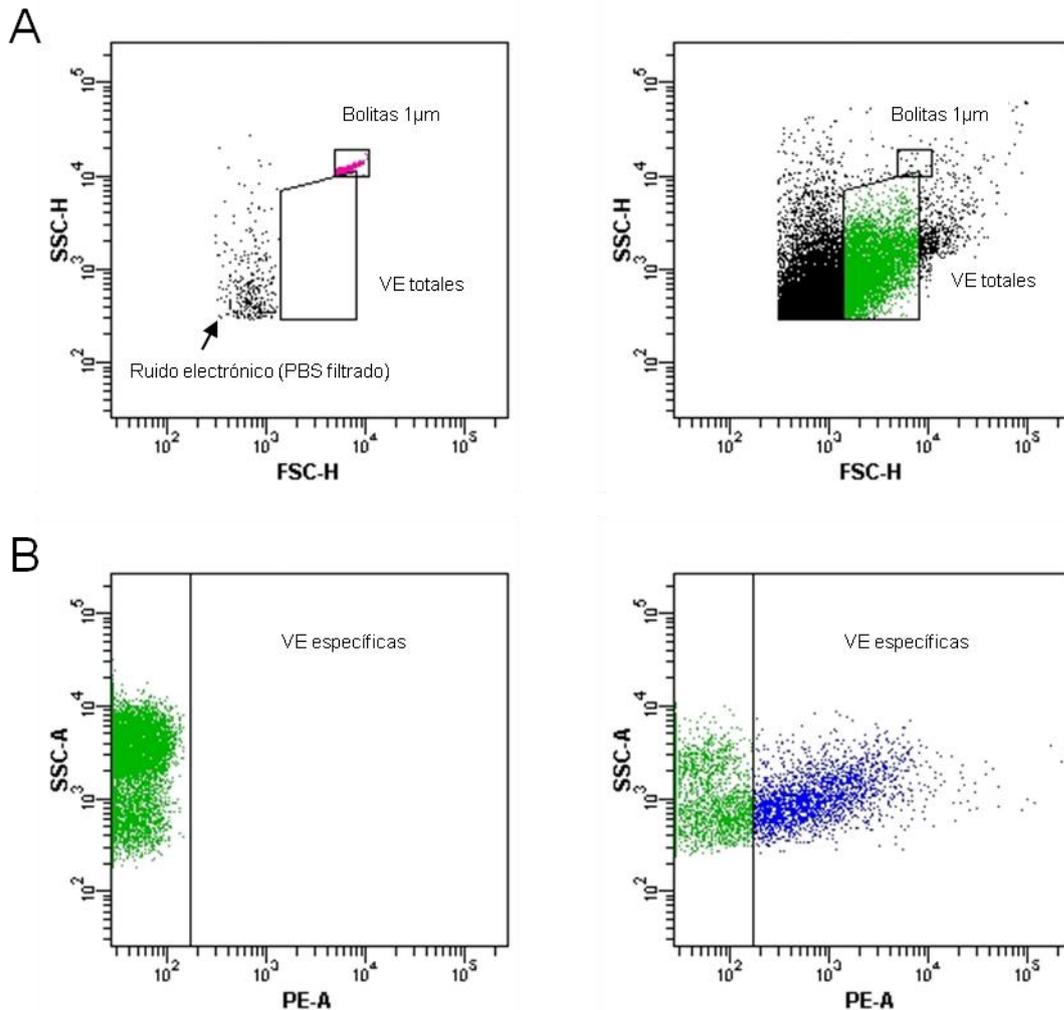


Figura 15: Estrategia de ventana para el análisis por citometría de flujo de VE. Diagramas de la izquierda: **A)** para definir los límites superior e inferior de la ventana de VE totales se utilizaron bolitas de latex de 1 μm de tamaño y el ruido electrónico dado por PBS filtrado, respectivamente. **B)** Los puntos verdes representan las VE marcadas con el control de isotipo para definir la negatividad del marcador PE (ficoeritrina) que se utilizó para identificar el origen celular de las VEP. **Diagramas de la derecha:** se muestra la misma estrategia de ventana aplicada a una muestra de VE. **A)** Los puntos verdes representan las VE incluidas en la ventana de VE totales. **B)** Los puntos azules representan las VE de origen celular específico (CD61+, CD45+ o CD14+).

La adquisición de las muestras se detuvo a los 4000 eventos en la región de bolitas Trucount. El volumen del tubo fue 40 multiplicado por el factor de dilución. El número de bolitas Trucount por tubo es provisto por el fabricante en cada lote.

El funcionamiento del citómetro fue revisado semanalmente con el uso de CST *beads* (BD).

2.2. Medición de la concentración de VE con *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

El sistema de análisis por seguimiento de partículas, conocido por sus siglas en inglés como NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), se basa en el movimiento browniano de las partículas

suspendidas en un fluido y permite estudiar la distribución de tamaño y concentración de estas partículas⁵².

Gracias a la colaboración con el grupo de metabolómica del CIC BioGune (Derio, País Vasco), liderado por el Dr. Juan Manuel Falcón Pérez, realizamos el NTA de las VE en un modelo LM10 (Nanosight). Su rango de análisis de nanopartículas es de 10 nm a 2000 nm y el volumen de muestra mínimo requerido es de 300 μ l.

Brevemente, los ajustes para todas las muestras fueron mantenidas constantes (viscosidad, etc) y la temperatura se ajustó para cada muestra. Una alícuota de 5 μ l del pellet de VE resuspendidas, se diluyó en PBS filtrado a 1:150 en las muestras derivadas de sangre y a 1:50 en las derivadas de orina. Se realizaron dos mediciones de 1 minuto por cada muestra. Los valores analizados fueron distribución de tamaño (moda) y concentración de VE. La señal basal se midió con PBS filtrado el cual no mostró señal de dispersión. El análisis se consideró válido cuando obtuvimos 200 *tracks* (partículas seguidas durante la grabación del video).

2.3. Caracterización morfológica de las VE mediante crio-microscopía electrónica (ME)

Seguimos el protocolo utilizado por Perez et al ⁷⁰. En resumen, una alícuota de 10 μ l de VE resuspendidas en PBS filtrado fueron directamente adsorbidas sobre rejillas de carbono fenestradas mediante descarga lumínica (Quantifoil Micro Tools GmbH). Las rejillas se transfirieron a 95% de humedad y se sumergieron rápidamente en etanol líquido con la ayuda de Vitrobot (Maastricht Instruments BV). Una vez vitrificadas las muestras, las imágenes fueron analizadas a temperatura de nitrógeno líquido (aprox. -160° C) mediante un microscopio de transmisión de electrones crio-JEM-2200FS / CR (JEOL) equipado con un disparador de emisión de campo y operado a un voltaje de aceleración de 200 kV.

3. Aislamiento de RNA de las VE (RNA_{VE})

Partiendo del pellet de VE resuspendido en un volumen final de 200 μ l, utilizamos 185 μ l para la extracción de RNA total contenido en las VE (RNA_{VE}) mediante el kit miRNeasy serum/plasma (Qiagen). Este kit está especialmente diseñado para obtener RNA mensajeros y micros de muestras como suero, plasma, LCR, orina u otras muestras biológicas con escasa cantidad de RNA. El protocolo utilizado fue el indicado por la casa comercial. La elución final se hizo en todos los casos en un volumen final de 14 μ l de agua libre de RNAsas. Luego de aislado el RNA_{VE}, medimos su concentración con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Finalmente, en

alguno de los experimentos realizados en esta tesis se agruparon las muestras de RNA_{VE} obtenidas de sujetos con características similares, para alcanzar la concentración mínima necesaria para llevar a cabo el análisis de RNA_{VE} (por ejemplo en estudios de secuenciación de RNA o microarrays de RNA, véase capítulo 3 y 4, secciones de materiales y métodos).

CAPITULO 1

Vesículas extracelulares según el estadio clínico de pacientes de esclerosis múltiple

1. Introducción

Una de las ramas del estudio de las VE se orienta a su cuantificación según el origen celular, siendo las derivadas de la circulación sanguínea una de las más estudiadas en el ámbito clínico. Habitualmente, mediante citometría de flujo, se caracterizan y contabilizan las VE derivadas de plaquetas, leucocitos y sus subtipos, eritrocitos y células endoteliales, entre otras. El hecho de que su obtención sea mediante una simple punción venosa y su procesamiento para aislarlas sea rápido y sencillo, da a las VE un potencial atractivo como biomarcador no invasivo.

Los estudios iniciales sobre VE en EM siguieron esta línea de investigación sobresaliendo la serie de publicaciones del grupo liderado por Alireza Minagar quien describió por primera vez en el año 2001 la relación entre el aumento en la concentración de VE derivadas de endotelio y la exacerbación clínica de EM¹³⁸. Posteriormente se demostró que las VE derivadas de plaquetas también estaban aumentadas en pacientes con EM¹⁴⁶. A raíz de esto, se sucedieron varias investigaciones profundizando en el tema reforzando la propuesta de las VE como un biomarcador candidato, con fuerza diagnóstica comparable a la imagen por resonancia¹³⁸. A su vez, se exploró su capacidad como biomarcador para la monitorización de pacientes tratados con IFN β , observándose el descenso de la concentración según evolucionaba el tratamiento^{152,153}.

Por otro lado, se intentó formular una explicación biológica al papel que las VE juegan en la enfermedad publicándose un par de trabajos que concluyen que las VE derivadas de endotelio tienen una participación fundamental en la migración transendotelial dentro de la barrera hemato-encefálica^{143,145}.

Hasta el momento de comenzar nuestro trabajo, que derivó finalmente en esta tesis, solo existían los trabajos citados en el párrafo anterior. En consecuencia, nuestra primera aproximación fue intentar replicar los resultados de trabajos predecesores y ampliar el estudio a nuevos estadios clínicos de la enfermedad hasta el momento no estudiados, como las etapas progresivas, específicamente la EM secundaria progresiva (EMSP) y profundizar el efecto de otros tratamientos recientemente salidos al mercado como el caso de natalizumab (NTZ).

Durante el desarrollo de este primer trabajo, se publicaron interesantes artículos ampliando el hasta entonces incipiente conocimiento de las VE en la EM, que fueron utilizados en la discusión de nuestros resultados.

2. Objetivos

Los objetivos de este primer capítulo son los siguientes:

- Investigar las concentraciones de VE circulantes derivadas de plaquetas (VEP), leucocitos totales (VEL) y monocitos (VEM), basándonos en que dichas células tienen un desempeño central en el desarrollo de la EM. Analizar las VE en pacientes con distintos estadios clínicos incluyendo EMSP, EMRR tanto no tratados como tratados con IFN β o NTZ y en controles sanos.
- Evaluar la capacidad de estas VE como posibles biomarcadores de fácil acceso (vía sanguínea).

3. Materiales y métodos

3.1. Pacientes

Analizamos 97 muestras de 20 controles sanos (CS) y 77 pacientes de EM que cumplieron los criterios diagnósticos de McDonald revisados en 2010¹²¹, evaluados en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Universitario Donostia. El grupo de pacientes EM comprendió 13 pacientes EMSP, 64 pacientes EMRR divididos en 20 tratados con NTZ, 20 con IFN β 1a o 1b (agrupados como IFN β) y 24 no tratados (NoT). Todos los pacientes se encontraban en fase de remisión clínica al momento del estudio. Todos los individuos dieron su consentimiento escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital.

3.2. Recolección de muestras y aislamiento de VE

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo como se describe en la sección de “materiales y métodos comunes”, apartado 1.1 “Extracción de sangre para aislamiento de vesículas extracelulares”. El aislamiento se realizó según el protocolo descrito en el apartado Aislamiento de vesículas extracelulares con el método “centri2500”, de la misma sección.

3.3. Citometría de flujo

El análisis de concentración de VE y el estudio de su origen celular se realizó según se detalla en “materiales y métodos comunes”, apartado 2.1 “Análisis del origen celular de VE mediante citometría de flujo”.

3.4. Análisis estadístico

Se realizó con el paquete informático PASW Statics v18.0 (SPS inc.) y con STATA v11.0 (Stata-Corp, College Station, TX). Los test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk se utilizaron para verificar la distribución normal y a su vez, los valores fueron normalizados mediante transformación logarítmica natural. Para evaluar las diferencias entre grupos, se aplicaron las pruebas T de student y Análisis de varianzas (ANOVA) más corrección con Bonferroni.

Luego, realizamos análisis de regresión para explorar la relación entre el estadio clínico como un predictor de categoría y VE. Además efectuamos análisis multivariante corregido por sexo y cuando correspondió, por MSSS. El coeficiente beta (β) se expresó como anti-logaritmo con base e. El error de tipo I se estableció en 0,05.

4. Resultados

4.1. Población de estudio

La media de dosis recibidas de los pacientes tratados con NTZ fue de 22 ± 14 . Tal como esperábamos, el grupo EMSP presentó los scores más altos de MSSS ($7,6 \pm 1,2$) como resultado del mayor tiempo desde el inicio de la EM en estos pacientes, seguido por los pacientes tratados con NTZ ($4,3 \pm 2,7$) ya que este fármaco es utilizado como terapia de segunda línea en España, luego los pacientes con IFN β ($3,4 \pm 2,2$) y finalmente los NoT ($1,5 \pm 1,9$). En la [Tabla 3](#) se describen las características generales de los pacientes y controles incluidos en este estudio.

Tabla 3: Características de controles sanos y pacientes EM.

| | Controles sanos n=20 | Pacientes EM | | | |
|--|-------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|-------------------------------|
| | | Remitente-recidivante | | | Secundaria Progresiva n=13 |
| | | No tratados n=24 | IFN beta n=20 | Natalizumab n=20 | |
| Edad (años) | 37,1 \pm 12,7 | 44,1 \pm 11,7 | 43,8 \pm 13,4 | 42,8 \pm 9,1 | 56,7 \pm 14,2 |
| Sexo (masc./fem.) | 9/11 | 6/18 | 10/10 | 9/11 | 3/10 |
| Escala de estado de discapacidad extendida (siglas en inglés EDSS) | - | 1,3 \pm 1,5 | 2,5 \pm 1,7 | 4,1 \pm 1,8 | 7,0 \pm 0,7 |
| Duración de enfermedad (años) | - | 13,1 \pm 9,9 | 10,8 \pm 7,7 | 14,2 \pm 7,9 | 24,3 \pm 10,5 |
| Escala de severidad de esclerosis múltiple (siglas en inglés MSSS) | - | 1,5 \pm 1,9 | 3,4 \pm 2,2 | 4,3 \pm 2,7 | 7,6 \pm 1,2 |

Valores expresados como media \pm desviación estándar.

4.2. Diferencias en las VE entre pacientes EM no tratados y controles sanos

El primer paso fue evaluar si la EM podría modular el nivel de VE, para ello nos centramos en la comparación entre CS y NoT, evitando la posible influencia dada por la terapia. Encontramos que el contaje de VEP CD61+ fue 2,2 veces significativamente mayor en NoT (media 1262 VE/ μ l) que en CS (media 566 VE/ μ l; $p=0,002$) ([Figura 16](#)). Las VEP CD45+ y las VEM CD14+ no fueron significativamente diferentes aunque se observó una tendencia en el mismo sentido que lo

sucedido en VEP. Este efecto fue mantenido en el análisis de regresión cuando se corrigió por sexo.

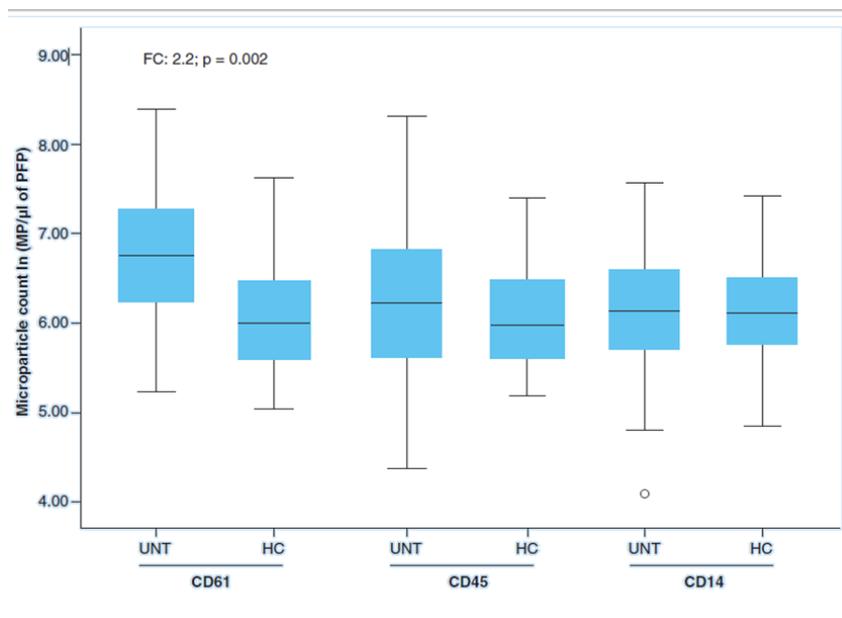


Figura 16: Concentración de VE de pacientes no tratados y controles sanos. Se observa una diferencia significativa entre pacientes no tratados (UNT) y controles sanos (HC) en las VE CD61+. FC: fold change.

4.3. Diferencias de VE basadas en el estadio clínico de EM

Nuestro siguiente objetivo fue averiguar si los distintos estadios clínicos de la EM tenían su reflejo en los niveles de VE. Los pacientes EMRR en conjunto presentaron contajes de los tres subtipos de VE significativamente más altos que CS y EMSP. Por otro lado, encontramos niveles similares de VEP CD61+ ($\beta = 1,5$; $p = 0,139$) y VEL ($\beta = 0,8$; $p = 0,409$) en pacientes EMSP y CS (Figura 17). Los resultados para EMRR versus CS fueron: VEP CD61+ $\beta = 2,9$; $p < 0,001$; VEL CD45+ $\beta = 2,1$; $p = 0,001$ y VEM CD14+ $\beta = 1,5$; $p = 0,031$. Los resultados para EMRR versus EMSP fueron: VEP CD61+ $\beta = 0,5$; $p = 0,002$; VEL CD45+ $\beta = 0,4$; $p < 0,001$ y VEM CD14+ $\beta = 0,3$; $p < 0,001$.

El mismo análisis fue realizado nuevamente ajustando por sexo y MSSS. El sexo no afectó los resultados. Por otro lado, y tal como se esperaba, el grupo EMSP mostró colinearidad con la variable MSSS, pero para el resto de comparaciones no mostró efecto. La concentración de VE de ninguno de los tres orígenes específicos mostró relación con la edad.

Finalmente, es interesante observar que la distribución de VE según su origen específico se mantuvo en los tres grupos de EM, siendo siempre las VEP CD61+ las más abundantes, seguidas de las VEL CD45+ y luego las VEM CD14+. Sin embargo, para el caso de los CS la distribución de VE según origen es homogénea entre los tres orígenes.

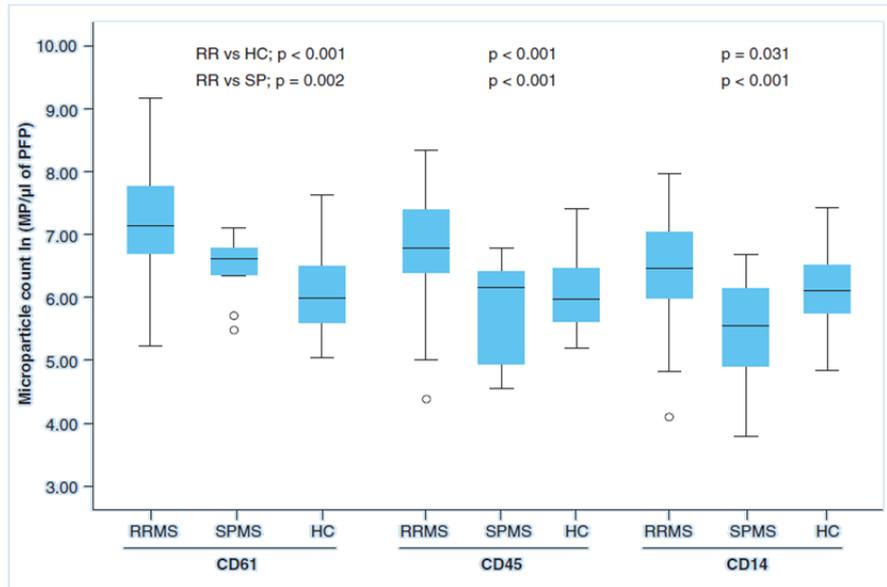


Figura 17: Concentración de VE según el estadio clínico de EM. Se observa diferencia significativa entre pacientes EM remitente-recidivante (RRMS) y EM secundaria progresiva (SPMS) así como con controles sanos (HC), en los tres subtipos de VE. Los pacientes EMRR incluyen tanto tratados como no tratados. CD61: VE derivadas de plaquetas; CD45: VE derivadas de leucocitos; CD14: VE derivadas de monocitos.

4.4. Efecto del tratamiento de EM en las VE

El último objetivo era analizar el efecto de dos tratamientos inmunomoduladores sobre la concentración de las VE, incluyendo IFN β que ya se había evaluado por otros autores y NTZ que por el contrario no había sido explorado hasta el momento. El análisis de regresión fue hecho comparando los grupos IFN β y NTZ teniendo como referencia el grupo NoT. Ambos tratamientos revelaron mayores niveles de concentración de los tres subtipos de VE comparados con NoT. Los resultados para IFN β fueron: VEP CD61+ $\beta = 1,7$; $p = 0,021$; VEL CD45+ $\beta = 2,6$; $p = 0,001$ y VEM CD14+ $\beta = 2,1$; $p = 0,001$. Los resultados en el grupo NTZ: VEP CD61+ $\beta = 1,9$; $p = 0,005$; VEL CD45+ $\beta = 2,4$; $p < 0,001$ y VEM CD14+ $\beta = 1,7$; $p = 0,014$. No se hallaron diferencias estadísticas al comparar ambos tratamientos entre sí (Figura 18). Además de lo expuesto, al estudiar mediante análisis multivariante, ajustado por sexo y MSSS, los resultados se mantuvieron sin cambios, demostrando que estas diferencias son independientes del nivel de discapacidad o la duración de la enfermedad al igual que son independientes del sexo.

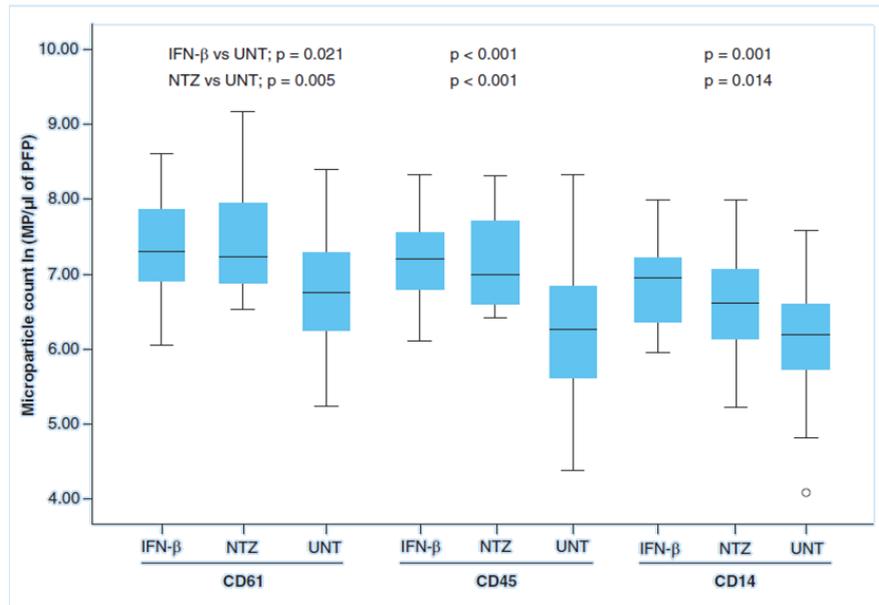


Figura 18: Efecto de los tratamientos de EM sobre la concentración de VE. Los pacientes tratados con IFNβ o natalizumab (NTZ) muestran niveles más altos de concentración de los tres subtipos de VE (CD61+, CD45+ y CD14+) comparado con pacientes no tratados (UNT).

5. Discusión

Hemos encontrado un incremento de 2,2 veces el nivel de VEP CD61+ en pacientes NoT comprado con CS. Teniendo en cuenta que son pacientes *naïve* de tratamiento con una media de MSSS baja ($1,5\pm 1,9$) y con una actividad de la enfermedad reducida debido a la baja tasa de brotes, dicho incremento en las VEP CD61+ podría sugerir que los niveles de VE circulantes son afectados por los cambios fisiopatológicos iniciales de la enfermedad. Por otro lado, las VEL CD45+ y las VEM CD14+ no muestran diferencias por lo que según nuestros resultados, no se ven influenciados por el desarrollo inicial de la EM o sus cambios no son apreciados en la circulación sanguínea.

La relación entre el número de VEP y las condiciones inflamatorias fue establecido en otros artículos, siendo demostrado ampliamente en enfermedades cardiovasculares donde el endotelio juega un rol principal y, en enfermedades autoinmunes en las cuales la activación celular perpetúa el daño mediado por el sistema inmune^{27,61}. Se detallaron numerosas funciones para las VEP tales como promover el reclutamiento de monocitos¹⁴³, regular la actividad proteolítica de las células endoteliales¹⁴⁴ e inducir apoptosis^{141,166}. Específicamente, en pacientes con EM la activación plaquetaria podría ser una respuesta al daño endotelial que sucede en la BHE con la consecuente liberación de VEP. En el trabajo publicado por Sheremata y colaboradores, se analiza la concentración de VEP donde se describe un incremento de 2 veces la concentración en pacientes EM comparados con controles¹⁴⁶. Este resultado es consistente con nuestro estudio.

El presente trabajo introduce, por primera vez, el estudio de VE de pacientes EMSP y también del subtipo derivado de leucocitos (VEL) entre otros orígenes específicos en pacientes de EM. Encontramos que los pacientes con EMSP presentan similar contaje de VEP y VEL e incluso un menor número de VEM respecto a los resultados en CS (Figura 17). Por otro lado, el grupo EMRR muestra las concentraciones más altas para los tres subtipos de VE al compararlo tanto con CS como con EMSP. Sabemos además que una característica de los pacientes de EMRR es la persistente actividad inflamatoria de la enfermedad, aunque solo llegue a manifestarse clínicamente en los brotes. Por el contrario, se considera que los pacientes EMSP han pasado a una progresión degenerativa con de una decreciente actividad inflamatoria¹⁶⁷. De esta manera, podríamos postular que las VE reflejan el estadio clínico de la EM o su actividad al mostrar un incremento de concentración durante los períodos de brote-remisión y volviendo a niveles basales, similares a los de un CS en la fase progresiva de la enfermedad. En línea con lo observado hasta aquí, Verderio y colaboradores encontraron valores similares de VE derivadas de microglia en el SNC respecto a los pacientes con EM primaria progresiva⁹⁹. Estos resultados refuerzan la hipótesis actual de que las VE forman parte de un sistema de comunicación celular, transmitiendo

señales a distancia de una célula a otra y particularmente promoviendo la propagación de la inflamación. Tras la interpretación de nuestros resultados, podríamos añadir que, tal vez en las fases neurodegenerativas crónicas el rol de las VE circulantes no tiene relación directa con la inflamación.

El manejo terapéutico actual de los pacientes con EM intenta modular el sistema inmune con el uso de IFN β , NTZ y fingolimod entre otros. Nos propusimos determinar si dichos tratamientos influían en el número de VE. Nuestro análisis reveló mayores concentraciones de los tres subtipos de VE en pacientes tratados con IFN β respecto a NoT. Similares resultados obtuvimos al considerar los pacientes tratados con NTZ. Además, no hallamos diferencias al comparar ambos grupos tratados entre ellos. Hemos hipotetizado que en los pacientes tratados con NTZ, debido al bloqueo de la entrada de leucocitos hacia el SNC y sumado a la movilización de células progenitoras desde la médula ósea¹⁶⁸, se produce un incremento de leucocitos en el compartimento sanguíneo que podría dar lugar al aumento del número de VEL.

Por otro lado, la elevación observada aquí de los otros dos subtipos de VE en pacientes tratados no está dilucidada por completo. No podemos excluir que mecanismos o factores implicados fuera de nuestro conocimiento estén implicados en el proceso de liberación de VE modulado por dichas terapias. Algunos autores han descrito el efecto inhibitorio del IFN β sobre la liberación de VE derivadas de endotelio^{145,152,153} y del fingolimod sobre VE derivadas de microglia⁹⁹. Sin embargo, en nuestro conocimiento, estos efectos no fueron estudiados en VEP, VEL o VEM ni en pacientes tratados con NTZ. Lógicamente, nuevos estudios al respecto clarificarán el rol de estas VE en la EM.

Adicionalmente, debemos mencionar que a pesar de los grandes esfuerzos que se están llevando a cabo en la estandarización de estos estudios, una limitación importante es la dificultad al comparar resultados de diversas investigaciones realizadas con metodologías distintas.

Está claramente establecido que el sistema inmune se comporta de manera diferente entre hombres y mujeres en la mayoría de las enfermedades autoinmunes^{103,169} por lo que según nuestra hipótesis esperábamos hallar diferencias al segregar por sexo. Pero por el contrario, los resultados descritos no cambiaron cuando realizamos análisis multivariante ajustado por sexo. Notablemente, solo en CS encontramos que las mujeres tenían concentraciones de VE mayores que en hombres aunque no significativas, lo que posiblemente revela una actividad de producción de VE basal mayor, desapareciendo esa diferencia durante la enfermedad.

Hemos confirmado que las VE pueden reflejar los distintos estadios clínicos de la EM de acuerdo al balance entre inflamación y degeneración crónica, al mostrar un aumento de concentración en

EMRR y niveles basales en EMSP. Asimismo, los tratamientos modulan la liberación de VE lo que resulta en un aumento de niveles de VE circulantes. Por lo tanto, proponemos que las VEP, VEL y VEM podrían ser agentes activos en la fisiopatología de la EM y ser fuente de ser futuros biomarcadores de la enfermedad o monitores del tratamiento.

Finalmente, quisiéramos puntualizar dos limitaciones de este capítulo. Por un lado, sería necesario investigar el potencial valor de cada subtipo de VE como indicador válido del estado clínico, para lo cual debería enfrentarse a biomarcadores ya establecidos como la imagen por RM, de la cual se carecen datos relativos a esta serie de individuos. La siguiente limitación se debe a que el análisis de muestras tomadas en distintos momentos del día puede presentar una considerable variabilidad individual de los niveles de VE, no solo de manera circadiana, sino que también influido por actividades fisiológicas^{170,171}. En este sentido, estos resultados proporcionados por un estudio de corte transversal nos invitan a preguntarnos qué sucedería en estudios longitudinales.

CAPITULO 2

Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares en un entorno hospitalario

Comparación de métodos, propuesta de flujo de trabajo

1. Introducción

En el período entre la publicación de nuestro primer trabajo, que comprende el primer capítulo de esta tesis y los trabajos posteriores que comenzábamos a realizar hemos sido testigos de una verdadera explosión de publicaciones sobre VE, con cada vez más disimiles protocolos utilizados para aislarlas y analizarlas (revisado en ^{42,43}). Debido a esta variabilidad técnica, los subsiguientes análisis ómicos y sus resultados pueden ser considerablemente distintos e incluso no comparables ⁴⁶.

A la vez, muchos de los avances en diagnóstico de enfermedades, monitorización de tratamientos e incluso moléculas plausibles de ser utilizadas como tratamientos conseguidos mediante la investigación en VE, están basados en experimentación *in vitro*, apoyados en una infraestructura no siempre disponible en un entorno hospitalario.

Este escenario nos hizo detener en nuestra búsqueda de biomarcadores en EM e intentar evaluar cuál de los métodos más extendidos al momento, era posible ser aplicado en nuestro entorno hospitalario. Concretamente, nos centramos en los pasos iniciales concernientes al estudio de VE que comprenden el aislamiento y caracterización de las vesículas proponiendo finalmente, un flujo de trabajo adaptado al entorno en el que nos encontramos.

2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Comparar 5 métodos de aislamiento de VE, cuatro de ellos ampliamente utilizados en la comunidad científica y uno recientemente publicado.
- Analizar cuál de ellos podría adecuarse a un entorno hospitalario y de aplicación diaria.
- Evaluar la complementariedad de las técnicas más extendidas al día de hoy, para la caracterización de VE.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras de pacientes

La sangre periférica y la orina son las muestras más empleadas en un entorno sanitario. Se pueden extraer a través de técnicas no invasivas o mínimamente invasivas y de ellas se obtiene gran cantidad de información útil. De acuerdo a estas premisas, hemos decidido partir de estos dos tipos de muestras para aislar las VE.

La recolección de muestras comprendió entonces sangre y orina de 10 controles sanos (CS) (5 varones y 5 mujeres, con un promedio de edad de los 10 CS de 37 ± 8 años) y se llevó a cabo según se describe en la sección de “materiales y métodos comunes”, apartado 1.1 “Extracción de sangre para aislamiento de vesículas extracelulares”. Todos los individuos dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Donostia.

A cada donante sano se le requirió rellenar un formulario acerca de la práctica de ejercicio reciente en la última hora, uso de medicación, ciclo ovulatorio, enfermedad aguda y horas de sueño previa a la extracción

El flujo de trabajo seguido en el presente capítulo se resume en la [Figura 19](#).

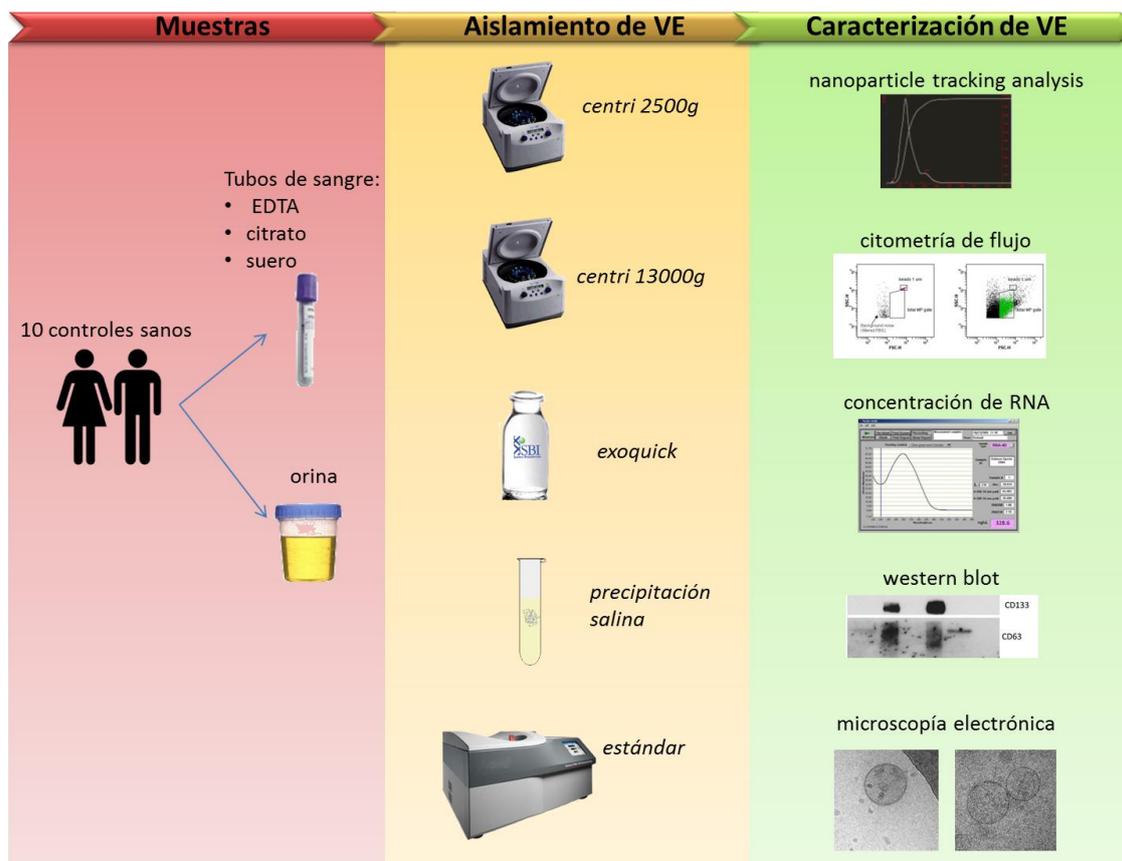


Figura 19: Comparación de 5 protocolos de aislamiento de VE. Se aislaron muestras de sangre y orina con 5 protocolos diferentes (ver Tabla 5 para más detalles) y luego se caracterizaron mediante 5 métodos de análisis.

3.1.1. Sangre

Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas a las 8:30 h en el Hospital Universitario Donostia, estando los donantes en ayunas durante 8 h y se procesaron dentro de la primera hora posterior a la extracción.

El procesamiento de muestras se realizó como se describe en la sección de “materiales y métodos comunes”, apartado 1.1 “Extracción de sangre para aislamiento de vesículas extracelulares”. En este estudio, para cada individuo se extrajeron los siguientes tubos de sangre (todos de Vacutainer, Becton Dickinson [BD]):

- 3,8 ml citrato (utilizado para CMF)
- 10 ml EDTA (utilizado para el resto de estudios)
- 8 ml suero

A los tres tubos se les realizó una primera centrifugación común a 2500 g durante 15 minutos, para descartar así la masa celular y obtener el sobrenadante de plasma pobre en plaquetas (PPP) para los dos primeros y suero pobre en plaquetas para el último. Los protocolos de aislamiento de

VE parten de este PPP o suero pobre en plaquetas. Además, se extrajeron muestra de sangre extras en un tubo de 10 ml de EDTA y un tubo de 8 ml de suero que fueron usados para realizar un hemograma, perfil de lípidos y proteínas en el laboratorio general del hospital (Figura 20). Los parámetros analizados por el laboratorio general y sus resultados en los 10 donantes sanos se presentan en la Tabla 4.

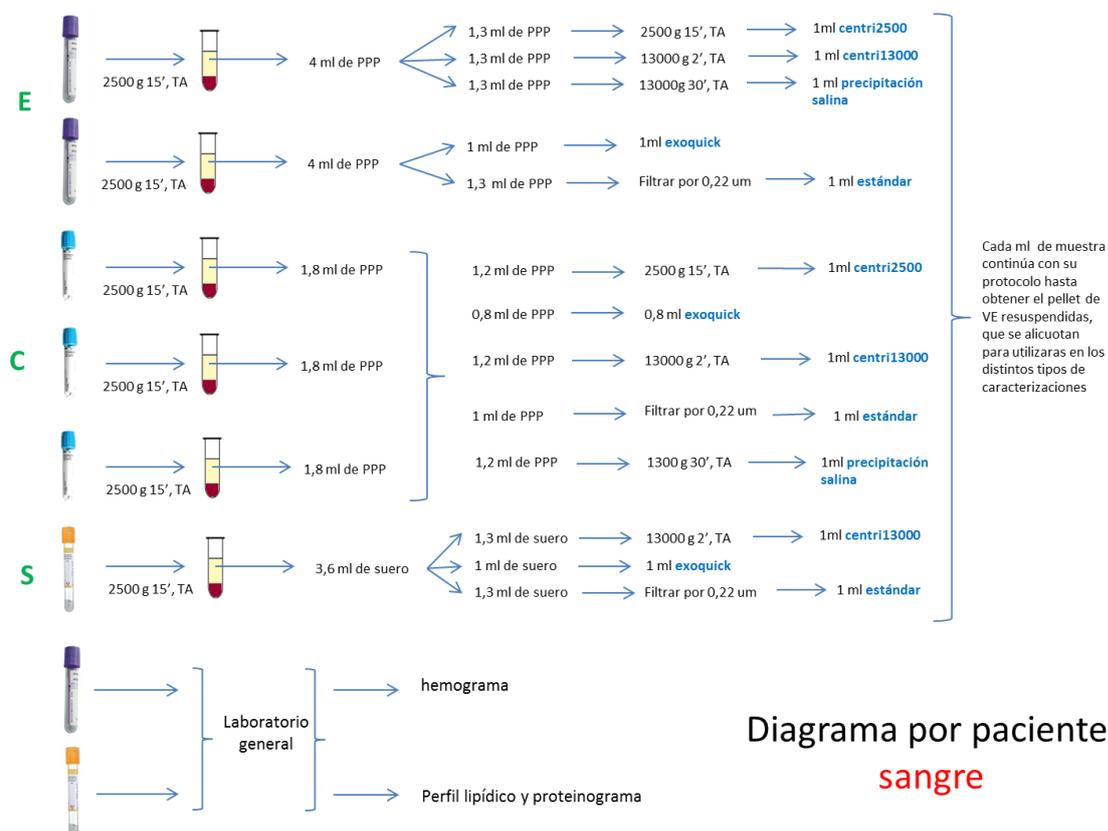


Figura 20: Procesamiento de las muestras de sangre, desde la obtención de muestras hasta la separación en alícuotas, destinadas a los distintos protocolos de caracterización de VE. En este diagrama se puede observar el destino de cada tubo extraído por en cada individuo.

3.1.2. Orina

Se solicitó a cada donante que recolectara en su domicilio 60 ml de la primera micción de orina en condiciones asépticas (para la cual se entregó una guía impresa), manteniéndolo a 4º C hasta su proceso en el laboratorio. El promedio de tiempo entre recolección en los domicilios y análisis en el laboratorio fue de 2,7 h. Una vez recibidas las muestras, se enviaron 10 ml de orina de cada individuo al laboratorio general, para análisis de algunos parámetros básicos (Tabla 4). El resto fue alicuotado en 5 tubos de 10 ml y centrifugados a 2500 g, durante 15 minutos, para obtener así 9,5 ml de orina libre de células (OLC), descartando 0,5 ml de pellet (Figura 21).

Diagrama por paciente

orina

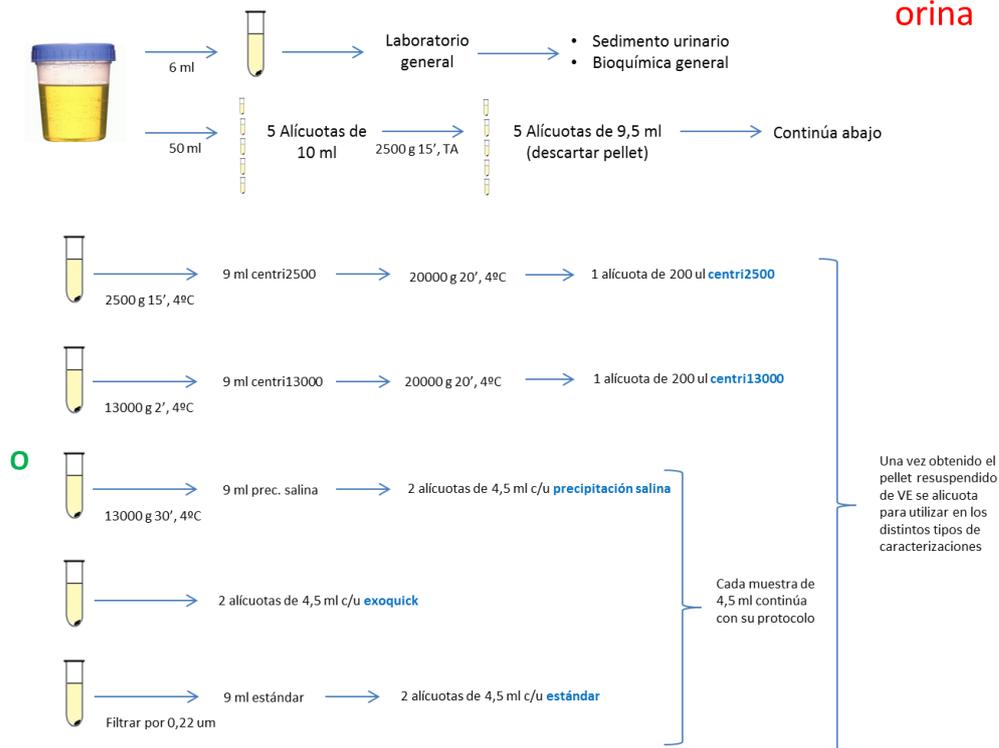


Figura 21: Procesamiento de las muestras de orina, desde la obtención de muestras hasta la separación en alícuotas, destinadas a los distintos protocolos de caracterización de VE.

Tabla 4: Parámetros de laboratorio analizados en las muestras de sangre y orina de los 10 donantes sanos.

| | | |
|---------------|---|------------|
| SANGRE | Creatinina (mg/dl) | 0,9±0,3 |
| | Colesterol total(mg/dl) | 184,9±37,7 |
| | HDL (mg/dl) | 69,9±14,1 |
| | Triglicéridos (mg/dl) | 65,7±20,1 |
| | LDL (mg/dl) | 101,9±37,5 |
| | Proteínas totales (g/dl) | 7,2±0,6 |
| | Albumina (g/dl) | 4,3±0,3 |
| | Hematocrito (%) | 41,7±3,4 |
| | Leucocitos (*10e3/μl) | 7,0±2,5 |
| | Recuento de plaquetas (*10e3/μl) | 238,7±56,7 |
| | Recuento de linfocitos (*10e3/μl) | 1,9±0,5 |
| ORINA | Densidad (g/l) | 1019,4±7,7 |
| | pH | 6,0±0,9 |
| | Filtrado glomerular (ml/min/1.73 m ²) | 84,3±15,5 |
| | Recuento de eritrocitos (eri./μl) | Negativo |
| | Recuento de leucocitos (leu./μl) | Negativo |
| | Recuento de cél. epiteliales (cel./μl) | Negativo |

Los valores están representados en media±DS de los 10 donantes sanos.

3.2. Protocolos de aislamiento de VE

El procesamiento de plasma y suero fue igual en todos los métodos por lo cual para una descripción más simple de los protocolos solo nos referiremos al plasma.

Los protocolos descritos a continuación están resumidos en la [Tabla 5](#).

3.2.1. Centri2500

Este método se describe en la sección “materiales y métodos comunes”, apartado 1.2 “Aislamiento de vesículas extracelulares con el método ‘centri2500’”. En el caso de las muestras de orina, tras la segunda centrifugación a 2500 g 15 minutos de los 9,5 ml de OLC, se obtienen 9 ml de orina libre de *debris* (OLD).

3.2.2. Centri13000

Referirse a la sección “materiales y métodos comunes”, apartado 1.3 “Aislamiento de vesículas extracelulares con el método ‘centri1300’”.

3.2.3. Exoquick

Este método consiste en la precipitación de VE a través del uso de un reactivo comercial aglutinante, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, a 250 µl de PPP o 9,5 ml de OLC obtenido de la primera centrifugación agregamos 63 µl o 2 ml de *exoquick* TC (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) e incubamos durante la noche a 4º C, sin rotación. Luego, centrifugamos la solución dos veces a 1500 g 30 y 5 minutos respectivamente para sedimentar las EV. Se resuspende finalmente en 200 µl de PBS. Vale aclarar que las primeras versiones de *exoquick* incluían en su protocolo un filtrado de 0,45 µm para evitar precipitación de partículas grandes u otros contaminantes. Actualmente no lo indica por lo cual nosotros no lo hemos realizado.

3.2.4. Precipitación salina (salting out)

Este método está basado en el protocolo publicado recientemente por Brownlee *et al.* ¹⁷², y consiste en la precipitación de VE a través del agregado de acetato sódico 1M, pH 4,75. A 1,3 ml de PPP o 9,5 ml de OLC obtenido de la primera centrifugación se vuelve a centrifugar a 13000 g, 30 minutos. Extraemos 1 ml de sobrenadante de PPP o 9 ml de OLC al cual le agregamos acetato sódico (dilución 1/10), se incuba en hielo 60 minutos y luego a 37º C, 5 minutos. Posteriormente se centrifuga la dilución a 5000 g, 10 minutos y el pellet se lava con buffer de acetato sódico a 0,1 M. Se resuspende finalmente en 200 µl de PBS.

3.2.5. Estándar

Este método, basado en una publicación de They y colaboradores, es el más extendido actualmente y podría considerarse el *estándar*¹⁷³. Sin embargo la ISEV aún no ha dado su posición respecto a si hay efectivamente un protocolo estándar. Aplicando el protocolo, partimos de 1,3 ml de PPP o 9,5 de OLC, se filtra por 0,22 μm y luego se centrifuga a 10000g durante 30 minutos para obtener PLP u OLD. Este se ultracentrifuga a 100000g en centrífuga modelo Optima MAX tabletop (Beckman Coulter) durante 75 minutos. El pellet obtenido se resuspende en 200 μl de PBS filtrado.

Tabla 5: Métodos de aislamiento de VE comparados en este capítulo.

| Método | Principio de aislamiento | Pasos |
|-----------------------------|--|--|
| Centri2500 | Centrifugación diferencial | 2500g 15' x2 + 20000g 20' para sedimentar las VE |
| Centri13000 | Centrifugación diferencial | 2500g 15' + 13000g 2' + 20000g 20' para sedimentar las VE |
| Exoquick | Aglutinación - Precipitación | 2500g 15' + aglutinación con exoquick + 1500g 30' y 5' para sedimentar las VE |
| Precipitación salina | Precipitación | 2500g 15' + 13000g 30' + precipitación ácida + 5000g 10' para sedimentar las VE |
| Estándar | Centrifugación diferencial – filtrado por tamaño - Ultracentrifugación | 2500g 15' + filtrado por 0,22- μm + 10000g 30' + 100000g 75' para sedimentar las VE |

3.3. Métodos de detección de VE

3.3.1. Citometría de flujo (CMF)

Descrito en la sección “materiales y métodos comunes”, apartado 2.1 “Análisis del origen celular de VE mediante citometría de flujo”. Se hace la aclaración de que en este capítulo se analizaron solo dos orígenes celulares: de plaquetas (CD61+) y leucocitos totales (CD45+).

3.3.2. Análisis por seguimiento de partículas [Nanoparticle tracking analysis (NTA)]

Descrito en la sección “materiales y métodos comunes”, apartado 2.2 “Medición de la concentración de VE mediante ‘Análisis por seguimiento de partículas’ [del inglés: *Nanoparticle tracking analysis* (NTA)]

3.3.3. Western blot (WB)

Para marcaje de VE se utilizaron los anticuerpos primarios CD133 (Miltenyi Biotec S.L) y CD63 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Como anticuerpos secundarios se emplearon conjugados de ratón y conejo con HRP (del inglés: *horseradish peroxidase*) (Cell Signaling). Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones no reductoras. Las muestras (10µl de VE resuspendidas en PBS) se incubaron a 95º C, durante 5 minutos y luego se separaron en geles de poliacrilamida SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). El bloqueo se hizo con leche en polvo al 5% (peso/volumen) en una solución de Tween-20 al 0,1% de Tris-PBS (T-TBS), durante una hora a temperatura ambiente. En la misma solución se incubó la membrana con los anticuerpos primarios durante la noche, a 4º C. El lavado posterior de los anticuerpos primarios se realizó con la solución de T-TBS y la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a HRP fue llevado a cabo durante 1 h en T-TBS a temperatura ambiente. Luego de un lavado, se añadió el substrato *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Inc) y se midió la intensidad de señal por quimioluminiscencia.

3.3.4. Crio-microscopía electrónica (ME)

Se procedió según se detalla en la sección “materiales y métodos comunes”, apartado 2.3 “Caracterización morfológica de las VE mediante crio-microscopía electrónica (ME)”.

3.4. Aislamiento de RNA de VE

Se procedió según se detalla en la sección “materiales y métodos comunes”, apartado 3 “Aislamiento de RNA de las VE (RNA_{VE})”.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el paquete informático PASW Statistics v18.0 (SPSS Inc.). Para el análisis de distribución normal se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Debido a que las variables presentaron una distribución normal, se aplicó la prueba de T de Student de muestras relacionadas para analizar las diferencias entre grupos. Posteriormente,

realizamos estudios de regresión con la prueba de Pearson para explorar la relación entre los diferentes parámetros de laboratorio general y las variables de VE. El error de tipo I se estableció en 0,05.

4. Resultados

4.1. Sangre

4.1.1. Concentración de VE

La concentración de EV fue estudiada con dos métodos: NTA y CMF convencional. Es importante destacar que los límites de detección por tamaño son distintos para ambos métodos siendo 50 nm para el primero⁵² y aproximadamente 400 nm para el segundo¹⁷⁴.

4.1.1.1. NTA

Al utilizar NTA, el software requiere por defecto un mínimo de 200 partículas analizadas durante el tiempo que dura la captura de video, llamados “tracks”. En el caso de las muestras obtenidas por los métodos *precipitación salina* y *estándar* solo algunas lo alcanzaron debido a la baja concentración de VE. Esto fue crítico para el análisis de NTA causando una alta variabilidad en estas muestras.

Con *exoquick* se aisló mayor cantidad de VE que con los demás métodos. En detalle, mediante *exoquick* obtuvimos aproximadamente 4 veces más EV que con los métodos *centri2500* y *centri13000* ($p=0,007$ y $p=0,05$ respectivamente) y 23 veces más con respecto a los métodos *precipitación salina* y *estándar* ($p=0,002$ en ambos) (Figura 22A). No hay diferencia significativa en la concentración aislada de EV entre los protocolos de *centri2500* y *centri13000* o entre *estándar* y *precipitación salina*. Sin embargo, sí hay diferencia significativa entre los dos primeros y los dos últimos obteniendo un valor $p<0,001$ para *centri2500* vs *precipitación salina* y *estándar* y, $0,002$ y $<0,001$ para *centri13000* vs *precipitación salina* y *estándar*, respectivamente (Tabla 6).

Respecto a las EV aisladas desde suero, obtenidas mediante los protocolos *exoquick*, *centri13000* y *estándar*, observamos que, al igual que con plasma, el primero aísla más EV que los otros dos métodos. A su vez, comparando los valores de suero con plasma, las EV aisladas a partir de suero son aproximadamente 3,4 veces más que las aisladas de plasma en el caso de *exoquick* y 1,3 en el caso de *centri13000*, a pesar de ello las diferencias no alcanzan la significancia estadística (Tabla 6).

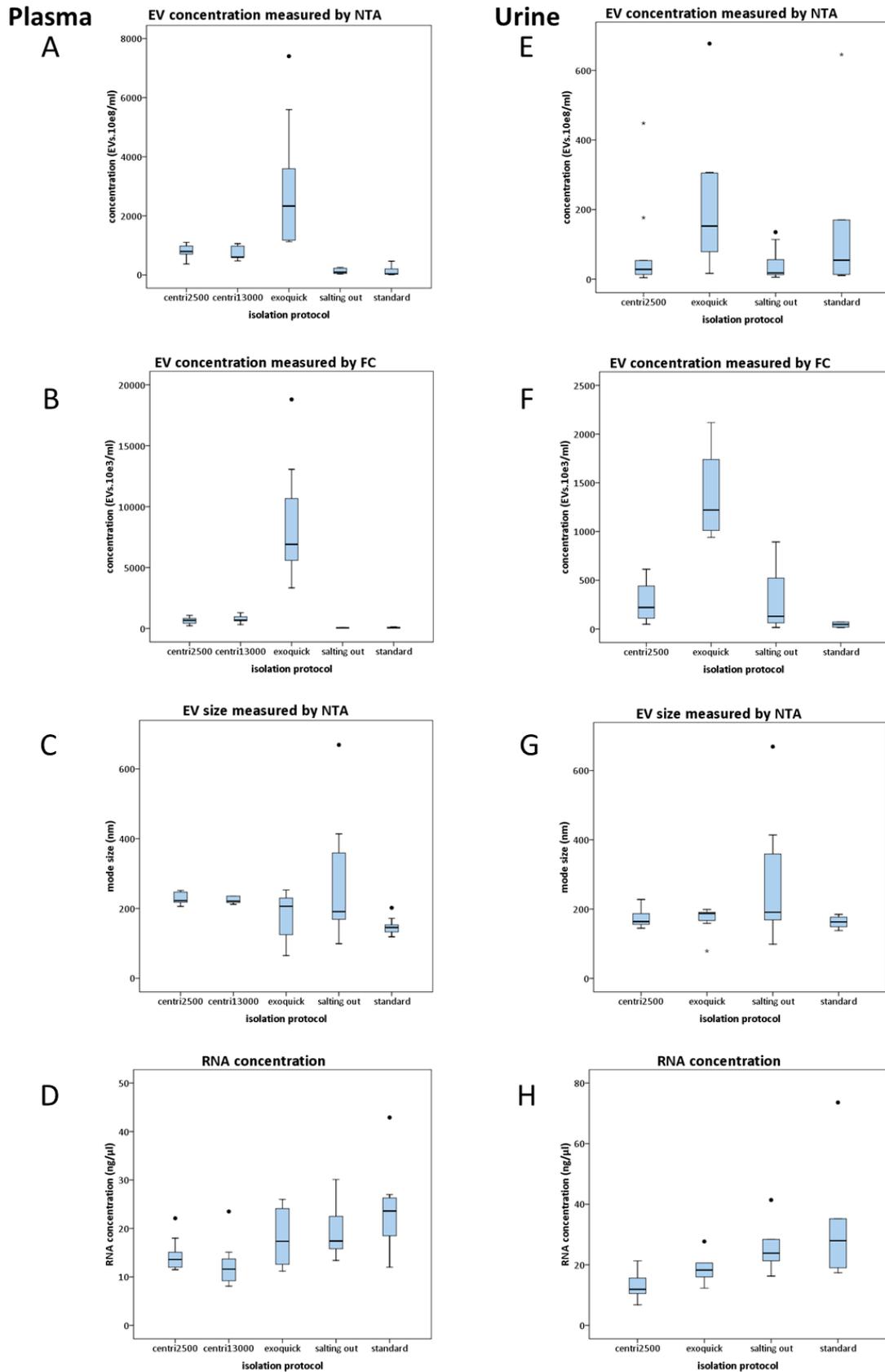


Figura 22: Resultados de la comparación de 5 protocolos de aislamiento de VE evaluando concentración de VE medida por NTA (A and E) o citometría de flujo convencional (CMF) (B y F), distribución del tamaño de VE medido por NTA (C y G) y concentración de RNA_{EV} (D y H). EN la columna izquierda se muestran los resultados de las EV derivadas de plasma y en la derecha aquellas derivadas de orina.

Tabla 6: Significancia estadística de las comparaciones entre NTA y CMF, tanto para VE de plasma como de orina.

| | | PLASMA | | | | ORINA | | | | |
|----------|--------------|------------|-------------|----------|--------------|--|----------|--------------|----------|--|
| NTA | | centri2500 | centri13000 | exoquick | prec. salina | centri2500 | exoquick | prec. salina | estándar | |
| | centri2500 | | | | | no se realizaron análisis estadísticos debido a no alcanzar el mínimo de tracks para NTA (explicación en el texto) | | | | |
| | centri13000 | 0.846 | | | | | | | | |
| | exoquick | 0.007 | 0.050 | | | | | | | |
| | prec. salina | <0.001 | 0.002 | 0.002 | | | | | | |
| estándar | <0.001 | <0.001 | 0.002 | 0.854 | | | | | | |
| CMF | | centri2500 | centri13000 | exoquick | prec. salina | centri2500 | exoquick | prec. salina | estándar | |
| | centri2500 | | | | | 0.039 | | | | |
| | centri13000 | 0.170 | | | | 0.947 | 0.001 | | | |
| | exoquick | <0.001 | 0.001 | | | 0.168 | 0.013 | 0.290 | | |
| | prec. salina | <0.001 | <0.001 | <0.001 | | | | | | |
| estándar | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.279 | | | | | | |

4.1.1.2. CMF

A pesar de que las concentraciones de VE en el análisis mediante CMF fueron menores que a través de NTA, existe una buena correlación global (teniendo en cuenta todos los métodos de aislamiento) entre ambas aproximaciones ($R=0,99$; $p<0,001$) observando, por ejemplo que, tanto por CMF como por NTA el método que mayor concentración de VE aísla es *exoquick* y los que menos *estándar* y *precipitación salina*. Sin embargo, no se aprecia una correlación significativa entre estas dos aproximaciones cuando realizamos la correlación uno a uno de cada método por separado. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre todos los métodos excepto entre las *centri2500* y *centri13000* y entre *precipitación salina* y *estándar* (Figura 22B).

4.1.2. Tamaño de las VE

Hemos analizado la distribución de la moda del tamaño de VE (medido por NTA), para cada individuo y observamos que no presenta una distribución normal. Los resultados mostraron una gran similitud en los valores obtenidos por los distintos protocolos, con un rango de 150 a 277 nm y un promedio de 227,8 nm (Figura 22C). Congruente con estos datos, las imágenes de EM muestran EV de tamaños cercanos a 100-200 nm (Figura 23). Solo hay diferencia significativa en las EV aisladas por *estándar* respecto a *centri2500* y *centri1300*, siendo las del primero las más pequeñas con un promedio de 158,7 nm. Además las imágenes de VE obtenidas por *exoquick* presentan numerosas estructuras filamentosas agregadas entre sí y otras globulares que no son VE. Para las EV obtenidas de suero se mantienen resultados similares a EV de plasma.

4.1.3. Concentración de RNA_{VE}

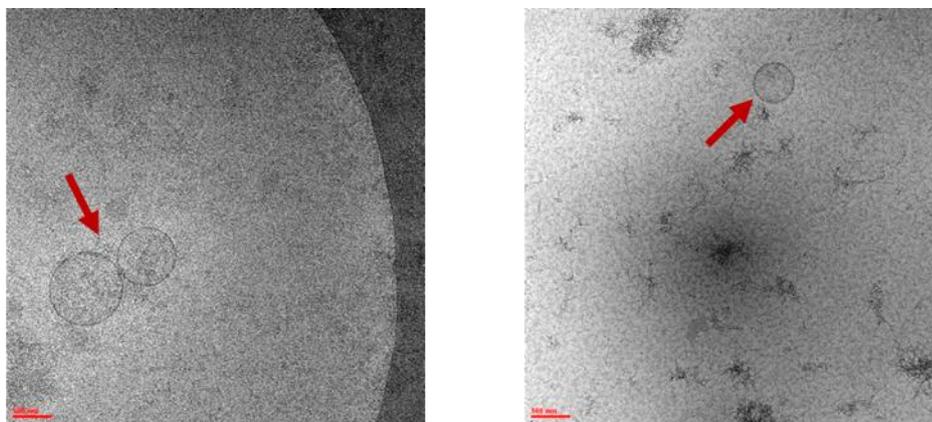
A pesar de que *precipitación salina* y *estándar* son los protocolos con los cuales se observan menores concentraciones de EV, son los que significativamente más RNA extraen (19,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 23,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente) comparando con *centri2500* y *centri13000* (14,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente). Llamativamente *exoquick* obtiene 18,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a pesar de aislar VE a una

concentración 23 veces mayor que *precipitación salina* o *estándar*. En el caso de las EV aisladas desde tubos de suero los resultados son similares a plasma: con *estándar* se obtiene más RNA que *centri13000* y *exoquick* (Figura 22D).

4.1.4. Western blot

La detección de marcadores de EV a través de WB se utilizó como modo confirmatorio de la presencia de EV y para ver diferencias en ellos según la muestra era aislada por uno u otro protocolo.

Se ha observado una importante variabilidad entre métodos. En resumen, se observó que CD63 presentaba mayor señal en las VE derivadas de plasma que en las de suero. Dentro de las VE derivadas de plasma, CD133 tuvo una señal mayor en aquellas aisladas a través de *centri2500* y *centri13000* que mediante los protocolos de *precipitación salina* o *estándar*. CD133 fue también peor detectado en las muestras de suero que en plasma. Por otro lado, CD133 fue, en general, mayor detectado en las muestras derivadas de orina respecto a las derivadas de sangre. Un dato a tener en cuenta es que, en nuestras manos, *exoquick* no se pudo analizar por WB en las muestras derivadas de plasma debido a la imposibilidad de disolver el pellet.



VE derivadas de plasma

VE derivada de orina

Figura 23: Caracterización de VE mediante microscopía electrónica. Dos imágenes de crio-microscopía electrónica de VE derivadas de plasma y orina (señaladas con flechas rojas). La barra roja representa 100 nm. Notoriamente, en la imagen de VE derivadas de orina se observan contaminantes no vistos en las imágenes de muestras derivadas de plasma.

4.2. Orina

4.2.1. Concentración de VE

En el análisis por NTA de EV obtenidas de orina observamos que las concentraciones son bajas para la mayoría de los métodos al punto de no alcanzar el mínimo de tracks. Por lo tanto, al igual que lo sucedido para las muestras de plasma aisladas de los métodos *precipitación salina* y *estándar*, debemos ser cautos al interpretar los datos de NTA de VE derivadas de orina.

Nuevamente, *exoquick* es el método que aísla más VE de orina tanto por NTA como por CMF aunque seguido por *estándar*. Los métodos de *centri2500* y *precipitación salina* presentaron valores similares. La [Figura 22E,F](#) resume los valores obtenidos de concentración de VE derivados de orina, medidos por NTA y CMF respectivamente ([Tabla 6](#)).

En resumen, tanto por NTA como por CMF obtuvimos resultados en proporción similares a los de VE de sangre aunque 10 a 20 veces menos en forma absoluta.

4.2.2. Tamaño de las VE

Las modas de tamaños de VE obtenidas de los distintos protocolos son similares entre ellas y a su vez el promedio de dichas modas (207 nm) es cercano al de VE obtenidas a partir de sangre (228 nm). Al igual que lo sucedido en sangre, las VE más pequeñas fueron aisladas mediante el protocolo *estándar* (163 nm) ([Figura 22G](#)).

Los tamaños analizados por NTA son, nuevamente, congruentes con los observados en ME. Vale aclarar que en las imágenes se aprecia un mayor número de partículas contaminantes no compatibles con VE, que lo observado en sangre ([Figura 23](#)).

4.2.3. Concentración de RNA_{VE}

Sorprendentemente, se obtuvo una concentración mayor de RNA en las EV aisladas con *estándar* (33 µg/µl) y *precipitación salina* (25,9 µg/µl) que con los otros métodos, incluso más que lo obtenido en sangre en donde la concentración de EV es 10 a 20 veces más que en orina ([Figura 22H](#)).

4.2.4. WB

Las muestras de EV de orina obtenidas a través de *exoquick* se pueden usar para WB a diferencia de lo ocurrido con plasma.

Resumidamente, la detección de CD133 en las muestras derivadas de orina es superior en VE aisladas por agentes precipitantes (métodos *exoquick* y *precipitación salina*) que en los métodos de centrifugación, a pesar de que *estándar* revela mejores resultados en orina que en plasma. Por el contrario, en general para todos los métodos, la señal de CD63 es más débil en las EV derivadas de orina comparadas con plasma o suero.

4.3. Correlaciones con parámetros de laboratorio

Se analizó la posibilidad de que las concentraciones de VE obtenidas por los distintos métodos y provenientes de distintas muestras (plasma, suero, orina) tuvieran su reflejo en algún parámetro de laboratorio medido en sangre u orina relacionado con la composición de las VE, principalmente lípidos y proteínas. De esta manera también se pretende inferir si la cuantificación de EV pueda estar artefactada por la variación de estos parámetros, fenómeno previamente descrito¹⁷⁵.

Interesantemente se encontró correlación entre la concentración, medida por NTA, de VE derivadas de plasma obtenidas mediante *centri13000* y el colesterol total ($R = 0,953$; $p = 0,003$) y LDL ($R = 0,935$; $p = 0,006$) en sangre. También observamos correlación entre concentración, medida por NTA, de VE derivadas de plasma obtenidas mediante *estándar* y triglicéridos en sangre ($R = 0,789$; $p = 0,007$).

Respecto a las concentraciones de VE de origen celular específico y el número absoluto de su fuente celular en sangre, no se ha encontrado correlación alguna. Las concentraciones de VEP CD61+ y VEL CD45+ están diagramadas en la [Figura 24](#).

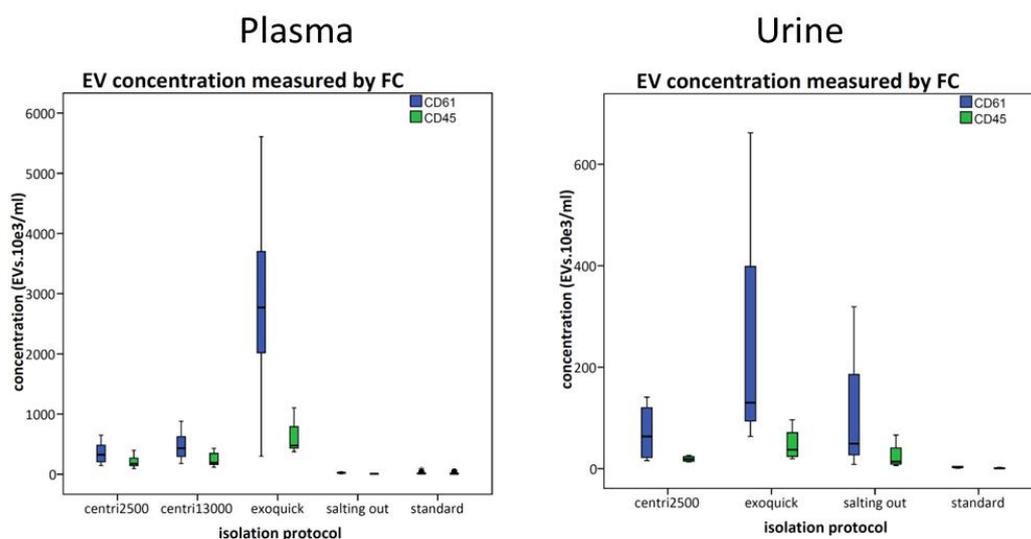


Figura 24: Concentraciones de VE en plasma y orina, derivadas de plaquetas (CD61+) y de leucocitos (CD45+), obtenidas con cada método de aislamiento.

En relación a muestras de EV derivadas de orina, solo se ha encontrado correlación entre la densidad urinaria y la concentración de VE, medida tanto por NTA como CMF, obtenidas por *precipitación salina* ($R=0,841$; $p=0,002$ para NTA y $R=1,000$; $p=>0,001$ para CMF).

5. Discusión

En nuestro estudio hemos comparado los métodos de aislamiento de VE habitualmente usados, incluyendo centrifugación diferencial, aglutinación, precipitación, y el considerado estándar que incluye ultracentrifugación (más filtro). Los cinco métodos requieren de una tecnología sencilla para su aplicación con excepción del método por ultracentrifugación el cual, a pesar de utilizar un instrumento de simple manipulación, no es frecuente encontrarlo en un laboratorio de rutina de cualquier hospital. Pero la elección de uno o varios de ellos como el más adecuado para ser aplicado diariamente en un ambiente hospitalario dependerá en gran medida de cuál es la prioridad a alcanzar con dicho método, las cuales pueden ser entre otras: i) la obtención de la máxima cantidad de VE por volumen de muestra, ii) pureza medida en marcadores y características “clásicas” de las EV, ii) elección de uno de los 3 fundamentales tipos de EV conocidos (exosomas, MP/MV, cuerpos apoptóticos) y iii) el que presente mejor ratio tiempo/coste.

5.1. Aislamiento de VE

En primer lugar observamos que *exoquick*, además de su fácil implementación (rapidez y dependiente de poca tecnología) es el método que significativamente aísla la mayor cantidad de VE respecto a los otros 4 métodos, medido por NTA y CMF. La cantidad es aún mayor partiendo de suero. A su vez la disolución de la muestra derivada de suero en *exoquick* es notablemente mejor que lo sucedido con plasma. Sin embargo esta notoria diferencia (23 veces más que el método *estándar*) podría deberse a la agregación y precipitación de otros elementos suspendidos en la muestra no necesariamente EV, tal como se observa en imágenes de EM. Taylor et al¹⁷⁶ demostraban mayor aislamiento de VE con este método respecto a ultracentrifugación (*estándar*), cromatografía y esferas magnéticas y a su vez, con una pureza mayor de proteínas exosomales y RNA. Nuestros resultados concuerdan en forma parcial con las observaciones de Taylor ya que la concentración de RNA obtenida de *exoquick* es menor que con el método *estándar*. En otro estudio que compara *exoquick* con *estándar*, entre otros métodos, concluye que la combinación de ambos es con el cual se aíslan más EV aunque la mejor calidad de exosomas fue conseguida con *estándar* combinado con gradiente de densidad de sucrosa¹⁷⁷. Finalmente, *exoquick* es el método con un costo mayor que el resto de los comparados en este trabajo.

Las diferencias en las concentraciones entre los dos métodos de centrifugación diferencial (*centri2500* y *centri13000*) no son estadísticamente significativas. Solo se observa mediante citometría de flujo que en el diagrama de FSC/SSC el clúster de VE tiene menos *debries* en

centri13000 y que las VE aisladas con este método muestran un marcaje más intenso con CD63 en WB. Las conclusiones del Workshop de la *Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis* (ISTH SCC) promueven el uso de estos protocolos⁴¹ y de esa manera evitar la variabilidad al resuspender el pellet¹⁶⁵. Sin embargo, en nuestra opinión, la principal desventaja de esta propuesta es que al no concentrar las VE en un pellet, como hacemos en nuestro estudio agregando una centrifugación final a 20000 g, no es posible el posterior lavado de dicho pellet, manteniéndose las VE disueltas en la muestra junto a otras partículas contaminantes como agregados de proteínas. Respecto al tamaño de las VE entre estos métodos es similar, incluso en las imágenes de EM. Concluyendo de esta manera que la segunda centrifugación probablemente no sea tan crítica y podría variar, al menos entre 2500g a 13000g con el objetivo de eliminar debris celulares. Por otro lado estos métodos aíslan unas 6 veces más EV que *estándar* lo que se puede explicar porque son métodos menos “restrictivos”. Finalmente, los requerimientos técnicos de estos dos métodos son accesibles a cualquier laboratorio básico y el tiempo que consume para su aplicación es considerablemente menor que *estándar*.

La ultracentrifugación es actualmente el método “*gold estándar*” para aislar VE, fundamentalmente exosomas. Con la intención de buscar alternativas a este protocolo, Brownlee *et al.*¹⁷² han descrito recientemente un novedoso método denominado *salting out* o *precipitación salina* en castellano, basado en la precipitación de las VE con el agregado de ácido acético. En nuestro estudio, con *precipitación salina* obtuvimos la menor concentración de EV respecto a los demás métodos, aunque similar a la *estándar*, tal como los autores apuntan. Vale hacer la aclaración de que en dicho artículo se aíslan VE de sobrenadante de cultivos por lo que las muestras no son comparables.

Respecto a la distribución de tamaños de VE son similares entre los métodos *exoquick*, *precipitación salina*, *centri2500* y *centri13000* siendo las de tamaño menor a 200 nm las más abundantes. Sin embargo, se observa un cúmulo de VE a un tamaño cercano a 500-600 nm que podría representar las micropartículas. Por el contrario, *estándar* aísla VE de menor tamaño, ya que se utiliza un filtro de 0,22 excluyendo las posibles VE mayores (micropartículas, cuerpos apoptóticos). De acuerdo con Jy y colaboradores¹⁷⁸, creemos que la capacidad de los primeros cuatro protocolos son capaces de enriquecer el aislamiento en vesículas de mayor tamaño y esto puede ser útil a la hora de buscar la aplicación clínica de estas.

En el caso de orina, las concentraciones obtenidas por los distintos métodos fueron bajas por lo que es recomendable diluir poco o no diluir las muestras para analizar por NTA, CMF, WB y CMF. Nuevamente, *exoquick* fue el método con el que se obtuvo mayor concentración de VE,

congruente con los resultados de otros autores¹⁷⁹. Indudablemente, cuando trabajamos con muestras de orina, es crítico evitar proteínas contaminantes como Tamm-Horsfall la cual atrapa VE, y pueden ser eliminadas con el simple agregado de ditioneitol (conocido como DTT) y calor¹⁶. Además, Rood y colaboradores, sugirieron que el método más efectivo en términos de purificación de VE derivadas de orina para luego realizar análisis de proteómica es la combinación de ultracentrifugación seguido de exclusión por tamaño con cromatografía¹⁷. La importante desventaja de este protocolo sería que consume más tiempo que los aquí analizados y requiere infraestructura que puede hacerlo difícilmente compatible con una aplicación clínica habitual.

5.2. Detección y caracterización de VE

Durante el procesamiento de las muestras luego de la centrifugación a 20000 g durante 20 minutos, se observó en algunas de ellas una fina capa lipídica en el sobrenadante. Esto se correspondía en CMF con una densidad de VE mayor. Sin embargo eso no se correlacionó con los resultados por NTA. Se sabe que la densidad y tamaño de las EV puede superponerse con las lipoproteínas y eso producir artefactos en el análisis de CMF^{175,181}. A su vez, hemos encontrado correlación entre las LDL presente en plasma y la concentración de VE en distintos métodos lo que nos hace inferir que al intentar aislar VE, parte de las LDL pueden ser arrastradas y ser interpretadas como VE. Una forma de evaluar la pureza de las VE aisladas es a través del ratio VE/proteínas¹⁸² que ha quedado fuera del alcance de nuestro estudio pero creemos que son métodos simples y comparables interlaboratorio.

Usualmente los métodos utilizados para contabilizar VE son NTA y CMF. Según nuestros resultados no son correlacionables y probablemente sea por el rango en el tamaño de partículas que cada uno puede analizar. La correlación podría ser estudiada a partir de las VE mayores a 400 nm que es el mínimo tamaño en que CMF puede medir, por lo que creemos que más que métodos excluyentes deberían ser complementarios, siendo NTA más preciso para el conteo y CMF para la caracterización múltiple de orígenes celulares.

Dentro de los métodos analizados para valorar el tamaño de las VE vemos que NTA al permitir el análisis individual de cada partícula posibilita realizar comparaciones de distribución de tamaños, mientras que la ME nos da información robusta sobre las características de las VE pero no brinda distribución de tamaños de las VE. En este sentido NTA tiene ventaja al ser un análisis múltiple y en pocos minutos, pero nuevamente debe ser complementado con la ME para caracterizar morfológicamente las VE.

Las tetraspaninas -complejo de proteínas encargadas en el tráfico vesicular intracelular- han sido usadas ampliamente como marcadores generales de VE, sin embargo, durante los últimos años algunos trabajos han revelado que no todas las VE las expresan al mismo nivel, sugiriendo así que diferentes subtipos de VE podrían coexistir en el mismo pellet^{183,184}. CD63 y CD133 son dos de las tetraspaninas más empleadas para caracterizar VE. En nuestro estudio, para el caso de las VE derivadas de orina, CD63 presentó un nivel bajo o indetectable excepto en aquellas obtenidas con el protocolo *estándar*. Tanto la falta de CD63 en las VE derivadas de orina mayores a 100 nm¹⁸⁵ como su expresión en VE obtenidas con el protocolo *estándar*^{186,187} previamente descrito por otros autores, son congruentes con nuestros resultados. Por otro lado, encontramos expresión detectable de CD133 con todos los métodos. De acuerdo con otros autores, concluimos que la presencia de VE CD133+/CD63- demuestra el aislamiento de las vesículas grandes que usualmente expresan este patrón de marcadores^{86,188,189}. Además, Bobrie y coautores describieron que CD63 es un marcador variable solamente encontrado en una fracción del gradiente de sucrosa¹⁸³ lo que implica el cuestionamiento de CD63 como un marcador estándar de VE¹⁹⁰. Luego, la expresión de CD63 es susceptible de ser regulado por SCRT (maquinaria encargada de la formación de cuerpos multivesiculares) llevando a un bloqueo de la evaginación de este subtipo de VE¹⁹¹ y este mecanismo podría ser más frecuente en las VE derivadas de orina resultando en una baja expresión de CD63. Respecto a plasma, la detección del patrón opuesto (CD133-/CD63+) en VE obtenidas a través del protocolo *estándar*, nos permite asegurar que hemos conseguido el aislamiento de una fracción específica de VE, pertenecientes al subgrupo de exosomas¹⁸⁸.

En relación a las concentraciones de RNA_{VE} obtenidas a través de los 5 métodos de aislamiento, observamos una gran variabilidad. A pesar de que Taylor y colaboradores concluyen que *exoquick* aísla más que, entre otros métodos, ultracentrifugación¹⁷⁶ nosotros hemos observado inesperadamente que las concentraciones de RNA obtenidas con los diferentes métodos son similares. Llamativamente, concentraciones altas de RNA fueron obtenidas de VE de orina (especialmente a través de los métodos de *precipitación salina* y *estándar*), incluso con valores similares o mayores que los obtenidos desde plasma y suero a pesar de tener concentraciones entre 10 a 20 veces menores. Estos resultados nos inducen a pensar que como en el presente estudio no hemos usado RNAsas para eliminar los posibles RNA circulantes libres fuera de las VE, las concentraciones de RNA medidas corresponden a ambos tipos (dentro y fuera de VE). En un artículo de posicionamiento de la ISEV los autores sugieren que el uso de RNAsas solo extrae los RNA libres no específicamente unidos a las VE, mientras que su uso en combinación con proteasas elimina además los complejos nucleoproteicos que pueden permanecer adheridos a la membrana de la VE¹⁹². De todos modos, si el objetivo final es utilizar el RNA como una fuente de potenciales

biomarcadores, en nuestra opinión creemos que sería útil preservar no solo el RNA contenido dentro de las VE sino que también el RNA adherido a su membrana.

5.3. VE del laboratorio al paciente

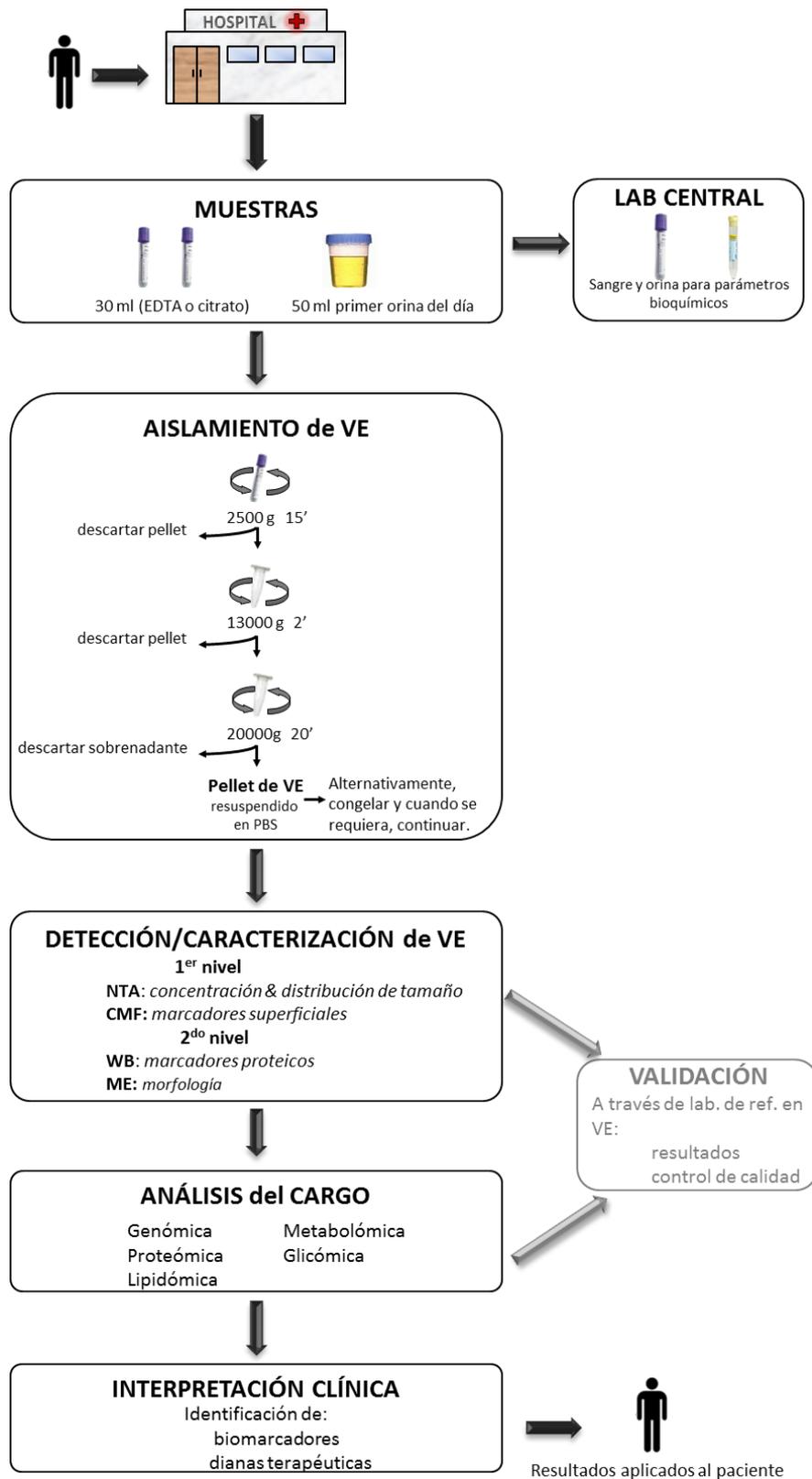
La importancia del estudio de VE para complementar el diagnóstico o pronóstico en numerosas enfermedades está ampliamente demostrado y con una tendencia *in crescendo* de publicaciones enfocadas en ello ^{193,194,195}. Aún más, su aplicación como terapia ya ha sido probada en ensayos clínicos con resultados prometedores ⁷⁸. Sin embargo, creemos que un flujo de trabajo que comprenda desde la recolección de las muestras para luego aislar, procesar y caracterizar VE con las cuales obtener resultados válidos a ser aplicados en pacientes necesita ser estandarizado con urgencia. Específicamente, los diferentes métodos de aislamiento obtienen subtipos de VE disimiles y en consecuencia, los estudios ómicos llevados a cabo en ellas podrían dar resultados incomparables. Además, no todos estos métodos son aplicables en un entorno hospitalario.

Con el objetivo de contribuir a este debate y de acuerdo a los resultados del presente trabajo, consideramos que el método *centri13000* es el más adecuado para ser insertado en un ambiente hospitalario ya que: a) requiere una infraestructura simple disponible en un laboratorio general, prescindiendo de ultracentrífuga, b) aísla VE con características similares a las aisladas por *estándar* pero con mayores concentraciones, c) recupera no solo las VE pequeñas como estándar sino que además recupera las de mayor tamaño y d) las VE aisladas mediante este método presentan menos contaminación, mediante análisis por CF y WB, comparado con *centri2500*.

Coincidimos con Deun y colaboradores ¹⁹⁶ en que es necesario una validación del sistema de aislamiento por lo que proponemos que dicha validación podría ser llevada a cabo por un laboratorio de referencia dirigido por un grupo con demostrada experiencia en el ámbito de las VE. Los resultados obtenidos en un entorno clínico deberían ser comparados con los del laboratorio de referencia para asegurar entonces un control de calidad. Por otro lado, para la posterior detección y caracterización de las VE, recomendamos analizarlas con al menos un método de cuantificación (NTA o CMF) y uno de caracterización (WB, ME o CMF si no se utilizó en la cuantificación) dando así una información complementaria y completa ([Figura 25](#)).

En conclusión, el aislamiento de VE, al menos para aquellas derivadas de plasma, un método de centrifugación diferencial de velocidad media (*centri13000*) y su posterior análisis con al menos un método de cuantificación (NTA, por ejemplo) y otro para caracterización (CMF o WB por ejemplo) podría encajar en un flujo de trabajo que una desde el paciente al laboratorio y vuelva al paciente en forma de información que contribuya a su manejo clínico.

Figura 25: (página siguiente). Flujo de trabajo propuesto para el estudio de las vesículas extracelulares (VE) en un entorno hospitalario. Los pacientes que son visitados (durante la mañana) en el hospital se someten a la recogida de muestras de 30 ml de sangre (EDTA o citrato) y 50 ml de la primera micción de orina del día. Inmediatamente, 15 ml de sangre y 40 ml de orina se destinan al protocolo de aislamiento VE y el resto de 15 ml y 10 ml se envían al laboratorio central para analizar parámetros bioquímicos. El sedimento obtenido de VE se resuspenden en PBS o podría opcionalmente ser congelado y continuar con el procedimiento cuando se requiera. Luego, la detección/caracterización de VE se divide en dos niveles: por un lado cuantificación y tamaño (NTA) y por otro caracterización con citometría de flujo (CMF), más western blot (WB) y microscopía electrónica (ME). Posteriormente, el análisis del cargo de VE puede realizarse con varias plataformas ómicas permitiendo la identificación de compuestos específicos llevados por las VE. Tanto la detección como el estudio del cargo de las VE deberían ser referenciados a un laboratorio experto en VE con el fin de proporcionar una validación de los resultados y pasar una prueba de control de calidad. Por último, las moléculas detectadas son interpretadas en el contexto global del paciente con el objetivo de identificar biomarcadores o una posible diana terapéutica. Los resultados proporcionados por el estudio de VE se aplican de nuevo al paciente con el fin de mejorar el diagnóstico o curso de la enfermedad.



CAPITULO 3

Análisis del cargo de las vesículas extracelulares de pacientes de esclerosis múltiple

1. Introducción

En los capítulos anteriores nos hemos centrado en el número y el origen de las VE, mientras que en este profundizaremos en su potencial capacidad de provocar una respuesta en las células receptoras. Esta capacidad funcional de las VE probablemente esté ligada tanto a los receptores en su membrana como al cargo contenido en su interior. Dicho cargo comprende proteínas, material genético, lípidos, y glúcidos que la célula de origen selecciona para luego excretar al medio extracelular. A su vez, el enriquecimiento del contenido se ve influido por el microambiente en que se encuentre la célula. Es así como los distintos estados de una enfermedad pueden modificar el microambiente celular y estimular a un cambio del cargo. En sentido inverso el estudio de esta fracción subcelular ha permitido comprender diversos procesos fisiológicos y patológicos y a su vez, ha sido propuesto como una fuente de biomarcadores para numerosas enfermedades.

La caracterización del cargo se ha llevado a cabo en VE de diferentes tejidos en humanos, así como en modelos *in vitro* de enfermedad o líneas celulares tumorales en un intento de reflejar lo ocurrido en los pacientes. Concretamente en enfermedades del SNC, la mayoría de los estudios realizados han sido en modelos *in vitro*, como el caso de la enfermedad de Alzheimer⁹⁸ y tumores cerebrales¹⁹⁷, principalmente glioblastoma. Por otro lado, en el año 2014 se publicó un interesante estudio que describe el perfil proteómico de VE de LCR humano realizado por espectrometría de masas¹⁹⁸. Aunque no explica si los individuos donantes de LCR sufren o no alguna enfermedad, este estudio aporta una completa base de datos de proteínas presentes en LCR, muchas de las cuales tienen íntima relación con el desarrollo de enfermedades del SNC. Toda la información del cargo que estos estudios ofrecen, está disponible en las bases de datos públicas y constituyen una buena herramienta de comparación. En el caso de de la EM no hay todavía estudios sobre el cargo en pacientes ni en su modelo animal por lo que pese a saber que las VE tienen relación con la enfermedad desconocemos el rol que juega el cargo.

Decíamos que el cargo de las VE se ha propuesto como fuente de biomarcadores, tanto diagnóstico, pronóstico o de monitorización de tratamientos. En la EM se utiliza como biomarcador diagnóstico y pronóstico el estudio de las bandas oligoclonales (BOC) tipo IgM en el LCR. En este sentido, el análisis del cargo de VE de LCR puede ser una fuente potencial de biomarcadores en las enfermedades del SNC, más concretamente en la EM. A su vez, la comparación con el cargo de las VE circulantes en sangre en el mismo paciente podría permitir la

obtención de marcadores subrogados de lo que sucede en el parénquima nervioso, evitando en un futuro la necesidad de una punción lumbar.

Por último, como toda enfermedad autoinmune, la EM presenta una desregulación del sistema inmune. Es conocida la existencia de un predominio de componentes pro inflamatorios durante las fases remitente-recurrente (EMRR) con un perfil de citoquinas tipo Th1/Th17 liberadas al medio extracelular¹⁹⁹ mientras que durante las fases progresivas (EMSP y EMPP) el componente degenerativo es el predominante, con más participación de citoquinas reguladoras tipo Th2/Th22^{200,201}. Se ha descrito la relación entre las VE y la propagación de la respuesta inmune, pero no se ha estudiado hasta el momento el papel que pueden jugar las VE circulantes en sangre en el tráfico de citoquinas durante las distintas fases de la EM.

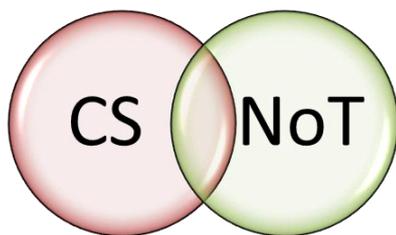
Por todo ello, en este trabajo hemos intentado profundizar en la caracterización desde diferentes aproximaciones del mensaje que portan las VE.

2. Objetivos

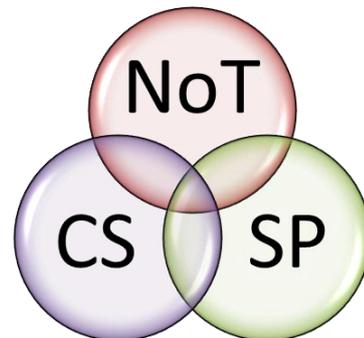
En el presente capítulo, para la descripción del cargo de las VE realizamos 3 experimentos con las aproximaciones habitualmente empleadas como son la proteómica y la transcriptómica, más un estudio multiplexado del contenido en citoquinas. Para ello incluimos muestras de pacientes en las principales formas clínicas de la enfermedad ([Figura 26](#)) con el objetivo de:

- Estudiar el cargo proteico de las VE de pacientes NoT y compararlo con el de CS, pareados por sexo y edad.
- Caracterizar el perfil de citoquinas transportadas por las VE en pacientes con EM (RR no tratado y EMSP) y compararlo con controles sanos.
- Analizar las moléculas de RNA (mensajero y micro) presentes en las VE obtenidas en LCR y suero de pacientes con EM y relacionar los resultados obtenidos con el patrón de BOC IgM. A su vez, estudiar las diferencias según la fuente de obtención de las VE: LCR y suero.

PROTEOMICA: espectrometría de masas



CITOQUINAS: luminex



TRANSCRIPTÓMICA:
secuenciación de RNA

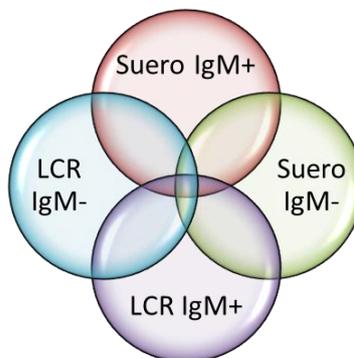


Figura 26: Experimentos realizados para el análisis del cargo de VE. CS: control sano; NoT: pacientes de EM no tratados; SP: pacientes con diagnóstico de EM secundaria progresiva.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras de pacientes y controles sanos

Todos los pacientes de EM estudiados cumplían los criterios diagnósticos de McDonalds revisados en 2010. En el caso de pacientes no tratados (NoT), para la recolección de muestras se tuvo en cuenta que haya pasado al menos seis meses después de la última dosis de corticoides en caso de haber habido un brote. La selección de los NoT pretende reflejar el estadio de la enfermedad libre de modulación externa ejercida por el tratamiento. A los controles sanos (CS) se les realizó un cuestionario para descartar enfermedades o utilización de medicamentos que puedan interferir en el estudio.

Para el estudio de proteómica utilizamos muestras de sangre periférica de cuatro pacientes NoT. Se seleccionan dos varones y dos mujeres para poder apreciar diferencias según sexo y se compararon con cuatro controles sanos (CS) pareados por sexo y edad.

En el estudio de citoquinas, se recolectaron muestras de sangre periférica de 11 NoT, 12 EMSP, y 11 CS.

Las muestras utilizadas en el estudio de transcryptómica fueron cedidas por la Dra. Luisa M. Villar del Hospital Ramón y Cajal, Madrid y consisten en el par LCR/suero de pacientes diagnosticados de EM clasificados según sus resultados del estudio de BOC, realizado por el método de fosfatasa alcalina, en IgM positivas (IgM+) o negativas (IgM-). A su vez, todos eran positivos para IgG. La media de edad era de $29,5 \pm 5,4$ años y todos los pacientes eran de sexo femenino.

Las características de los sujetos a estudio se describen en la [Tabla 7](#).

Tabla 7: Características generales de pacientes no tratados y controles sanos para el estudio de proteómica.

| tipo | edad | t evol | EDSS |
|-------------|------|--------|------|
| NoT1 | 33 | 3,7 | 0 |
| NoT2 | 34 | 0,3 | 0 |
| NoT3 | 32 | 10,5 | 2 |
| NoT4 | 31 | 0,3 | 0 |
| CS1 | 32 | - | - |
| CS2 | 34 | - | - |
| CS3 | 33 | - | - |
| CS4 | 31 | - | - |

3.2. Aislamiento de VE

Las VE fueron aisladas siguiendo el método de centrifugación seriada denominado “centri13000”, descrito en la sección de materiales y métodos comunes, apartado “Aislamiento de vesículas extracelulares con el método `centri13000`”.

Para el estudio de citoquinas, luego del aislamiento, se procedió a la digestión de la membrana plasmática vesicular con el agregado de 200 µl de Tritón 1% durante 60 minutos. La detención de la reacción se realizó con el agregado de 200 µl de PBS.

En el estudio de transcriptoma, las muestras recolectadas según los protocolos establecidos en el laboratorio del Hospital Ramón y Cajal, habían sido procesadas a 300 g durante 15 minutos para los LCR y a 1300g durante 10 minutos para los sueros. Para evaluar de forma orientativa qué concentración de VE había en dichas muestras de LCR, se analizó por citometría de flujo una muestra de CS. No obtuvimos una cantidad de eventos mínimos que permitiera un análisis válido. Posteriormente, se probó la precipitación de exosomas con exoquick (System Bioscience) en nuevas muestras de CS, tanto de suero como LCR, obteniendo pequeños pellets, de los cuales se extraía escaso contenido de RNA. Finalmente, se decidió realizar la extracción, tanto para LCR como suero, de RNA libre de células con el kit mirEasy serum/plasma (Qiagen), aunque sin otro proceso extra de enriquecimiento en VE incluyendo así el RNA contenido en las VE y el circulante libre. Aún así, debido a la baja concentración de RNA, medida en Nanodrop, tanto para LCR como para suero (media de 15 ng/µl) decidimos agrupar las muestras según el patrón de BOC IgM obteniendo una concentración de 30 a 50 ng/µl en cada grupo. En total se confeccionaron 4 agrupamientos o pools de 3 muestras cada una:

- LCR IgM+
- Suero IgM+
- LCR IgM-
- Suero IgM-

3.3. Análisis por espectrometría de masas

El análisis proteómico se realizó en la Unidad de Proteómica de NavarraBiomed, Pamplona, dirigida por el Dr. Enrique Santamaría. Los protocolos empleados fueron los mismos que los publicados por Liechtenstein y colaboradores²⁰².

El fundamento de la proteómica diferencial radica en la precipitación de proteínas de VE de las 8 muestras, digestión y marcaje con la tecnología iTRAQ, fraccionamiento mediante HPLC para la obtención de subfracciones y posterior análisis por espectrometría de masas de alta resolución²⁰³.

Para evaluar si la técnica iTRAQ era válida para muestras de VE, decidimos primero hacer un análisis cualitativo con una muestra control, denominado “estudio previo”. Posteriormente, observando que obteníamos resultados válidos, procedimos al análisis específico de las muestras de pacientes y controles sanos.

En nuestro experimento, de manera somera, este procedimiento consistió en desnaturalizar con un tampón específico, cuantificar por Bradford y precipitar con metanol y cloroformo las proteínas a partir de 10 μ l de VE (por cada muestra). En lo posible se intentó conseguir 80 μ g en total (según nuestros estudios previos, la concentración de proteínas de VE es aproximadamente 15 a 20 μ g/ μ l). Posteriormente, procedimos a la reducción de las proteínas con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), alquilación con metil metanetiosulfonato (MMTS) y digestión con tripsina. Luego, realizamos el marcaje por separado de cada muestra con iTRAQ 8 plex (Kit de ABSciex) para inmediatamente mezclarlas en un único tubo, siguiendo el protocolo del fabricante. Con el objetivo de reducir la complejidad de la muestra y aumentar así la cobertura del proteoma a analizar fraccionamos la muestra mediante HPLC de fase reversa en un pH 9.8. Finalmente, cada fracción recogida en el proceso anterior se analizó por espectrometría de masas mediante LC-MS/MS en un 5600 TripleTof (ABSciex) con un gradiente de 3 horas y una columna de 25 cm. En el análisis bioinformático para la identificación de proteínas utilizamos el software ProteinPilot versión 4.5 (ABSciex) haciendo uso del algoritmo Paragon²⁰⁴ como motor de búsqueda y explotación de datos mediante Ingenuity (Qiagen). En la [Figura 27](#) se esquematiza el flujo de trabajo seguido en el estudio por espectrometría de masas.

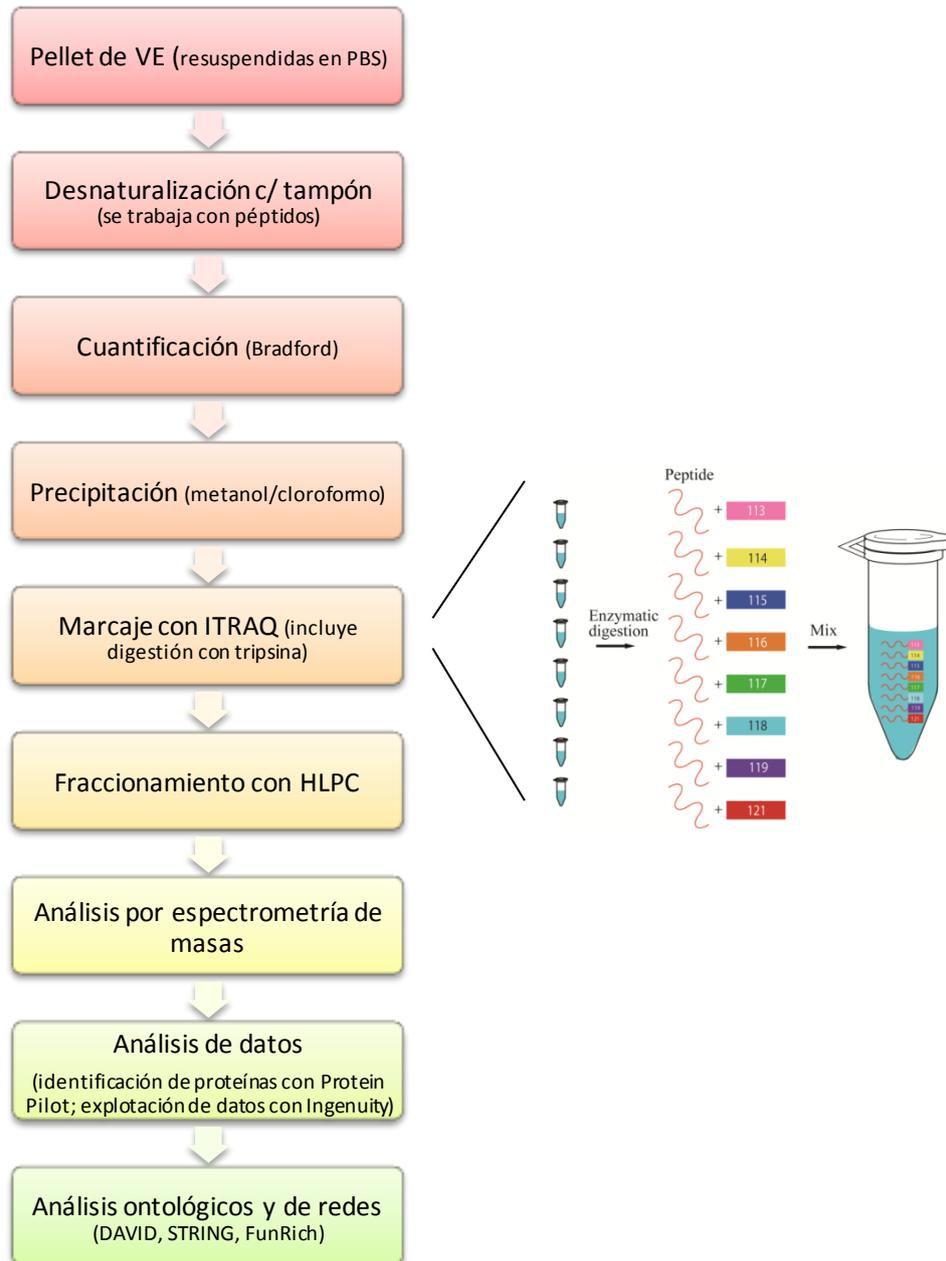


Figura 27: Esquema del procedimiento para el estudio proteómico mediante el marcaje con iTRAQ 8 plex y posterior análisis por espectrometría de masas.

3.4. Análisis diferencial de datos

El listado de proteínas deriva de un filtrado estadístico, en el que se han tenido en cuenta solo las identificaciones que superan el punto de corte dado por el FDR (del inglés: *false discovery rate*, definido como el porcentaje de proteínas señuelo identificadas sobre el total de proteínas identificadas) menor al 1%. Con el objetivo de minimizar la aparición de falsos positivos debido a asignaciones erróneas del motor de búsquedas se trabajó a precisiones de masa por debajo de 5 ppm de error.

Finalmente, para el análisis diferencial se tomó como referencia la primera muestra (CS1) y se calcularon ratios de expresión de las 7 muestras restantes. Se construyó un “volcano plot” donde se incluyeron las proteínas que tenían una expresión similar entre controles, con un ratio mayor a 0,8 y menor a 1,3 (con $p > 0,05$) y a su vez, que el ratio entre cada NoT y el CS1 fuera mayor a 1,3 (mayor nivel de expresión) o menor a 0,8 (menor nivel de expresión). Se propone así una lista de proteínas candidatas en la que los cuatro CS tienen el mismo nivel de expresión, y al menos dos de los NoT tienen un nivel de expresión diferente.

Tanto la lista de proteínas coexpresadas en las 8 muestras como la lista de proteínas diferencialmente expresadas entre CS y NoT se compararon con las bases de datos Exocarta²⁰⁵ y Vesiclepedia²⁰⁶. Estas bases de datos son un compendio colaborativo de proteínas y genes identificados en VE, clasificados según especie donde se detectaron, tejido de origen, método de obtención, etc.

Por otro lado, se analizaron dichas listas mediante las herramientas bioinformáticas DAVID v6.7 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, <https://david.ncifcrf.gov/>)²⁰⁷, FunRich v2.1.2 (incluido dentro de la página web Vesiclepedia y Exocarta^{205,206}) y STRING v9.1 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, <http://stringdb.org>). Estos programas infieren rutas metabólicas activadas o desreguladas dentro de las proteínas evaluadas, proporcionan datos sobre el tejido y parte celular en que se expresan las proteínas y en qué procesos biológicos están implicadas. Si bien se utilizaron las tres herramientas para el análisis de datos con el objetivo de dar robustez al mismo, finalmente al observar similitud entre los resultados optamos por *FunRich* para mostrar gráficamente los resultados y STRING para diagramar las redes de proteínas tanto coexpresadas como diferencialmente expresadas.

3.5. ELISA para detección del factor de von Willebrand

La validación de la presencia del factor de von Willebrand en VE se llevó a cabo mediante kit específico de ELISA (AbCam) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron VE, aisladas como se indica anteriormente, de 10 CS, 9 NoT, 5 EMSP, 3 EM priparia progresiva, 14 EM tratados (5 con IFN β , 5 con NTZ y 4 con FGM), diluidas a 1:100 en diluyente provisto por el kit filtrado. Posteriormente debimos repetir el ensayo diluyendo las muestras a la mitad (1:200) debido a que, con la dilución indicada por el fabricante (1:100), los valores de absorbancia quedaban fuera de rango de la curva estándar.

Como se observará en los resultados, no obtuvimos validación del estudio de proteómica. Pudiendo deberse esto a la diferencia entre los procesamientos de las muestras (en el análisis por

espectrometría de masas se digieren las proteínas a nivel de péptidos mientras que en nuestro protocolo de aislamiento para el ELISA vWF no), utilizamos entonces el buffer de lisis del protocolo empleado en masas que contiene CHAPS. Este es un detergente no desnaturizante para solubilizar proteínas de membrana y romper interacciones proteína-proteína. También comparamos con otro detergente, Triton, al 0,1% y 1%. Obtuvimos resultados dispares pero entre las dos concentraciones de tritón no hubo diferencia y esta era mayor que sin tratar las muestras. Por otro lado tratando las muestras con el buffer de lisis observamos menos cantidad de vWF que sin tratarlas. Por lo tanto la validación final se realizó tratando las muestras con tritón al 1% en 14 CS y 15 NoT.

3.6. Ensayo multiplexado de detección de citoquinas (tecnología Luminex®)

Utilizamos el kit MILLIPIX MAP *Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel* (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, en la placa provista en el kit se añaden 25 µl de muestra más 25 µl de buffer y luego 25 µl de una mezcla de microesferas magnéticas con el anticuerpo de captura específico para cada citoquina (en nuestro caso analizamos: IL6, IL17, TNFα, IL23, IL1β, IL2, Fractalkina, MIP-1β, IL21, I-TAC e IL10). Se incuba durante la noche, en agitación a 4°C y luego se añade un anticuerpo biotinilado para la detección incubándolo 1 hora. Posteriormente, se añade un conjugado de estreptavidina-PE como molécula reportera que completa la reacción en la superficie de cada microesfera y se incuba durante 30 minutos. Finalmente se lee en el analizador MAGPIX (Millipore) donde cada microesfera es individualmente identificada gracias a su color y asociado a esta identificación se analiza la intensidad lumínica dada por la presencia del reportero streptavidina-PE. De esta manera, la posibilidad de añadir varias microesferas conjugadas a la vez a una misma muestra permite obtener múltiples resultados en cada una de ellas

3.7. Secuenciación

Las 4 muestras de RNA de pacientes con BOC IgM + o - fueron secuenciadas en un chip de 318 pocillos con el sistema PGM (del inglés: *personal genome machine*) de Ion Torrent (Life Technologies) utilizando kits de 100 pares de bases. La confección de las librerías se realizó siguiendo el protocolo del fabricante.

3.8. Análisis informático

El análisis de expresión diferencial del transcriptoma se llevó a cabo con la plataforma virtual de acceso libre Galaxy (Johns Hopkins University) siguiendo el protocolo propuesto

por Trapnell *et al*²⁰⁸. Brevemente, las lecturas obtenidas se alinearon y mapearon al genoma humano v19 utilizando la herramienta *TopHat*. Posteriormente se evaluó la calidad de las muestras mediante la herramienta *FastQC* y se procedió a la limpieza y optimización de los datos de cada muestra en base a dicho informe de calidad con *Trimmer*. Luego, los datos obtenidos (*accepted hits, splice junctions, deletions, insertions*) codificados en archivos visualizables (bam, bed) se ensamblaron mediante la herramienta *Cufflinks* que estima la abundancia relativa de los transcritos ensamblados en base al número de lecturas. Los cruces de las muestras, realizados de dos en dos (4 análisis en total) se confeccionaron con la herramienta *Cuffmerge*. Para la obtención de las diferencias de expresión de RNA entre las muestras cruzadas se usó la herramienta *Cuffdiff* a partir de los datos obtenidos del paso previo. Finalmente el informe (resumen y gráficos: regresión y densidad) de las diferencias de expresión de cada muestra se confeccionó usando la herramienta *CummeRbund*. En la [Figura 28](#) se presenta el esquema resumido del análisis informático.



Figura 28: Flujo de trabajo realizado en el estudio de secuenciación de VE.

3.9. Análisis estadístico

Se realizó con el paquete informático PASW Statics v18.0 (SPS inc.). Para evaluar las diferencias entre grupos, se aplicó el Análisis de varianzas (ANOVA) más corrección con Bonferroni. El error de tipo I se estableció en 0,05.

4. Resultados

4.1. Proteómica

En un primer análisis que denominamos “estudio previo”, cotejamos el listado de proteínas identificadas en las VE (N=160) con la base de datos Exocarta, observando que 32 de ellas (20% del dataset) se han visto previamente en VE humanas por espectrometría de masas. Las 128 que no están en Exocarta probablemente en su mayoría sean plasmáticas. En un segundo análisis teniendo en cuenta la base de datos Vesiclepedia y el artículo citado en la introducción referente a la caracterización del proteoma de VE en LCR, detectamos 34 proteínas en VE ya descritas en Vesiclepedia y 87 proteínas en VE que también se encontraron en VE de LCR.

En resumen, la muestra analizada presenta un componente plasmático notorio. Se han observado proteínas aún no registradas en vesiclepedia y/o exocarta. Llamativamente cerca del 50% de las proteínas vistas (87 de 160) se han descrito en VE de LCR.

Al verificar en el “estudio previo” que éramos capaces de identificar proteínas con nuestros protocolos, procedimos al estudio específico entre CS y pacientes NoT, cuyos resultados se muestran a continuación.

4.1.1. 70% de proteínas no identificadas previamente en bases de datos de VE

Del análisis por espectrometría de masas se obtuvo una lista inicial de 98 proteínas presentes en las cuatro muestras. A su vez, el 35,7% (35 de 98) habían sido previamente reportadas como cargo de VE en la base de datos de Vesiclepedia y el 32,7% (32 de 98) en Exocarta. Curiosamente, 35 son proteínas también presentes en VE de LCR según el estudio citado. Por último, 26 proteínas son comunes a las 3 bases de datos y nuestro estudio, es decir que cerca de un 70% de las proteínas identificadas no habían sido previamente reportadas en estudios de VE.

4.1.2. Las proteínas identificadas están involucradas en hemostasia y transporte de lipoproteínas

Tras la búsqueda de aquellas diferencialmente expresadas según el algoritmo descrito en el apartado de análisis de datos, encontramos que del total de proteínas presentes en las 4 muestras solo 7 cumplían las condiciones destacándose el factor de von Willebrand, estando infraexpresado aproximadamente 4 veces en todas las muestras de NoT respecto a CS ([Tabla 8](#)).

[Tabla 8](#): Proteínas diferencialmente expresadas entre CS y NoT.

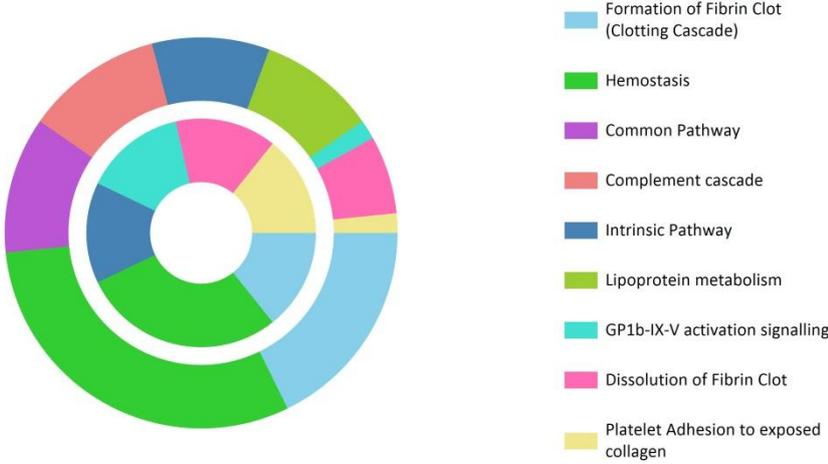
| Nombre | Ratios sobre CS 1 | | | | | | |
|--|-------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| | CS 2 | CS 3 | CS 4 | NoT 1 | NoT 2 | NoT 3 | NoT 4 |
| von Willebrand factor | 1,12 | 1,16 | 1,22 | 0,29 | 0,22 | 0,26 | 0,52 |
| Complement factor H | 0,92 | 0,82 | 1,12 | 1,02 | 0,71 | 0,76 | 0,95 |
| Ig kappa chain C region | 1,20 | 1,13 | 0,91 | 1,42 | 0,78 | 1,12 | 1,41 |
| Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 | 0,86 | 0,78 | 1,03 | 1,61 | 0,95 | 1,03 | 1,46 |
| Histidine-rich glycoprotein | 0,92 | 1,06 | 1,12 | 0,94 | 0,83 | 1,42 | 1,37 |
| Ficolin-3 | 1,07 | 1,27 | 0,95 | 1,45 | 0,85 | 1,04 | 1,47 |
| Actin, cytoplasmic 2 | 0,95 | 0,84 | 1,30 | 1,66 | 1,25 | 1,43 | 2,00 |

En azul claro valores de infraexpresión y en verde de sobreexpresión de NoT respecto a CS.

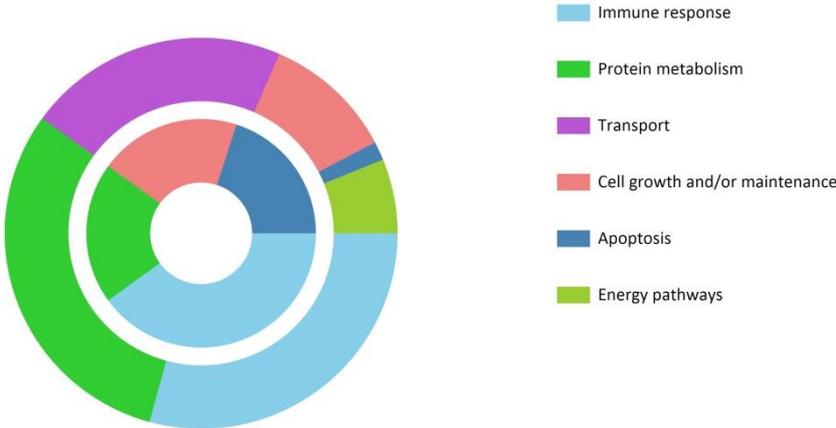
Con el objetivo de evaluar en qué procesos biológicos estaban implicadas las proteínas totales, presentes en las 4 muestras, procedimos al estudio ontológico mediante la herramienta de acceso libre DAVID y FunRich. Observamos que las principales vías están relacionadas con procesos de hemostasia, específicamente en la regulación de la formación del coagulo de fibrina y del metabolismo y transporte de lipoproteínas. Estas vías a su vez están involucradas en la respuesta inmune, metabolismo de proteínas y transporte, entre los más destacados proceso biológicos. Además la ubicación de la mayoría de estas proteínas es extracelular, algunas en lisosomas y otras en gránulos de plaquetas. Resultados similares se observaron para las 7 proteínas diferencialmente expresadas entre CS y NoT (Figura 29).

Figura 29: Análisis ontológicos de las proteínas coexpresadas (círculos externos) y diferencialmente expresadas (círculos internos) en CS y NoT. Se detallan las vías metabólicas, los procesos biológicos y la ubicación celular de las proteínas analizadas. (En la página siguiente).

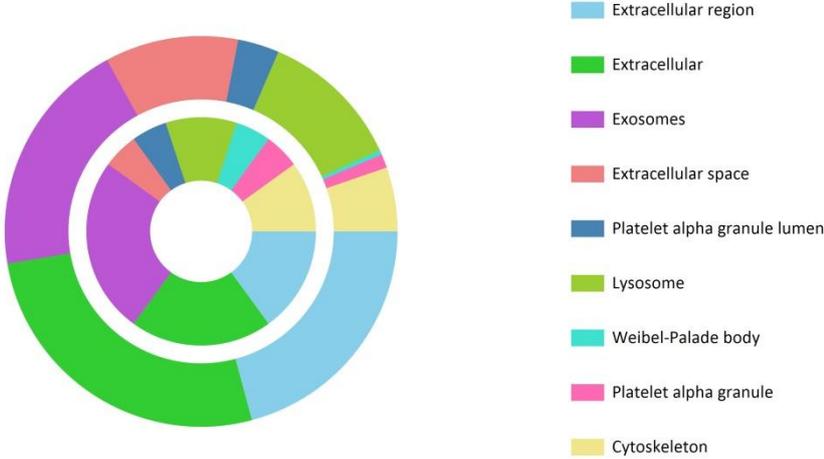
Biological pathway Comparison



Biological process Comparison



Cellular component Comparison



La estructura de la red de proteínas totales es compacta lo que refleja una estrecha relación entre sus componentes. El factor de von Willebrand es justamente un nodo importante de la red y en íntima relación con la albumina. Al agruparlas por MCL (del inglés: *Markov Cluster Algorithm*, algoritmo de agrupación gráfica de Markov) se observó que estas dos proteínas y otras relacionadas con la coagulación quedaron incluidas en el agrupamiento mayor de la red (proteínas en color rosa) (Figura 30).

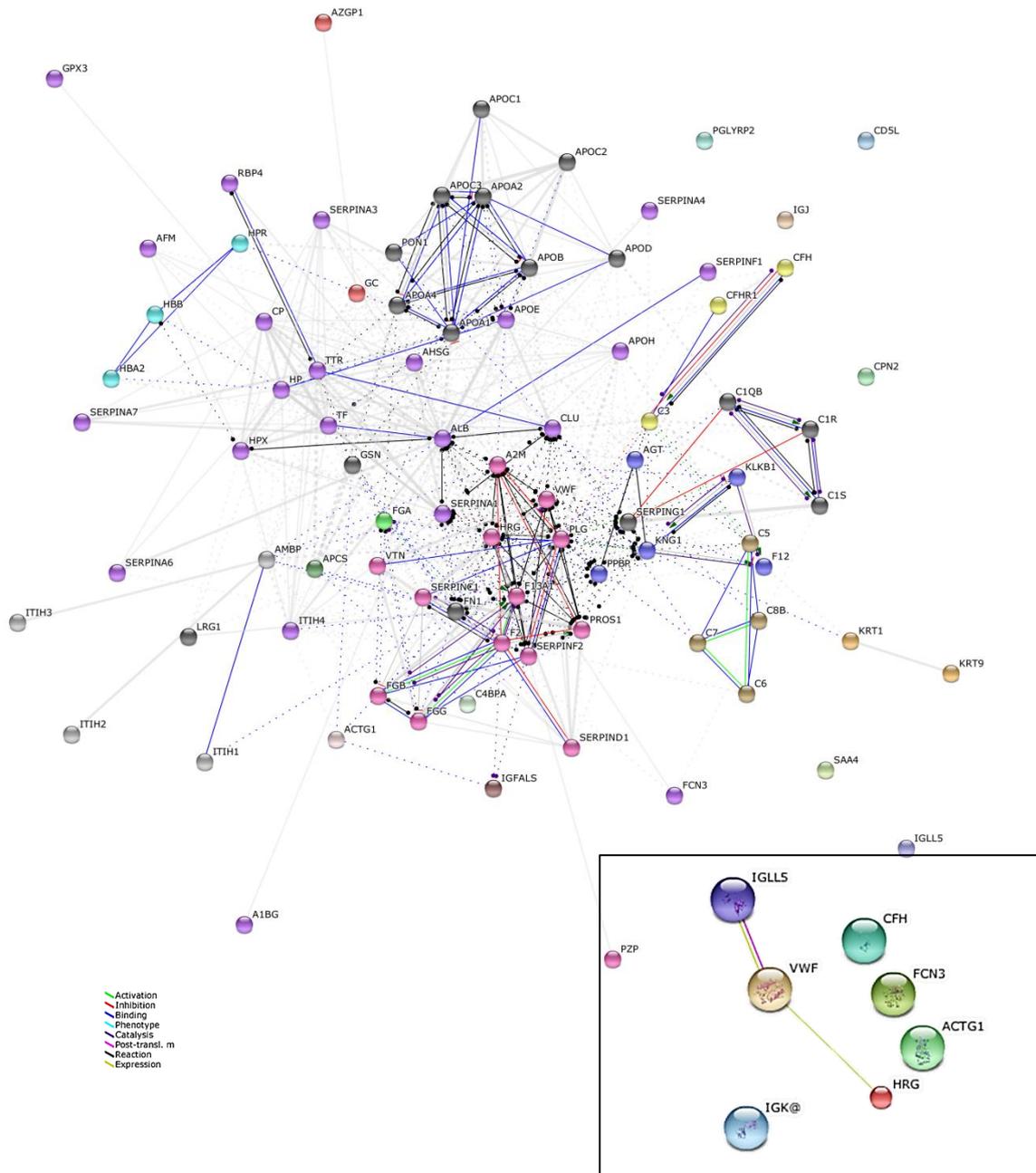


Figura 30: Imagen de la red de proteínas obtenidas en el análisis mediante la herramienta STRING de la lista de proteínas co-expresadas en las cuatro muestras. En el recuadro inferior derecho la red de proteínas diferencialmente expresadas entre CS y NoT.

Posteriormente se realizaron todos estos análisis segregando por sexo sin encontrarse diferencias con el análisis global. Sin embargo, cabe destacar que en 4 de las 98 proteínas (serotransferrina, alfa 2 macroglobulina, globulina de unión al corticoesteroide y angiotensinógeno) presentaban un patrón opuesto de expresión entre pacientes hombres y mujeres.

4.1.3. Validación del factor de von Willebrand

En la validación final observamos una gran variabilidad de concentración de factor de von Willebrand tanto en CS como en NoT. No hay diferencias significativas entre los grupos y no podemos concluir la diferencia observada en el estudio por espectrometría de masas.

4.2. Citoquinas

En 9 de las 11 citoquinas analizadas no se consiguió alcanzar el umbral de detección. Solo para I-TAC y TNF α se obtuvieron valores posibles de ser analizados (por encima del umbral), aunque también siendo muy cercanos al límite de detección. En ambas citoquinas se observa una variabilidad muy importante dentro de cada grupo (CS, NoT y SP) y en ninguno de los casos existe diferencia significativa entre grupos (Figura 31).

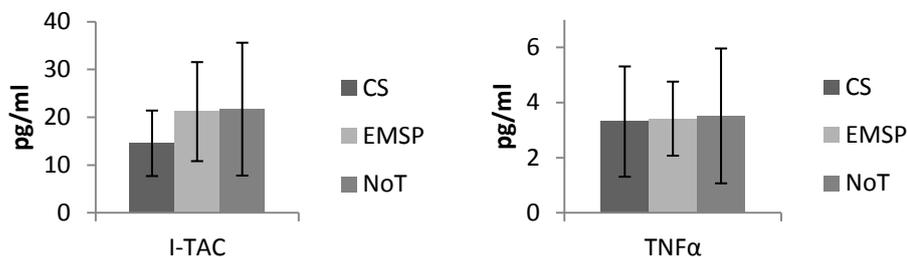


Figura 31: Concentraciones de citoquinas en VE. CS: controles sanos; EMSP: pacientes de EM secundaria progresiva; NoT: pacientes de EM no tratados. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos

4.3. Transcriptómica

4.3.1. Control de calidad (QC) y limpieza de los datos

Para realizar el análisis de calidad de los datos de origen se utilizó la herramienta FastQC, incluyendo los siguientes test: calidad de secuencia por base, puntuación de calidad por secuencia, contenido por base de la secuencia, contenido G+C por base, contenido G+C por secuencia, niveles de duplicación y secuencias sobrerrepresentadas.

En base a los resultados del control, se concluye los niveles de calidad de los datos de partida son bajos, y pueden condicionar la fiabilidad de los procesos subsiguientes del análisis. Para mitigar estos efectos, se procedió a realizar una limpieza de los datos mediante filtro de calidad (excluye lecturas de baja calidad en base a su puntuación) y recorte (*trim*) de los extremos 5'. De esta forma se consiguió aumentar significativamente el valor promedio de calidad de los datos, aunque reduciendo el tamaño muestral. Los parámetros de limpieza fueron los siguientes:

QC de Pool 1: Filtro: Valor de corte de calidad: 20 = Porcentaje de bases por encima del valor de corte = 90. Trim: se excluye por encima de la base 230. Porcentaje de muestra excluida: 70%. Tamaño final: 245.208 lecturas.

QC de Pool 2: Filtro: Valor de corte de calidad: 20 = Porcentaje de bases por encima del valor de corte = 90. Trim: se excluye por encima de la base 230. Porcentaje de muestra excluida: 65%. Tamaño final: 190.090 lecturas.

QC de Pool 3: Filtro: Valor de corte de calidad: 20 = Porcentaje de bases por encima del valor de corte = 90. Trim: no se ejecuta. Porcentaje de muestra excluida: 73%. Tamaño final: 209.984 lecturas.

QC de Pool 4: Filtro: Valor de corte de calidad: 20 = Porcentaje de bases por encima del valor de corte = 90. Trim: se excluye por encima de la base 230. Porcentaje de muestra excluida: 48%. Tamaño final: 377.099 lecturas.

4.3.2. Alineamiento y mapeado

El mapeado de secuencias se realizó sobre el genoma de referencia HG19, mediante la herramienta Tophat 2, usando los parámetros por defecto dados por la comunidad. Los resultados se ofrecen en la [Tabla 9](#).

[Tabla 9](#): Resumen de los alineamientos por agrupamiento de muestras.

| | S IgM+ | S IgM- | LCR IgM+ | LCR IgM- |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Lecturas de entrada | 245.208 | 190.090 | 209.984 | 377.099 |
| Lecturas mapeadas | 48317 (19,7%) | 40454 (21,3%) | 34935 (16,6%) | 107817 (28,6%) |
| Alineamiento múltiple | 25046 (51,8%) | 21016 (52,0%) | 11463 (32,8%) | 21663 (20,1%) |

4.3.3. Expresión diferencial del cargo de RNA

Los resultados de los cuatro análisis de expresión diferencial son resumidos en la siguiente [Tabla 10](#):

[Tabla 10](#): resumen de resultados de los test de expresión diferencial.

| | S IgM+ vs S IgM- | LCR IgM+ vs LCR IgM- | S IgM+ vs LCR IgM+ | S IgM- vs LCR IgM- |
|-----------------------|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| Transcritos | 55.095 | 55.095 | 55.095 | 55.095 |
| Test ok | 109 | 146 | 117 | 149 |
| No test | 53.605 | 53.568 | 53.597 | 53.565 |
| low data | 1.381 | 1.381 | 1.381 | 1.381 |
| Significativos | 0 | 0 | 0 | 0 |

Transcritos: Total de transcritos analizado en base al archivo de identificación GTF (del inglés: Gene Transfer Format). “Test Ok”: transcritos que superan el test. “No Test”: transcritos sin suficientes alineamientos para testar. “Low Data”: secuencias demasiado complejas o demasiado simples. Significativas: Total de transcritos con diferencias significativas entre ambas muestras, de acuerdo al test.

De estos resultados se desprende que las diferencias de expresión entre las muestras analizadas no son estadísticamente significativas para ninguno de los cruces planteados.

Respecto a la composición muestral, del total de transcritos evaluados que superan el test, es decir, que están presentes en al menos una de las muestras y son no ambiguos estructuralmente, y que poseen una expresión diferencial mayor o igual que 2, se obtiene la siguiente distribución por tipo de secuencia (Tabla 11):

Tabla 11: Distribución por tipo de secuencia en cada experimento.

| | | S IgM+ vs S IgM- | LCR IgM+ vs LCR IgM- | S IgM+ vs LCR IgM+ | S IgM- vs LCR IgM- | |
|---------------|--------------------|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------|
| sncRNA | miRNA | | 9 | 5 | 6 | 9 |
| | snoRNA | | 62 | 73 | 69 | 77 |
| | otros snoRNA | ACA | 1 | 5 | 2 | 6 |
| | | RNU | 2 | 1 | 1 | 1 |
| genes | de prot. ribosomal | | 3 | 7 | 8 | 8 |
| | Histonas | | 3 | 6 | 2 | 4 |
| | No histonas | | 3 | 14 | 7 | 18 |
| Total | | | 83 | 111 | 95 | 123 |

Dada la escasa cantidad de miRNA no hemos podido realizar estudios ontológicos sobre sus potenciales dianas. Solo obtuvimos valores significativos en el análisis ontológico de los genes (no sncRNA) de los cruzamientos LCR IgM+ vs LCR IgM- y suero IgM- vs LCR IgM- (Figura 32). En el último cruzamiento, destaca por número de genes implicados las vías de señalización mediante VEGFR 1 y 2 (del inglés: *vascular endothelial growth factor receptor*) (Figura 32B).

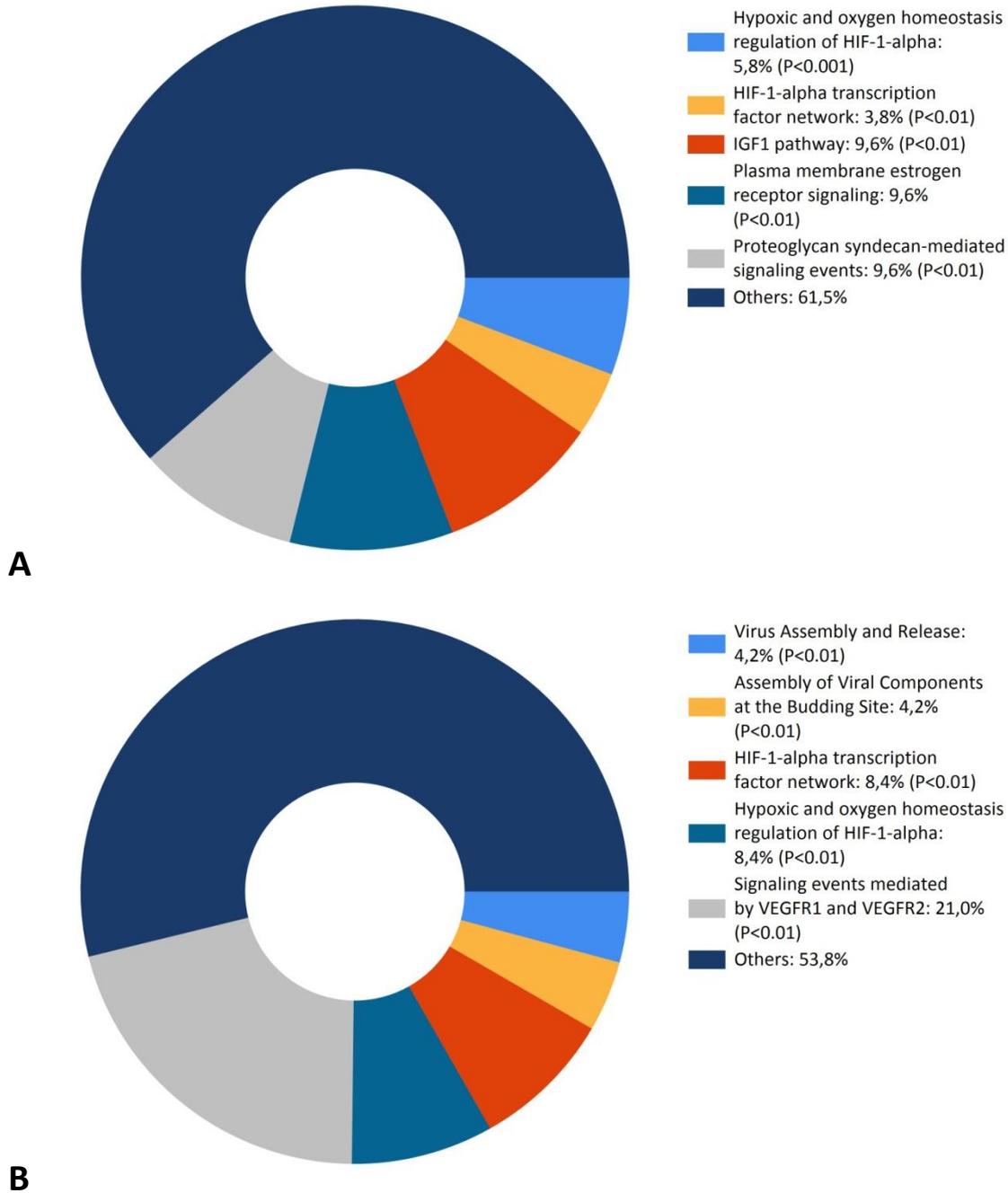


Figura 32: Procesos biológicos en que participan los genes del cargo de VE. A) para los genes diferencialmente expresados entre LCR IgM+ vs LCR IgM-. B) para los genes diferencialmente expresados entre suero IgM- vs LCR IgM-.

5. Discusión

En este capítulo hemos explorado el contenido de las VE en pacientes de EM cursando distintos estadios clínicos, tratados o no, a su vez comparándolo con CS. Según nuestro conocimiento, hasta el momento no había sido descrito el cargo de VE en pacientes con EM.

A través de las distintas aproximaciones empleadas podemos confirmar la presencia de proteínas, RNA mensajero, pequeños RNA no codificantes y citoquinas. Podemos concluir también, de manera global, que dada la baja cantidad de material aislado desde las VE, aun habiendo agrupado muestras, los estudios ómicos han presentado ciertas dificultades técnicas, sobre todo respecto al control de calidad, lo que ha reducido los datos válidos para ser analizados. Estas limitaciones no son tan considerables en aquellos estudios que parten de la producción *in vitro* de VE, obteniendo concentraciones suficientemente mayores que las vistas en nuestro trabajo con muestras humanas, como para superar los mínimos requeridos para las diversas plataformas de análisis.

No obstante, partiendo de solo 4 ml de sangre periférica por cada individuo y aislando las VE mediante centrifugación diferencial, hemos podido identificar 98 proteínas expresadas tanto en CS como en pacientes NoT. La construcción de la red de interacción proteína-proteína y el estudio ontológico nos permitió observar que la mayoría de ellas están integradas en vías de coagulación. También se identifican proteínas involucradas en la respuesta inmune lo que confirma la integración de las VE en la complejidad del sistema inmune. Vemos también que algunas de estas proteínas juegan un rol en el tráfico de lipoproteínas, lo que reafirma a las VE como un medio de comunicación extracelular.

En nuestro estudio proteómico, con la intención de buscar biomarcadores diagnósticos en EM, analizamos el perfil del cargo proteico de las VE en pacientes no tratados (NoT) y lo comparamos con el de controles sanos (CS). De las 98 proteínas coexpresadas, 7 estaban diferencialmente expresadas entre CS y NoT, destacándose el factor de von Willebrand con una diferencia de aproximadamente 4 veces mayor en CS que en NoT. Un estudio llevado a cabo en el modelo animal EAE, concluyó que la ausencia del factor de von Willebrand conducía a una permeabilidad mayor de la barrera he hemato-encefálica, mayor inflamación en el parénquima nervioso y por ende una EAE más severa²⁰⁹. Esto podría ser congruente con nuestros resultados en donde los pacientes debido a una disminución de dicho factor, al menos en el contenido en las VE circulantes en sangre, pueda llevar al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, en un estudio de dos décadas atrás, los autores observaban niveles similares de este factor entre las distintas etapas de la enfermedad (RR, SP) y en controles sanos y a su vez no hallaban correlación con otros marcadores clínicos o auxiliares, concluyendo que un daño endotelial significativo que pueda cause la elevación sérica del factor sea improbable en la EM. En nuestros resultados, a pesar de hallar diferencias entre los grupos estudiados, no hemos conseguido la validación mediante ELISA. Por otro lado, comparamos nuestra lista de proteínas coexpresadas con 2 bases de datos de VE de todo tipo y una de VE de LCR y llamativamente solo un tercio estaba incluido en ellas. Esto podría

deberse a que la mayoría de los estudios que conforman estas bases están realizados *in vitro* y estos no presentan la complejidad proteica de VE aisladas de sangre humana. Más sorprendente aún es el solapamiento con las proteínas de LCR humano del estudio de Chiasserini. En su trabajo observa también una importante presencia de albúmina y de proteínas relacionadas con la coagulación lo que coincide con nuestros resultados.

Un grupo de proteínas de gran interés en la EM son las citoquinas, debido a su compromiso en el desarrollo de la enfermedad, lo que ha abierto posibles usos terapéuticos de estas o sus receptores como los casos de secukinumab (anti IL17-A), daclizumab (anti receptor de IL2) o laquinimod (inhibición de liberación de perfil de citoquinas proinflamatorias: TNF α , IFN γ , IL-12, IL-17)¹²⁹. Por este motivo decidimos incluir el análisis de citoquinas contenidas en las VE estudiadas con un kit específico y evaluar las diferencias entre pacientes en diversos estadios clínicos. Nuestra hipótesis al respecto es que los perfiles de citoquinas transportadas en las VE circulantes en los pacientes con EMRR podrían presentar un perfil pro inflamatorio, mientras que en las fases progresivas tipo EMSP presentarían un perfil regulador. Sin embargo, la baja concentración de citoquinas presentes en las VE ha permitido la detección de solo dos de ellas: I-TAC y TNF α , sin diferencias significativas entre los grupos. Precisamente I-TAC es una quimiocina expresada en abundancia en leucocitos circulantes en la periferia²¹⁰, lo cual concuerda con el hecho de ser una de las dos detectadas en VE circulantes. Su principal efecto es la quimiotaxis de linfocitos T activados²¹⁰, función que podría ser desarrollada por VE portadoras de esta quimiocina en pacientes de EM. En nuestro análisis vemos un aumento no significativo de I-TAC en pacientes respecto a controles. En el caso de TNF α , una citoquina relacionada con la fase aguda de la inflamación, tampoco encontramos diferencia entre los grupos estudiados. Nuevamente, dentro de los pocos estudios que analizan el perfil de citoquinas en VE, donde la mayoría han sido llevado a cabo *in vitro*, TNF α no ha sido identificada²².

En la última década, otro de los focos puesto sobre la VE ha sido su capacidad de trasportar material genético de una célula a otra y a través de ello ejercer funciones reguladoras a distancia². Siguiendo esa línea, uno de nuestros objetivos fue evaluar en las VE de pacientes, obtenidas tanto de LCR como de suero, el contenido en RNA y pequeños no codificantes RNA (sncRNA). Debido a las dificultades técnicas discutidas previamente, el análisis final se realizó con el RNA libre total, el cual incluye el contenido dentro de las VE. No obstante, solo una pequeña porción de la muestra superó los criterios mínimos para posterior análisis ómico. Pese a estas limitaciones, pudimos observar un enriquecimiento en RNA pequeño nucleolar o snoRNA en todos los pooles de muestras. La función de estos snoRNA está relacionada con la metilación y pseudouridilación de otros RNA, aunque todavía no está dilucidada por completo²¹¹. Es llamativa la aparición de estos

snRNA en VE circulantes ya que hasta ahora se habían localizado siempre en el nucléolo de la célula (de ahí su nombre) ejerciendo su función sobre los ribosomas.

A su vez, con los resultados de transcriptómica, concluimos que las BOC IgM no se asocian a cambios de RNA en suero y LCR. Además, no existen diferencias significativas en la composición en RNA entre las muestras de LCR y suero. Sin embargo, un importante número de sncRNA presentes en las VE de suero están también presentes en LCR, por lo que podrían considerarse una fuente de biomarcadores subrogados del estado del parénquima nervioso.

En la comparación del RNA libre en suero vs LCR de los pacientes con BOC IgM- (mejor pronóstico) distinguimos la participación de un 21% de genes involucrados en las vías de señalización mediante VEGFR 1 y 2, los que a su vez promueven la migración celular y permeabilidad vascular²¹². Este hallazgo tiene relevancia debido a que se ha demostrado que las VE en pacientes de EM promueven la migración de linfocitos y monocitos¹⁴³, pudiendo contener entre sus genes aquellos que modulen las vías de señalización de VEGFR. En nuestro estudio los genes implicados en este proceso son: FTH1, GAPDH, PKM y ALDOA.

En conjunto, podemos concluir que los estadios de la enfermedad condicionan el cargo de las VE y que a su vez, este podría ser una fuente de biomarcadores, tanto diagnósticos como pronósticos de la enfermedad. Por último, la opción de utilizar LCR tiene importantes limitaciones. Tal como apuntan Street *et al*, el volumen de LCR requerido para un análisis ómico adecuado (100-200 ml) solo se puede conseguir en contadas patologías, siendo necesaria refinar los métodos de aislamiento de VE para conseguir buenos resultados con los volúmenes que se pueden obtener en la clínica diaria (10-15 ml)⁹⁵.

CAPITULO 4

Efecto del fingolimod sobre las vesículas extracelulares

1. Introducción

Dentro de las numerosas funciones de las VE descritas, la mayoría está íntimamente ligada a la regulación del sistema inmune¹⁴. Esa regulación es crítica en las denominadas enfermedades autoinmunes. En ellas, las VE son capaces de promover tanto la activación del sistema inmune mediante la presentación de antígenos como propagar la inflamación a través de la activación linfocitaria y, de manera contraria, regular negativamente algunas poblaciones linfocitarias gracias a la transmisión de sncRNA^{39,213}. Uno de los sncRNA mejor estudiados en la respuesta del sistema inmune es el miR-155 cuya función general es la inhibición de células dendríticas y linfocitos. Momen-Heravi y colaboradores, han descrito el efecto inhibitorio de VE enriquecidas in vitro con miR-155 sobre la producción de TNF en macrófagos, previamente activados²¹⁴.

Por otro lado, hemos visto en el capítulo 1 y 3 que factores como el estadio de la enfermedad y los fármacos inmunomoduladores influyen en la concentración y composición de los mensajes llevados por las VE. Pero no hemos indagado acerca de los cambios en el cargo ejercido por el tratamiento. En esta línea de investigación, Verderio y coautores, demostraron un descenso de la concentración de VE derivadas de microglía en LCR en ratones EAE, tras la administración de fingolimod (FGM), un inmunomodulador aprobado en 2011 para EMRR, de administración oral⁹⁹. El efecto en humanos consiste en el bloqueo de salida de linfocitos T *naïve* y memoria central de los ganglios linfáticos hacia la circulación¹⁵⁴. Se ha visto además que la disminución de estas poblaciones en circulación es alcanzada a las 4-6 h de su administración¹³¹. Aún así, el conocimiento sobre las VE circulantes obtenidas específicamente de pacientes y a lo largo del tratamiento, así como el efecto de las mismas sobre el sistema inmune permanece aún por dilucidar.

2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

1. Caracterizar las VE circulantes en sangre de pacientes tratados con FGM durante un año y analizar la evolución de la concentración y origen celular de las mismas.
2. Evaluar el efecto inmediato del fármaco (a las 5h de la primera dosis) sobre las VE explorando:
 - a. su contenido genético, específicamente sncRNA.
 - b. su función reguladora frente a linfocitos.

3. Comparar los resultados del objetivo 2 con pacientes no tratados (NoT) y controles sanos (CS)

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras de pacientes y controles

Para el desarrollo de este capítulo analizamos VE obtenidas de sangre periférica de 20 pacientes, diagnosticados según los criterios de McDonald 2010 y tratados con FGM durante un año, visitados en la Unidad de EM del Hospital Universitario Donostia. Todos los pacientes estaban en remisión clínica al momento de las extracciones.

Para el experimento que requirió comparación con VE de pacientes no tratados (NoT) y de controles sanos (CS), se utilizaron 5 y 8 muestras, respectivamente, depositadas en el Biobanco Vasco y se procesaron del mismo modo que aquellas de pacientes tratados con FGM.

Con la excepción de un paciente varón tratado con FGM, todos los demás individuos eran mujeres. En la [Tabla 12](#) se describen las características clínicas de los individuos de este estudio.

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del hospital.

Tabla 12: Características clínicas de los individuos estudiados con microarrays de miRNA.

| Muestra | edad | EDSS | t evol EM | tto previo |
|---------|------|------|-----------|------------|
| NoT1 | 32 | 2 | 10,5 | sin tto |
| NoT2 | 31 | 0 | 0,3 | sin tto |
| NoT3 | 37 | 0 | 0,0 | sin tto |
| NoT4 | 52 | 2 | 13,8 | sin tto |
| NoT5 | 22 | 0 | 0,0 | sin tto |
| G-010 | 36 | 4,5 | 6,6 | AVONEX |
| G-011 | 34 | 4,5 | 10,8 | BETAFERON |
| G-012 | 50 | 6 | 18,5 | REBIF |
| G-013 | 49 | 4 | 20,2 | NTZ |
| G-014 | 36 | 3,5 | 16,8 | NTZ |
| G-015 | 40 | 1 | 9,2 | NTZ |
| G-016 | 50 | 3,5 | 22,1 | AG |
| G-017 | 40 | 2 | 12,4 | BETAFERON |
| G-018 | 33 | | 9,3 | AG |
| G-019 | 30 | 3,5 | 4,2 | NTZ |
| G-020 | 41 | 3 | 20,8 | AG |
| CS1 | 41 | | | |
| CS2 | 28 | | | |
| CS3 | 22 | | | |
| CS4 | 36 | | | |
| CS5 | 26 | | | |

| | |
|------------|----|
| CS6 | 33 |
| CS7 | 33 |
| CS8 | 42 |

NoT: paciente de EM no tratado; G-NN: pacientes que comienzan tratamiento con fingolimod; CS: control sano; tto: tratamiento; NTZ: natalizumab; GA: acetato de glatimero.

3.2. Calendario de extracciones en pacientes tratados con FGM

Para cada paciente tratado con FGM se realizó una extracción mensual durante 6 meses, comenzando con la primera extracción antes de la primera dosis, denominada visita 0 (V0 0h) y así sucesivamente hasta la sexta visita (V6). Al cumplir el año de tratamiento se recolectó una muestra final (V12). En 11 pacientes, se efectuó además una extracción a las 5 horas de recibir al primera dosis (V0 5h) durante la monitorización cardíaca, período en que el paciente permanece en reposo, en posición decúbito supino. Cada muestra fue extraída en ayunas a las 9:30 h y a las 14:30 h para las V0 5h.

La extracción de sangre fue realizada como se describe en la sección de materiales y métodos comunes, apartado “extracción de sangre”.

3.3. Aislamiento de VE

Las VE fueron aisladas siguiendo el método de centrifugación seriada denominado “centri13000”, descrito en la sección de materiales y métodos comunes, apartado “Aislamiento de vesículas extracelulares con el método `centri13000`”.

3.4. Caracterización de VE

Las EV aisladas fueron caracterizadas mediante CMF para estudiar el origen celular; a través de NTA para cuantificar su concentración y evaluar el tamaño y con crio-ME para describir su morfología. Los protocolos empleados para cada tecnología se detallan en la sección “Materiales y métodos comunes”. Además se cuantificó el contenido de proteínas mediante la técnica de Bradford (Biorad) ya que es la manera habitual de mesurar las dosis de VE utilizadas en experimentación tanto *in vivo* como *in vitro* (véase Anexo xx).

3.5. Arrays de small non-coding RNA

Para cada pool, se marcaron 300 ng de RNA utilizando el kit FlashTag HSR de Genisphere (Affymetrix) y se hibridaron al array GeneChip miRNA v4 (Affimetric). Este array abarca 2578 miRNA maduros, 2025 mirNA inmaduros, 1996 snoRNA (distribuidos en snoRNA, CDBox,

H/ACAbbox y scaRNA) de la especie humana. Resumidamente, las moléculas de RNA son poliadeniladas y en un siguiente paso de ligamiento se añade una molécula de DNA marcada con biotina (señal amplificadora). Finalmente, el RNA marcado es hibridado al array, durante 16 horas a 48° C y 60 rpm. Durante esta incubación el RNA se une a las sondas que están adheridas a la matriz. Al finalizar se realiza un lavado y tinción en el GeneChip Fluidics Station 450. La captura de la imagen se llevó a cabo en un escaner GeneChip 7G Scanner (Affymetrix).

Para el análisis de datos realizamos la normalización de los datos brutos con el programa Expression Console (Affymetrix) utilizando el algoritmo *Robust Multiarray Average*²¹⁵. Se aplicó también la detección de señal por encima del ruido de fondo para determinar qué sondas eran detectadas o no en cada array y de esas sólo se analizaron las sondas humanas.

Con el objetivo de indagar qué cambios ocurren en el cargo de sncRNA contenido en las VE entre los dos estados a analizar (llámese array A y array B), procedimos al siguiente análisis: i) presentes (abreviados con la letra P) en array A pero ausente (abreviados con la letra A) en array B más los infraexpresados en array B, y de forma opuesta ii) ausentes (A) en array A pero presentes (P) en array B más los sobreexpresados en array B. Siguiendo la lógica planteada en los capítulos anteriores, comparamos CS vs NoT para indagar en el cambio del cargo de sncRNA en pacientes sin influencia de tratamientos. Por otro lado la comparación entre los pacientes NoT vs FGM 0h puede darnos información sobre qué características presentan los pacientes tratados, ya que todos los que comenzaban con FGM habían sido tratados previamente con diversos fármacos. Y por último la comparación FGM 0h vs FGM 5h nos permite ver el efecto inmediato del fármaco sobre el cargo de las VE.

Para averiguar la función biológica de los miRNA hibridados, investigamos sus genes dianas eligiendo solo aquellos miRNA validados experimentalmente en la base de datos miRTarBase, actualizada en septiembre de 2015²¹⁶. El resultado de las interacciones fue visualizado en el programa Cytoscape donde añadimos dos pasos adicionales de filtrado consistente en la selección de los genes i) regulados por dos o más miRNA, partiendo de la hipótesis que dichos genes estarían más afectados en nuestro estudio y ii) que presenten una interacción con evidencia sólida (*strong evidence*). Finalmente, para evaluar en qué procesos biológicos estaban implicados los genes dianas, analizamos las listas de genes mediante la herramienta bioinformática DAVID v6.7 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, <https://david.ncifcrf.gov/>)²⁰⁷. Para ello cargamos la lista de genes identificándolos por su *Gene Symbol* y ejecutamos la herramienta *Functional Annotation Chart* seleccionando siempre las bases de datos Panther y Pathways KEGG. Las opciones se han fijado en 4 genes como mínimo en cada comparación y un valor EASE de 0,01 excepto en comparación NoT P - FGM 0h A +

infraexpresados, en la que debido al número de genes se ha aumentado el umbral a 10 genes como mínimo en cada grupo. Por último, graficamos solo las entradas pasan el filtro de Bonferroni establecido en 0,01.

3.6. Producción de VE enriquecidas en miR-155

Con el objetivo de evaluar la función inhibitoria de los sncRNA contenidos en el cargo de VE circulantes decidimos compararlo con VE enriquecidas en un miRNA con función inhibitoria conocida. Como veíamos en la introducción, se sabe que el miR-155 posee una función inhibitoria general sobre las células inmunes.

Para obtener estas VE enriquecidas en miR-155 (VE155) infectamos células HEK293 con partículas lentivirales construidas mediante el empaquetador de plásmidos de Trono Lab (Addgene #12253, #12251, and #12259)²¹⁷ con un vector de transferencia que codifica tanto para pre-miR-155 o para una secuencia *scramble* (SCR, sin diana conocida) (GeneCopia HmiR0358-MR03 y CmiR0001-MR03) y el reportero GFP (del inglés: *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde). Tras 48 h de cultivo a 37° C y 5% de CO₂, corroboramos una adecuada infección mediante la observación de expresión de GFP en las células. Estas fueron lavadas cuidadosamente con PBS para eliminar virus remanentes en el sobrenadante. Luego de 48 hs más de cultivo aislamos las VE enriquecidas en miR-155 (VE155), o SCR (VEscr) mediante la centrifugación del contenido de los pocillos como se indica en materiales y métodos comunes, apartado “Aislamiento de vesículas extracelulares con el método `centri13000`”. Luego, tratamos el pellet de VE con RNAsas para eliminar los posibles miR-155 libres en el sobrenadante, no contenidos en las VE. Caracterizamos las VE por CMF para evaluar la expresión de GFP.

3.7. Aislamiento de RNA de las VE (RNA_{VE}) y cuantificación del cargo de miR-155

Se aisló el RNA_{VE} de los 11 pacientes a los cuales se les extrajo sangre antes y 5 h posteriores a la primera toma de FMG así como de los 5 NoT y 8 CS y de las VE155 y VEscr. Se procedió según se detalla en materiales y métodos comunes, apartado 3 “Aislamiento de RNA de las VE (RNA_{VE})”.

La cuantificación del cargo de miR-155 o scr contenido en las VE se llevó a cabo con qPCR. Para ello se realizó la transcripción inversa de 70ng de ARN, extraídos de las muestras de EV155 o EVscr, mediante el kit de TaqMan microRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) y luego, se amplificaron 2 ng de cDNA por triplicado en un termociclador 7900HT (ThermoFisher Scientific).

3.8. Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con VE

La obtención de PBMC (del inglés: *peripheral blood mononuclear cells*, células mononucleares de sangre periférica) para los distintos ensayos de este apartado se realizó mediante separación de fases con ficoll partiendo de 16 ml de sangre periférica de donantes sanos recolectada en tubos de heparina sódica.

Previo al ensayo funcional definitivo debimos ajustar la dosis de PHA y VE. Con el objetivo de equilibrar la activación de las PBMC con la inhibición de producida por las VE decidimos ajustar por un lado la concentración de fitohemaglutinina (PHA) para activar aproximadamente el 50 % de las PBMC y por otro la dosis de VE a añadir en cada pocillo para inhibir el 50% de la activación de PBMC.

3.8.1. Ajuste de concentración de PHA para cultivo de PBMC

Para ello, medimos la activación celular de PBMC mediante el porcentaje de expresión de CD25+ frente a 0%; 0,01%; 0,1%; 0,25% y 0,5%. Previos trabajos no publicados de nuestro grupo demostraban la activación del 90% de PBMC con 0,5%. Finalmente observamos que con 0,1% aproximadamente el 50% de las PBMC se habían activado (CD25+) (Figura 33).

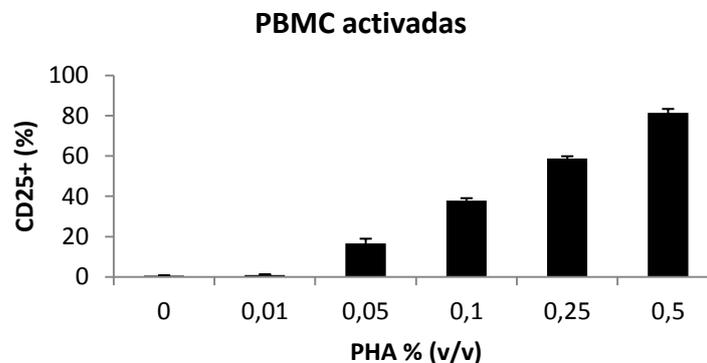


Figura 33: Ajuste de concentración de PHA para cultivo de PBMC.

3.8.2. Ajuste de la concentración de VE a añadir en cultivo de PBMC

Para este objetivo, probamos un rango amplio basado en diversos reportes que utilizaban VE en cultivos de líneas celulares incluyendo 0 µg; 5 µg; 50 µg; 100 µg y 200 µg. Decidimos finalmente utilizar la dosis de 100 µg con la cual obteníamos una inhibición del 66% respecto al basal (0 µg) (Figura 34).

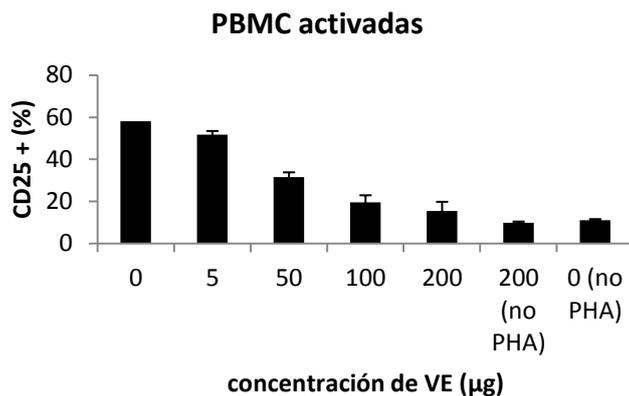


Figura 34: Ajuste de concentración de VE a añadir en cultivo de PBMC.

3.8.3. Ensayo funcional del efecto de las VE sobre la activación de PBMC

Habiendo ajustado la concentración de PHA y de VE en ensayos previos, procedimos entonces al estudio funcional.

En una placa de 96 pocillos sin tratar, con fondo plano, se dispensaron 10^5 PBMC por pocillo en un volumen final de 200 µl de medio RPMI 1640 con L-Glutamina (Gibco, ThermoFisher) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10000 U/ml de penicilina más 10000 µg/ml de estreptomycin y 10% de DMSO (Dimetil sulfóxido). A su vez añadimos 100 µg de VE correspondientes a cada condición (CS, NoT, V0 0h; V0 5h; VE155; VEscr; CS o PBS) e incubamos a 37°C and 5% CO₂ durante 3 h. Luego activamos las PBMC inespecíficamente con PHA (Gibco, Thermo Fisher) a 0,1% concentración final, dejando durante 72 h en incubación. Para cada condición se analizaron dos donantes de VE al azar y a su vez todas las condiciones fueron realizadas por duplicado. Tras las 72 hs de incubación, centrifugamos el contenido de cada pocillo a 300 g, 5 minutos para obtener por un lado las PBMC a analizar por citometría de flujo y por otro lado los sobrenadantes en los que estudiamos el perfil de citoquinas mediante luminex (Millipore). El análisis citométrico se llevó a cabo en un citómetro Guava (Millipore) donde contabilizamos el porcentaje de poblaciones celulares (linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos), el porcentaje de activación de cada uno de ellas y la viabilidad celular. Para ello se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales anti humanos: CD16-FITC; CD25-PE; CD14-PE-Cy7; CD19-APC; CD3-APC-Cy7 y sus respectivos controles de isotipo (todos de BD) y 7-AAD (life technologies).

3.9. Análisis estadístico

Para los resultados obtenidos de NTA y CMF se utilizó el test de ANOVA con el posterior análisis de Dunnett para determinar los puntos en los cuales había diferencia respecto al valor basal (V0 0h). En las medidas por duplicado se calculó la media más la desviación estándar. Para aquellos pares de muestras que se necesitaran compararse sus valores, se calculó el fold change.

Como se comentó en materiales y métodos, para el análisis de los microarrays se usó el algoritmo *Robust Multiarray Average* el cual permite crear una matriz de expresión de los datos de Affimetrix. Los valores de intensidad brutos son corregidos respecto al ruido de fondo basal, luego transformados a valores log₂ y finalmente normalizados por cuartil²¹⁵. Con los datos de miRNA normalizados se calcularon los fold change. Para estudiar las diferencias entre cada par de arrays analizado, consideramos las sondas que presentaron un cambio en la expresión (fold change) mayor que 2 para la sobreexpresión y menor que 0,5 para la infraexpresión.

4. Resultados

4.1. Caracterización de vesículas extracelulares circulantes

A través de NTA observamos que el perfil de tamaño es similar en todas las muestras y, aunque pueden existir pequeñas diferencias, presenta un pico de concentración en torno a los 180 nm. Esto se confirma con las imágenes obtenidas en microscopía electrónica (Figura 35A). Mediante CMF caracterizamos los tres orígenes celulares más frecuentes de VE circulantes en sangre, siendo en orden decreciente de concentración: CD61 para VE derivadas de plaquetas, CD45 para VE derivadas de leucocitos y CD14 para aquellas derivadas de monocitos (Figura 35B). No se observó un cambio significativo o tendencia en los subtipos de VE de los tres orígenes estudiados ni cambios morfológicos a lo largo del tratamiento con FGM.

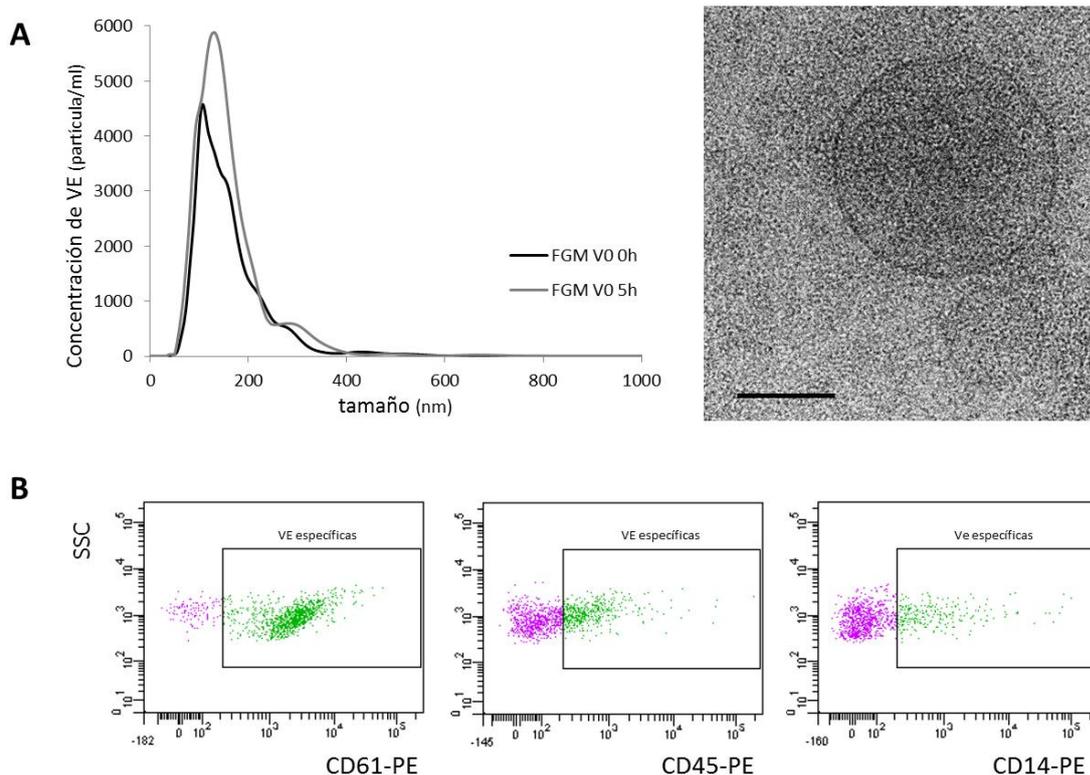


Figura 35: Caracterización de VE circulantes de pacientes de EM tratados con FGM. A) Un ejemplo de la distribución de tamaño y concentración medida por NTA antes y después de la primera dosis de FGM (izquierda) y morfología confirmada mediante microscopía electrónica (derecha). B) análisis mediante citometría de flujo de las algunas de las poblaciones de vesículas más abundantes de origen circulatorio. CD61: VE derivadas de plaquetas; CD45: VE derivadas de leucocitos y CD14: VE derivadas de monocitos. Barra de tamaño = 100 nm.

4.2. FMG afecta a la concentración de VE en las primeras horas

Hemos realizado extracciones seriadas de sangre para observar si existía variabilidad en la concentración medida por NTA a través del tiempo. Observamos un incremento significativo ($p=0.045$) de 2 veces entre la concentración previa a la primera dosis (V0 0h) y a las 5 hs (V0 5h). En los siguientes meses las concentraciones se mantuvieron a un nivel similar al previo al inicio del tratamiento (Figura 36). Debido a la diferencia observada en las primeras 5 horas post tratamiento decidimos estudiar en profundidad el cargo y la función inmunomoduladora de estos dos grupos de VE con mayor detalle.

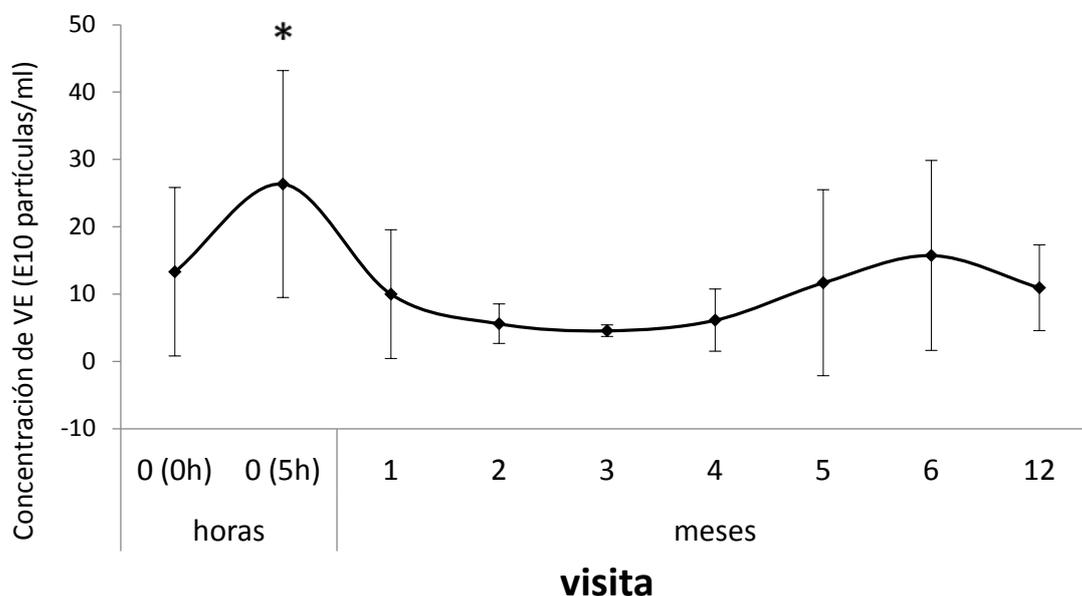


Figura 36: Serie temporal de la concentración de VE durante un año de tratamiento con FMG. Se desglosan las primeras 5 horas de tratamiento observándose un incremento significativo entre las 0 y 5 horas. Las demás visitas se realizaron con la periodicidad de un mes hasta los 6 meses y luego a los 12 meses sin apreciarse cambios significativos.

Por otro lado, analizamos si existía correlación entre la concentración de VE en cada visita y la escala de discapacidad EDSS resultando solo significativo en la V12 (spearman $r=0,78$).

4.3. Descripción de los arrays de sncRNA

Se analizaron 6599 sondas, sin considerar controles, de las cuales 5213 no hibridaron con ninguna de las 4 pools de muestras, por lo tanto las sondas presentes, en al menos un array son en total 1386 (21% del total de sondas).

En común en los 4 grupos (CS, NoT, FGM V0 0h y FGM V0 5h) se identificaron 194 sncRNA, lo que hemos denominado “carga de sncRNA común”. Este corresponde a un 27-35 % del total de las sondas de cada grupo. La distribución de sondas en cada grupo se refleja en la [Figura 37](#).

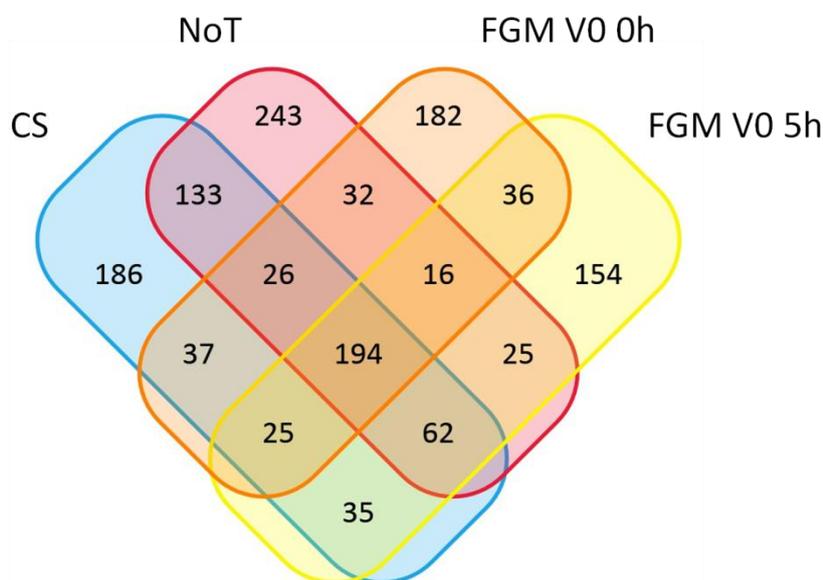


Figura 37: Distribución por grupo de cantidad de sondas de sncRNA presentes en VE. CS: controles sanos; NoT: pacientes de EM no tratados; FGM: fingolimod.

El número de sncRNA presente en cada condición y los diferencialmente expresados entre cada comparación se describe en la [Tabla 13](#).

Tabla 13: Número de sncRNA presente en cada condición y diferencialmente expresados entre cada comparación.

| comparación (condición A/B) | sncRNA presentes en una condición y ausentes en la otra | | sncRNA presentes en las dos condiciones | | | |
|--------------------------------|---|-----|---|-------|----------|-------------|
| | A | B | sobreexp | igual | infraexp | total |
| CS/NoT | 283 | 316 | 59 | 333 | 23 | 1014 |
| NoT/FGM 0h | 463 | 282 | 43 | 183 | 42 | 1013 |
| FGM 0h/FGM 5h | 277 | 274 | 46 | 194 | 33 | 824 |

La distribución según el tipo de sncRNA fue similar en cada array e incluso en el cargo común, siendo la mayoría miRNA (maduros) seguidos de miRNA (inmaduros) y luego los snoRNA (nucleolares) ([Tabla 14](#)).

Tabla 14: Distribución de tipo de sncRNA para cada array.

| tipo de sncRNA | CS | | NoT | FGM 0h | | FGM 5h | | carga común | |
|----------------|------------|-------------|-----|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| miRNA | 382 | 55% | | 262 | 48% | 243 | 44% | 124 | 64% |
| mirNA | 137 | 20% | | 115 | 21% | 127 | 23% | 28 | 14% |
| snoRNA | 140 | 20% | | 134 | 24% | 134 | 24% | 32 | 16% |
| CDBox | 29 | 4% | | 25 | 5% | 30 | 5% | 9 | 5% |
| H/ACAbox | 6 | 1% | | 9 | 2% | 7 | 1% | 1 | 1% |
| scaRNA | 4 | 1% | | 5 | 1% | 6 | 1% | 0 | 0% |
| TOTAL | 698 | 100% | | 550 | 100% | 547 | 100% | 194 | 100% |

4.4. Redes de interacción de miRNA-genes dianas y estudios ontológicos

Las redes de interacción entre miRNA y sus genes dianas diagramadas en cytoscape fueron confeccionadas con la base de datos miRTarBase utilizando el filtro de grado ≥ 2 (gen regulado por al menos dos miRNA). Para el estudio ontológico no se aplicó dicho filtro, con el objetivo de mantener un mayor número de genes y así enriquecer la lista de rutas identificadas (Tabla 15). Tanto las redes como los análisis ontológicos parten de la lista con el filtro de evidencia sólida.

Tabla 15: Número de miRNA y genes dianas en cada comparación de arrays.

| Comparación | sin filtro | | filtro grado ≥ 2 | |
|--------------------------------|------------|-------|-----------------------|-------|
| | miRNA | Genes | miRNA | Genes |
| 1 CS P-NoT A + infraexp | 17 | 123 | 3 | 2 |
| 2 CS A-NoT P + sobreexp | 94 | 1047 | 82 | 346 |
| 3 NoT P-FGM 0h A + infraexp | 143 | 1492 | 124 | 520 |
| 4 NoT A-FGM 0h P + sobreexp | 12 | 74 | 5 | 6 |
| 5 FGM 0h P-FGM 5h A + infraexp | 13 | 189 | 9 | 23 |
| 6 FGM 0h A-FGM 5h P + sobreexp | 32 | 607 | 26 | 89 |

A continuación se presentan las redes y estudios ontológicos de cada comparación (Figura 38, Figura 39, Figura 40 y Figura 41).

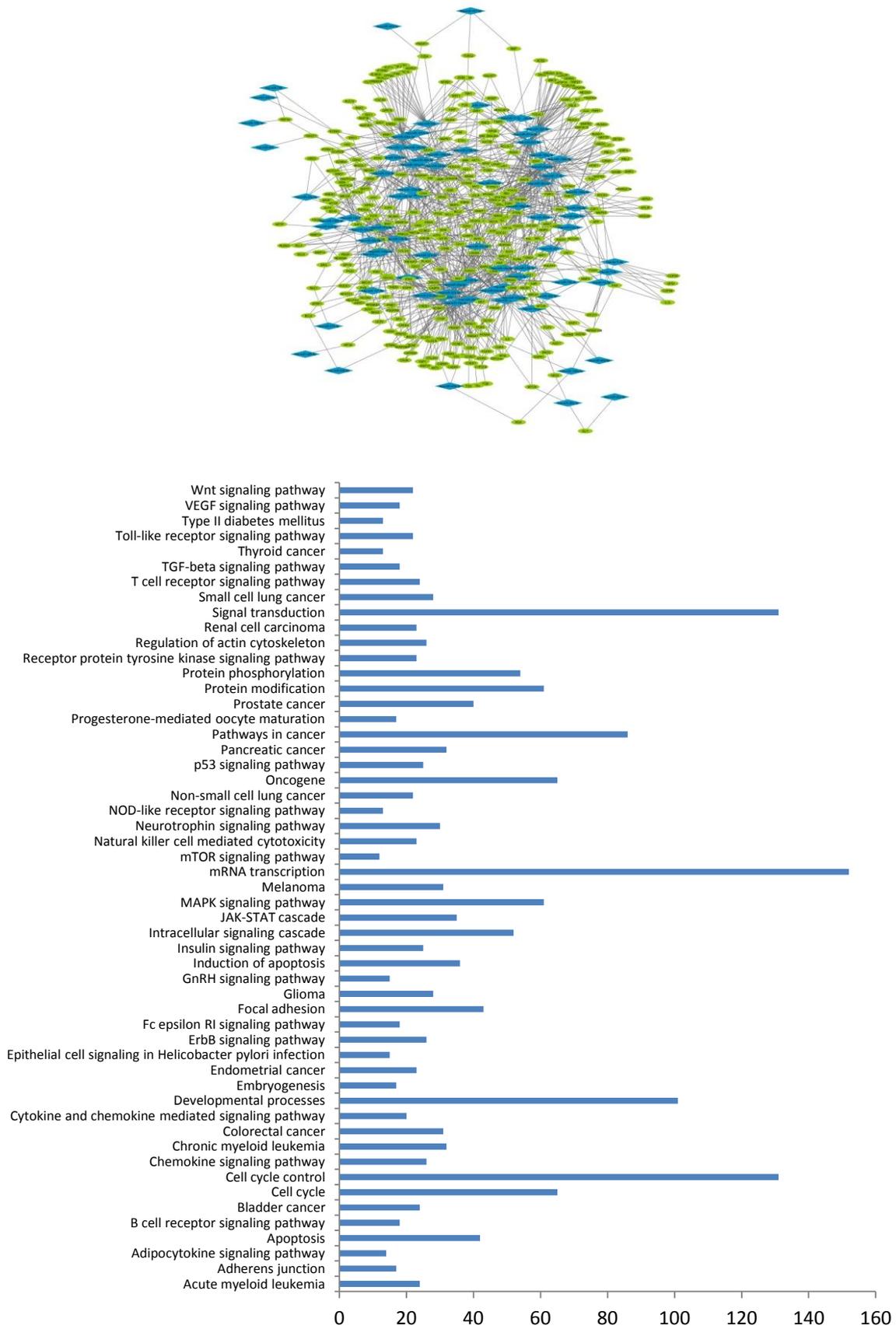


Figura 38: Red y estudio ontológico para la comparación 2: CS A-NoT P + infraexp.

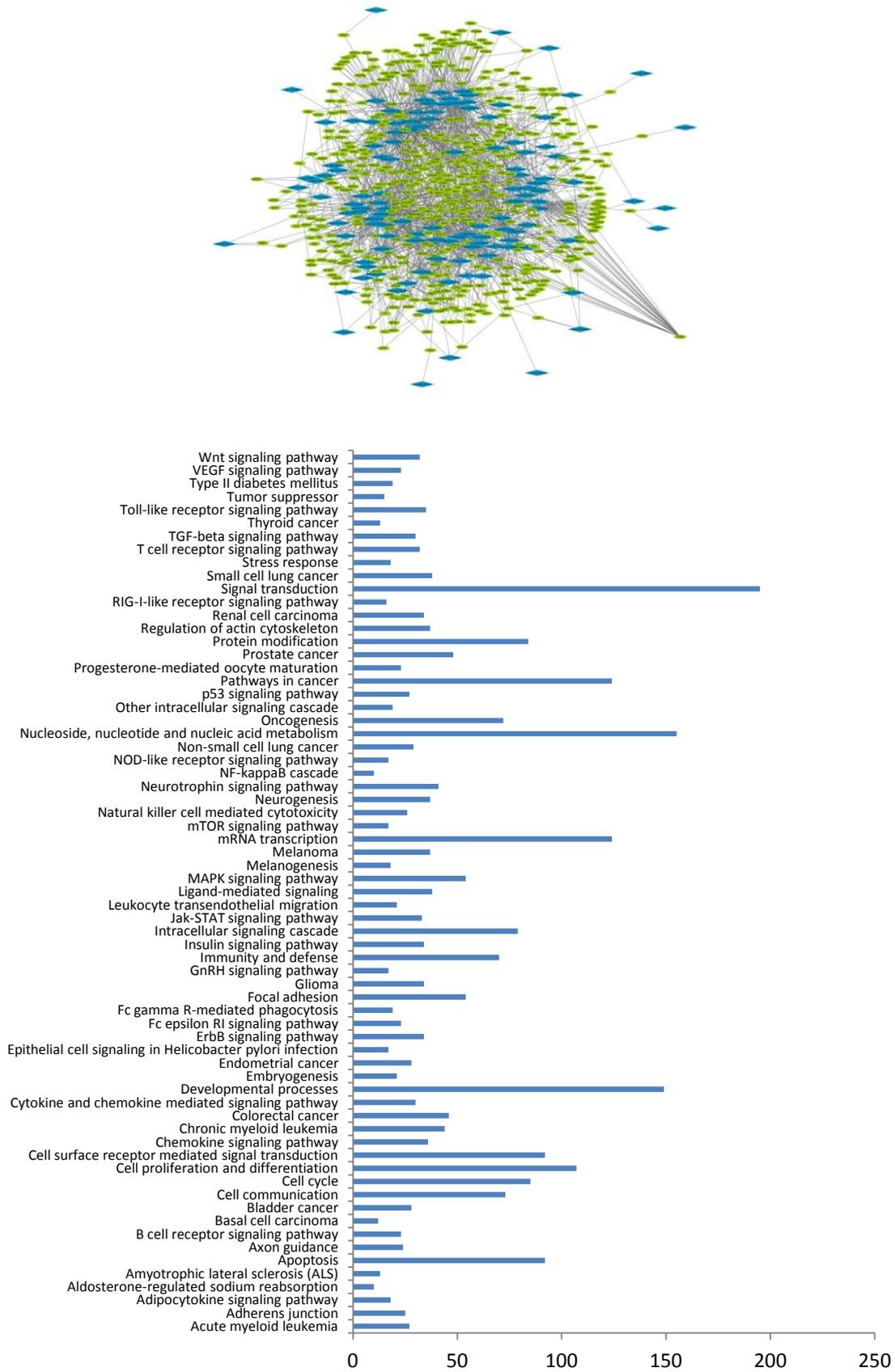


Figura 39: Red y estudio ontológico para la comparación 3: NoT P-FGM 0h A + infraexp.

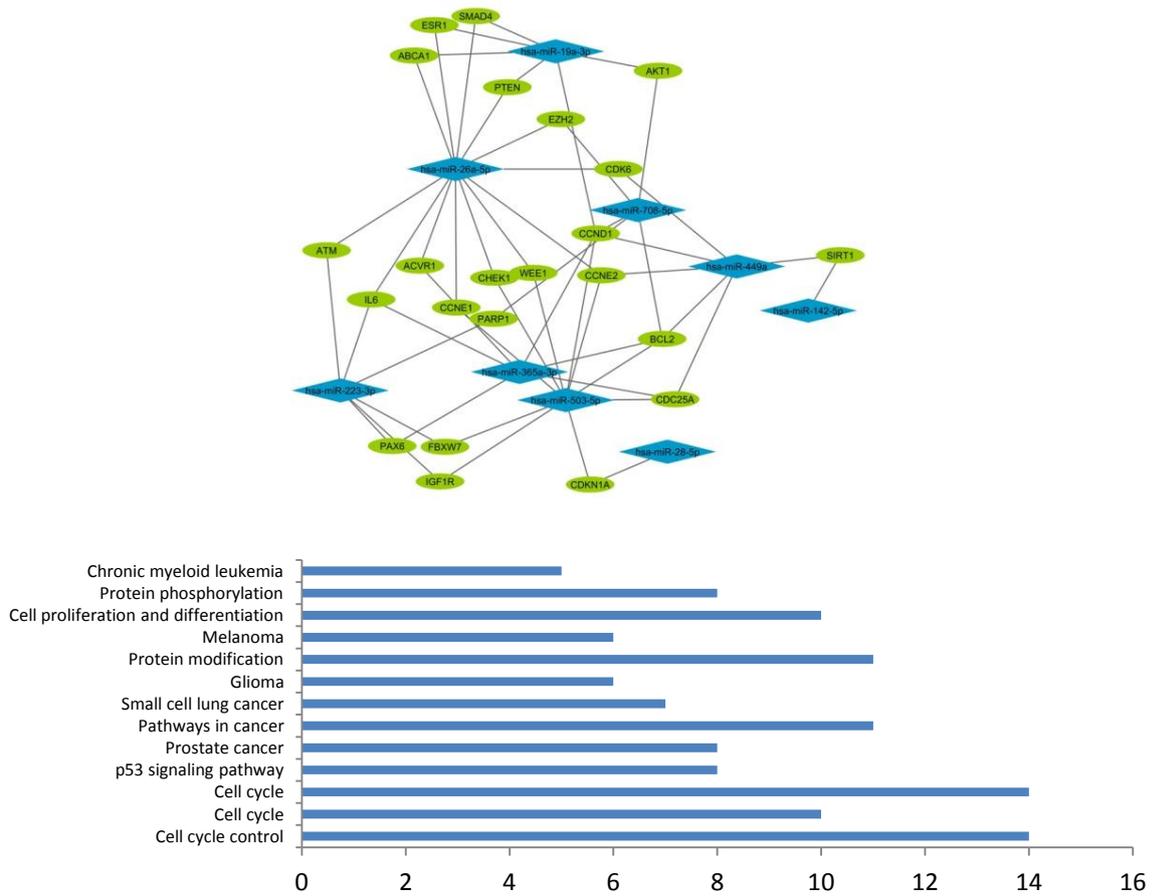


Figura 40: Red y estudio ontológico para la comparación 5: FGM 0h P-FGM 5h A + infraexp.

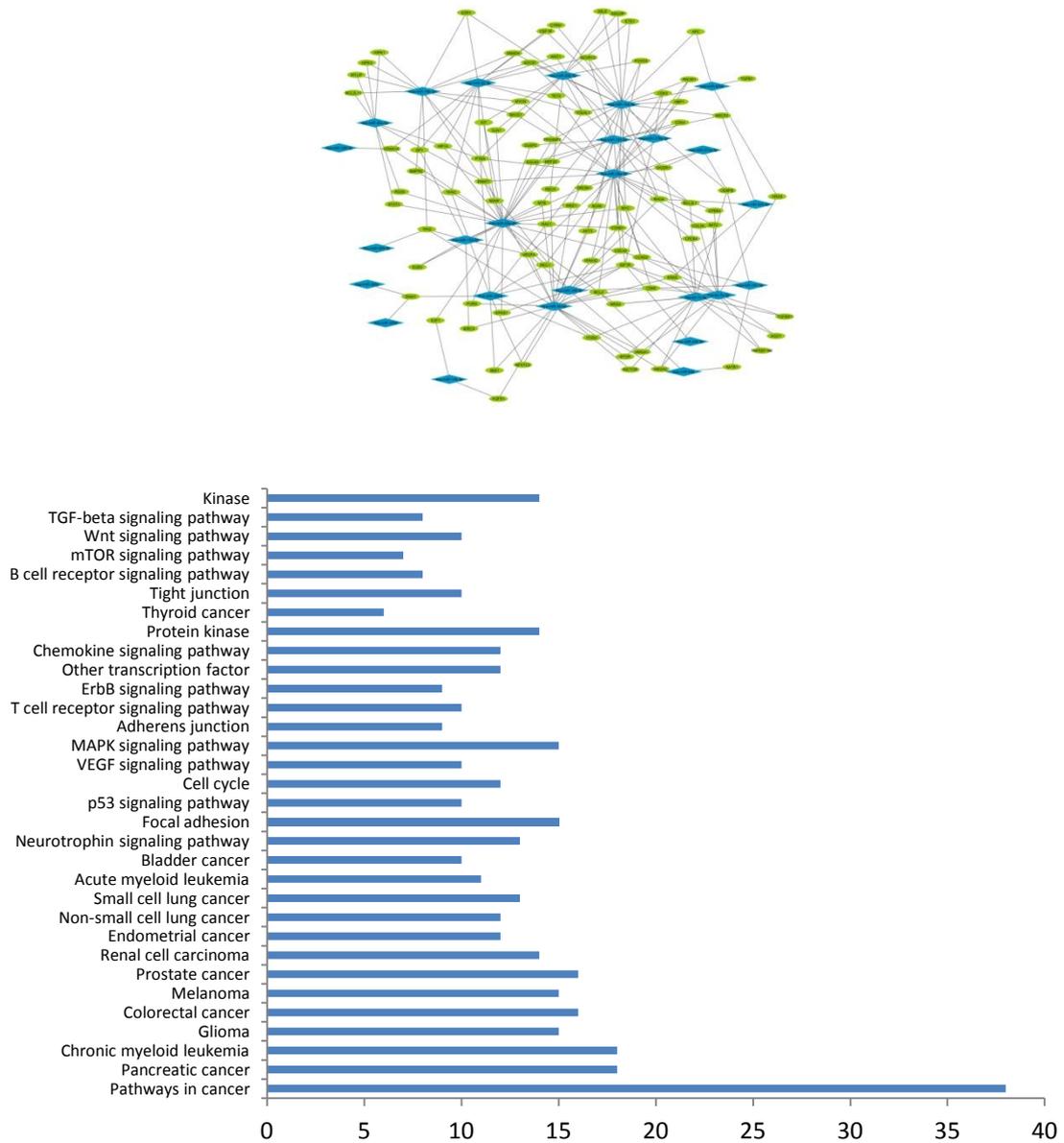


Figura 41: Red y estudio ontológico para la comparación 6: FGM 0h A-FGM 5h P + sobreexp.

En los casos de las comparaciones 1 (CS P-NoT A + infraexp) y 4 (NoT A-FGM 0h P + sobreexp) se obtienen sólo 2 genes (SP1 y RHOA) y 7 genes (CD274, SIRT1, CCND1, CCNE2, BCL2, CDC25A) respectivamente, por lo que no se ha realizado el estudio ontológico. Se presentan solo las redes de interacción de cada una de ellas (Figura 42).

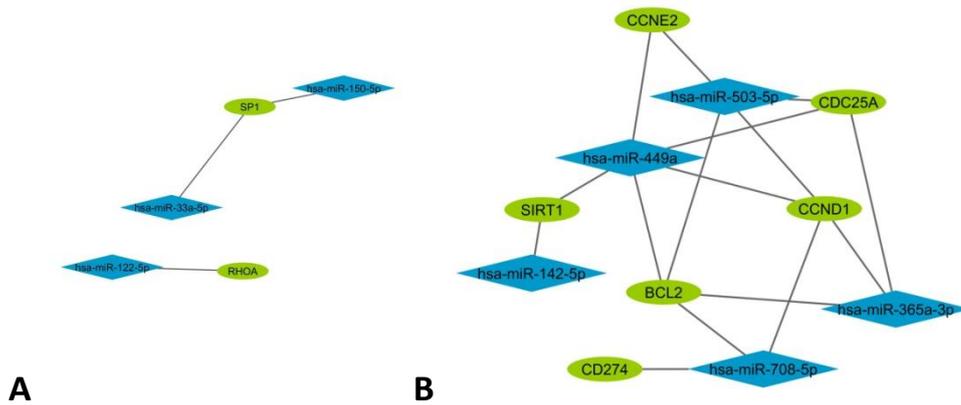


Figura 42: Redes de las comparaciones A) CS P-NoT A + infraexp y B) NoT A-FGM 0h P + sobreexp.

A su vez, dentro de los cuatro estudios ontológicos encontramos 10 vías comunes, la mayoría relacionada a cáncer, sin embargo una destaca por su relación con la función de las VE, la vía relacionada a *focal adhesion* o adhesión focal.

4.5. FGM modula el cargo de sncRNA en las primeras 5 horas de tratamiento

Al analizar el contenido en sncRNA de las VE previo al tratamiento con FGM (V0 0h) y luego de las 5h (V0 5h) encontramos que 277 sncRNA estaban presentes solo a las 0h y 274 presentes solo a las 5h. Por otro lado la distribución de sncRNA fue similar entre ambos arrays (Tabla 11). Además observamos que 273 sncRNA eran comunes para ambos grupos, dentro de los cuales 46 (16,85%) estaban sobreexpresados ($FC > 2$) y 33 (12,09%) infraexpresados ($FC < 0.5$) en 5h respecto a 0h. En otras palabras, cerca de un 50% del cargo en sncRNA se mantiene presente tras las 5h de tratamiento dentro del cual aproximadamente el 30% sufre un importante cambio en su expresión ($FC < -2$ ó > 2). El otro 50% no se expresa a las 5 horas y en reemplazo existe un 50% de “nuevos” miRNA expresados.

Con la intención de centrarnos en el cambio del cargo de las VE luego de la primera toma de FGM decidimos analizar aquellos sncRNA presentes en un momento pero ausentes en el otro y viceversa, asumiendo que esos sncRNA serían aquellos con más valor informativo respecto a la modulación sufrida por el FGM. Además incluimos en cada análisis a aquellos en común en ambos momentos, sobre o infra expresados en V0 5h dependiendo de su presencia o ausencia, respectivamente. Todos ellos resultaron miRNA maduros. Luego estudiamos sus genes dianas obteniendo, para la comparación FGM 0h P – FGM 5 h A + infraexp. que 13 miRNA tenían 189 genes dianas, reduciéndose a solo 9 miRNA con 23 regulados por al menos dos o más miRNA. En

el sentido inverso, para los ausentes en VO 0h, encontramos 32 miRNA que se reducen a 26 validados experimentalmente, con 89 genes dianas regulados por al menos dos o más miRNA.

4.6. FGM afecta en 5 h la funcional reguladora de las EV circulantes

El siguiente objetivo fue evaluar si FGM modificaba en las primeras horas de tratamiento la capacidad funcional de las VE circulantes frente a la activación linfocitaria. Para ello enfrentamos las VE circulantes obtenidas a la 0h y 5h a un cultivo de linfocitos activados policlonalmente resultando en una inhibición de la activación linfocitaria, medida a través de la expresión de CD25, de 0,42 y 0,65 veces respectivamente comparadas con el basal. Este resultado fue congruente con la observación directa al microscopio en la cual apreciamos la formación de más y mayores agregados (signo indirecto de activación celular) en los pocillos con VE de 5h ([Figura 43A](#)). Por lo tanto, tras 5h posteriores a la primera dosis, las VE circulantes tienen 1,6 veces menos capacidad inhibitoria de la activación linfocitaria. A su vez, la inhibición producida por las VE de 0h fue similar a la de los CS y NoT (0,43 y 0,48 veces respectivamente) ([Figura 43B](#)).

El efecto inhibitorio de la activación se evidenció también con la menor producción de citoquinas en los pocillos donde se agregaron VE. En detalle, las VE obtenidas a 0 h y 5 h inhibieron la producción de IL6 0,36 y 0,34 veces respecto al basal, respectivamente. En el caso de IL17A los resultados fueron de 0,22 y 0,26 veces respectivamente ([Figura 43C](#)). Los resultados de inhibición de la producción de ILs por las otras VE (CS y NoT) fueron similares a las de los pacientes con FGM.

Por otro lado, la viabilidad celular y la distribución de las poblaciones linfocitarias no se vieron afectadas tras la incubación con VE. En nuestras manos, no parece que a las concentraciones de VE usadas en cultivo, la presencia de HLA aportado por las VE puedan tener un efecto significativo ya que no hemos observado diferencias de activación ni muerte celular entre los pocillos que tenían VE autólogas de las que se añadió VE alogénicas.

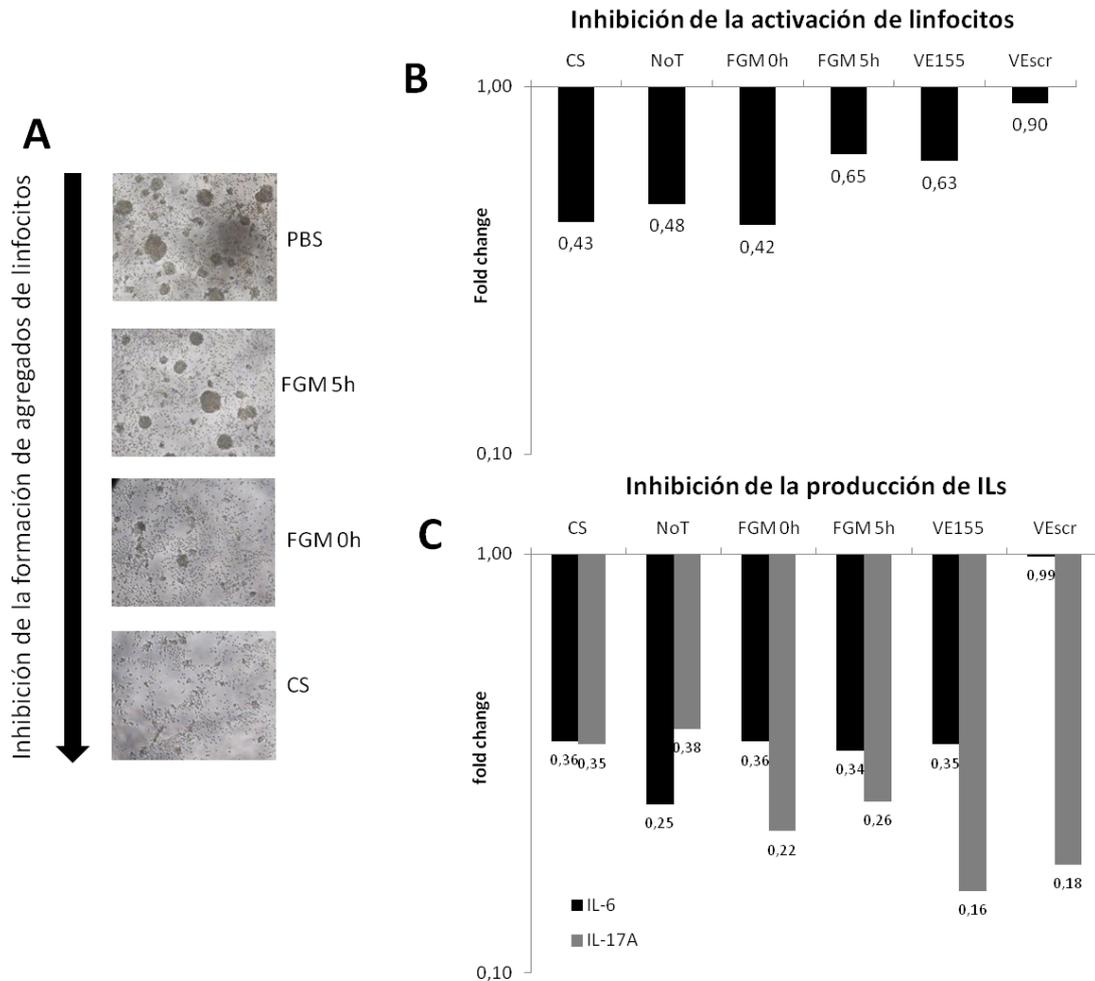


Figura 43: Las VE inhiben la activación linfocitaria. A) Imágenes de microscopía donde se observa un gradiente de mayor a menor agregados de linfocitos desde PBS (escasa inhibición de la activación) hasta CS (gran inhibición de la activación). A su vez, se puede observar que hay más cantidad de agregados (menor inhibición) en a FGM 5h respecto a los de VO 0h (mayor inhibición). (10x). B) Las VE inhiben la activación de linfocitos (medida por la expresión de CD25+ en citometría de flujo). FGM 0h inhibe la activación más que las VE de FGM 5h. Por otro lado las VE enriquecidas en miR-155 (VE155) inhiben más la activación linfocitaria que su control (VEscr) y a nivel similar que FGM 5h. C) La producción de interleuquinas (ILs) IL-6 e IL17A de las PBMC se ve inhibida tras el agregado de VE tanto circulantes como enriquecidas en miR-155.

4.7. Caracterización de VE enriquecidas en miR-155

Tras la infección de las células HEK293 con el constructo miR-155 observamos fluorescencia verde en cultivo indicando sobreexpresión celular del miR-155 y positividad para GFP en el análisis por citometría de flujo de las VE. Además, el Ct de la cuantificación de miR-155 contenido en las VE luego del tratamiento con RNAsa fue $35,1 \pm 0,6$ para las VE155 y $29,1 \pm 0,1$ para las VEscr, confirmando el enriquecimiento del cargo de las VE155 en miR-155 (Figura 44).

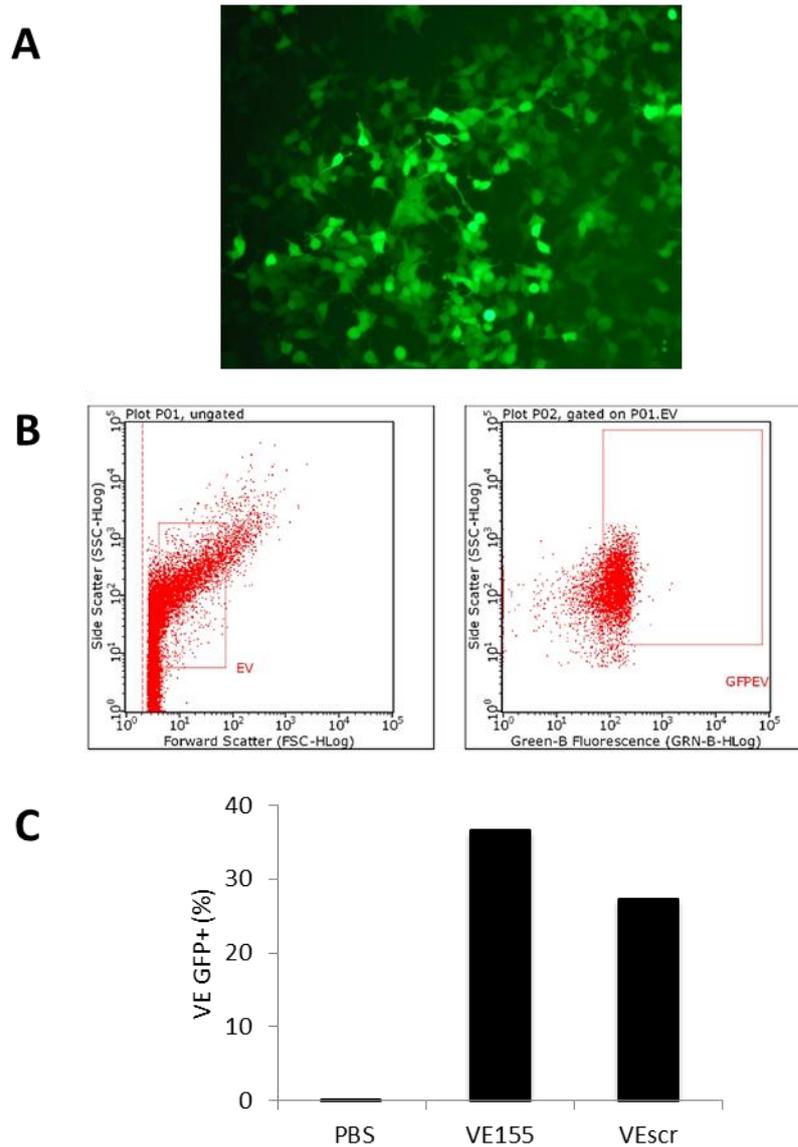


Figura 44: Caracterización de VE enriquecidas en miR-155. A) Confirmación de la infección de las células HEK293 con lentivirus miR-155 o *scramble* por la positividad para GFP. B) El aislamiento de VE del sobrenadante del cultivo fue confirmado a través de CMF, evaluando la positividad para GFP tanto en VE155 como VEscr. C) porcentaje de VE positivas para GFP.

4.8. EV enriquecidas en miR-155 inhiben la activación linfocitaria

Teniendo en cuenta los resultados en los puntos anteriores, decidimos analizar si el contenido en sncRNA de las VE podía ser un mecanismo posible para inhibir la activación linfocitaria. Con ese fin incubamos VE enriquecidas en miR-155 (VE155) o VEscr en un cultivo de linfocitos activados. El resultado obtenido fue una mayor inhibición de la activación respecto al basal a través de las VE155 (0,63 veces) que a través de las VEscr (0,90 veces) medido por la expresión de CD25 en los PBMC cultivados (Figura 43B). Además, se observó una disminución de producción de IL-6 en los pocillos donde se agregó VE155 comparado con los que se agregó VEscr (Figura 43C). Esta diferencia no se observó para el caso de IL-17A.

Por otro lado los resultados mostraron que no hay diferencia significativa en la cuantificación de miR-155 del sobrenadante de cultivos enriquecido en VE tratado o no con RNAsa. Esto nos induce a hipotetizar que la mayoría de los miR-155 producidos in vitro se encuentran dentro de las VE protegidos del efecto de RNAsas.

5. Discusión

Con este trabajo hemos confirmado la presencia de VE circulantes en sangre en pacientes de EM caracterizadas por un tamaño aproximadamente de 200 nm, con envoltura de bicapa lipídica que posee en superficie marcadores de origen celular abundantes en circulación (leucocitos totales, monocitos, plaquetas) y con un contenido enriquecido en sncRNA, principalmente miRNA. Los datos morfológicos son congruentes con resultados previos de nuestro propio grupo²¹⁸ y otros⁹⁹ en los cuales el método de aislamiento de VE de pacientes con EM ha sido la centrifugación diferencial.

Nuestros resultados revelan que la proporción de VE según origen celular no se vio afectada por el tratamiento con FGM. Cabe aclarar que el análisis por CMF de VE en nuestro caso excluye un gran porcentaje de las mismas debido a que su límite de detección es aproximadamente de 300 nm²¹⁹.

La concentración de VE durante el primer año de tratamiento con FGM ha sufrido variaciones individuales pero la cohorte en conjunto no presenta modulaciones significativas. Sin embargo, la posibilidad de tener a los pacientes monitorizados en el hospital durante las primeras horas, nos ha permitido observar que sí hay un incremento significativo en la concentración a las primeras 5 horas de 2 veces respecto al momento previo a la primera dosis. Este resultado fue opuesto al esperado, teniendo en cuenta que FGM es una molécula tipo esfingosina que inhibe la movilidad vesicular¹³² y fue demostrado previamente que reduce la concentración de VE derivadas de microgía en el LCR de ratones⁹⁹. De todos modos, este efecto no ha sido demostrado en VE derivadas de células circulantes ni en las horas iniciales del tratamiento. Una posible explicación podría ser que la inhibición de la liberación de VE circulantes vía esfingosina presente un mecanismo de retroalimentación. Tomando en conjunto estos resultados, hipotetizamos que la inhibición inicial de la movilidad vesicular en células circulantes causada por FGM puede actuar como una señal compensatoria de liberación de VE a las 5 h, finalmente incrementando la concentración de VE circulantes. Subsecuentemente, una vez que FGM alcanza su rango terapéutico, se establece un equilibrio entre la liberación de vesículas y la inhibición de este fenómeno.

Al observar que FGM modulaba en forma inmediata la concentración de VE, decidimos caracterizar el cargo de sncRNA de las EV antes y después de la primera toma y compararlo con el de CS y NoT. En la descripción inicial del contenido genético de las VE en los cuatro tipos de individuos comprobamos un enriquecimiento en miRNA (maduros) y mirNA (inmaduros) pero además hallamos un porcentaje de 20 a 25 % de snoRNA, que por su condición nucleolar no es

esperable su presencia en VE, las cuales son formadas en el citoplasma. Según lo publicado en vesiclepedia y otras bases de datos similares, pocos trabajos habían descrito la presencia de este tipo de RNA no codificante²⁰⁶. Además aproximadamente un 30 % del total de las sondas de cada grupo era común a las 4 condiciones. Llama la atención que en los procesos biológicos que eran comunes a todas las comparaciones destacaba la “adhesión focal” que es el proceso por el cual las células se adhieren a las membranas basales y pueden migrar a través de ellas. Tomando estas observaciones en conjunto, podríamos suponer que hay un porcentaje del contenido genético que es estable, presente en cualquier tipo de VE y que a la vez, está involucrado en el mecanismo de la fusión de las VE con su célula diana.

Centrados en el efecto de FGM en las primeras 5 h, apreciamos un importante cambio en el perfil de expresión en donde cerca del 50 % de los sncRNA eran específicos de cada situación, estando presentes a las 0h y ausentes a las 5h y viceversa. Por otro lado el 50% restante en común, presente en ambos momentos, sufría también una significativa modulación cambiando la expresión de cerca del 30 % de los mismos. Abonando esta observación un reporte previo describía la rápida modulación del perfil de RNA de sangre total a las 4 y 12 horas con IFN beta en pacientes de EM²²⁰. A pesar de este cambio en los sncRNA no somos capaces de detectar cambios en las rutas metabólicas reguladas por los miRNA presentes antes y después del inicio con FGM, al menos con el protocolo seguido en este estudio. Sin embargo los nodos principales de las redes cambian destacándose el gen *CDKN1A* (del inglés *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A) para la red construida con los genes y miRNA presentes en FGM 0 h y ausentes a las 5 h mientras que a la inversa, ausentes a las 0 h y presentes a las 5 h, uno de los nodos principales es *ESR1* (receptor de estrógeno 1).

Por otro lado, hemos demostrado que las VE circulantes tienen un papel inhibitorio de la activación de linfocitos, sin afectar su viabilidad. Este rol se había confirmado para otras VE como las derivadas de leche materna³³ o líneas celulares de cancer³⁴ pero no en VE circulantes. A su vez, encontramos algunos estudios que exploran las funciones de VE, realizados en el modelo EAE o en cultivos organotípicos afirmando su capacidad de promover el daño de la mielina, sin embargo para nuestro conocimiento, no hay estudios que analicen las VE circulantes en pacientes de EM^{85,99,221}. Sorprendentemente, esta capacidad reguladora está disminuida luego de 5 h de tratamiento con FGM. Estos datos nos conducen a pensar que tras la dosis inicial de FGM se promueve un ambiente menos antiinflamatorio a nivel vesicular, probablemente en concordancia con la disminución del estado inflamatorio al arrestarse los linfocitos circulantes (Figura 45).

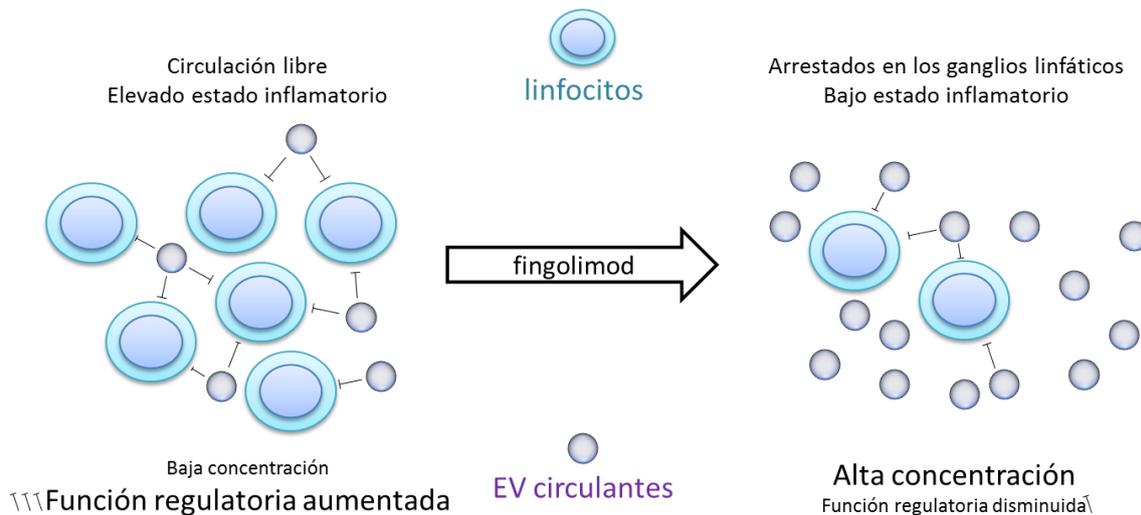


Figura 45: Fingolimod modula la liberación y función reguladora de las VE circulantes. Previo al tratamiento con fingolimod los linfocitos circulan libremente en el torrente sanguíneo manteniendo un estado proinflamatorio que caracteriza a la enfermedad EM. A su vez la concentración de VE es baja pero mantienen una elevada función reguladora probablemente para contrarrestar el estado proinflamatorio linfocitario. Posterior a la primera dosis de tratamiento con fingolimod este escenario cambia, quedando los linfocitos arrestados en los ganglios linfáticos lo que condiciona a un estado menos inflamatorio y en consecuencia se liberan una mayor cantidad de VE pero ahora con un perfil menos regulador de acuerdo al microambiente circulatorio.

Para enlazar ambos conceptos aquí establecidos sobre el contenido enriquecido en miRNA y la función reguladora de las VE, decidimos analizar el efecto inhibitorio de VE enriquecidas en miR-155 del cual se conoce su función inhibitoria^{222,214}. Comprobamos que las VE enriquecidas en miR155 eran responsables de una mayor inhibición de la activación de linfocitos y producción de IL-6 que su control. Otros autores han conseguido resultados similares con el miR-568, aunque sin detallar si se encontraba dentro de VE o circulante libre²¹³. En este sentido, nuestro trabajo nos permite asegurar que el cargo genético de las VE es funcional y que el enriquecimiento de vesículas tanto en células como artificiales podría ser una alternativa funcional y con menos complejidad biológica que las VE obtenidas de individuos.

En resumen, hemos caracterizado las VE circulantes de una cohorte de pacientes tratados con FGM, observando que el tratamiento produce un cambio inicial rápido en el perfil de sncRNA de las VE y que a su vez modula la capacidad reguladora de las VE sobre los linfocitos activados. De este modo, el presente trabajo demuestra el rol de las VE en la patología de la EM y su implicancia en el funcionamiento de los tratamientos inmunomoduladores. A su vez, deja abierta la posibilidad del uso de las VE como posibles tratamientos coadyuvantes gracias a su papel regulador del sistema inmune.

DISCUSIÓN GENERAL

Gran parte de esta tesis habla sobre la comunicación, estudiando tanto cómo se trasmite el mensaje, cuándo se trasmite y qué información lleva. Como reflejaba de manera muy elegante el filósofo navarro Juan David García Bacca en su ensayo *De magia a técnica. Ensayo de teatro filosófico-literario-técnico*, la fluidez de la comunicación es señal de entendimiento entre las partes, y como consecuencia la distancia entre ellas se acorta. Para ilustrar esto García Bacca, postula que la dimensión relativa del mundo ha ido disminuyendo a medida que las comunicaciones han crecido y se han hecho más fluidas (Figura 46)²²³.

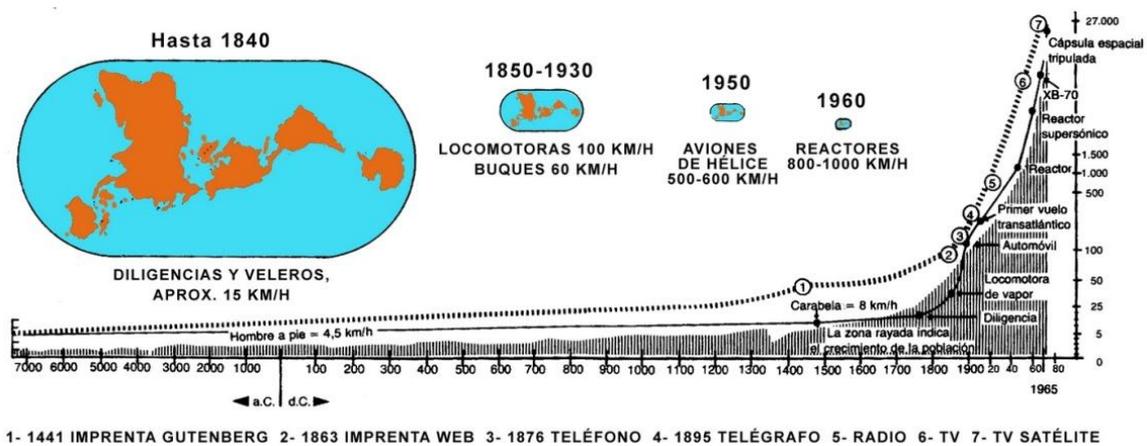


Figura 46: Disminución relativa del tamaño del mundo con el incremento en la rapidez de las comunicaciones. Tomado de ²²³.

Durante siglos, el tamaño relativo se mantuvo constante mientras la velocidad de la comunicación estaba signada a la de un hombre a pie. Pero a partir del siglo XV con la irrupción de la imprenta, y los posteriores avances en los medios de comunicación, la velocidad de la comunicación creció vertiginosamente de manera exponencial, disminuyendo relativamente las distancias entre los distintos puntos del planeta.

En los últimos siglos, la ciencia ha nutrido este proceso, al punto de que ciencia y comunicación pueden considerarse conceptos indisolubles. Siguiendo ese paradigma, los integrantes de la comunidad científica, debemos mantener una comunicación fluida entre pares, para acortar distancias y nutrir de forma colectiva a la ciencia.

En particular, en nuestro ámbito de la biomedicina, la comunicación entre biología y clínica (o medicina) debe alimentarse recíprocamente. En la clínica diaria surgen preguntas que requieren del apoyo de la biología para proponer respuestas acordes. A su vez, la biología puede servirse de la clínica como motor de búsqueda, estudio y posterior interpretación de los procesos biológicos. En este sentido, el estudio de las VE y sus posibles aplicaciones clínicas precisa esta dinámica de

reciprocidad para que sus resultados tengan valor. Pero esta dinámica nos sitúa frente a una serie de desafíos, que son precisos resolver, o al menos movernos hacia ese fin. Durante el desarrollo de esta tesis, hemos identificado algunos de ellos, agrupados aquí en tres, como se ilustra en la **Figura 47** y que pasaremos a discutir. A su vez, comentaremos los cambios de concepto o escenario que el estudio de VE ha provocado.

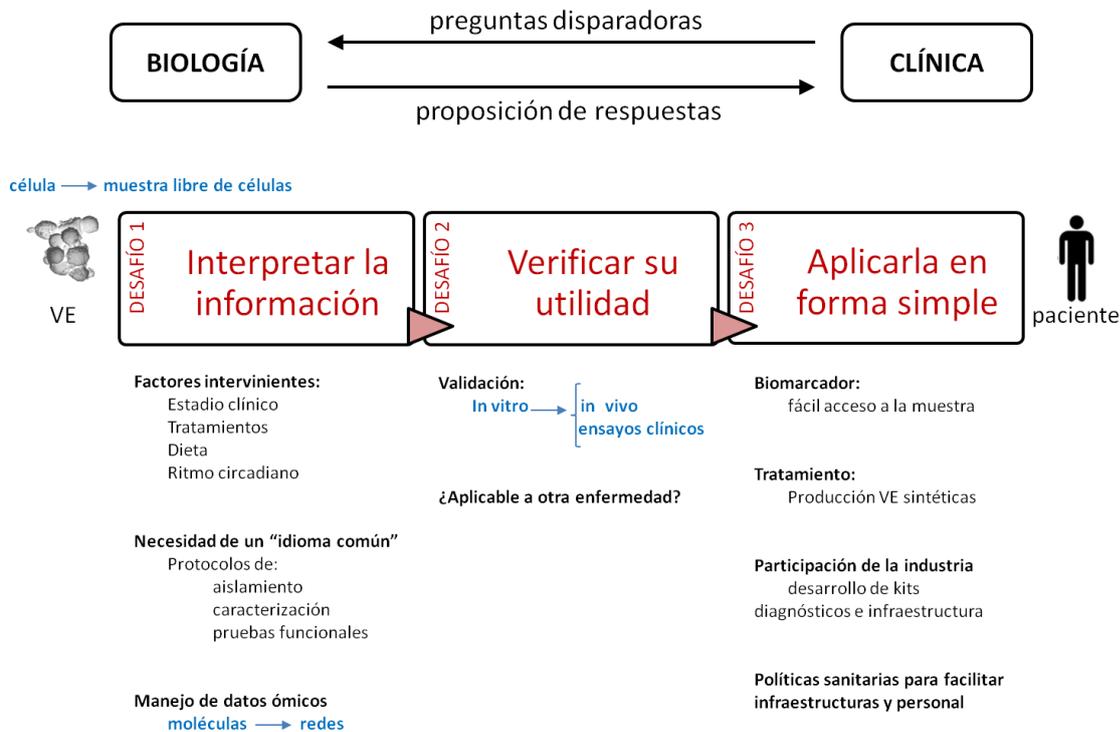


Figura 47: Desafíos al estudiar las VE con una aplicación clínica. En bordó los 3 desafíos analizados; en cian los cambios de escenario propuestos en esta discusión.

1. Interpretar la información

El primero cambio de escenario que vale mencionar es el de considerar a la muestra libre de células, que incluye las VE, como una fuente de información. Podríamos decir que estábamos parcialmente habituados a este nuevo escenario, ya que el estudio de moléculas solubles, hormonas, etc. es algo corriente. Sin embargo no tenemos el concepto de que existe material genético o proteínas seleccionados específicamente por la célula y que estos pueden ser aislados en un líquido extracelular. La fuente de información que esta muestra libre de células puede proveer es inmensurable, pero ¿somos capaces de interpretar ese cúmulo de información? He aquí el primer desafío.

Tanto en el capítulo 1, como en el 3 y 4, hemos observado que existen factores que intervienen en la cantidad y composición de las VE. El estadio clínico de la EM y los distintos tratamientos inmunomoduladores afectan significativamente la concentración circulante de VE, permaneciendo elevadas durante las etapas inflamatorias (EMRR) y disminuyendo en la etapa progresiva (EMSP), así como aumentándose en pocas horas tras el uso de FGM. Otros factores fuera del estudio de esta tesis, como la dieta¹⁸¹, ejercicio²²⁴ o el ritmo circadiano¹⁷⁰, también influyen notoriamente en la dinámica de las VE. Parece claro que en los estudios futuros hay que tener en cuenta el máximo de variables posibles ya que el sistema de comunicación de las VE es sensible y responde con gran rapidez a los cambios.

Por otro lado, dentro del desafío de la interpretación de datos, se abre otro aspecto a tener en cuenta que es la necesidad de “hablar en un mismo idioma”, de utilizar un mismo canal de comunicación entre pares. En un campo novedoso como el de las VE, aún es temprano para considerar que hay procedimientos estándar o protocolos establecidos y que entonces los estudios puedan ser comparables y la información extrapolable de uno a otro. Esto ha quedado manifestado en el capítulo 2, donde se analiza la posibilidad de aplicación de un flujo de trabajo para el estudio de VE adecuado a un entorno hospitalario. Cuanto más completa sea la caracterización, utilizando métodos de los dos niveles, más específica será la información y por lo tanto más clara su interpretación. Además, la suma de pruebas funcionales, como fue utilizada en el capítulo 4, refuerza la caracterización de las VE. En suma los pasos futuros para la correcta traslación de las VE a la clínica pasa sin duda por protocolizar de manera consensuada la metodología a utilizar.

Por último, un claro ejemplo de la importancia de una interpretación correcta de la información sucede en el manejo de datos masivos de los estudios ómicos en VE: debe ser con cautela, aplicando filtros de calidad y evitando la búsqueda “dirigida” de resultados. Y lógicamente, mediante el uso de protocolos comunes que permitan la comparación entre pares. A su vez, esta realidad nos lleva a otro cambio de escenario, el de análisis e interpretación en redes. En enfermedades complejas como la EM, donde su patología no es unicausal, existen variedades fenotípicas difíciles de agrupar en compartimentos estancos y sus tratamientos presentan una efectividad muy variable, quizás sea necesario abordarlas teniendo en cuenta no solo sus componentes, sino la relación entre ellos. En otras palabras, las explicaciones biológicas con los estudios ómicos, no buscan dar respuesta del tipo “molécula-enfermedad” sino, por el contrario, “grupo de moléculas y su interrelación-enfermedad”. Volviendo al caso de la EM, tal vez el actual desconocimiento de un autoantígeno causal pueda verse superado por el conocimiento de grupos de antígenos y su valor en conjunto como causa de la enfermedad. En nuestro análisis

proteómico, hemos encontrado el factor de von Willebrand elevado en CS respecto a pacientes NoT. Veíamos a su vez que dicha diferencia tenía sentido en la hipótesis del daño de la BHE. Sin embargo, hasta el momento su validación no se ha conseguido, tal vez por cuestiones técnicas, o quizá porque este factor por sí solo no pueda diferenciar entre CS y NoT, y sea necesario utilizar más componentes de esa red.

Esto último nos da paso al siguiente desafío en el estudio de VE y su aplicación clínica que es verificar la utilidad de la información brindada por las VE.

2. Verificar su utilidad

En el apartado anterior hemos comentado que las VE son una amplia fuente de información, pero ¿qué parte de esa información es realmente relevante y útil para la enfermedad en cuestión? Como mencionamos en la introducción, los pasos para el desarrollo de un biomarcador requieren la validación en cohortes independientes. Es en esa etapa donde podremos saber si la información obtenida de las VE tiene validez clínica.

Actualmente, la gran mayoría de las propuestas de VE como biomarcadores, como vehículos terapéuticos o incluso como dianas terapéuticas están basadas en investigación *in vitro*, sin embargo, el paso a modelos *in vivo* y su verificación en individuos no termina por completarse. Ese paso inconcluso puede traducirse en que el biomarcador (o terapia) propuesta, no pueda ser extendido a la clínica ya que en condiciones más complejas que caracterizan a un modelo vivo, no sea evidente la capacidad como biomarcador (o su eficacia terapéutica). Al respecto, planteamos otro cambio de escenografía que consiste en extender la experimentación *in vitro* a la del modelo vivo o en ensayo clínico para el caso de propuestas de tratamiento, para ampliar así el número de propuestas que realmente lleguen a humanos.

Por otro lado, debe plantarse si la utilidad clínica de las VE propuestas para una enfermedad pueden servir para otra. Con los datos obtenidos en nuestro estudio, deberíamos analizar si esa información es válida para otra enfermedad autoinmune o inflamatoria. Esto pone de manifiesto una limitación de esta tesis que es la falta de comparación con individuos de otras enfermedades de similares características, con lo que evaluar la especificidad de los resultados.

En caso de verificar la utilidad de la información para la enfermedad estudiada, además de reafirmar el conocimiento estaremos en condiciones de aplicarla en beneficio de los pacientes. Pero esto también nos enfrenta a un nuevo desafío.

3. Aplicarla en forma simple

El tercer desafío es procurar la aplicabilidad clínica. ¿De qué nos sirve tener la información, saber que es verosímil pero que esta no pueda ser transferida a la práctica en beneficio de los pacientes? Son numerosos los obstáculos que presenta este desafío, desde cuestiones biológicas a políticas sanitarias.

Uno de los obstáculos biológicos es la facilidad para acceder a la muestra de VE. Pude suceder que se hayan identificado moléculas de VE o un subtipo de vesículas que sean candidatas para aplicarse como biomarcadores, pero estas no pueden ser extraídas sino mediante una técnica invasiva. Es el caso de los tumores de difícil acceso (retroperitoneales, del SNC, mediastínicos) y que no tienen conexión al torrente sanguíneo o linfático; a pesar de que se hayan identificado marcadores en sus modelos en líneas celulares cultivadas, su aplicación clínica carece de sentido por la dificultad que representa la obtención de la muestra. En el capítulo 3 hemos estudiado pares de muestra de suero y LCR con el fin de analizar similitudes y proponer a las VE circulantes como marcadores de los procesos ocurridos en el SNC, a fin de evitar futuras punciones lumbares. Hemos encontrado un importante solapamiento en el cargo de las VE de los dos tipos de muestras, lo que deja abierta una vía de exploración con el objetivo comentado.

En la propuesta de las VE como posibles terapias encontramos dos alternativas, el uso de VE autólogas, producidas *in vitro* a partir de células dendríticas aisladas del paciente²²⁵ o, la utilización de vesículas sintéticas, diseñadas “a la carta”²²⁶. Al día de hoy solo se ha conseguido producir *in vitro* cantidades suficientes de VE para aplicarse como tratamiento en forma continua, mediante la extracción de células dendríticas por leucoaféresis y posterior cultivo necesitando una producción de 1 a 4 litros de sobrenadante para conseguir suficiente cantidad de VE^{78,79}. Si queremos hacer prevalecer la simplicidad de la aplicación clínica, probablemente esta opción quede desestimada. Por el contrario, el uso de vesículas sintéticas como liposomas o PLGA (del inglés: *polylacti-co-glycolic acid*), permiten una producción a gran escala y sin necesidad de someter al paciente a una leucoaféresis, aunque aún no ha sido aplicado en ensayos clínicos. Además, las vesículas sintéticas presentan ventajas frente a los fármacos de uso convencional, ya que pueden ser direccionadas mediante el acoplamiento de moléculas en su superficie y pueden cargarse con una combinación de moléculas terapéuticas que funcionen sinérgicamente. Sin embargo, tanto una como la otra propuesta requieren de infraestructuras adecuadas para asegurar unas condiciones de buena manufacturación (GMP, del inglés: *Good Manufacture Practice*), las que están disponibles sólo en algunos pocos hospitales o centros de investigación asociados a ellos²²⁷. A su vez, el uso de VE o análogos sintéticos como tratamiento biológico

requiere de marcos regulatorios similares al de la terapia celular o génica, que quizá deban adaptarse para el caso particular de VE. A principios de octubre de 2015, la ISEV congregó una reunión de expertos para definir y consensuar la aplicación de VE como terapias en ensayos clínicos, de la que se espera pronto una publicación de posicionamiento para sentar las bases en este campo.

La integración de la industria biotecnológica en esta línea de investigación ha permitido un avance a gran velocidad en el desarrollo de kits para aislar VE y procesar su cargo. Del mismo modo, cuando se ha concluido con el proceso de descubrimiento de un biomarcador o verificación de una utilidad clínica obtenidos del estudio de VE, es justamente la industria biotecnológica la que posee las herramientas para llevar a cabo la transformación de la investigación a un producto de fácil aplicación.

Para concluir, hemos evidenciado la presencia de VE en pacientes de EM y que estas pueden ser una fuente de información útil para el manejo clínico de la enfermedad, hemos observado que el estadio clínico y los tratamientos influyen la cantidad, composición y función de estas VE y hemos examinado los métodos posibles para estudiar las VE en forma rutinaria en un ambiente hospitalario. Creemos que esta novedosa vía de comunicación entre células provocará un cambio en la concepción de la fisiopatología de la EM y en un futuro próximo, será una herramienta útil para su manejo clínico.

CONCLUSIONES

1. La concentración de VEP está aumentada en pacientes NoT respecto a CS. Por otro lado, la concentración de VEP, VEL y VEM está aumentada en pacientes EMRR y disminuida en EMSP, ambos respecto a CS. Por lo tanto, se postula que las VE circulantes en sangre son un reflejo del estadio clínico.
2. La concentración de los tres subtipos de VE está aumentada en pacientes tratados con IFN β y NTZ respecto a los NoT.
3. *Exoquick* es el protocolo con el que se aísla una mayor cantidad de VE de sangre y orina, aunque el concentrado de VE obtenido presenta una elevada contaminación con elementos distintos a VE.
4. El método *Centri13000*, es el siguiente protocolo en cantidad de VE aisladas, obteniendo mayor pureza, sin perder las VE de mayor tamaño, además no requiere una infraestructura compleja. Por el contrario, el método de ultracentrifugación aísla solo VE pequeñas y requiere una infraestructura y tiempo mayores que otros métodos. Por ello se propone como método de trabajo el *Centri1300*.
5. La cuantificación de EV obtenida mediante CMF no se correlaciona con la de NTA debido a la diferencia del tamaño mínimo de detección de cada plataforma.
6. Para una completa detección y caracterización de VE proponemos combinar plataformas en dos niveles. En el primer nivel NTA para concentración y distribución de tamaño y CMF para caracterización múltiple y en el segundo nivel WB para marcadores proteicos y ME para la morfología.
7. Las proteínas que componen las VE participan mayoritariamente en vías de coagulación y transporte de lipoproteínas. Entre ellas destaca el factor de von Willebrand que está sobreexpresado en CS respecto a NoT.
8. Existe un solapamiento parcial entre el cargo de las VE circulantes en sangre y las de LCR.
9. La concentración de citoquinas en las VE aisladas mediante centrifugación diferencial es baja, identificando únicamente a I-TAC y TNF α .
10. El patrón de BOC no se asocia al RNA libre en suero y LCR. Tampoco existe asociación entre el RNA libre de suero y LCR.
11. El cargo de RNA de las VE circulantes está enriquecido en sncRNA, principalmente miRNA y snoRNA. Aproximadamente un 30% de dicho cargo es común en los distintos estadios de la enfermedad, lo que apoya la idea de que las VE tienen un cargo estable.

12. FMG modula, en las primeras 5 h de tratamiento, a las VE circulantes aumentando su concentración, modificando su cargo genético y disminuyendo su capacidad inhibitoria sobre linfocitos activados.
13. Las VE circulantes, tanto de pacientes como de controles sanos, presentan una función inhibitoria de la activación de linfocitos sin afectar su viabilidad.
14. A su vez, esta función se observa para las VE enriquecidas con miR155.
15. El cargo de las VE puede ser una fuente de biomarcadores para la EM.

PUBLICACIONES

Publicaciones derivadas de esta tesis (ver ANEXO):

1. Matías Sáenz-Cuesta, Haritz Irizar, Tamara Castillo-Triviño, Mainer Muñoz-Culla, Iñaki Osorio-Querejeta, Alvaro Prada, Lucia Sepúlveda, et al. 2014. "Circulating Microparticles Reflect Treatment Effects and Clinical Status in Multiple Sclerosis." *Biomarkers in Medicine* 8 (5): 653–661.
2. Sáenz-Cuesta, Matías, Iñaki Osorio-Querejeta, and David Otaegui. 2014. "Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: What Are They Telling Us?" *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (March): 1–9.
3. Sáenz-Cuesta, Matías, Ander Arbelaiz, Amaia Oregi, Haritz Irizar, Iñaki Osorio-Querejeta, Mainer Muñoz-Culla, Jesus M Banales, Juan M Falcón-Pérez, Javier Olascoaga, and David Otaegui. 2015. "Methods for Extracellular Vesicles Isolation in a Hospital Setting." *Frontiers in Immunology* 6 (February).
4. Sáenz-Cuesta, Matías, María Mittelbrunn, and David Otaegui. 2015. "Editorial : Novel Clinical Applications of Extracellular Vesicles." *Frontiers in Immunology* 6 (July): 1–2.
5. Matías Sáenz-Cuesta, Ainhoa Alberro, Mainer Muñoz-Culla, Iñaki Osorio-Querejeta, Mikel Tainta, Álvaro Prada, Tamara Castillo-Triviño, Marta Fernández-Mercado, Juan Manuel Falcón-Pérez, Javier Olascoaga, David Otaegui. Impaired regulatory function of extracellular vesicles during initial fingolimod therapy. Manuscrito enviado a *Journal of Clinical Investigation*.

Libro virtual (E-book), haciendo la función de editor invitado de Research Topic en la revista *Frontiers in Immunology*:

Sáenz-Cuesta M, Mittelbrunn M, Otaegui D. Novel Clinical Applications of Extracellular Vesicles. *Frontiers*; 2015. doi:10.3389/978-2-88919-645-6.

Otros artículos en los que participé como 1^{er} autor o coautor durante el desarrollo de esta tesis:

1. **Sáenz-Cuesta, Matías**, Natalia Martínez-Pomar, Javier de Gracia, Pilar Echaniz, Eduardo Villegas, Alvaro Prada, David Otaegui, Núria Matamoros, and Emilio Cuadrado. 2012. "TAC1 Mutation in Good's Syndrome: In Search of a Genetic Basis." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 145 (1) (October): 27–30.
2. Moreno, Montserrat, **Matías Sáenz-Cuesta**, Joaquín Castelló, Ester Cantó, Laura Negrotto, Angela Vidal-Jordana, Xavier Montalban, and Manuel Comabella. 2013. "Circulating Levels of Soluble Apoptosis-Related Molecules in Patients with Multiple Sclerosis." *Journal of Neuroimmunology* 263 (1-2) (October 15): 152–4.
3. Irizar, Haritz, Mainer Muñoz-Culla, Olaia Zuriarrain, Estibaliz Goyenechea, Tamara Castillo-Triviño, Alvaro Prada, **Matías Saenz-Cuesta**, et al. 2012. "HLA-DRB1*15:01 and Multiple Sclerosis: A Female Association?" *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 18 (5) (May): 569–77.
4. Irizar, Haritz, Mainer Muñoz-Culla, Lucia Sepúlveda, **Matías Sáenz-Cuesta**, Alvaro Prada, Tamara Castillo-Triviño, Gorka Zamora-López, Adolfo López de Munain, Javier Olascoaga, and David Otaegui. 2014. "Transcriptomic Profile Reveals Gender-Specific Molecular Mechanisms Driving Multiple Sclerosis Progression." *PloS One* 9 (2) (January): e90482.
5. Muñoz-Culla, M, H Irizar, T Castillo-Triviño, **M Sáenz-Cuesta**, L Sepúlveda, I Lopetegi, a López de Munain, J Olascoaga, SE Baranzini, and D Otaegui. 2014. "Blood miRNA Expression Pattern Is a Possible Risk Marker for Natalizumab-Associated Progressive

Multifocal Leukoencephalopathy in Multiple Sclerosis Patients." *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England) 20 (14) (May 22): 1851–1859.

6. Irizar, Haritz, Maider Muñoz-Culla, **Matías Sáenz-Cuesta**, Iñaki Osorio-Querejeta, Lucía Sepúlveda, Tamara Castillo-Triviño, Alvaro Prada, Adolfo Lopez de Munain, Javier Olascoaga, and David Otaegui. 2015. "Identification of ncRNAs as Potential Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis through Differential ncRNA - mRNA Network Analysis." *BMC Genomics* 16 (1) (January): 250.
7. Maider Muñoz-Culla, Haritz Irizar, **Matias Saenz-Cuesta**, Tamara Castillo-Trivino, Iñaki Osorio-Querejeta, Lucia Sepulveda, Adolfo Lopez de Munain, Javier Olascoaga, and David otaegui. "SncRNA (microRNA & snoRNA) opposite expression pattern found in multiple sclerosis relapse and remission is sex dependent". Under revision in *Scientific Reports*.

BIBLIOGRAFIA

1. Brücher, B. L. D. M. & Jamall, I. S. Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment, Carcinogenesis, and Anticancer Treatment. *Cell. Physiol. Biochem.* **34**, 213–243 (2014).
2. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–659 (2007).
3. Chargaff, E. & West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* **166**, 189–197 (1946).
4. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* **13**, 269–288 (1967).
5. Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B. & Teng, K. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J. Cell. Physiol.* **147**, 27–36 (1991).
6. Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N. J. & Heine, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **645**, 63–70 (1981).
7. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
8. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
9. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
10. Araldi, E. *et al.* International society for extracellular vesicles: first annual meeting, April 17–21, 2012: ISEV-2012. *J. Extracell. Vesicles* **1**, 1–11 (2012).
11. Vlassov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 940–8 (2012).
12. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* **4**, 594–600 (1998).
13. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a

- pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–891 (2012).
14. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* **14**, 195–208 (2014).
 15. Fleury, A., Martinez, M. C. & Le Lay, S. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front. Immunol.* **5**, 370 (2014).
 16. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 575–581 (2009).
 17. Mause, S. F. & Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* **107**, 1047–57 (2010).
 18. Waldenström, A., Genneback, N., Hellman, U. & Ronquist, G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* **7**, e34653 (2012).
 19. Christianson, H. C., 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.* **110**, 17380–5 (2013).
 20. Théry, C. *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* **166**, 7309–18 (2001).
 21. Frey, B. & Gaip, U. S. The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Semin Immunopathol* **33**, 497–516 (2011).
 22. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 1–60 (2015).
 23. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–83 (2013).
 24. György, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2667–2688 (2011).
 25. Morel, O. *et al.* Procoagulant microparticles: Disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2594–2604 (2006).
 26. Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their

- morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 614–627 (2014).
27. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev Immunol* **9**, 581–93 (2009).
 28. Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J. & Schorey, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **110**, 3234–3244 (2007).
 29. Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* **2**, 282 (2011).
 30. Giri, P. K. & Schorey, J. S. Exosomes Derived from M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS One* **3**, e2461 (2008).
 31. Sprague, D. L. *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: Unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* **111**, 5028–5036 (2008).
 32. Robert Gastpar, Mathias Gehrman, Maria A. Bausero, Alexzander Asea, Catharina Gross, Josef A. Schroeder, and G. M. Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. *Cancer Res* **65**, 5238–5247 (2005).
 33. Admyre, C. *et al.* Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.* **179**, 1969–1978 (2007).
 34. Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J. Immunol.* **187**, 676–683 (2011).
 35. Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* **67**, 7458–7466 (2007).
 36. Liu, C. *et al.* Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. *J. Immunol.* **176**, 1375–1385 (2006).
 37. Abusamra, A. J. *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells, Mol. Dis.* **35**, 169–173 (2005).
 38. Valenti, R. *et al.* Human Tumor-Released Microvesicles Promote the Differentiation of Myeloid Cells with Transforming Growth Factor- β -Mediated Suppressive Activity on T

- Lymphocytes. *Cancer Res.* **66**, 9290–9298 (2006).
39. Chaput, N. & Théry, C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.* **33**, 419–40 (2011).
40. Lacroix, R. *et al.* Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 437–46 (2012).
41. Lacroix, R. *et al.* Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1190–1193 (2013).
42. Momen-Heravi, F. *et al.* Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol. Chem.* **394**, 1253–62 (2013).
43. Witwer, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. vesicles* **2**, 1–25 (2013).
44. Rood, I. M. *et al.* Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **78**, 810–816 (2010).
45. Shao, H. *et al.* Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat. Med.* **18**, 1835–40 (2012).
46. van der Meel, R., Krawczyk-Durka, M., van Solinge, W. W. & Schiffelers, R. M. Toward routine detection of extracellular vesicles in clinical samples. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 244–53 (2014).
47. Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P. & Dignat-George, F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 807–18 (2010).
48. Nolte-'t Hoen, E. N. M. *et al.* Dynamics of dendritic cell-derived vesicles: high-resolution flow cytometric analysis of extracellular vesicle quantity and quality. *J. Leukoc. Biol.* **93**, 395–402 (2013).
49. Nolte-'t Hoen, E. N. M. *et al.* Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **8**, 712–720 (2012).
50. Witwer, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. vesicles* **2**, 1–25 (2013).

51. Anderson, W., Kozak, D., Coleman, V. a, Jämting, Å. K. & Trau, M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. *J. Colloid Interface Sci.* **405**, 322–30 (2013).
52. Dragovic, R. A. *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* **7**, 780–8 (2011).
53. Pienimaeki-Roemer, A. *et al.* Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion* **55**, 507–521 (2015).
54. Palomo, L. *et al.* Considerations for Applying Metabolomics to the Analysis of Extracellular Vesicles. *Front. Immunol.* **5**, 651 (2014).
55. Gerlach, J. Q. *et al.* Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One* **8**, e74801 (2013).
56. Garcia-Contreras, M. & Robbins, P. D. Exosomes and microvesicles: applications for translational research from biomarkers to therapeutic applications. 2013 ASMEV meeting report. *CellR4* **1**, 173–175 (2013).
57. El Andaloussi, S., Mager, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 347–357 (2013).
58. Santiago-Dieppa, D. R. *et al.* Extracellular vesicles as a platform for ‘liquid biopsy’ in glioblastoma patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 819–825 (2014).
59. Yalak, G., Ehrlich, Y. H. & Olsen, B. R. Ecto-protein kinases and phosphatases: an emerging field for translational medicine. *J. Transl. Med.* **12**, 165 (2014).
60. Hood, J. L. & Wickline, S. A. A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **4**, 458–467 (2012).
61. Pisetsky, D. S., Ullal, A. J., Gauley, J. & Ning, T. C. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatol. (United Kingdom)* **51**, 1737–1746 (2012).
62. Sellam, J. *et al.* Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren’s syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R156 (2009).

63. Sabatier, F. *et al.* Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* **51**, 2840–5 (2002).
64. Ye, R., Ye, C., Huang, Y., Liu, L. & Wang, S. Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis. *Thromb. Res.* **130**, 253–8 (2012).
65. Amabile, N., Guérin, A. P., Tedgui, A., Boulanger, C. M. & London, G. M. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol. Dial. Transplant* **27**, 1873–80 (2012).
66. Amabile, N. *et al.* Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur. Heart J.* **35**, 2972–2979 (2014).
67. Huang, P.-H. *et al.* Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J. Hypertens.* **28**, 1655–65 (2010).
68. Aoi, W. & Sakuma, K. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Front. Physiol.* **5**, 39 (2014).
69. Roberts, T. C. *et al.* Extracellular microRNAs are dynamic non-vesicular biomarkers of muscle turnover. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9500–13 (2013).
70. Perez, A. *et al.* A Pilot Study on the Potential of RNA-Associated to Urinary Vesicles as a Suitable Non-Invasive Source for Diagnostic Purposes in Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. **6**, 179–92 (2014).
71. Welton, J. L. *et al.* Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1324–38 (2010).
72. Gámez-Valero, A., Lozano-Ramos, S. I., Bancu, I., Lauzurica-Valdemoros, R. & Borràs, F. E. Urinary Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Kidney Diseases. *Front. Immunol.* **6**, 1–10 (2015).
73. Del Boccio, P. *et al.* A hyphenated microLC-Q-TOF-MS platform for exosomal lipidomics investigations: Application to RCC urinary exosomes. *Electrophoresis* **33**, 689–696 (2012).
74. Andre, F. *et al.* Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. *J. Immunol.* **172**, 2126–2136 (2004).
75. Chaput, N. *et al.* Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. II. Exosomes in CpG Adjuvants Efficiently Prime Naive Tc1 Lymphocytes Leading to Tumor Rejection. *J.*

- Immunol.* **172**, 2137–2146 (2004).
76. Tran, T.-H., Mattheolabakis, G., Aldawsari, H. & Amiji, M. Exosomes as nanocarriers for immunotherapy of cancer and inflammatory diseases. *Clin. Immunol.* **160**, 46–58 (2015).
 77. Hao, S., Bai, O., Yuan, J., Qureshi, M. & Xiang, J. Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8+ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. *Cell Mol Immunol* **3**, 205–211 (2006).
 78. Escudier, B. *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* **3**, 10 (2005).
 79. Morse, M. a *et al.* A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* **3**, 9 (2005).
 80. Kim, S.-H. *et al.* Exosomes Derived from IL-10-Treated Dendritic Cells Can Suppress Inflammation and Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* **174**, 6440–6448 (2005).
 81. Kim, J. W. *et al.* Fas Ligand – Positive Membranous Vesicles Isolated from Sera of Patients with Oral Cancer Induce Apoptosis of Activated T Lymphocytes. 1010–1020 (2005).
 82. De Robertis, E. D. P. & Bennett, H. S. A submicroscopic vesicular component of Schwann cells and nerve satellite cells. *Exp. Cell Res.* **6**, 543–545 (1954).
 83. De Robertis, E. D. & Bennett, H. S. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol* **1**, 47–58 (1955).
 84. Antonucci, F. *et al.* Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J.* **31**, 1231–1240 (2012).
 85. Bakhti, M., Winter, C. & Simons, M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* **286**, 787–96 (2011).
 86. Marzesco, A.-M. *et al.* Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* **118**, 2849–58 (2005).
 87. Court, F. a. *et al.* Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* **59**, 1529–1539 (2011).
 88. Frühbeis, C. *et al.* Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates

- oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* **11**, e1001604 (2013).
89. Lai, C. P.-K. & Breakefield, X. O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front. Physiol.* **3**, 228 (2012).
90. Frühbeis, C., Fröhlich, D. & Krämer-Albers, E.-M. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front. Physiol.* **3**, 119 (2012).
91. Rajendran, L. *et al.* Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. *J. Neurosci.* **34**, 15482–15489 (2014).
92. Doeuvre, L., Plawinski, L., Toti, F. & Anglés-Cano, E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J. Neurochem.* **110**, 457–68 (2009).
93. Morel, N. *et al.* Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury. *J. Trauma* **64**, 698–704 (2008).
94. Huang, M., Hu, Y.-Y. & Dong, X.-Q. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surg. Neurol.* **72**, 481–9; discussion 489 (2009).
95. Street, J. M. *et al.* Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* **10**, 5 (2012).
96. Mobarrez, F. *et al.* Microparticles and microscopic structures in three fractions of fresh cerebrospinal fluid in schizophrenia: case report of twins. *Schizophr. Res.* **143**, 192–7 (2013).
97. Patz, S. *et al.* More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J. Neurotrauma* **30**, 1232–42 (2013).
98. Joshi, P. *et al.* Microglia convert aggregated amyloid- β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ.* **21**, 582–93 (2014).
99. Verderio, C. *et al.* Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann. Neurol.* **72**, 610–24 (2012).
100. Smalheiser, N. R. Do Neural Cells Communicate with Endothelial Cells via Secretory Exosomes and Microvesicles? *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2009**, 383086 (2009).

101. Koutsouraki, E., Costa, V. & Baloyannis, S. Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. *Int. Rev. Psychiatry* **22**, 2–13 (2010).
102. Goodin, D. S. *The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. Handb. Clin. Neurol.* **122**, (Elsevier B.V., 2014).
103. Sadovnick, a D. European Charcot Foundation Lecture: the natural history of multiple sclerosis and gender. *J. Neurol. Sci.* **286**, 1–5 (2009).
104. Tullman, M. J. Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis. *Am. J. Manag. Care* **19**, S15–20 (2013).
105. Kampman, M. T. & Brustad, M. Vitamin D: a candidate for the environmental effect in multiple sclerosis - observations from Norway. *Neuroepidemiology* **30**, 140–146 (2008).
106. Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., Wilson, R. W. & Paty, D. W. Life expectancy in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology* **42**, 991–994 (1992).
107. Sawcer, S. *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214–219 (2011).
108. Beecham, A. H. *et al.* Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **45**, 1353–1360 (2013).
109. Perron, H. *et al.* Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **286**, 65–72 (2009).
110. Arruti, M., Castillo-triviño, T., Egüés, N. & Olascoaga, J. Tabaco y esclerosis múltiple. **60**, 169–178 (2015).
111. Correale, J., Garcea, O., Villa, A., Melamud, L. & Rugilo, C. in *Neuroimmunol. Clínica* (Correale, J., Villa, A. & Garcea, O.) 127–164 (Panamericana, 2011).
112. Challoner, P. B. *et al.* Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7440–7444 (1995).
113. Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. & Weinshenker, B. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **343**, 938–952 (2000).
114. Martino, G. & Hartung, H. P. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr. Opin. Neurol.* **12**, 309–321 (1999).

115. Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B. & Aloisi, F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.* **7**, 852–8 (2008).
116. Comabella, M. & Khoury, S. J. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **142**, 2–8 (2012).
117. Fernandez, O. in *Med. Interna (Bucur)*. (Farreras, P. & Rozman, C.) 1652–1662 (Harcourt, 2002).
118. Gelfand, J. M. *Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. Handb. Clin. Neurol.* **122**, (Elsevier B.V., 2014).
119. Kuhle, J. *et al.* Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult. Scler. J.* **21**, 1013–1024 (2015).
120. Lublin, F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* **83**, 278–286 (2014).
121. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* **69**, 292–302 (2011).
122. Villar, L. M. *et al.* Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J. Clin. Invest.* **115**, 187–194 (2005).
123. Derfuss, T. Personalized medicine in multiple sclerosis: hope or reality? *BMC Med.* **10**, 116 (2012).
124. Teunissen, C. E., Malekzadeh, A., Leurs, C., Bridel, C. & Killestein, J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis-the long road to clinical application. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 585–596 (2015).
125. Roxburgh, R. H. S. R. *et al.* Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* **64**, 1144–1151 (2005).
126. Zwibel, H. L. & Smrtka, J. Improving quality of life in multiple sclerosis: an unmet need. *Am. J. Manag. Care* **17 Suppl 5**, S139–45 (2011).
127. Tullman, M. J. A review of current and emerging therapeutic strategies in multiple sclerosis. *Am. J. Manag. Care* **19**, S21–7 (2013).
128. Cornblath, D. R., Bienen, E. J. & Blight, A. R. The safety profile of dalfampridine extended release in multiple sclerosis clinical trials. *Clin. Ther.* **34**, 1056–69 (2012).

129. Ali, R., Nicholas, R. S. J. & Muraro, P. A. Drugs in development for relapsing multiple sclerosis. *Drugs* **73**, 625–50 (2013).
130. Selewski, D. T., Shah, G. V., Segal, B. M., Rajdev, P. a. & Mukherji, S. K. Natalizumab (Tysabri). *Am. J. Neuroradiol.* **31**, 1588–1590 (2010).
131. Francis, G. *et al.* Temporal profile of lymphocyte counts and relationship with infections with fingolimod therapy. *Mult. Scler.* **20**, 471–80 (2014).
132. Trkov, S. *et al.* Fingolimod-A sphingosine-like molecule inhibits vesicle mobility and secretion in astrocytes. *Glia* **60**, 1406–1416 (2012).
133. Pluchino, S., Furlan, R. & Martino, G. Cell-based remyelinating therapies in multiple sclerosis: evidence from experimental studies. *Curr. Opin. Neurol.* **17**, 247–255 (2004).
134. Bhargava, P. & Calabresi, P. a. Novel therapies for memory cells in autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* n/a–n/a (2015). doi:10.1111/cei.12602
135. Martin, M. del P. *et al.* Decrease in the Numbers of Dendritic Cells and CD4+ T Cells in Cerebral Perivascular Spaces Due to Natalizumab. *Arch Neurol* **65**, 1596–1603 (2008).
136. Dore-Duffy, P. *et al.* Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity. *Ann. Neurol.* **37**, 55–62 (1995).
137. Minagar, A. *et al.* Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium* **10**, 299–307 (2003).
138. Minagar, a *et al.* Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* **56**, 1319–24 (2001).
139. Lacroix, R. *et al.* Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica* **97**, 1864–72 (2012).
140. Sbai, O. *et al.* Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. *Glia* **58**, 344–366 (2010).
141. Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R. & Wewers, M. D. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One* **4**, (2009).

142. Bianco, F. *et al.* Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 Release from Microglia. *J. Immunol.* **174**, 7268–7277 (2005).
143. Jy, W. *et al.* Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front. Biosci.* **9**, 3137–3144 (2004).
144. Barry, O. P., Praticò, D., Savani, R. C. & Fitzgerald, G. a. Modulation of Monocyte – Endothelial Cell Interactions by Platelet Microparticles. *J. Clin. Invest.* **102**, 136–144 (1998).
145. Jimenez, J. *et al.* Elevated endothelial microparticle-monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of interferon-beta 1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte-endothelial micropar. *Mult. Scler.* **11**, 310–5 (2005).
146. Sheremata, W. a *et al.* Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* **5**, 27 (2008).
147. Gatson, N. N. *et al.* Induction of pregnancy during established EAE halts progression of CNS autoimmune injury via pregnancy-specific serum factors ☆. *J. Neuroimmunol.* **230**, 105–113 (2011).
148. Williams, J. L. *et al.* Serum exosomes in pregnancy-associated immune modulation and neuroprotection during CNS autoimmunity. *Clin. Immunol.* **149**, 236–43 (2013).
149. Larkin, M. Raised endothelial microparticles an early marker for multiple sclerosis? *Lancet* **357**, 1679 (2001).
150. Calabresi, P. A. *et al.* Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann. Neurol.* **41**, 669–674 (1997).
151. Dhib-Jalbut, S., Jiang, H. & Williams, G. J. The effect of interferon beta-1b on lymphocyte-endothelial cell adhesion. *J. Neuroimmunol.* **71**, 215–222 (1996).
152. Sheremata, W. a *et al.* Interferon-beta1a reduces plasma CD31+ endothelial microparticles (CD31+EMP) in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* **3**, 23 (2006).
153. Lowery-Nordberg, M. *et al.* The effects of high dose interferon-β1a on plasma microparticles: correlation with MRI parameters. *J. Neuroinflammation* **8**, 43 (2011).
154. Chun, J. & Hartung, H.-P. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. *Clin Neuropharmacol* **33**, 91–101 (2010).

155. Bianco, F. *et al.* Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* **28**, 1043–54 (2009).
156. Dawson, G. & Qin, J. Gilenya (FTY720) inhibits acid sphingomyelinase by a mechanism similar to tricyclic antidepressants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 321–323 (2011).
157. Kosaka, N. *et al.* Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy. ‘Exocure’ is another choice for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 376–382 (2013).
158. Pusic, A. D. & Kraig, R. P. Youth and environmental enrichment generate serum exosomes containing miR-219 that promote CNS myelination. *Glia* **62**, 284–99 (2014).
159. Belogurov, A. a. *et al.* Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis. *FASEB J.* **27**, 222–231 (2013).
160. Cappellano, G. *et al.* Subcutaneous inverse vaccination with PLGA particles loaded with a MOG peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. **32**, 5681–5689 (2014).
161. Führmann, T. *et al.* Peptide-functionalized polymeric nanoparticles for active targeting of damaged tissue in animals with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci. Lett.* **602**, 126–132 (2015).
162. Ashcroft, B. a *et al.* Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomed. Microdevices* **14**, 641–9 (2012).
163. Jayachandran, M., Miller, V. M., Heit, J. a & Owen, W. G. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J. Immunol. Methods* **375**, 207–14 (2012).
164. Dey-Hazra, E. *et al.* Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.* **6**, 1125–33 (2010).
165. Dignat-George, F., Sabatier, F., Camoin-Jau, L. & Sampol, J. Numeration of circulating microparticles of various cellular origin by flow cytometry. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 1844–1846 (2004).
166. Andreola, G. *et al.* Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* **195**, 1303–1316 (2002).
167. Dutta, R. & Trapp, B. D. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple

- sclerosis. *Prog. Neurobiol.* **93**, 1–12 (2011).
168. Planas, R., Jelčić, I., Schippling, S., Martin, R. & Sospedra, M. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **42**, 790–8 (2012).
169. Irizar, H. *et al.* HLA-DRB1*15:01 and multiple sclerosis: a female association? *Mult. Scler.* **18**, 569–77 (2012).
170. Madden, L. A. *et al.* Microparticle-associated vascular adhesion molecule-1 and tissue factor follow a circadian rhythm in healthy human subjects. *Thromb. Haemost.* **99**, 909–915 (2008).
171. Bastos-Amador, P. *et al.* Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *J. Proteomics* **75**, 3574–84 (2012).
172. Brownlee, Z., Lynn, K. D., Thorpe, P. E. & Schroit, A. J. A novel ‘salting-out’ procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J. Immunol. Methods* **407**, 120–6 (2014).
173. Théry, C., Clayton, A., Amigorena, S. & Raposo, G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 1–29 (2006).
174. van der Pol, E. *et al.* Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1182–92 (2014).
175. van Ierssel, S. H. *et al.* Endothelial microparticles (EMP) for the assessment of endothelial function: an in vitro and in vivo study on possible interference of plasma lipids. *PLoS One* **7**, e31496 (2012).
176. Taylor, D. D., Zacharias, W. & Gercel-taylor, C. Exosome Isolation for Proteomic Analyses and RNA Profiling. *Methods Mol. Biol.* **728**, 235–246 (2011).
177. Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T. & Ishiguro, N. Comparison of Methods for Isolating Exosomes from Bovine Milk. *J. Vet. Med. Sci.* **74**, 1523–1525 (2012).
178. Jy, W., Horstman, L. L. & Ahn, Y. S. Microparticle size and its relation to composition, functional activity, and clinical significance. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 876–80 (2010).
179. Alvarez, M. L., Khosroheidari, M., Kanchi Ravi, R. & DiStefano, J. K. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* **82**, 1024–1032 (2012).

180. Alvarez, M. L. in *Methods Mol. Biol. RNA Mapp. SE - 13* (Alvarez, M. L. & Nourbakhsh, M.) **1182**, 145–170 (Springer New York, 2014).
181. Fox, S. C., May, J. A. & Heptinstall, S. [P-S-526] Measurement of endothelial microparticles in blood is impaired if chylomicrons are present after a fatty meal. *J. Thromb. Haemost.* **5**, (2007).
182. Webber, J. & Clayton, A. How pure are your vesicles? *J. Extracell. vesicles* **2**, 1–6 (2013).
183. Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G. & Théry, C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. vesicles* **1**, 1–11 (2012).
184. Tauro, B. J. *et al.* Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 587–98 (2013).
185. Hara, M. *et al.* Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli. *Hum. Pathol.* **41**, 1265–75 (2010).
186. Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M. a. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13368–73 (2004).
187. Gonzales, P. a *et al.* Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 363–79 (2009).
188. Berckmans, R. J., Sturk, A., Tienen, L. M. van, Schaap, M. C. L. & Nieuwland, R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* **117**, 3172–3181 (2011).
189. Dimuccio, V. *et al.* Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One* **9**, e104490 (2014).
190. Jorgensen, M. *et al.* Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J. Extracell. vesicles* **1**, 1–9 (2013).
191. Gan, X. & Gould, S. J. Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins. *Mol. Biol. Cell* **22**, 817–30 (2011).
192. Hill, A. F. *et al.* ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. *J. Extracell. vesicles* **1**, 1–8 (2013).

193. van der Pol, E., Böing, A. & Harrison, P. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* **64**, 676–705 (2012).
194. Ghiran, I. & Kuo, W. Guest editorial-Examining the role of microvesicles to develop prognostic and diagnostic assays. *J. Appl. Oral Sci.* (2010). at <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-77572010000500001&script=sci_arttext>
195. Katsuda, T., Kosaka, N. & Ochiya, T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics* **14**, 412–25 (2014).
196. Deun, J. Van *et al.* The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. vesicles* **1**, 1–14 (2014).
197. Graner, M. W. *et al.* Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J.* **23**, 1541–1557 (2009).
198. Chiasserini, D. *et al.* Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: A comprehensive dataset. *J. Proteomics* **106**, 191–204 (2014).
199. Kallaur, A. *et al.* Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol. Med. Rep.* **7**, 1010–1020 (2013).
200. Petereit, H. F. *et al.* Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **206**, 209–214 (2003).
201. Heesen, C., Sieverding, F., Schoser, B., Hadji, B. & Kunze, K. Interleukin-12 is detectable in sera of patients with multiple sclerosis - association with chronic progressive disease course? *Eur J Neurol.* **6**, 591–596 (1999).
202. Liechtenstein, T. *et al.* A highly efficient tumor-infiltrating MDSC differentiation system for discovery of anti-neoplastic targets, which circumvents the need for tumor establishment in mice. *Oncotarget* **5**, 7843–57 (2014).
203. Unwin, R. D., Griffiths, J. R. & Whetton, A. D. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. *Nat. Protoc.* **5**, 1574–82 (2010).
204. Shilov, I. V *et al.* The Paragon Algorithm , a Next Generation Search Engine That Uses Sequence Temperature Values and Feature Probabilities to Identify Peptides from Tandem Mass Spectra * □. 1638–1655 (2007). doi:10.1074/mcp.T600050-MCP200

205. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. & Simpson, R. J. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1241–4 (2012).
206. Kalra, H. *et al.* Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* **10**, e1001450 (2012).
207. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
208. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–78 (2012).
209. Noubade, R. *et al.* von-Willebrand factor influences blood brain barrier permeability and brain inflammation in experimental allergic encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* **173**, 892–900 (2008).
210. Cole, K. E. *et al.* Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.* **187**, 2009–2021 (1998).
211. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 861–874 (2011).
212. Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M. & Cross, M. J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* **19**, 2003–12 (2007).
213. Li, W. *et al.* MiR-568 inhibits the activation and function of CD4⁺ T cells and Treg cells by targeting NFAT5. *Int. Immunol.* **26**, 269–81 (2014).
214. Momen-Heravi, F., Bala, S., Bukong, T. & Szabo, G. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 1517–1527 (2014).
215. Irizarry, R. a *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
216. Hsu, S. Da *et al.* MiRTarBase update 2014: An information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **42**, 78–85 (2014).
217. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463–8471 (1998).

218. Sáenz-Cuesta, M. *et al.* Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark. Med.* **8**, 653–661 (2014).
219. Sáenz-Cuesta, M. *et al.* Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
220. Oliver-Martos, B. *et al.* Gene expression changes immediately after interferon beta administration in multiple sclerosis patients according to therapeutic response. *Mult. Scler.* **19:(SI)**, 501 (2013).
221. Yu, L. *et al.* Exosomes with membrane-associated TGF- β 1 from gene-modified dendritic cells inhibit murine EAE independently of MHC restriction. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2461–72 (2013).
222. Rodriguez, A. *et al.* Requirement of bic/miRNA-155 for Normal Immune Function. *Science (80-.).* **316**, 608–612 (2007).
223. García Bacca, J. D. *De magia a técnica: ensayo de teatro filosófico-literario-técnico.* (Anthropos, 1989).
224. Frühbeis, C., Helmig, S., Tug, S., Simon, P. & Krämer-Albers, E.-M. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J. Extracell. Vesicles* **4**, (2015).
225. Lamparski, H. G. *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **270**, 211–226 (2002).
226. De La Peña, H. *et al.* Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology. *J. Immunol. Methods* **344**, 121–132 (2009).
227. Aiastui, A. Should Cell Culture Platforms move towards EV therapy requirements? *Front. Immunol.* **6**, (2015).

ANEXOS

ANEXO 1

Cuestionario

Fecha de nacimiento: / /

Sexo: femenino / masculino

Ayuno: si / no

Horas dormidas anoche (aprox): hs

¿Toma alguna medicación? ¿Cuál?

¿Toma anticonceptivos orales?

Fecha de última regla: / /

¿Está en este momento pasando alguna infección o proceso agudo?

¿Acaba de hacer algún ejercicio brusco (correr, subir escaleras muy rápido, etc) en la última hora previa a la extracción?

Hora de recolección de orina:

Indicaciones para recolección de orina

- Lávese las manos.
- Quite la tapa amarilla del frasco. No quite el adhesivo de la tapa. Evitar que la cánula de la tapa toque cualquier objeto/mano/etc.
- Mujer: Lávese los genitales externos y zonas próximas con agua y jabón y séquese de delante a atrás con una gasa o paño limpio. Varón: retraer el prepucio y limpiar el glande con agua y jabón.
- **Comience a orinar en el water** (de cara a la cisterna de éste) desechando el primer chorro de orina (durante aprox 3 a 4 segundos).
- **A continuación, orine en el frasco intentando recolectar el máximo posible** (se requiere un mínimo de 60ml, algo más de la mitad del frasco). Cierre el frasco con la tapa y anote en el cuestionario la hora de recolección.

ANEXO 2

Estudio de MPs en pacientes tratados con fingolimod (Gilenya®)

INTRODUCCION

Las **micropartículas** (MPs) son pequeños mensajeros que utilizan las células para comunicarse entre ellas, de tamaño menor de 1 μm . Pueden contener en su interior fragmentos de material genético (ARN y ADN) y en su superficie señales que indican de qué célula provienen.

En diversas enfermedades se encuentran variaciones en el número de dichas MPs según el estadio clínico en que se encuentre el paciente, el tipo de tratamiento que utilice, etc. En particular en la **esclerosis múltiple**, se produce inflamación en distintas zonas del sistema nervioso, ocasionando daño del endotelio de la barrera hemato-encefálica provocando la estimulación de este endotelio y liberación de micropartículas.

PROYECTO DE INVESTIGACION

El **objetivo** de este estudio es evaluar el posible papel que desempeñan las MPs como indicadores de predicción, pronóstico, evolución y respuesta a tratamiento de la esclerosis múltiple.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Pacientes visitados en la UEM HUD/IISB tratados con fingolimod que hayan firmado el consentimiento informado correspondiente.

CALENDARIO DE VISITAS:

Cada día de consulta de la UEM (martes y jueves) se citará un paciente a la primera hora. Se procederá a explicar la información necesaria para luego solicitar la firma del consentimiento por escrito.

Actualmente, a marzo del 2013, hay 10 posibles candidatos a entrar en el estudio, que son pacientes de esclerosis múltiple tratados con Fingolimod. Se prevé la entrada de nuevos pacientes candidatos a ser tratados con Fingolimod a un ritmo de 1 por mes.

La **periodicidad de visitas** para cada paciente será de **un mes**, completando 7 visitas en total. Para los pacientes naïve de tratamiento con Fingolimod se extraerán en la primera visita las muestras iniciales, previo al comienzo del tratamiento (tiempo 0) y las 6 restantes (tiempos 1 al 6) en los sucesivos meses. A los pacientes que ya hayan comenzado el tratamiento con fingolimod antes que el inicio de este estudio, se procederá a extraer 7 muestras (1 por cada visita), careciendo de la muestra a tiempo 0.

Esquema de visitas/extracciones:

Pacientes que comienzan con fingolimod:



Pacientes que ya comenzaron con fingolimod:



MUESTRAS:

En cada visita, luego de la entrega del consentimiento informado firmado, se le extraerá sangre al paciente de la siguiente manera:

| Pacientes | muestra | tubos | procesado por |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|---------------|
| Fingolimod (Gilenya) | RNA - DNA - plasma | 2 EDTA (4ml) | BIOBANCO |
| | PBMC | 4 heparina (4 ml c/u) | UEM |
| | Suero | 1 suero (4 ml) | |
| | MP | 1 citrato (3 ml) | |

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN

La extracción se debe realizar entre las 8 h. y las 11 h. de la mañana.

Venopunción: con aguja calibre 21, en vena antecubital luego de colocar un torniquete suave. El orden de extracción es el que indica la tabla anterior, comenzando por el tubo EDTA, siguiendo por los tubos de heparina, etc.

Tubo de recogida: se utilizarán los tubos que indica la tabla. Nota: el tubo de citrato es el comúnmente denominado “coagulación” (tapón azul). Luego de extraídos deben ser agitados suavemente 2 o 3 veces.

Transporte a Biodonostia: **No podrá pasar más de 1 hora** desde la extracción. Se mantendrá en todo momento a temperatura ambiente (20-24 °C). Personal del laboratorio de la UEM de Biodonostia será el encargado de recoger cada martes y jueves las muestras para luego ser procesadas en el laboratorio.

IMPORTANTE: Se debe evitar agitación del tubo, y debe realizarse dentro de una caja que disponga los tubos en forma vertical.

Para cualquier consulta llamar al: **943006250** (Biodonostia)

Matías Sáenz Cuesta

Unidad de Esclerosis Múltiple

Instituto de Investigación Biodonostia

ANEXO 3

Artículos publicados en relación a esta tesis.

Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis

Aim: To evaluate whether circulating microparticles (MPs) derived from three cell subtypes (platelets, total leukocytes or monocytes) obtained from multiple sclerosis (MS) patients were modulated depending on the clinical status and to investigate the effect of treatments on MP levels. **Patients & methods:** The MP counts were assessed with flow cytometry. **Results:** The platelet-derived MP level was higher in untreated MS patients than controls. Relapsing–remitting patients showed the highest levels in the three subtypes of MP while secondary progressive patients presented similar levels to those of healthy controls. Treatments had significant effects increasing the three subtypes of MP counts. **Conclusion:** We suggest that MPs play a role in MS pathogenesis, reflecting disease status with an increment of their shedding during inflammatory periods and turning to baseline during chronic progressive degeneration.

Keywords: extracellular vesicles • microparticles • multiple sclerosis • secondary progressive • treatment

Microparticles (MPs) are vesicles produced by budding at the cell membrane followed by fission on the connecting membrane stalks [1]. They are shed during cell stimulation, stress or activation, apparently playing a role in extracellular communication with no direct contact. Characteristically, MP are smaller than 1 μm and carry membrane markers from the source cell. They have also been shown to contain genetic material, such as mRNA and miRNA, which produces genotypic modifications in the target cell [2]. Among others, the known functions of MP include: antigen presentation to T cells, cellular activation/inhibition/differentiation, apoptosis induction, monocytes differentiation and promotion of regulatory activity of CD4⁺ cells [3].

Numerous types of MP have been described, each one characterized by cell lineage markers, the most widely studied being those obtained from peripheral blood such as platelet-, endothelial-, leukocyte-, erythrocyte- and monocyte-derived MP.

Other studies focusing on the CNS with the aim of finding markers that might reflect CNS status, have described MP derived from neural stem cells, neurons, astrocytes, microglia and oligodendrocytes [4]. MP levels have been related to some autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Sjögren's Syndrome, being the correlation between elevated counts and disease activity [5,6]. Thus, in recent years, the study of MP has progressed considerably with the final goal, in most cases, being to obtain new biomarkers for monitoring the disease under study and go in depth the knowledge on its pathophysiology.

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the CNS whose pathogenesis involves the interaction of genetic predisposition, environmental triggers and an imbalanced immune system, causing demyelinating lesions in the brain and the spinal cord. It affects 2 million people worldwide, with increased susceptibility in women.

Biomarkers in Medicine



Matías Sáenz-Cuesta^{1,2},
Haritz Irizar^{1,2},
Tamara Castillo-Triviño^{1,2,3},
Maider Muñoz-Culla^{1,2},
Iñaki Osorio-Querejeta^{1,2},
Alvaro Prada^{1,2},
Lucía Sepúlveda^{1,2},
María P López-Mato⁴,
Adolfo López de Munain^{3,5,6,7},
Manuel Comabella^{2,8},
Luisa M Villar^{2,9},
Javier Olascoaga^{2,3,7}
& David Otaegui^{*1,2}

¹Multiple Sclerosis Unit, Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain

²Spanish Network on Multiple Sclerosis
³Department of Neurology, Donostia University Hospital, San Sebastián, Spain

⁴Cytometry & Microscopy Platform, Inbiomed Foundation, San Sebastián, Spain

⁵CIBERNED, Carlos III Health Institute, Ministry of Science & Innovation, Madrid, Spain

⁶Department of Neurosciences, University of the Basque Country, San Sebastián, Spain

⁷Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain

⁸Department of Neurology-Neuroimmunology, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Cemcat, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁹Multiple Sclerosis Unit, Department of Immunology, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain

*Author for correspondence:
Tel.: +34 943 006 012 ext. 6293
Fax: +34 943 006 250
david.otaegui@biodonostia.org

Future
Medicine  part of 

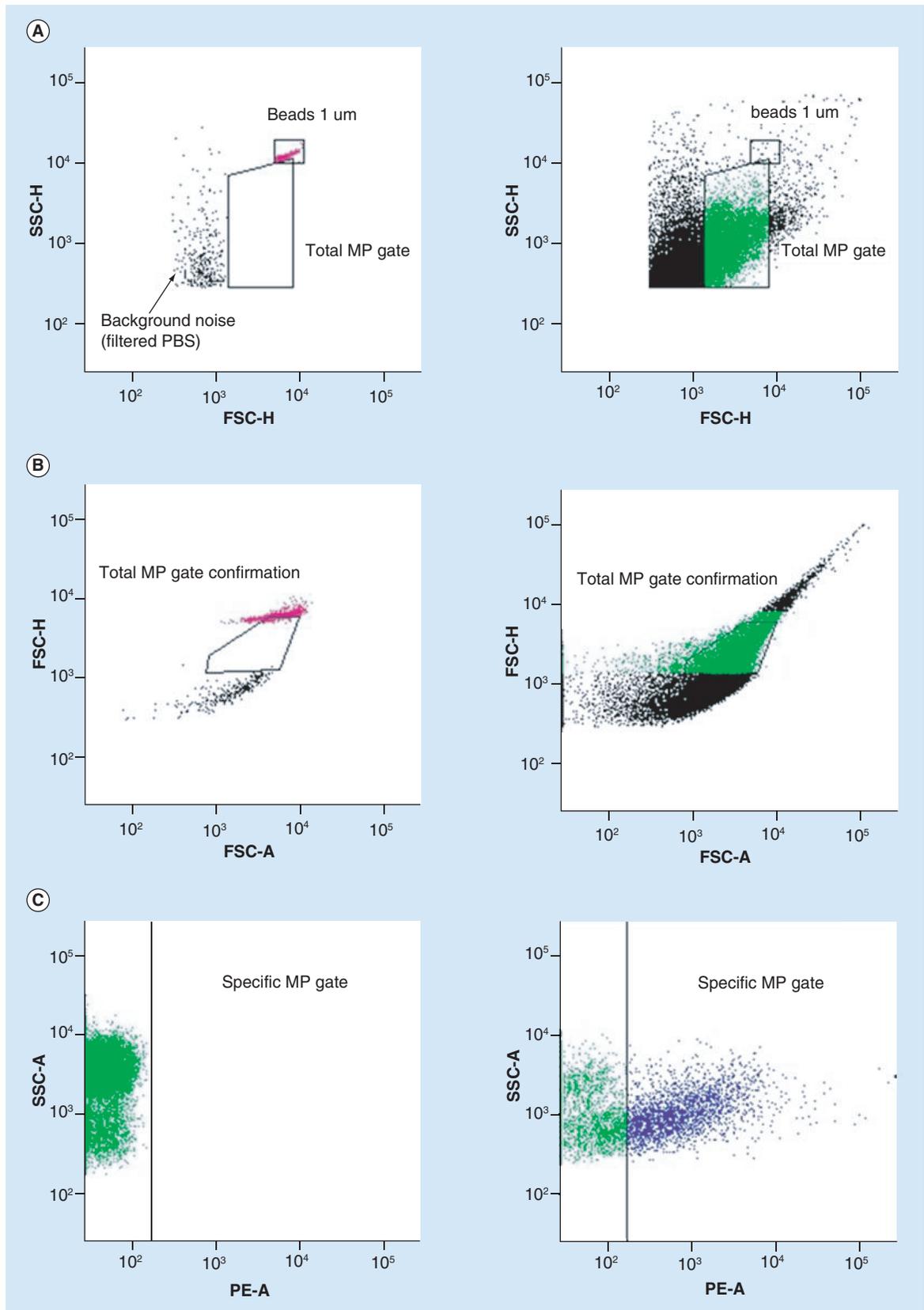


Figure 1. Gating strategy. Left dot plots: (A) 1- μ m beads dot plot and PBS background noise are used as upper and lower limits for the total MP gate respectively. (B) A confirmation gate was applied using a FSC-H and FSC-A dot plot in which MP appear along the diagonal separated from the background noise; the upper limits are from the same 1- μ m beads as in (A). (C) Green dots represent MP labeled with IgG isotype control used to visualize the PE marker identifying cellular origin-specific MP. Right dot plots: the same gating strategy applied to an MP sample. (A & B) Green dots represent MP included in the total MP gate. (C) Blue dots represent cellular origin-specific MP (i.e., CD61⁺, CD45⁺ or CD14⁺).

Please see color figures online at www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/bmm.14.9.

MP: Microparticle.

Currently the female:male ratio is 2.6:1. Sex differences have been observed in immune responses, as well as treatment outcome [7]. MS is clinically heterogeneous, but the most common clinical course being the relapsing–remitting MS (RRMS) characterised by episodes of acute worsening of symptoms followed by periods of remission. The secondary progressive (SPMS) form is less frequent and it is characterized by a chronic axonal degeneration leading gradually to disability with or without superimposed relapses. A clinical tool to monitorized progression of MS is the MS Severity Scale (MSSS) which is an algorithm that relates Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) and disease duration [8]. At present, there are several biomarkers to support diagnosis and monitor the disease including MRI features, oligoclonal bands and functional markers, such as evoked potentials.

In an attempt to better understand immunological pathways implicated in MS, researchers have been investigating MP in this disease. Studies have focused on comparing the MP counts in both remission and relapse as well as its relationship with IFN- β treatment [9,10]. Moreover, increases in platelet-derived MP (PMP) [11] and endothelial-derived MP [12] have been observed during relapses. A recent work suggested microglia-derived MP obtained from cerebrospinal liquid (CSF) as a possible biomarker for MS [4]. These reports illustrate the potential usefulness of MP as biomarkers that can be, in some cases, easily and rapidly measured. However, to our knowledge, there have been no studies of MP in patients receiving natalizumab or including patients in the SPMS phase.

In the absence of specific cell-origin MP marker for MS we decided to investigate MP derived from three cell types that are clearly involved in MS pathology (platelets, total leukocytes and monocytes) in peripheral blood obtained from MS patients in different phases including SPMS forms, RRMS patients treated with natalizumab or IFN- β , untreated MS patients and healthy controls. Leukocytes, monocytes and platelets are active linked players during the initiation and perpetuation of inflammation. To note, this work is focused on peripheral blood samples according to our main objective being to find markers of the disease obtained in a more easily way than CSF. In

addition, blood circulating MP could not be present in CSF and *vice versa*, hence we focus in those blood-derived MP related to MS pathology, some of them not explored until now.

Patients & methods

Patients & samples collection

We tested 97 samples from 20 healthy controls (HC) and 77 MS patients fulfilling the McDonald diagnostic criteria, recruited at the Multiple Sclerosis Unit of Donostia University Hospital. The MS group comprised 13 SPMS patients, 64 RRMS patients divided in 20 treated with natalizumab (NTZ) and 20 treated with IFN- β 1a or 1b and 24 untreated (UNT). All MS patients were in clinical remission at the time of the study. All subjects gave written informed consent.

All blood samples were processed within the first hour after collection. Briefly, 4-ml samples of peripheral blood were collected by venipuncture in a citrate tube (Becton Dickinson [BD], Belgium) and centrifuged twice at 2500 g for 15 min, recovering the supernatant to obtain platelet-free plasma (PFP). PFP was stored at -80 °C in 500- μ l aliquots until used.

When required, aliquots were thawed on ice and 1 ml was processed for each individual. To pellet MP, the PFP aliquots were centrifuged at 20,000 g for 20 minutes and 900 μ l of the supernatant were discarded. Then, pelleted MP were resuspended with 100 μ l of PBS (GIBCO, Life Technology, Paisley, UK) filtered twice through a 0.22- μ m filter.

The study was approved by the hospital Ethics Committee.

Flow cytometry

PE-labelled CD61 clone PM6/13, CD14 clone 47-3D6 (Cytgonos, Salamanca, Spain) and CD45 clone HI30 (BD) were used in the analysis. All mAb were titrated and spun before being used to precipitate aggregates. A volume of 40 μ l of resuspended MP was mixed in a microcentrifuge tube with 4 μ l of the corresponding mAb and incubated for 20 minutes at room temperature. Next, labelled MP were washed once with 300 μ l of filtered PBS, resuspended in further 300 μ l of filtered PBS and acquired at a low rate in a FACS Canto II flow cytometer (BD). Cytometer performance was checked using CST beads (BD).

Table 1. Characteristics of healthy controls and multiple sclerosis patients.

| Characteristics | Healthy controls (n = 20) | MS patients | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------|-------------------------|--------------------------------------|
| | | Relapsing–remitting | | | Secondary progressive (n = 13) |
| | | Untreated (n = 24) | IFN-β (n = 20) | Natalizumab (n = 20) | |
| Age (years) | 37.1 ± 12.7 | 44.1 ± 11.79 | 43.8 ± 13.4 | 42.8 ± 9.1 | 56.7 ± 14.2 |
| Sex (male/female) | 9/11 | 6/18 | 10/10 | 9/11 | 3/10 |
| Expanded Disability Status Scale | – | 1.3 ± 1.5 | 2.5 ± 1.7 | 4.1 ± 1.8 | 7.0 ± 0.7 |
| Disease duration (years) | – | 13.1 ± 9.9 | 10.8 ± 7.7 | 14.2 ± 7.9 | 24.3 ± 10.5 |
| Multiple Sclerosis Severity Scale | – | 1.5 ± 1.9 | 3.4 ± 2.2 | 4.3 ± 2.7 | 7.6 ± 1.2 |

Values are expressed as mean ± standard deviation.
MS: Multiple sclerosis.

Gating strategy

Side and forward scatter were measured on a logarithmic scale with the threshold set at 300 for each parameter, to avoid instrument noise. Then, the lower limit was defined with the exclusion of background noise given by the signal of PBS filtered twice (Figure 1A). To define the upper limit of the total MP gate, 1-µm non-labelled polystyrene latex beads were used (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Only events included within this region were further analyzed for specific labeling. The MP region was verified using megamix™ beads (BioCytex, Marseille, France) as previously described [13], and also checked using a FSC-H versus FSC-A dot plot, in which the MP region appears along the diagonal separated from the background noise below (Figure 1B).

Then, we used MP labelled with IgG isotype control (BD) as a negative control to set the PE marker (Figure 1C). All events included in the total MP region and positive for PE were defined as cellular origin-specific MP. Depending on their parental cell, we defined specific cellular lineage MP as follows: CD61+ PMP; CD45+ leucocyte-derived MP (LMP) and CD14+ monocyte-derived MP (MMP).

The cellular origin-specific MP counts were obtained using Trucount™ tubes (BD) according to the following formula:

$$\frac{\text{Events in MP gate}}{\text{Events in Trucount bead gate}} \times \frac{\text{Number of beads per tube}}{\text{Test volume}} = \text{absolute MP count} / \mu\text{l of PFP}$$

When 4000 events had been acquired in the Trucount gate, acquisition was stopped. The test volume was 40 µl multiplied by the corresponding dilution factor, while the number of beads was taken from the data sheet. Verification of the accuracy of Trucount tubes was assessed by comparing a lymphocyte subset

counts obtained with Trucount tubes with the results from a digital cell counter (Beckman Coulter, FL, USA; data not shown).

Statistic analysis

Statistical analysis was performed with PASW Statistics v18.0 (SPSS inc.) and with STATA v11.0 (Stata-Corp, College Station, TX). Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests were used to check normally distribution and the values were normalized using natural logarithmic transformation. T-tests and between-groups ANOVA (analysis of variance) plus a Bonferroni correction were applied to assess differences between the groups.

After that, we performed regression analyses to explore the relationship between different clinical status as a categorical predictor and MP. We also did multivariate analyses correcting for gender and when appropriate, for the MSSS. Beta coefficient (β) is expressed as anti-logarithm to base *e*. Significant differences were considered when *p* < 0.05.

Results

Study population

IFN-β group, which include IFN-β 1a- and 1b-treated patients was analyzed as a whole group due to the similar clinical characteristics between subgroups. Regarding to NTZ patients, the media doses intake was 22 ± 14. As expected, the SPMS group had the highest MDSS scores (7.6 ± 1.2) as a result of the longer time since MS onset in these patients, followed by NTZ patients (4.3 ± 2.7) which is also expected given that it is a second line therapy in Spain, IFN-β patients with a mean MSSS of 3.4 ± 2.2 and finally UNT with 1.5 ± 1.9. Table 1 describes the general characteristics of patients and controls included in the study.

MP differences between untreated MS patient & healthy controls

The first step was to explore whether MS could affect MP levels, avoiding the possible modulation that therapy or long-term progression could exert. We found that CD61⁺ PMP count was 2.2-times significantly higher in UNT (mean: 1262 MP/μl) than in HC (mean: 566 MP/μl; p=0.002) (Figure 2). CD45⁺ LMP and CD14⁺ MMP did not show differences. This effect was maintained in the regression analysis when correcting by gender.

MP differences based on clinical MS status

Our next objective was to evaluate whether the different status of MS had their reflection on MP levels. RRMS presented significantly higher counts of the three types of MP compared with both HC and SPMS groups. In the other hand, similar levels of CD61⁺ PMP (β = 1.5; p = 0.139) and CD45⁺ LMP (β = 0.8; p=0.409) in SPMS patients and HC groups were found (Figure 3). Results for RRMS versus HC were: CD61⁺ PMP β = 2.9; p < 0.001; CD45⁺ LMP β = 2.1; p = 0.001 and CD14⁺ MMP β = 1.5; p = 0.031.

Results for RRMS versus SPMS were: CD61⁺ PMP β = 0.5; p = 0.002; CD45⁺ LMP β = 0.4; p < 0.001, and CD14⁺ MMP β=0.3; p<0.001.

Interestingly, the rank of the number of the origin-specific MP was maintained in the three MS groups, being CD61⁺ PMP the most numerous, followed by CD45⁺ LMP and CD14⁺ MMP.

The same analysis was performed adjusting again by gender and MSSS. Gender did not affect the results. The SPMS group showed co-linearity, as expected, with the MSSS variable, but for the rest of the comparisons showed no effect on the differences.

Finally, any of the three different specific-origin MP counts showed relation to age (data not shown).

MS therapy effect on MP levels

The regression analysis was made comparing IFN-β and NTZ groups and having the UNT as reference. Both treatments showed higher levels for the three subtypes of MP comparing to UNT. Results for IFN-β were: CD61⁺ PMP β = 1.7; p = 0.021; CD45⁺ LMP β = 2.6; p < 0.001 and CD14⁺ MMP β = 2.1; p = 0.001. Results for NTZ: CD61⁺ PMP

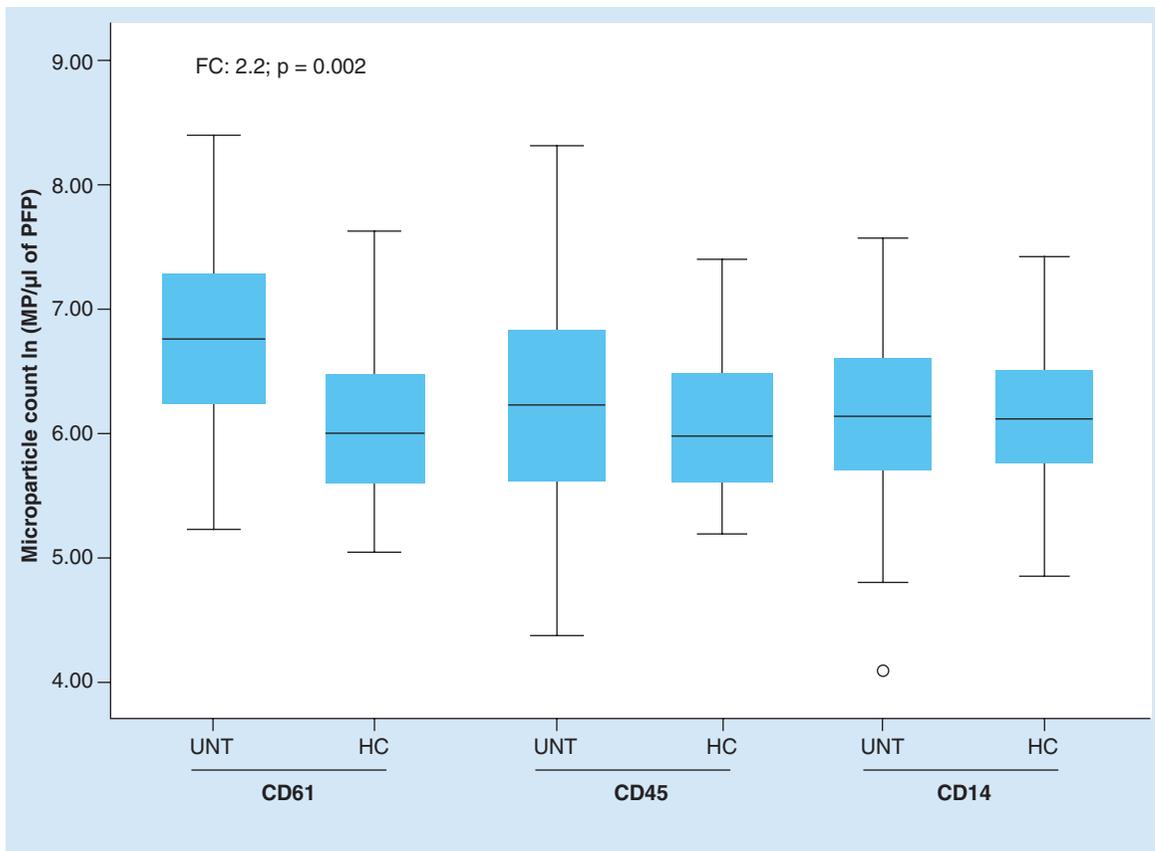


Figure 2. Microparticle differences between untreated multiple sclerosis patient and healthy controls. A possible effect of multiple sclerosis disease on microparticle levels avoiding modulation of natural progression or therapy is proposed. HC: Healthy control; FC: Fold change; MP: Microparticle; UNT: Untreated.

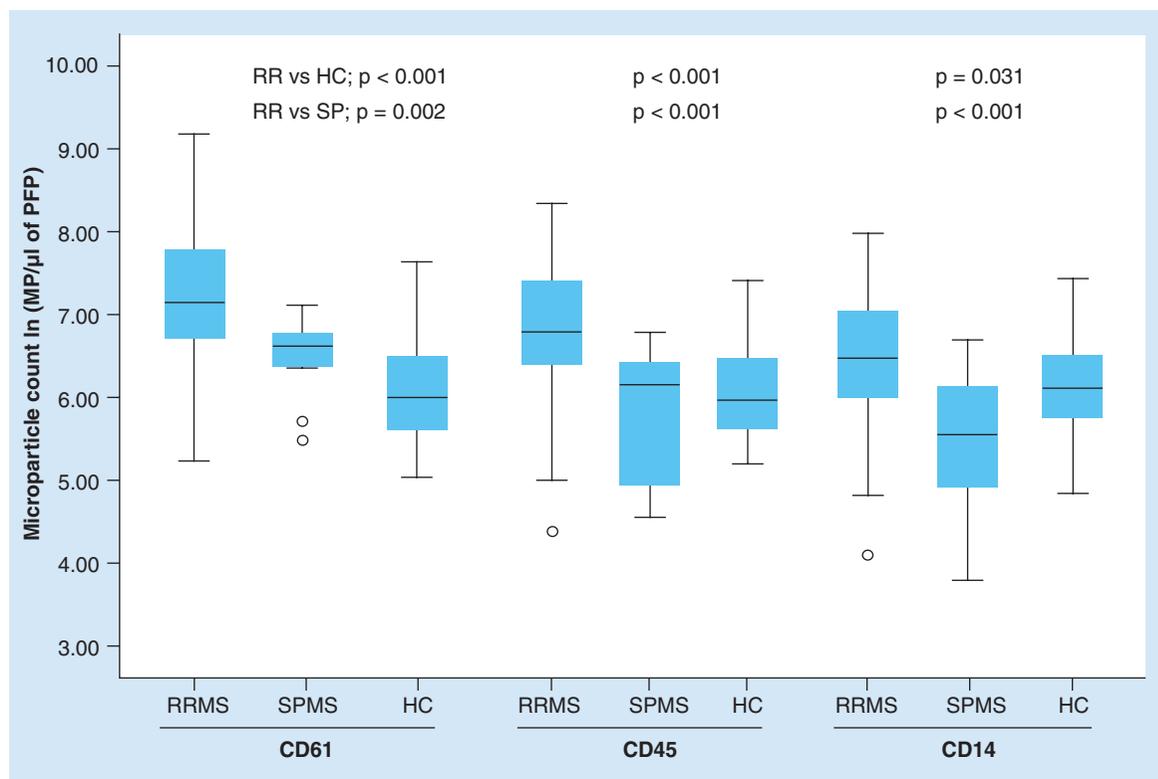


Figure 3. Microparticle differences based on clinical multiple sclerosis status. Microparticle levels of three subtypes (CD61⁺ PMP; CD45⁺ LMP and CD14⁺ MMP) were analyzed in RRMS patients, which includes treated and untreated patients, SPMS patients and HC.

HC: Healthy control; MS: Multiple sclerosis; RR: Relapsing–remitting; SP: Secondary progressive.

$\beta = 1.9$; $p = 0.005$; CD45⁺ LMP $\beta = 2.4$; $p < 0.001$, and CD14⁺ MMP $\beta = 1.7$; $p = 0.014$. No statistical significant was found when comparing both treatments between them (Figure 4). Besides this, when we performed multivariate analysis adjusting by gender and MSSS, the results were unaffected, showing that these differences are independent from the grade of disability and disease duration as well as gender.

Discussion

We found a 2.2-fold increment in CD61⁺ PMP count in UNT comparing to HC. Taking into account that they are treatment-naïve patients with a low mean MSSS (1.5 ± 1.9) and reduced disease activity due to a low relapse rate (data not shown), increased CD61⁺ PMP may suggest that MP levels are affected by the early pathophysiological events of the disease. On the other hand, CD45⁺ LMP and CD14⁺ LMP did not show differences, presumably not being influenced by initial development of MS or reflected in peripheral blood. The relationship between the number of PMP and inflammatory conditions is well established, having been widely reported in cardiovascular diseases where the endothelium plays a major role and also in autoimmune diseases where cell activation perpetuates immune system-mediated damage [3,5]. Several

functions have been described for PMP, such as promoting recruitment of monocytes [14], regulating proteolytic activity in endothelial cells [15] and inducing apoptosis [16,17]. Specifically, in patients with MS platelet activation may be a response to endothelial damage, with the consequent release of PMP. In a recently published work, analyzing a distinct subtype of platelet-derived MP (CD41⁺) that we did, a twofold increment in counts has been found in MS patients compared with controls [11]. This result is consistent to our data.

RRMS patients are characterized by an active inflammatory disease, peaking during relapses and declining on remitting periods. Conversely, SPMS patients turn to a degenerative progression while the inflammatory activity decreases gradually [18]. To our knowledge, we are the first group who investigated MP from SPMS patients and also leukocyte-derived MP in MS patient among others subtypes. We found that SPMS patients present similar PMP and LMP counts and even a lower MMP count of those showed by the HC group (Figure 4). On the other hand, the RRMS group presented the highest levels for the three types of MP compared with both HC and SPMS. Hence, we could postulate that MP might reflect the clinical MS status or activity dis-

ease showing an increase during relapsing–remitting periods and returning to basal levels, similar to HC, at the secondary-progressive phase. In line with these observations, Verderio *et al.* found similar values of microglia-derived MP in HC compared with primary progressive patients [4]. These results enhance the running hypothesis that MP takes part in cellular communication systems, transmitting remote signals from cell to cell and particularly promoting the spread of inflammation. We here added that, maybe they are not key players in chronic neurodegenerative phases.

The current management of MS aims to modulate the immune system mainly with the use of IFN- β , glatiramer acetate, natalizumab and more recently, fingolimod. We set out to ascertain whether such treatments influence the number of MP. Our analysis revealed higher counts of the three types of cellular origin-specific MP when comparing IFN- β -treated patients with UNT. Similar results were obtained considering NTZ-treated patients. Moreover, no differences were found when comparing both therapies between them. We had hypothesized that in NTZ-treated patients due to blockage of leukocyte entry into the CNS and the mobilization of progenitor cells

from the bone marrow [19], an increment of leukocyte in the blood compartment would augment particularly the number of LMP. The increased in the other two MP subtypes here observed are not fully elucidated. We cannot exclude that mechanisms or confounding factors out of our understanding could be implicated. Some authors have described the inhibitory effect of IFN- β on the release of endothelial-derived MP [9,10,20] and of fingolimod on the release of microglia-derived MP [4]. However, to our knowledge, this was not investigated on PMP, LMP or MMP and regarding NTZ-treated patients. Further studies are required to clarify the role of these subtypes of MP in MS. Additionally; we should mention that although efforts on standardization are being carried out, a major limitation of experiments focus on MP is the difficulty to compare results among diverse studies due to differences on the methodology used.

It is well established that the neuroimmune system behaves differently in women and men in most autoimmune diseases [7,21]. Conversely, the previous results were unaffected when we performed multivariate analysis adjusting by gender. Notably, only in HC we found that women present higher MP counts than men, possibly revealing a higher basal activity of

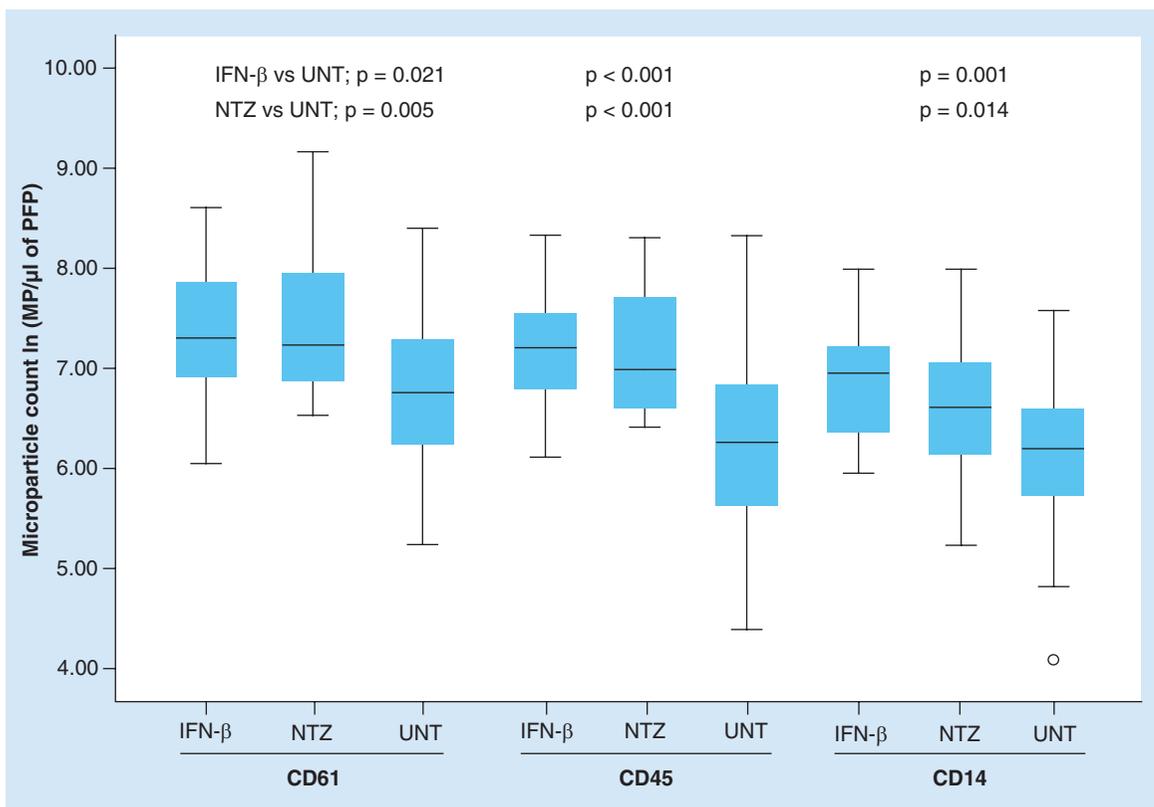


Figure 4. Multiple sclerosis therapy effect on microparticle levels. Patients treated with IFN- β or NTZ reveal higher levels of the three subtypes of microparticle (CD61 $^{+}$; CD45 $^{+}$ and CD14 $^{+}$) compared with UNT patients. NTZ: Natalizumab; UNT: Untreated.

MP production, disappearing this difference during disease.

Finally, we would address a limitation of our work which is related to individual variation of MP levels not only in a circadian manner but also influence by physiological activities [22,23]. In this way, the results given by a cross-sectional one time analysis challenge us towards future longitudinal studies.

Conclusion

In summary, we confirm that MP might reflect the different clinical MS status according to the balance between inflammation and chronic degeneration, showing increased levels in RRMS and basal levels in SPMS. Furthermore, treatments modulate the release of MP resulting in elevated MP levels. Hence, we propose that PMP, LMP and MMP may be active players in MS pathophysiology.

Future perspective

In the biology systems perspective of the complex diseases, MP will take part as active players in the next future. In our opinion, MP study is a promising field that will rise gradually in immune and neurodegenerative diseases. However more studies are necessary to understand the potential protective, modulatory or suppressive role of the MP involved in the neuroimmune system. In this way, an effort to standardize the isolation, methodology and nomenclature in this field should be done.

Acknowledgements

The authors would like to thank I Crespo from IDIBAPS (Barcelona) for many helpful discussions on gating microparticles and advice on flow cytometry. The authors also thank the editors of Ideas Need Communicating Language Services, supported by BIOEF, for improving the use of English in the manuscript.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported partially by two grants from the Basque Government: SAIOTEK program (SAIO11-PC11BN3) and Health Department (GV-2011111028). H Irizar and M Muñoz-Culla are PhD students granted by the Education Department of the Basque Government. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Writing assistance was utilized in the production of this manuscript. Ideas Need Communicating Language Services, supported by BIOEF, was utilized to improve the use of English in the manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive Summary

Background

- Evidence suggests that circulating cell-derived microparticles (MPs) play a role in contact-free cell-to-cell communication after cell activation, stimulation or stress.
- Furthermore, it has been observed that the quantity and composition of MP is associated with different physiopathological immune processes.

Patients & methods

- We analyzed 77 multiple sclerosis (MS) patients (comprising treated or not relapsing–remitting and secondary progressive patients) and 20 healthy controls.
- MPs derived from three cell subtypes (platelets, total leukocytes or monocytes) were obtained from blood samples through centrifugation steps and analyzed by flow cytometry.

Results

- The platelet-derived MP level was 2.2-times increased in untreated MS patients compared with healthy controls.
- Relapsing–remitting patients showed the highest levels in the three subtypes of MP compared with secondary progressive patients and healthy controls.
- Patients treated with IFN- β or natalizumab had significant higher counts of the three subtypes MP compared with untreated patients.

Discussion & conclusion

- Previous reports reveal a relationship between MP levels and inflammatory states.
- This is the first evidence of increasing leukocyte- and monocyte-derived MP in MS patients.
- MP counts may reflect the different clinical status related to the balance between inflammation (relapsing–remitting MS) and chronic degeneration (secondary progressive MS).
- MP maybe are not key players in chronic neurodegenerative phases.
- More standardized studies are necessary to clarify treatment effect on MP levels.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

- 1 Lai CP-K, Breakefield XO. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front. Physio.* 3, 228 (2012).
- 2 Waldenström A, Genneback N, Hellman U *et al.* Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS ONE* 7(4), e34653 (2012).
- 3 Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593 (2009).
- **Review of the immunological role of extracellular vesicles.**
- 4 Verderio C, Muzio L, Turola E *et al.* Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann. Neurol.* 72, 610–624 (2012).
- **First evidence of microglia-derived microparticles in cerebrospinal fluid, and they seem to be factors of inflammation spreading.**
- 5 Pisetsky DS, Ullal AJ, Gauley J *et al.* Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology (Oxford)* 51(10), 1737–1746 (2012).
- 6 Sellam J, Proulle V, Jüngel A *et al.* Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res. Ther.* 11(5), R156 (2009).
- 7 Sadovnick A. European Charcot Foundation Lecture: the natural history of multiple sclerosis and gender. *J. Neurol. Sci.* 286(1–2), 1–5 (2009).
- 8 Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T *et al.* Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64(7), 1144–1151 (2005).
- 9 Sheremata WA, Jy W, Delgado S *et al.* Interferon-beta1a reduces plasma CD31⁺ endothelial microparticles (CD31+EMP) in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 3, 23 (2006).
- 10 Lowery-Nordberg M, Eaton E, Gonzalez-Toledo E *et al.* The effects of high dose interferon-β1a on plasma microparticles: correlation with MRI parameters. *J. Neuroinflammation.* 8, 43 (2011).
- 11 Sheremata W, Jy W, Horstman L *et al.* Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 5, 27 (2008).
- 12 Minagar A, Jy W, Jimenez JJ *et al.* Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 56(10), 1319–1324 (2001).
- **Endothelial cell-derived microparticles circulating in blood increase during relapsing and decrease in remission.**
- 13 Robert S, Poncellet P, Lacroix R *et al.* Standardization of platelet derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J. Thromb. Haemost.* 7, 190–197 (2008).
- 14 Jy W, Minagar A, Jimenez JJ *et al.* Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP–monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front. Biosci.* 9, 3137–3144 (2004).
- 15 Barry OP, Praticò D, Savani RC *et al.* Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 102(1), 136–144 (1998).
- 16 Andreola G, Rivoltini L, Castelli C *et al.* Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195(10), 1303–1316 (2002).
- 17 Sarkar A, Mitra S, Mehta S *et al.* Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS ONE* 4(9), e7140 (2009).
- 18 Dutta R, Trapp BD. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.* 93(1), 1–12 (2011).
- 19 Planas R, Jelčić I, Schippling S *et al.* Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 42(3), 790–798 (2012).
- 20 Jimenez J, Jy W, Mauro LM *et al.* Horstman LL. Elevated endothelial microparticle–monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of interferon-beta 1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte–endothelial microparticle complexes. *Mult. Scler.* 11(3), 310–315 (2005).
- 21 Irizar H, Muñoz-Culla M, Zurriarán O *et al.* HLA-DRB1*15:01 and multiple sclerosis: a female association? *Mult. Scler.* 18(5), 569–577 (2012).
- 22 Madden LA, Vince RV, Sandström ME *et al.* Microparticle-associated vascular adhesion molecule-1 and tissue factor follow a circadian rhythm in healthy human subjects. *Thromb. Haemost.* 99(5), 909–915 (2008).
- 23 Bastos-Amador P, Royo F, Gonzalez E *et al.* Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *J. Proteomics.* 75(12), 3574–3584 (2012).



Extracellular vesicles in multiple sclerosis: what are they telling us?

Matías Sáenz-Cuesta^{1,2*}, Iñaki Osorio-Querejeta^{1,2} and David Otaegui^{1,2}

¹ Multiple Sclerosis Unit, Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain

² Spanish Network on Multiple Sclerosis, Madrid, Spain

Edited by:

Shawn Hayley, Carleton University, Canada

Reviewed by:

Michela Matteoli, University of Milano, Italy

Robert Weissert, University of Regensburg, Germany

*Correspondence:

Matías Sáenz-Cuesta, Multiple Sclerosis Unit, Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, Dr. Begiristain s/n, San Sebastián, Gipuzkoa 20014, Spain
e-mail: matias.saenz@biodonostia.org

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-bound particles secreted by almost all cell types. They are classified depending on their biogenesis and size into exosomes and microvesicles or according to their cell origin. EVs play a role in cell-to-cell communication, including contact-free cell synapsis, carrying active membrane proteins, lipids, and genetic material both inside the particle and on their surface. They have been related to several physiological and pathological conditions. In particular, increasing concentrations of EVs have been found in many autoimmune diseases including multiple sclerosis (MS). MS is a central nervous system (CNS) demyelinating disease characterized by relapsing of symptoms followed by periods of remission. Close interaction between endothelial cells, leukocytes, monocytes, and cells from CNS is crucial for the development of MS. This review summarizes the pathological role of EVs in MS and the relationship of EVs with clinical characteristics, therapy, and biomarkers of the disease.

Keywords: extracellular vesicle, exosomes, microvesicle, multiple sclerosis, biomarker, therapy

WHAT ARE EXTRACELLULAR VESICLES?

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-bound particles coming from inside a cell or formed directly from its membrane, and excreted to the extracellular medium, that carry information whose function is cell-to-cell communication without direct contact. They play a role in physiological and pathological conditions, being released during cell activation, stress, and apoptosis. Specifically, these vesicles carry proteins, lipids, and genetic materials such as DNA, RNA, and miRNA, producing genotypic (Waldenström et al., 2012) and phenotypic (van der Vos et al., 2011) modifications in the recipient cell. This is facilitated by the receptors on the surface of the EV membrane that allow the target cell to identify the vesicles and interact with them (Choudhuri et al., 2014).

EVs CLASSIFICATION

BIOGENESIS

Though there are several ways of classifying EVs, the main division in nomenclature is based on biogenesis. Those formed inside multivesicular bodies and released extracellularly upon fusion of these bodies with the plasma membrane are called exosomes (Théry et al., 2009). Their main characteristic is to have a uniform size of between 30 and 150 nm, making them the smallest EVs. On the other hand, those known as microparticles (MP), microvesicles (MV), or ectosomes come from the modification of the cell membrane after external or internal stimuli, leading to a softening of the membrane-adjacent structure and allowing evagination and

vesicle formation followed by fission on the connecting membrane stalks until their full detachment. These MV/MPs vary greatly in size, ranging from 0.3 to 1 μm in diameter (Mause and Weber, 2010; Frey and Gaipf, 2011; Lai and Breakefield, 2012). However, the current trend is to call the entire set EVs, the term used by the newly formed International Society of Extracellular Vesicles (Witwer et al., 2013).

In this review, we follow this trend, using the term EVs to refer to all vesicles; we note, however, that specifically in multiple sclerosis (MS) related-research most studies refer to them as MPs or MVs.

CELL ORIGIN

Extracellular vesicles have been also classified as a function of their cell origin depending on the parental cell from which they arose, so far the most studied being those obtained from circulating cells in peripheral blood. Each cell has characteristic markers on its membrane enabling subsequent identification of the EV, e.g., as erythrocyte-, leukocyte-, platelet-, endothelial-, or monocyte-derived. Further, studies focusing on central nervous system (CNS)-derived EVs have described neural stem cell-, neuron-, astrocyte-, microglia-, and oligodendrocyte-derived vesicles (Lai and Breakefield, 2012) with the goal of finding markers that may reflect CNS status, since they can be detected remote from the site of release after cell activation.

TECHNIQUES FOR STUDYING EVs

The study of EVs is not straightforward, particularly with respect to isolation and characterization due to their small size and the low concentrations found in human fluids. Further, although efforts have been made to unify criteria in EV research (Robert et al., 2008; Dey-Hazra et al., 2010; Lacroix et al., 2012a; Witwer et al., 2013), they are not yet clearly established, making it difficult to compare

Abbreviations: BBB, blood-brain barrier; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; EAE, experimental autoimmune encephalitis; EEV, endothelial-derived EV; EV, extracellular vesicle; LEV, leukocyte-derived EV; MEV, monocyte/microglia-derived EV; MP, microparticle; MS, multiple sclerosis; MV, microvesicle; PEV, platelet-derived EV.

studies. Differences derived from centrifugation protocols, fluorochrome labeling, and gating strategies represent as yet unsolved barriers to standardization. Nevertheless, the most widely used techniques can be summarized as follows.

ISOLATION

The main approach that has been used for isolating EVs from human fluids or culture media supernatants is a series of sequential centrifugation steps. Different purities are obtained depending on the number of steps completed. Briefly, a first centrifugation step at a low velocity (200–300 g) separates cells from EV-containing fluid, which can be further purified or directly pelleted. For a further purification, a second centrifugation must be carried out (at 2,000–10,000 × g, depending on the fluid or EV fraction required). Otherwise, EVs can be directly pelleted from the first supernatant (centrifuging at forces of 10,000 up to 100,000 × g). Though there are many variations among authors, the first approach to EV analysis is usually based on the aforementioned steps. As an alternative protocol to obtain a more pure EV fraction, a sucrose gradient can be combined with one of the centrifugation steps.

Another isolation technique is polymeric precipitation (e.g., Exoquick, System Biosciences, CA, USA). The main advantage of this approach is rapid sample processing. However, the low purity obtained and mixing of different EV subsets make results difficult to interpret.

The extraction of EVs by passing a sample through filters is a cheap and easy method that can be applied alone or combined with centrifugation. There is, however, a risk of contamination with particles other than EVs of the same size.

CHARACTERIZATION

Flow cytometry is the technique most widely employed for studying EVs (including in MS research) to the possibility of using multiple parameters to identify the same vesicle. It is a powerful characterization tool, the process is rapid and the results can be quantified. Its main limitation is poor discrimination under 0.5 μm. However, new high-resolution cytometers can detect particles as small as 0.2–0.3 μm.

Recently, two novel tools appeared on the market created to characterize nanoparticles in size and concentration with a high resolution. They measure particles based on tunable resistive pulse sensing (qNANO, IZON Science, New Zealand) and Brownian motion of the particle with nanoparticle tracking analysis software (NS500 and NS300, Nanosight, UK). The simple and user-friendly operation and powerful measurements provided by these instruments herald a new era in the analysis of EVs.

Electron microscopy is usually performed in combination with flow cytometry to provide direct evidence of the presence of EVs, and it provides what is arguably the highest quality morphological information (**Figure 1**). On the other hand, the expensive and complex processing of samples limits its use.

Fluorescence microscopy is normally used to analyze EV function *in vitro*, as well as to localize EV in tissues and budding process. In particular, confocal microscopy is widely used in EV research.

In addition, enzyme-linked immunosorbent and Western blot assays have also been employed for analysis of EVs but are less

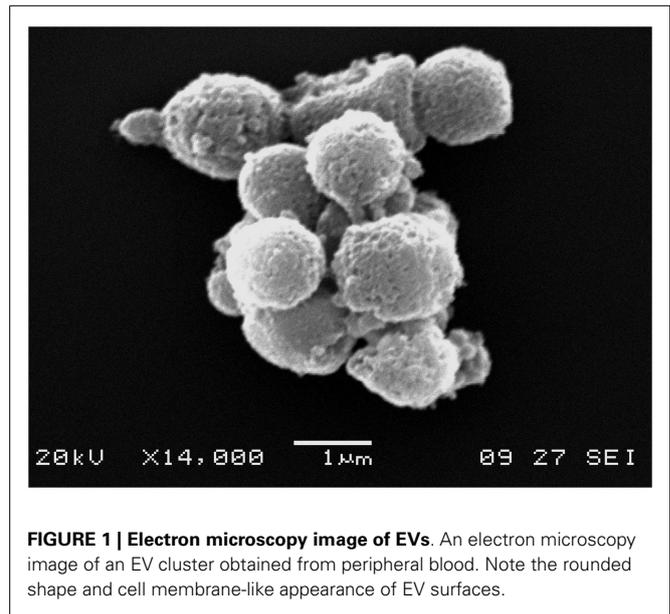


FIGURE 1 | Electron microscopy image of EVs. An electron microscopy image of an EV cluster obtained from peripheral blood. Note the rounded shape and cell membrane-like appearance of EV surfaces.

extensively used due to the poor characterization they provide and that they are difficult to quantify, respectively.

Notably, next-generation sequencing techniques are currently expanding to the field of EVs, specifically in the attempt to characterize their genetic cargo.

EVs IN NEUROSCIENCE

Vesicle secretion and the transfer of material carried within them in the CNS under physiological conditions were described many decades ago (de Robertis and Bennett, 1954). The classic example was the presence of vesicles in the neuronal synapses (de Robertis and Bennett, 1955). However, the mechanisms involved and modulation thereof by astrocytes, through the release of vesicles into the synaptic space, have only been properly understood in recent years (Antonucci et al., 2012). Vesicles have been implicated not only in the propagation of signals, but also in controlling neurogenesis with exosomes being involved in the regulation of myelin membrane biogenesis (Marzesco et al., 2005; Bakhti et al., 2011) and repairing damaged neurons (Court et al., 2011). Moreover, a recent study identified a new mechanism of regulation of the axonal integrity mediated by oligodendrocyte-derived EVs transferred to neurons (Frühbeis et al., 2013). It has been observed that EVs are released by neural cells, oligodendrocytes, neurons, microglia, astrocytes in the brain, and Schwann cells in the peripheral nervous system (reviewed by Lai and Breakefield, 2012; Frühbeis et al., 2012). All this implies that EVs perform functions necessary for growth and normal functioning of the nervous system.

In addition, EVs are involved in processes of CNS diseases carrying specific pathological cargo or performing functions that produce potential damage (Lai and Breakefield, 2012). Several studies have found variations in the number and function of circulating EVs in peripheral blood in diseases including Alzheimer's disease, dementia, epilepsy, stroke, traumatic brain injury, malaria, and tumors (mainly glioblastoma), among others (reviewed by

Lai and Breakefield, 2012; Dœuvre et al., 2009). To explore these functions, most studies expose primary cell cultures to suspensions of EVs analyzing the effects produced by EV in the cells such as morphological changes, fusion processes, induction of proliferation, and apoptosis. Another approach is to analyze EVs derived directly from human fluids. For this, peripheral blood and CSF are the most frequently studied samples. On the other hand, few studies have explored whether variations in EVs in CSF directly reflect the pathophysiology of the CNS (Morel et al., 2008; Huang et al., 2009; Street et al., 2012; Verderio et al., 2012; Mobarrez et al., 2013; Patz et al., 2013; Joshi et al., 2014) and only a couple of them have examined EVs derived from brain cells obtained from the CSF as a surrogate marker for what occurs in the CNS (Verderio et al., 2012; Joshi et al., 2014). Above all, it has not yet been elucidated whether EVs are able to migrate from the blood across the blood–brain barrier (BBB) into the CNS (or not) and vice versa (Smalheiser, 2009). More studies are required to provide evidence on whether there is an EV-mediated communication channel between the nervous and the cardiovascular systems.

MULTIPLE SCLEROSIS (MS) AS A NEUROIMMUNE DISEASE

Multiple sclerosis is a chronic autoimmune disease affecting the CNS, the cause of which remains elusive. It is, however, established that the pathogenesis of the disease involves genetic, environmental, and immune components (Bernard and Kerlero de Rosbo, 1992). There are different clinical forms, but the most prevalent is relapsing–remitting MS, characterized by outbreaks of symptoms lasting 1–3 weeks called relapses, followed by a recovery phase. During relapses, multiple areas of demyelination emerge, this being the main pathological feature of the disease. Immune

activation involved in the onset of the disease causes a release of proinflammatory cytokines (TNF, IL1-beta, IFN-gamma) plus a proliferation of leukocytes, monocytes, and platelets (Martino and Hartung, 1999). At the same time, endothelial dysfunction of the BBB affects its permeability, facilitating the activation, adhesion, and transendothelial migration of monocytes and T-lymphocytes into the CNS (Minagar et al., 2012). Cytokines and chemokines released at the site of a lesion recruit glial cells, macrophages, and lymphocytes perpetuating the immune activation leading to a chronic inflammatory state (McFarland and Martin, 2007). Currently, the diagnosis of MS is based on the 2010 revised McDonald criteria (Polman et al., 2011) including careful clinical evaluation supported by MRI findings and oligoclonal banding in the CSF, the main complementary tools. The treatment of MS has undergone a revolution with the advent of IFN-beta as a treatment in the 1980s and more recently with the new immunomodulator drugs, such as natalizumab and fingolimod.

Several studies summarized in this review suggest EVs are active players in the pathophysiological development of this disease. More specifically, higher numbers of EVs have been observed in MS patients than in healthy controls and a role for EVs has been proposed in inflammatory progression and lesion repair. Because of this, they could serve as new biomarkers of disease development and targets for future treatments.

We will discuss these issues in the following sections. In **Table 1** we summarize the origins and markers used for EVs reported.

IMMUNE ROLES OF EVs IN MS

One of the necessary processes for the establishment of MS is the transendothelial migration of leukocytes into the CNS through

Table 1 | Cellular origins of extracellular vesicles (EVs) in multiple sclerosis research.

| EV origin | Marker | Sample | Technique | Reference |
|------------------------|-------------|--------------|-----------|--|
| Endothelial | CD31+/CD42– | PPP and MVEC | FC | Minagar et al. (2001) |
| | | WB and MVEC | FC | Jy et al. (2004), Jimenez et al. (2005) |
| | CD51 | PPP and MVEC | FC | Minagar et al. (2001) |
| | CD54 | WB and MVEC | FC | Jy et al. (2004), Jimenez et al. (2005) |
| | CD106 | WB and MVEC | FC | Jy et al. (2004) |
| | CD62E | WB and MVEC | FC | Jy et al. (2004), Jimenez et al. (2005) |
| Platelet | CD146 | PPP | FC | Lowery-Nordberg et al. (2011) |
| | CD61 | PFP | FC | Sáenz-Cuesta et al. (2014) |
| | CD41 | PPP | FC | Sheremata et al. (2008) |
| Leukocyte | CD45 | PFP | FC | Sáenz-Cuesta et al. (2014) |
| Monocyte | CD14 | PFP | FC | Sáenz-Cuesta et al. (2014) |
| Astrocyte | GFAP | CSF | FM/WestB | Verderio et al. (2012) |
| Neuronal | SNAP-25 | CSF | FM/WestB | Verderio et al. (2012) |
| Oligodendrocyte | MBP | CSF | FM/WestB | Verderio et al. (2012) |
| Microglia/macrophage | IB4 | CSF | FM/FC/EM | Verderio et al. (2012) |
| GENERAL MARKERS | | | | |
| Exosomes | CD63 | PFP | WestB | Williams et al. (2013), Gatson et al. (2011) |
| Microvesicles | AnV | CSF | FC | Verderio et al. (2012) |

EM, electron microscopy (immunogold); PPP, platelet poor plasma; PFP, platelet free plasma; WB, whole blood; WestB, Western blot; CSF, cerebrospinal fluid; FC, flow cytometry; FM, fluorescence microscopy; MVEC, microvascular endothelial cell culture.

the BBB. This migration is favored by a weakening of the barrier. The fact that this mechanism is crucial to the pathogenesis of MS is demonstrated by the benefits observed with natalizumab, which blocks the entry of leukocytes into the CNS (del Pilar Martín et al., 2008). Proinflammatory cytokines such as TNF- α , IFN- γ , and IL-1- β released by inflammatory cells mediate the breaching of the BBB by the upregulation of the expression of adhesion molecules (VCAM-1, E-selectin, and PECAM-1) (Dore-Duffy et al., 1995), the loss of junctional integrity (Minagar et al., 2003), and the release of endothelial-derived EVs (EEVs) (Minagar et al., 2001). EEVs from the endothelial cells of BBB and other EVs shed from surrounding cells [leukocytes (LEV), platelets (PEV), microglia (MEV), and astrocytes] are vectors of numerous agents carried inside these vesicles or bound to their plasma membrane. The presence of metalloproteinases in EV cargo suggests that they may participate in the degradation of the extracellular matrix involved in BBB disruption (Sbai et al., 2010; Lacroix et al., 2012b). Moreover, caspase 1 carried by EVs shed from monocytes and microglia has been shown to regulate proteolytic activity of metalloproteases on endothelial cells (Bianco et al., 2005; Sarkar et al., 2009).

Minagar et al. (2001) hypothesized that plasma from MS patients contains factors that can induce endothelial activation, as suggested by the release into circulation of CD31+ EEVs from microvascular endothelial cell culture (MVEC) – a BBB model – treated with plasma from patients both in exacerbation and remission. After this pivotal study, Jy et al. (2004) demonstrated that EEVs found in plasma are able to interact and form complex with monocytes and induce their activation. These activated monocytes express Mac-1 integrin, which is an ICAM-1 receptor. The union of Mac-1 of monocytes with ICAM-1 of endothelial cells plays an important role in the transendothelial migration of inflammatory cells. Moreover, activated T cells release EVs containing the chemokine CCL5 and arachidonic acid responsible for promoting recruitment of monocytes and upregulating ICAM-1 in endothelial cells and LFA1 and Mac-1 in monocytes (Barry et al., 1998). To sum up, these data suggest that EEVs shed from the activated endothelial cells in MS patients promote the migration of monocytes and lymphocytes through the BBB and assist with the formation of demyelinating lesions. A validation of this hypothesis was performed in an elegant experiment carried by Jimenez et al. (2005): they investigated the transendothelial migration of monocytes using the MVEC model, adding plasma from relapsing or remitting MS patients and controls, and found that only the plasma from patients in relapse significantly promoted transendothelial migration. See **Figure 2** for a graphical summary of this paragraph.

Shedding new light on the role of EVs, a few recent studies have investigated EVs in the animal model of MS called experimental autoimmune encephalitis (EAE). The first published by Gatson et al. (2011) analyzed EVs (exosomes in this case) in late pregnant compared to virgin EAE mice. Results showed that EVs derived from serum of mice in late pregnancy were more numerous than those isolated from virgin mice. The proliferation of T-cells derived from splenocytes was also explored in the presence of whole serum, purified EVs, and EV-depleted serum. The three phases derived from pregnant animals were significantly more

suppressive of T-cell proliferation than EVs from virgin animals or cells cultured without any EVs. On the basis of these findings, authors concluded that EVs are responsible for immune modulation during EAE pregnancy. A further study by the same group analyzed this immune modulation showing a reduction in IFN- γ production and expression of Tbet (Th1 transcription factor) in T cells exposed to pregnancy-derived EVs. In addition, these researchers demonstrated the effect of pregnancy-derived EVs on migration to lesion areas in EAE of oligodendrocyte precursor cells and their maturation (Williams et al., 2013). This is the first publication that denoted a protective role of EVs in MS/EAE.

Verderio et al. (2012) identified other EV origins analyzing in depth CSF from humans and mice, both healthy and MS/EAE. Several types of brain cell including neurons, astrocytes, and resident microglial cells give rise to EVs. Peripheral macrophages are virtually absent in healthy brain parenchyma suggesting that myeloid EVs obtained in CSF are derived from resident microglia in the normal brain. This group also revealed that microglia store and release IL-1- β and MHC-II suggesting that the EVs produced from reactive myeloid cells may propagate neuroinflammation and provide an efficient route for rapid dissemination and presentation of antigens.

Regarding platelet-derived EVs (PEVs) in MS, P-selectin was observed on PEVs capable of binding to PSGL-1 and PECAM-1 from lymphocytes by increasing the expression of integrins such as $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), promoting the binding of these cells to the endothelium (Sheremata et al., 2008). Interestingly, this epitope is the target of natalizumab, one of the recent therapies approved for relapsing–remitting MS.

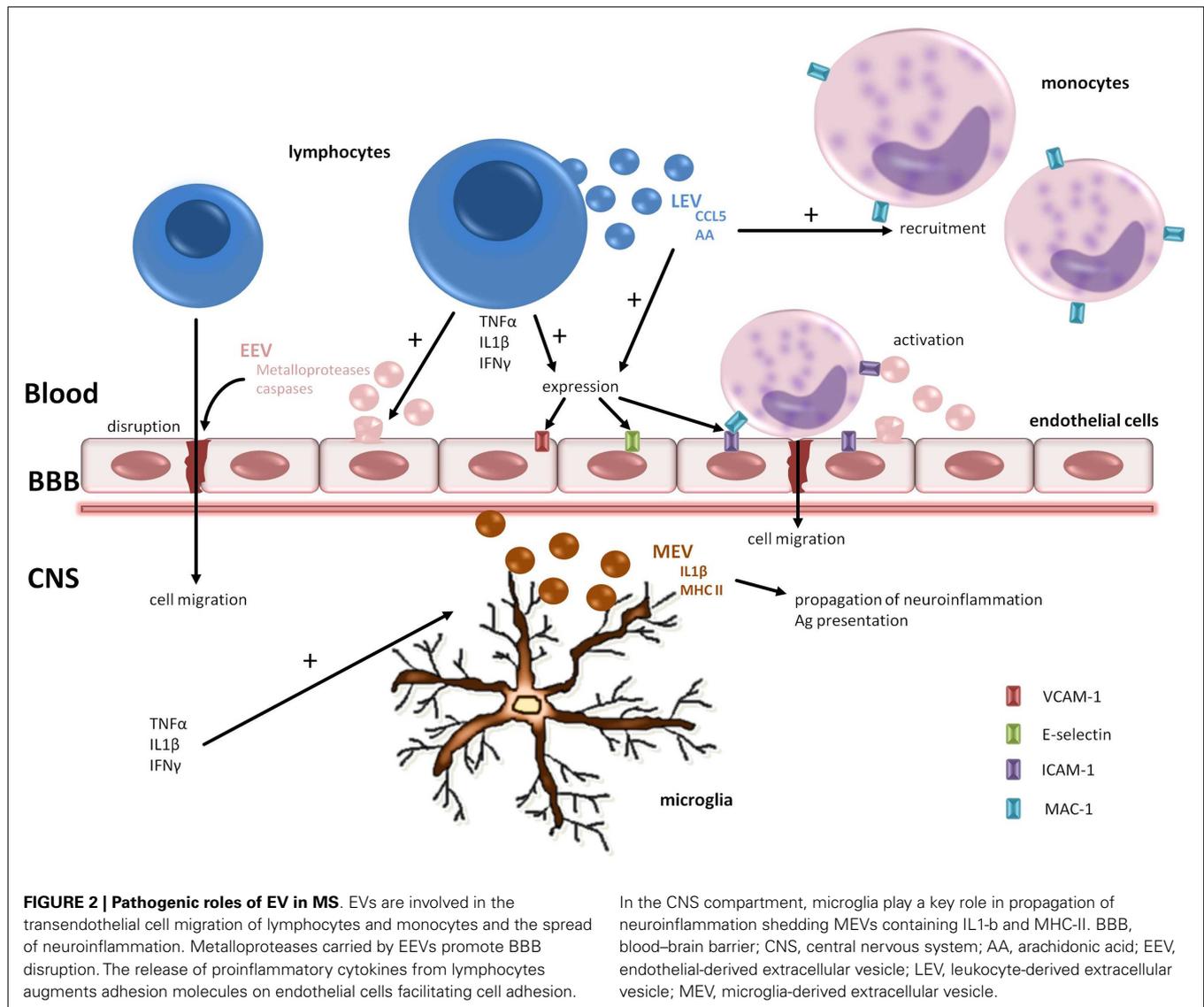
All this evidence supports the idea that EVs are involved in MS playing a pathological role, acting as immunomodulator agents in the disruption of the BBB and the propagation of inflammation of the parenchyma but that, on the other hand, they contribute to the repair of demyelinating lesions.

ARE EVs RELIABLE BIOMARKERS IN MS?

As stated above, the association between EV concentration and the pathological condition of MS patients is clearly established. The next challenge is to develop the application of EVs as useful biomarkers: as well as providing relevant information, they are easy to process at a low cost and hence their use could be extended to large study populations. However, clearly, the adoption of EVs as biomarkers needs to be based on an objective assessment of their diagnostic and monitoring potential for the disease in question. In the case of MS, EV measurements must be correlated with the clinical judgment of the neurologist, established scores, and the results of other complementary tests such as MRI. Several studies discussed in the following paragraphs have addressed these issues but it should be noted that the results are mixed, sometimes inconsistent, depending on the type of EV (MV, MP, or exosomes), their cell origin, methods employed, and analysis performed.

EV CONCENTRATION AND CLINICAL STATUS

A relationship between EV counts in plasma and MS status was first proposed by Minagar et al. (2001) more than a decade



ago. Their results revealed that CD51+ EEV concentrations were higher in relapse and remission, while those of CD31+ EEVs were only higher during relapse, compared to healthy controls. They proposed that the increase in CD51+ EEVs was related to chronic inflammation owing to endothelial erosion with subendothelial matrix exposure, and that CD31+ EEVs reflect acute endothelial damage. This was tested *in vitro*, and the results were only partially reproduced. Together the findings pointed to the existence of factors present in the plasma of MS patients but not in the *in vitro* model, such as activated leukocytes present during exacerbations, which were able to regulate the release of EEVs. Authors also described a concordance between CD31+ EEV counts and gad+ MRI findings. They claimed that these vesicles were as sensitive as gad+ MRI for detecting disease activity, and also that a decrease in vesicle count could precede a negativization of MRI findings. However, this was criticized for being a premature speculation and not supported by sufficient evidence (Larkin, 2001).

In the same line of research, 3 years later Jy et al. (2004) explored whether CD54+ and CD62E+ EEVs bound leukocytes *in vitro* and in whole blood from MS patients and controls. Their main conclusion was that CD54+ EEVs form complexes with monocytes in a TNF- α environment and also activated them. CD62E+ EEV-monocyte complexes were more numerous during exacerbations than in remission while the number of CD54+ EEV-monocyte complexes remained unchanged, suggesting that the former would be a better marker for monitoring MS. Authors reported that the measurement of both EEV-monocyte complexes together as a single EEV-monocyte complex fraction appeared to be more sensitive to MS exacerbation than gad+ MRI and even more sensitive than the CD31+ EEV analysis studied in their previous work. Finally, free EEVs (unbound to cells) bearing CD62E allowed better discrimination of disease activity (relapsing vs. remitting patients) than CD54+ EEVs, but not compared to the previously reported CD31+ EEVs.

Conversely a year later, Jimenez et al. explored free CD54+ and CD62E+ EEVs *in vitro* reporting an increase in both markers during relapse and normal values similar to control in remission. Analyzing EEVs from relapsing patients only, CD54+ and CD62E+ phenotypes were present in significantly higher numbers than CD31+ EEVs, indicating that they were more sensitive (*in vitro*) for identifying MS status (Jimenez et al., 2005). As stated by Witwer et al. (2013), EV studies are highly heterogeneous, this being attributable to the lack of standardized methods. Possibly, this underlies the mixed results described here, particularly with respect to the earlier work by Jy and colleagues.

Besides EEVs, other EVs have been explored including those derived from platelets, leukocytes, and monocytes. Platelet activation in patients with MS may be secondary to endothelial damage (Sheremata et al., 2008). CD62P (P-selectin) levels have been shown to be higher in MS patients than controls. Twofold higher CD41+ PEV counts were found in MS patients compared to controls, these vesicles showing properties as anticoagulants (Sheremata et al., 2008). Our group also demonstrated a significant difference in CD61+ PEV, CD45+ LEV, and CD14+ MEV counts in samples from MS patients compared to those from healthy controls (Sáenz-Cuesta et al., 2014). Moreover, the PEV count was found to be higher in untreated MS patients than controls. Relapsing–remitting patients had the highest counts for the three subtypes of EVs while secondary progressive patients were found to have similar numbers to those in healthy controls. We hypothesized that EVs reflect disease status with more being shed during inflammatory periods and numbers returning to baseline during chronic progressive degeneration. Another approach to monitoring the progression of the disease is to assess patient's disability using the Expanded Disability Status Scale. Our group found no relationship, however, between EV counts and scores on this scale, and nor were the counts related to disease duration or patients' age.

In human CSF, the numbers of EVs have also been seen to be higher in patients than controls (Verderio et al., 2012). Among patients, the acute phase was associated with higher numbers of MEVs than stable or chronic phases. In addition, MEVs counts correlated linearly with gad+ MRI images. In line with this, the concentration of MEVs obtained from CSF of EAE mice reflects the course and severity of EAE. The absolute numbers of MEVs were closely associated with the course of the disease, peaking at onset and during clinical relapses, and decreasing in the chronic phase of the disease or stable phase. In this work, authors also explored the potential of MEVs as a possible biomarker in MS plotting ROC curves. Specifically, based on ROC analysis, they obtained a sensitivity of 85% and specificity of 100% for distinguishing clinically isolated syndrome patients from healthy controls, and a sensitivity of 82% and specificity of 82% for differentiating stable (relapse-free patients) from relapsing MS patients.

EVs AND MS THERAPY

Current MS therapy is based on the modulation of the immune system with a wide range of drugs. In some cases, including IFN-beta, natalizumab, and fingolimod, the effect of the drug on EVs has been explored. However, there are several new drugs, already approved (teriflunomide, alemtuzumab, BG-12) or in the

final phases of testing (laquinimod, alemtuzumab, ocrelizumab), in which the potential modulation of EVs has not yet been investigated.

IFN-beta has antiviral and immunoregulatory activity mediated by its interaction with specific cell receptors on the surface of human cells. The precise mechanism of action in MS is still under investigation. So far, it is known that IFN-beta reduces the permeability of the BBB inhibiting leukocyte migration to the CNS (Calabresi et al., 1997) possibly interfering with endothelial adhesion, shifting the cytokine balance from Th1 to Th2, and increasing the expression of occludin at endothelial tight junctions (Dhib-Jalbut et al., 1996).

The effect of IFN-beta 1b on EVs was first explored by Jimenez et al. (2005) who observed an inhibitory effect on EEV production *in vitro* from MVEC culture adding plasma from MS patients, both in remission and relapse. Moreover, it was shown that monocyte–EEV complex formation and transendothelial migration are impaired after IFN-beta 1b exposure.

A first prospective study in a cohort with relapsing–remitting MS revealed a reduction in the numbers of CD31+ EEVs in plasma from week 12 of treatment with IFN-beta 1a (Sheremata et al., 2006). Conversely, no correlation was found with MRI, though there was insufficient data to draw definitive conclusions. Findings in a second cohort treated with high doses of INF-beta 1a and followed-up for a year suggest that CD54+ EEV number represents a more sensitive marker of treatment effect than CD31+ or CD146+ EEV numbers, while results showed a correlation of both CD31+ and CD54+ EEVs with T1-weighted MRI findings (the relation with CD146+ EEV failing to reach statistical significance) (Lowery-Nordberg et al., 2011). Authors speculate that the decrease they observed in plasma vesicles with IFN-beta therapy reflects a reduced interaction between CD4+ T-cells and the endothelium and subsequently less migration of the cells through a restored BBB.

Another immunomodulating drug approved (in 2006) for MS treatment is natalizumab, a recombinant humanized monoclonal antibody. A selective adhesion molecule inhibitor, binds to the alpha-4 subunit of human integrins profusely expressed on the surface of all leukocytes except neutrophils. In particular, it binds to alpha-4-beta-1 integrin, blocking the interaction with its analog receptor, the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Disruption of these molecular interactions prevents mononuclear leukocyte migration across the endothelium into the inflamed parenchymal tissue (Selewski et al., 2010). In a recent study analyzing plasma PEVs, LEVs, and MEVs, our group found higher counts of all three EV subtypes in IFN-beta and natalizumab-treated than untreated patients (Sáenz-Cuesta et al., 2014). No significant differences were found between the two therapies. A plausible hypothesis specifically for the rise in LEV number in natalizumab-treated patients is that blockage of leukocyte entry into the CNS would result in increase in the number of leukocytes in the blood compartment and, in turn, of LEVs in particular. The rise observed in the other two EV subtypes is, however, less well-understood.

Fingolimod is a new oral immunomodulator drug approved for the relapsing–remitting form of MS. It binds and induces

downregulation of the sphingosine 1 phosphate receptors present in lymphocytes regulating their egress from lymphoid tissues into the circulation. In that way, the drug reduces autoaggressive lymphocyte infiltration into the CNS (Chun and Hartung, 2010). Acid sphingomyelinase (aSMase) is inhibited by fingolimod (Dawson and Qin, 2011) and this enzyme controls EV production. These observations led Verderio et al. to theorize that using fingolimod could inhibit MEV shedding from reactive microglia and also macrophage infiltration into the CNS. Their experiments in an EAE model confirmed that MEV numbers decreased to baseline levels in the CSF with the administration of fingolimod. In mice, symptom scores and MEV counts were correlated during fingolimod treatment. Hence, a novel effect of fingolimod was postulated, namely, that it limits the spreading of the inflammatory signal by impairment of MEV production (Verderio et al., 2012). Despite these conclusions, there have so far been no reports evaluating the effect of fingolimod on EVs in humans, probably because it has only relatively recently become available commercially.

Apart from being biomarker for treatment response, it has been proposed that engineered EVs be loaded and used to deliver exogenous compounds for therapeutic purposes, raising the prospect of a novel clinical application for EVs. Preliminary studies with exosomes have been carried out in some types of cancer (Kosaka et al., 2013); however, more research is required before this approach can be used in clinical practice as a complementary therapy. Particularly in MS, a recently published study explored the ability of exosomes packed with microRNA to increase baseline myelination, reduce oxidative stress, and improve remyelination (Pusic et al., 2014). The results showed a significant increase in myelination in hippocampal slice cultures. Nevertheless, the effects of this therapeutic approach need to be investigated further, first in an animal model such as EAE and later in a clinical trial.

CONCLUDING REMARKS

Extracellular vesicles play important roles in the development of MS, in particular activating cells during relapses, leading to migration through the BBB, and spreading inflammation in CNS tissue. On the other hand, a protective effect of EVs has been described with the induction of maturation and migration of oligodendrocyte precursor cells.

Regarding the application of EV research findings to daily clinical practice, it is not yet possible to propose EVs as a specific biomarker for MS due to no compounds having been sufficiently closely linked to the disease. Nevertheless, there is evidence that they reflect disease progression. Particularly, EEVs, PEVs, and MEVs appear to be the most accurate markers. What is more, the effects of treatments seem to be reflected in EV counts. We consider it likely that new carefully designed studies with longer follow-up periods will allow us to confirm the involvement of EVs suggested by our current knowledge and open future applications.

Finally, there is an urgent need for consensus guided by the new scientific societies for EVs to standardize the methodologies and instruments used, in the analysis of EVs with potential

applications in clinical practice, and thereby make it possible to obtain comparable results.

ACKNOWLEDGMENTS

We especially thank the editors of Ideas Need Communicating Language Services, supported by BIOEFF, for improving the use of English in the manuscript.

REFERENCES

- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., et al. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J.* 31, 1231–1240. doi:10.1038/emboj.2011.489
- Bakhti, M., Winter, C., and Simons, M. (2011). Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* 286, 787–796. doi:10.1074/jbc.M110.190009
- Barry, O. P., Praticò, D., Savani, R. C., and FitzGerald, G. A. (1998). Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 102, 136–144. doi:10.1172/JCI2592
- Bernard, C. C., and Kerlero de Rosbo, N. (1992). Multiple sclerosis: an autoimmune disease of multifactorial etiology. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 760–765. doi:10.1016/0952-7915(92)90058-M
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., et al. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J. Immunol.* 174, 7268–7277.
- Calabresi, P. A., Tranquill, L. R., Dambrosia, J. M., Stone, L. A., Maloni, H., Bash, C. N., et al. (1997). Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann. Neurol.* 41, 669–674. doi:10.1002/ana.410410517
- Choudhuri, K., Llodrá, J., Roth, E. W., Tsai, J., Gordo, S., Wucherpfennig, K. W., et al. (2014). Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature* 507, 118–123. doi:10.1038/nature12951
- Chun, J., and Hartung, H. P. (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 91–101. doi:10.1097/WNF.0b013e3181cbf825
- Court, F. A., Midha, R., Cisterna, B. A., Grochmal, J., Shakhbazau, A., Hendriks, W. T., et al. (2011). Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* 59, 1529–1539. doi:10.1002/glia.21196
- Dawson, G., and Qin, J. (2011). Gilenya (FTY720) inhibits acid sphingomyelinase by a mechanism similar to tricyclic antidepressants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 321–323. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.115
- de Robertis, E. D., and Bennett, H. S. (1954). A submicroscopic vesicular component of Schwann cells and nerve satellite cells. *Exp. Cell Res.* 6, 543–545. doi:10.1016/0014-4827(54)90209-8
- de Robertis, E. D., and Bennett, H. S. (1955). Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 47–58. doi:10.1083/jcb.1.1.47
- del Pilar Martin, M., Craven, P. D., Winger, R., Frohman, E. M., Racke, M. K., Eagar, T., et al. (2008). Decrease in the numbers of dendritic cells and CD4+ T cells in cerebral perivascular spaces due to natalizumab. *Arch. Neurol.* 65, 1596–1603. doi:10.1001/archneur.65.12.noc80051
- Dey-Hazra, E., Hertel, B., Kirsch, T., Woywodt, A., Lovric, S., Haller, H., et al. (2010). Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.* 6, 1125–1133. doi:10.2147/VHRM.S13236
- Dhib-Jalbut, S., Jiang, H., and Williams, G. J. (1996). The effect of interferon beta-1b on lymphocyte-endothelial cell adhesion. *J. Neuroimmunol.* 71, 215–222. doi:10.1016/S0165-5728(96)00156-7
- Doeuvre, L., Plawinski, L., Toti, F., and Anglés-Cano, E. (2009). Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J. Neurochem.* 110, 457–468. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06163.x
- Dore-Duffy, P., Newman, W., Balabanov, R., Lisak, R. P., Mainolfi, E., Rothlein, R., et al. (1995). Circulating soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity. *Ann. Neurol.* 37, 55–62. doi:10.1002/ana.410370111

- Frey, B., and Gaip, U. (2011). The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Semin. Immunopathol.* 33, 497–516. doi:10.1007/s00281-010-0228-6
- Frühlich, C., Fröhlich, D., and Krämer-Albers, E. M. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front. Physiol.* 3:119. doi:10.3389/fphys.2012.00119
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., et al. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* 11:e1001604. doi:10.1371/journal.pbio.1001604
- Gatson, N. N., Williams, J. L., Powell, N. D., McClain, M. A., Hennon, T. R., Robbins, P. D., et al. (2011). Induction of pregnancy during established EAE halts progression of CNS autoimmune injury via pregnancy-specific serum factors. *J. Neuroimmunol.* 230, 105–113. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.09.010
- Huang, M., Hu, Y. Y., and Dong, X. Q. (2009). High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surg. Neurol.* 72, 481–489. doi:10.1016/j.surneu.2008.12.016
- Jimenez, J., Jy, W., Mauro, L. M., Horstman, L. L., Ahn, E. R., Ahn, Y. S., et al. (2005). Elevated endothelial microparticle-monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of interferon-beta 1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte-endothelial microparticle complexes. *Mult. Scler.* 11, 310–315. doi:10.1191/1352458505ms11840a
- Joshi, P., Turola, E., Ruiz, A., Bergami, A., Libera, D. D., Benussi, L., et al. (2014). Microglia convert aggregated amyloid- β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ.* 21, 582–593. doi:10.1038/cdd.2013.180
- Jy, W., Minagar, A., Jimenez, J. J., Sheremata, W. A., Mauro, L. M., Horstman, L. L., et al. (2004). Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front. Biosci.* 9:3137–3144. doi:10.2741/1466
- Kosaka, N., Takeshita, F., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Katsuda, T., Ono, M., et al. (2013). Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: “exocure” is another choice for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 376–382. doi:10.1016/j.addr.2012.07.011
- Lacroix, R., Judicone, C., Poncelet, P., Robert, S., Arnaud, L., Sampol, J., et al. (2012a). Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J. Thromb. Haemost.* 10, 437–446. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x
- Lacroix, R., Plawinski, L., Robert, S., Doeuvre, L., Sabatier, F., Martinez de Lizarrondo, S., et al. (2012b). Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica* 97, 1864–1872. doi:10.3324/haematol.2012.066167
- Lai, C. P.-K., and Breakefield, X. O. (2012). Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front. Physiol.* 3:228. doi:10.3389/fphys.2012.00228
- Larkin, M. (2001). Raised endothelial microparticles an early marker for multiple sclerosis? *Lancet* 357, 1679. doi:10.1016/S0140-6736(00)04867-4
- Lowery-Nordberg, M., Eaton, E., Gonzalez-Toledo, E., Harris, M. K., Chalamidas, K., McGee-Brown, J., et al. (2011). The effects of high dose interferon- β 1a on plasma microparticles: correlation with MRI parameters. *J. Neuroinflammation* 8, 43. doi:10.1186/1742-2094-8-43
- Martino, G., and Hartung, H. P. (1999). Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T cells. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 309–321. doi:10.1097/00019052-199906000-00010
- Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., et al. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 118(Pt 13), 2849–2858. doi:10.1242/jcs.02439
- Mause, S., and Weber, C. (2010). Microparticles: protagonists of novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* 107, 1057. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226456
- McFarland, H. F., and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8, 913–919. doi:10.1038/ni1507
- Minagar, A., Jy, W., Jimenez, J. J., Sheremata, W. A., Mauro, L. M., Mao, W. W., et al. (2001). Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 56, 1319–1324. doi:10.1212/WNL.56.10.1319
- Minagar, A., Long, A., Ma, T., Jackson, T. H., Kelley, R. E., Ostanin, D. V., et al. (2003). Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium* 10, 299–307. doi:10.1080/1714007544
- Minagar, A., Maghzi, A. H., McGee, J. C., and Alexander, J. S. (2012). Emerging roles of endothelial cells in multiple sclerosis pathophysiology and therapy. *Neurol. Res.* 34, 738–745. doi:10.1179/1743132812Y.0000000072
- Mobarrez, F., Nybom, R., Johansson, V., Hultman, C. M., Wallén, H., Landén, M., et al. (2013). Microparticles and microscopic structures in three fractions of fresh cerebrospinal fluid in schizophrenia: case report of twins. *Schizophr. Res.* 143, 192–197. doi:10.1016/j.schres.2012.10.030
- Morel, N., Morel, O., Petit, L., Hugel, B., Cochard, J. F., Freyssinet, J. M., et al. (2008). Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury. *J. Trauma* 64, 698–704. doi:10.1097/TA.0b013e31816493ad
- Patz, S., Trattnig, C., Grünbacher, G., Ebner, B., Gully, C., Novak, A., et al. (2013). More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins. *J. Neurotrauma* 30, 1232–1242. doi:10.1089/neu.2012.2596
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292–302. doi:10.1002/ana.22366
- Pusic, A. D., Pusic, K. M., Clayton, B. L., and Kraig, R. P. (2014). IFN γ -stimulated dendritic cell exosomes as a potential therapeutic for remyelination. *J. Neuroimmunol.* 266, 12–23. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.10.014
- Robert, S., Poncelet, P., Lacroix, R., Arnaud, L., Giraudo, L., Hauchard, A., et al. (2008). Standardization of platelet derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J. Thromb. Haemost.* 7, 190–197. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x
- Sáenz-Cuesta, M., Irizar, H., Castillo-Triviño, T., Muñoz-Culla, M., Osorio-Querejeta, I., Prada, A., et al. (2014). Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark. Med.* 8. doi:10.2217/BMM.14.9
- Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R., and Wewers, M. D. (2009). Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS ONE* 4:e7140. doi:10.1371/journal.pone.0007140
- Sbai, O., Ould-Yahoui, A., Ferhat, L., Gueye, Y., Bernard, A., Charrat, E., et al. (2010). Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. *Glia* 58, 344–366. doi:10.1002/glia.20927
- Selewski, D. T., Shah, G. V., Segal, B. M., Rajdev, P. A., and Mukherji, S. K. (2010). Natalizumab (Tysabri). *Am. J. Neuroradiol.* 31, 1588–1590. doi:10.3174/ajnr.A2226
- Sheremata, W., Jy, W., Horstman, L., Ahn, Y., Alexander, J. S., and Minagar, A. (2008). Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 5, 27. doi:10.1186/1742-2094-5-27
- Sheremata, W. A., Jy, W., Delgado, S., Minagar, A., McLarty, J., and Ahn, Y. (2006). Interferon-beta1a reduces plasma CD31+ endothelial microparticles (CD31+ EMP) in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 3, 23. doi:10.1186/1742-2094-3-23
- Smalheiser, N. R. (2009). Do neural cells communicate with endothelial cells via secretory exosomes and microvesicles? *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2009, 383086. doi:10.1155/2009/383086
- Street, J. M., Barran, P. E., Mackay, C. L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T. S., et al. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* 10, 5. doi:10.1186/1479-5876-10-5
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593. doi:10.1038/nri2567
- van der Vos, K. E., Balaj, L., Skog, J., and Breakefield, X. O. (2011). Brain tumor microvesicles: insights into intercellular communication in the nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 949–959. doi:10.1007/s10571-011-9697-y
- Verderio, C., Muzio, L., Turola, E., Bergami, A., Novellino, L., Ruffini, F., et al. (2012). Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann. Neurol.* 72, 610–624. doi:10.1002/ana.23627
- Waldenström, A., Genneback, N., Hellman, U., and Ronquist, G. (2012). Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS ONE* 7:e34653. doi:10.1371/journal.pone.0034653

Williams, J. L., Gatson, N. N., Smith, K. M., Almad, A., McTigue, D. M., and Whitacre, C. C. (2013). Serum exosomes in pregnancy-associated immune modulation and neuroprotection during CNS autoimmunity. *Clin. Immunol.* 149, 236–243. doi:10.1016/j.clim.2013.04.005

Witwer, K., Buzás, E., Bemis, L., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., et al. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles* 2, 20360. doi:10.3402/jev.v2i0.20360

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 22 January 2014; accepted: 17 March 2014; published online: 28 March 2014.

Citation: Sáenz-Cuesta M, Osorio-Querejeta I and Otaegui D (2014) Extracellular vesicles in multiple sclerosis: what are they telling us? *Front. Cell. Neurosci.* 8:100. doi: 10.3389/fncel.2014.00100

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2014 Sáenz-Cuesta, Osorio-Querejeta and Otaegui. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting

Matías Sáenz-Cuesta^{1,2}, Ander Arbelaiz^{3,4}, Amaia Oregi¹, Haritz Irizar^{1,2}, Iñaki Osorio-Querejeta^{1,2}, Maider Muñoz-Culla^{1,2}, Jesus M. Banales^{3,4,5,6,7}, Juan M. Falcón-Pérez^{5,6,8}, Javier Olascoaga^{1,2,9} and David Otaegui^{1,2}*

¹ Multiple Sclerosis Unit, Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain

² Spanish Network on Multiple Sclerosis, Madrid, Spain

³ Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Health Research Institute, Donostia University Hospital, San Sebastián, Spain

⁴ University of the Basque Country, San Sebastián, Spain

⁵ National Institute for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERhd, Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain

⁶ Ikerbasque - Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

⁷ Asociación Española Contra el Cáncer, Madrid, Spain

⁸ Metabolomics Unit, CIC bioGUNE, Derio, Spain

⁹ Department of Neurology, Donostia University Hospital, San Sebastián, Spain

Edited by:

Masaaki Murakami, Hokkaido University, Japan

Reviewed by:

Daisuke Kamimura, Hokkaido University, Japan

Yasunobu Arima, Osaka University, Japan

*Correspondence:

David Otaegui, Multiple Sclerosis Unit, Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, Dr. Begiristain s/n, San Sebastián 20014, Spain
e-mail: david.otaegui@biodonostia.org

The research in extracellular vesicles (EVs) has been rising during the last decade. However, there is no clear consensus on the most accurate protocol to isolate and analyze them. Besides, most of the current protocols are difficult to implement in a hospital setting due to being very time-consuming or to requirements of specific infrastructure. Thus, our aim is to compare five different protocols (comprising two different medium-speed differential centrifugation protocols; commercially polymeric precipitation – exoquick – acid precipitation; and ultracentrifugation) for blood and urine samples to determine the most suitable one for the isolation of EVs. Nanoparticle tracking analysis, flow cytometry, western blot (WB), electronic microscopy, and spectrophotometry were used to characterize basic aspects of EVs such as concentration, size distribution, cell-origin and transmembrane markers, and RNA concentration. The highest EV concentrations were obtained using the exoquick protocol, followed by both differential centrifugation protocols, while the ultracentrifugation and acid-precipitation protocols yielded considerably lower EV concentrations. The five protocols isolated EVs of similar characteristics regarding markers and RNA concentration; however, standard protocol recovered only small EVs. EV isolated with exoquick presented difficult to be analyzed with WB. The RNA concentrations obtained from urine-derived EVs were similar to those obtained from blood-derived ones, despite the urine EV concentration being 10–20 times lower. We consider that a medium-speed differential centrifugation could be suitable to be applied in a hospital setting as it requires the simplest infrastructure and recovers higher concentration of EV than standard protocol. A workflow from sampling to characterization of EVs is proposed.

Keywords: extracellular vesicles, protocol standardization, clinical application, nanoparticle tracking analysis, flow cytometry, translational research, urine

INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-bound particles shed from almost all cell types, carrying components from the cell donor such as lipids, proteins, RNA, glycolipids, and metabolites (1). It has been suggested that they play several biological roles like, for example, antigen presentation without cell contact (2), microenvironment modification, and distant cell education (3), roles that have been encompassed under the term “cell-to-cell contact-free communication”. In turn, their biological functions have been related to many pathophysiological processes, the most studied being cancer (4), immune-mediated diseases (5), and cardiovascular disorders (6).

A widespread concern in the biomedical research community is the gap between the basic research carried out in the laboratories

and the clinical setting where the new biological information should have a direct impact. Many researchers have directed their efforts toward bridging that gap and look for ways to translate lab findings into clinical solutions, emerging therefore the translational research. The translational research on EVs is not foreign to this goal: the current knowledge about EVs, mostly developed *in vitro*, has been proposed to be applied in a daily hospital routine giving answers to specific health queries (7–13). This possible application ranges from diagnostic to therapeutic objectives, including disease monitoring and the search of prognostic biomarkers, among others. But are the hospitals technologically prepared to employ EVs studies routinely?

The main steps for studying EVs and applying the results involve sampling (blood, urine, saliva, cerebrospinal fluid, joint

fluid, breast milk, ascitic fluid, etc.) and isolation, to be afterward characterized and analyzed their cargo and, finally, give a potential clinical interpretation and application. Concerning the first steps, sampling and pre-analytical parameters have been widely studied and are close to reach a consensus (14, 15). However, isolation is still a critical step due to several reasons. First, the methods to isolate EVs are currently highly diverse [reviewed by Momen-Heravi et al. (16) and Witwer et al. (17)] and depending on which one is employed, the results can be considerably different, even having started from the same sample. At the moment, most of them are based on EV density, including differential centrifugation steps from low speeds ($1,500 \times g$) to ultracentrifugation ($>100,000 \times g$), combined or not with density gradient and/or filtration. Precipitation using polymers and immunoaffinity agglutination are also widely used. Recently, the size-exclusion chromatography (18) and chip devices (19) have been added to the rest of methods. All of them, either by themselves or in combination, yield a solution enriched in EVs in different extents. Finally, depending on several factors such as time consumption, cost, friendly use, and reproducibility, these methods are or not able to be applied in a daily clinical routine. Despite lots of important works shedding light on this field, there is still a lack of consensus (20) evidencing the urgent need of standardized protocols appropriate for hospitals.

Considering the problems and needs regarding the use of EVs in a clinical setting, we established the following objectives for the

present study: to compare several protocols for EVs isolation and to analyze which of them could be the most suitable one to be used in daily clinical setting.

MATERIAL AND METHODS

Blood and urine are the most widely used samples in a hospital setting, as they provide useful information and they are easy to obtain with minimally invasive techniques. Thus, we decided to isolate EVs from these biofluids as the starting point for EV isolation.

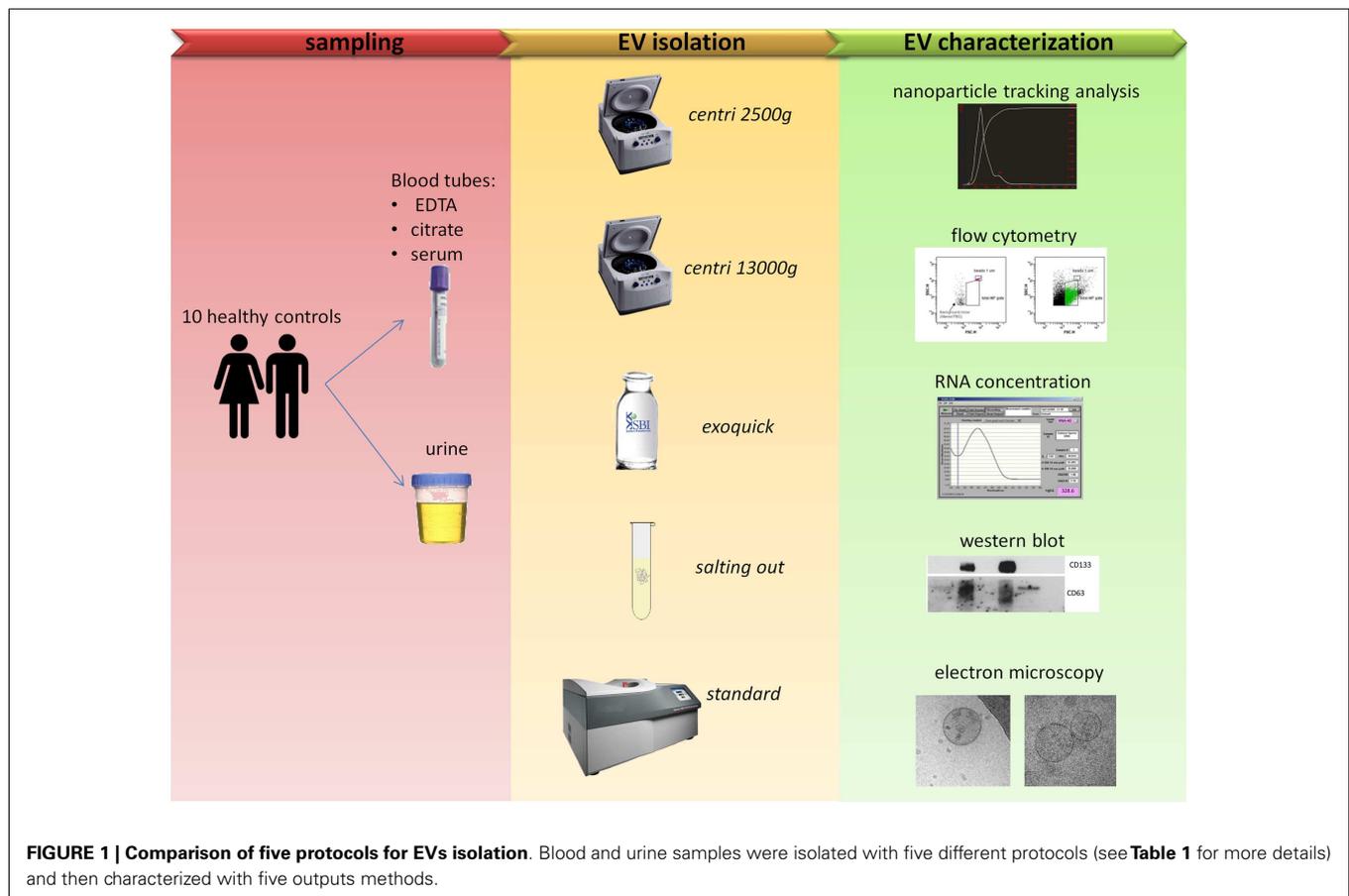
Samples were collected from 10 healthy individuals (5 males and 5 females; average age = 37 ± 8 years old) and stored according to the criteria of the Donostia node of the Basque Biobank. All subjects gave written informed consent and the study was approved by the Hospital Ethics Committee.

Donors underwent a questionnaire about recent exercising (within the last hour), drugs/medication intake, ovulatory cycle, acute illness, and sleeping hours.

The workflow followed in the present work is summarized in **Figure 1**.

BLOOD

Peripheral blood samples were collected at the Donostia University Hospital at 8:30 a.m. on fasting and were processed separately (without pooling them) within the first hour. After discarding the first milliliter, blood collection was done by venipuncture with a



21-gage needle in a 10-ml EDTA tube, a 3.8-ml citrate tube, and a 8-ml serum tube [Vacutainer, Becton Dickinson (BD)], kept upright and centrifuged at $2,500 \times g$ during 15 min. The supernatant was recovered to obtain platelet-poor plasma (PPP) or platelet-poor serum, being these samples the starting point for all the protocols. Besides, additional blood samples were collected in EDTA and serum tubes to perform a hemogram and obtain protein and lipid profiles in the core laboratory of the Hospital. The parameters tested are shown in **Table 1**.

Although we collected plasma and serum from peripheral blood, the present work is focused on plasma. In this sense, we are going to refer only to plasma in all the sections of “Materials and Methods” for the sake of simplicity. The results and discussion of blood-derived EVs will be also centered on plasma and only relevant results will be presented in the case of serum.

URINE

Sixty milliliter-first void of the day was collected in aseptic conditions by each individual at home, kept at 4°C until their processing with an average time of 2.7 h between collection and processing. Ten milliliters were sent to the core laboratory for the analysis of the most common urine parameters (**Table 1**). The rest was aliquoted in five tubes of 10 ml and centrifuged at $2,500 \times g$ for 15 min in order to obtain cell-free urine (CFU).

EV isolation protocols

The protocols described below are summarized in **Table 2**.

Centri2500. This method is based on the protocol published by Lacroix and colleagues (14). Briefly, 1.3 ml of PPP or 9.5 ml of CFU obtained at the first centrifugation are centrifuged again at $2,500 \times g$ during 15 min to get 1 ml of platelet-free plasma (PFP) or 9 ml of debris-free urine (DFU). Both PFP and DFU samples were stored at -80°C for later use. When needed, samples

were thawed on ice and centrifuged once again at $20,000 \times g$ during 20 min to pellet the EVs, discarding 900 μl of supernatant, following the protocols described by Ashcroft and colleagues (21) and Jayachandran and colleagues (22). The pellet containing the EVs was resuspended in 100 μl of PBS (GIBCO, Life Technologies) filtered twice through a 0.22 μm -pore filter.

Centri13000. This method is based on the protocol published by Dey-Hazra and colleagues (23) and Dignat-George and colleagues (24). In brief, it is a modification of the previous method where the second centrifugation performed on the 1.3 ml of PPP was done at 13,000 during 2 min to obtain PFP or DFU. The rest of the protocol was the same as the previous one. To note, this protocol was not performed for urine samples.

Exoquick. The basis for this method lays on the precipitation of EVs using a commercial agglutinating agent and was performed following the manufacturer’s instructions. In summary, 63 μl or 2 ml of exoquick TC (System Biosciences) were added either to 250 μl of PPP or to 9.5 ml of CFU, respectively, and the mix was incubated overnight at 4°C with no rotation. Then, two centrifugation steps were performed at $1,500 \times g$ for 30 and 5 min, respectively, to sediment the EVs and the pellet was resuspended in 200 μl of PBS. It needs to be noted that, although the first versions of the manufacturer’s instructions included a filtering step using a 0.45 μm -pore filter, it was removed in the latest version and, thus, it has not been included in our protocol.

Salting out. This method has been adapted from the protocol recently published by Brownlee and colleagues (25) and it is based on the precipitation of EVs through an aggregate of sodium acetate 1 M, pH 4.75. A centrifugation was performed on 1.3 ml of PPP or 9.5 ml of DFU at $13,000 \times g$ for 30 min; we collected the supernatant (1 ml of PPP or 9 ml of DFU), added sodium acetate (dilution 1/10), and incubated on ice for 60 min and, subsequently at 37°C for 5 min. The dilution was then centrifuged at $5,000 \times g$ during 10 min and the resulting pellet was washed with

Table 1 | Lab parameters analyzed in blood and urine samples.

| | | | |
|---|---|------------------|------------------|
| Blood | Creatinine (mg/dl) | 0.9 ± 0.3 | |
| | Total cholesterol (mg/dl) | 184.9 ± 37.7 | |
| | HDL (mg/dl) | 69.9 ± 14.1 | |
| | Triglycerides (mg/dl) | 65.7 ± 20.1 | |
| | LDL (mg/dl) | 101.9 ± 37.5 | |
| | Total proteins (g/dl) | 7.2 ± 0.6 | |
| | Albumin (g/dl) | 4.3 ± 0.3 | |
| | Hematocrit (%) | 41.7 ± 3.4 | |
| | Leukocyte ($10e3/\mu\text{l}$) | 7.0 ± 2.5 | |
| | Platelet count ($10e3/\mu\text{l}$) | 238.7 ± 56.7 | |
| | Lymphocyte count ($10e3/\mu\text{l}$) | 1.9 ± 0.5 | |
| | Urine | Density (g/l) | 1019.4 ± 7.7 |
| | | pH | 6.0 ± 0.9 |
| Glomerular filtrate ($\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$) | | 84.3 ± 15.5 | |
| Erythrocyte count (ery./ μl) | | Negative | |
| Leukocyte count (leu./ μl) | | Negative | |
| Epithelial cell count (cells/ μl) | | Negative | |

Values represent the mean \pm SD from the 10 healthy controls.

Table 2 | EV isolation methods compared in this work.

| Method | Isolation principle | Steps |
|-------------|---|--|
| Centri2500 | Differential centrifugation | $2500 \times g$ 15' \times 2 + $20,000 \times g$ 20' to pellet the EVs |
| Centri13000 | Differential centrifugation | $2500 \times g$ 15' + $13,000 \times g$ 2' + $20,000 \times g$ 20' to pellet the EVs |
| Exoquick | Agglutination-precipitation | $2500 \times g$ 15' + agglutination with exoquick + $1500 \times g$ 30' and 5' to pellet the EVs |
| Salting out | Precipitation | $2500 \times g$ 15' + $13000 \times g$ 30' + acid precipitation + $5000 \times g$ 10' to pellet the EVs |
| Standard | Differential centrifugation – size filtration – ultracentrifugation | $2500 \times g$ 15' + 0.22- μm filter + $10,000 \times g$ 30' + $1,00,000 \times g$ 75' to pellet the EVs |

a buffer with sodium acetate at 0.1 M to be finally resuspended in 200 μ l of PBS.

Standard. This is the method considered as the standard isolation protocol nowadays (26). The starting point was 1.3 ml of PPP or 9.5 ml of CFU that were filtered through a 0.22 μ m-pore filter and centrifuged at $10,000 \times g$ during 30 min to obtain either PFP or DFU. These were ultracentrifuged at $100,000 \times g$ in an Optima MAX tabletop centrifuge (Beckman Coulter) during 75 min. The resulting EV pellet was resuspended in 200 μ l of filtered PBS.

EV detection and characterization methods

Nanoparticle tracking analysis. The size distribution and concentration of EVs were measured using a NanoSight LM10 machine (NanoSight). All the parameters of the analysis were set at the same values for all samples and 1 min-long videos were recorded in all cases. Background was measured by testing filtered PBS, which revealed no signal. The EVs obtained from PFP (5 μ l) were diluted with filtered PBS to 1:150 and the ones obtained from DFU (5 μ l) to 1:50. For each sample, two measurements were performed. It is necessary for a minimum of 200 tracks (movements of single particles recorded by a camera) to obtain valid results. The following parameters were measured: the mean and mode of the size distribution and the concentration of EVs (27).

Flow cytometry. The labeling and gating of EVs were performed as described by Sáenz-Cuesta and colleagues (28). Briefly, 4 μ l of CD61-PE (Cytgonos) or CD45-PE (BD) monoclonal antibodies were mixed with 40 μ l of resuspended EVs and incubated for 20 min. Next, labeled EVs were washed once with 300 μ l of filtered PBS, resuspended in further 200 μ l of filtered PBS and acquired at low rate in a FACS Canto II flow cytometer (BD). Side and forward scatter were measured on a logarithmic scale with the threshold set at 300 for each parameter to avoid instrument noise (background signal). Then, the lower limit was defined with the exclusion of background noise given by the signal of PBS filtered twice. To define the upper limit of the total MP gate, 1- μ m non-labeled polystyrene latex beads were used (Sigma-Aldrich). The events that appeared in this region were included in the total EV count and were further analyzed for specific labeling (positive for PE marker). We defined CD61+ EVs as platelet-derived EVs (PEV) and CD45+ EVs as leukocyte-derived EVs (LEV). The total and cellular origin-specific EV concentrations were obtained using Trucount™ tubes [BD; Ref. (28)].

Western blot. Primary CD133 (Miltenyi Biotec S. L) and CD63 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) antibodies were used to study specific EV transmembrane markers. Mouse and rabbit HRP-conjugated antibodies (Cell Signaling) were employed as secondary antibodies. All protein procedures were done at non-reducing conditions. Samples (10 μ l of PBS-resuspended EVs) were incubated at 95°C for 5 min, separated in SDS polyacrilamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% milk (w/v) in TBS solution with 0.1% Tween-20 (T-TBS) and incubated in the same solution with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies were washed with the T-TBS solution

and incubation with secondary HRP-conjugated antibodies was performed at room temperature for 1 h in the same solution used for the primary antibodies. After washing with T-TBS solution, the HRP signal was detected by a chemiluminiscent reaction with the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

RNA isolation. A 185 μ l-aliquot of resuspended EVs was used to extract total RNA with the miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen). RNA concentration was measured with the nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

Cryo-electron microscopy. The cryo-electron microscopy (EM) was performed following the protocol used by Perez and colleagues (29). Briefly, 10 μ l of EV preparations were directly adsorbed onto glow-discharged holey carbon grids (QUANTIFOIL Micro Tools GmbH). Grids were blotted at 95% of humidity and rapidly plunged into liquid ethane with the aid of VITROBOT (Maas-tricht Instruments B). Vitrified samples were imaged at liquid nitrogen temperature using a JEM-2200FS/CR transmission cryo-electron microscope (JEOL) equipped with a field emission gun and operated at an acceleration voltage of 200 kV.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with PASW Statistics v18.0 (SPSS Inc.). Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests were used to check normality of distributions. As all of the variables were shown to follow a normal distribution, *T*-tests were applied to assess differences between the groups. Pearson's *R* correlations were computed to explore the relations between lab parameters and some EV parameters. Both differences between groups and correlations between variables were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

BLOOD

EV concentration

Extracellular vesicles concentration was measured using two independent methods: nanoparticle tracking analysis (NTA) and conventional flow cytometry (FC). It is to be noted that the lower detection limits are different, being 50 nm for NTA (27) and around 400 nm for FC (30).

Nanoparticle tracking analysis

When using NTA, the software requires a minimum of 200 tracks during the capture time of the video. In the case of the samples processed with the salting out and standard methods, only few of them reached that minimum. This was critical for NTA analysis causing a high variability on these samples (Figures 2A,E). The exoquick method yielded higher EV concentration values than any other method used. We obtained four times higher EV concentration with exoquick than with centri2500 ($p = 0.007$) and centri13000 ($p = 0.05$) and 23 times higher concentration values comparing to salting out ($p = 0.002$) and standard ($p = 0.002$) methods (Figure 2A). No significant differences have been found either between the EV concentrations obtained with the centri2500 and centri13000 methods, or between those yielded by the standard and the salting out methods. However, there are significant

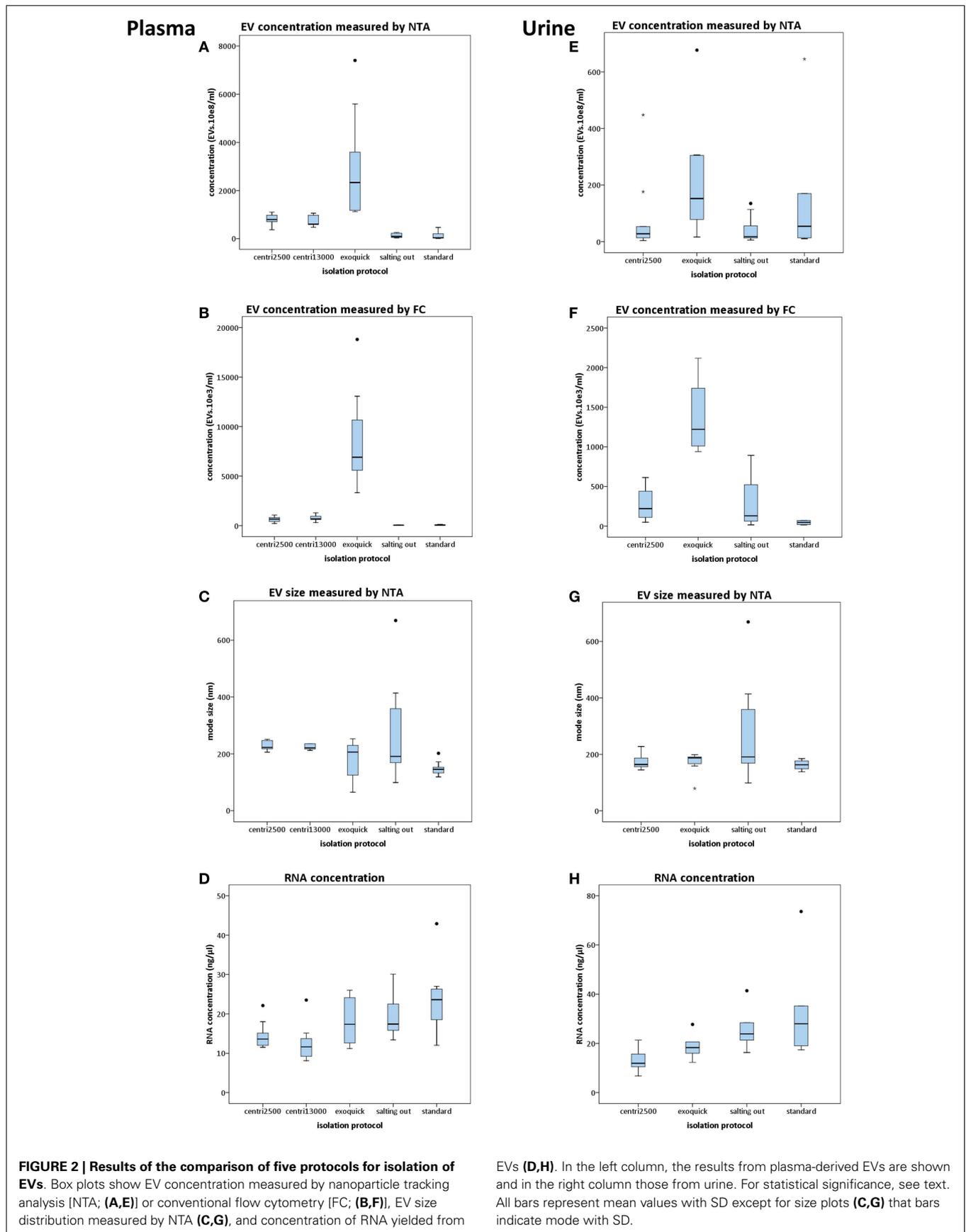


FIGURE 2 | Results of the comparison of five protocols for isolation of EVs. Box plots show EV concentration measured by nanoparticle tracking analysis [NTA; (A,E)] or conventional flow cytometry [FC; (B,F)], EV size distribution measured by NTA (C,G), and concentration of RNA yielded from

EVs (D,H). In the left column, the results from plasma-derived EVs are shown and in the right column those from urine. For statistical significance, see text. All bars represent mean values with SD except for size plots (C,G) that bars indicate mode with SD.

differences between these two groups of methods (**Figure 2A**) obtaining a p value of <0.001 for both *centri2500* vs. *salting out* and *standard* and 0.002 and <0.001 for *centri13000* vs. *salting out* and *standard* respectively. Regarding the EVs isolated from serum, they were obtained using the *exoquick*, *centri13000*, and *standard* protocols and we have observed that, as it happens with plasma, the *exoquick* method yields significantly higher EV concentrations than the other two methods. When we compared serum and plasma considering all isolation methods, 3.4 times higher EV concentrations have been observed for serum using *exoquick* and 1.3 times higher ones when using *centri13000*, but these comparison did not reach statistical significance (see Table S1 in Supplementary Material).

Flow cytometry. Although the EV concentrations obtained using FC were lower than those obtained by NTA, there was good correlation between the concentration profiles yielded by each approach when using the averages for each isolation method for the comparison ($R = 0.99$; $p < 0.001$). Nevertheless, no significant correlations were observed when performing the analysis for each isolation method separately. Besides, significant differences were observed between all isolation methods except for *centri2500* vs. *centri13000* and *salting out* vs. *standard* (**Figure 2B**).

EV size

There is great similarity between the modes of EV size obtained with the different isolation protocols ranging from 150 to 277 nm, average of mode size: 228 nm (**Figure 2C**). In accordance to these results, the EM images show EVs with a size between 100 and 200 nm (**Figure 3A**). Significant differences in size only exist between the EVs isolated with the *standard* method when compared to those obtained through the *centri2500* and *centri13000* methods, being the former the smallest of all at 158.7 nm. Besides, the EM images of the EVs obtained with *exoquick* present several filamentous aggregates and other globular structures not considered EVs.

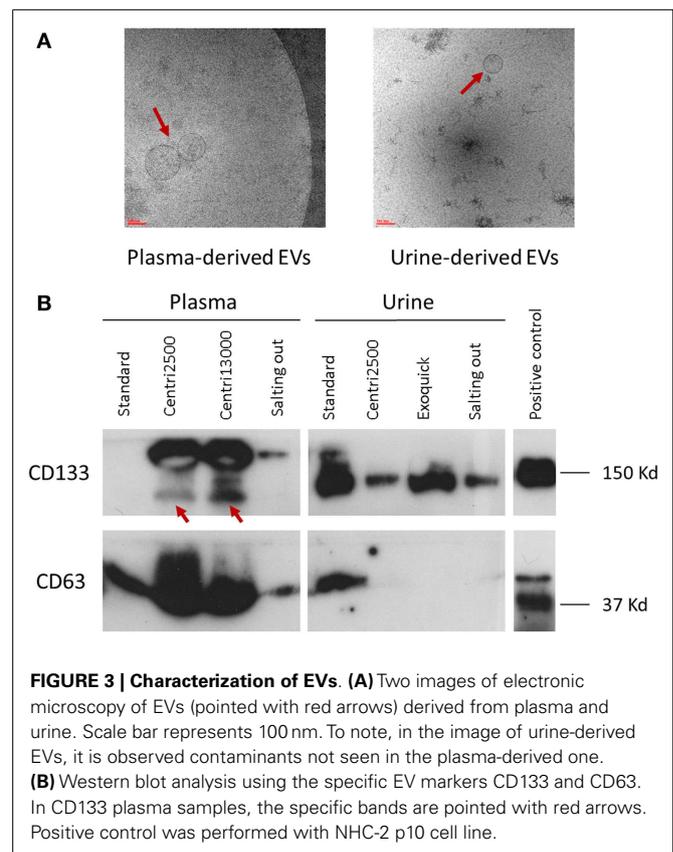
RNA concentration in EVs

Despite the *salting out* and the *standard* methods being the ones that yield the lowest EV concentrations, the highest RNA concentrations have been obtained through these methods (19.5 ± 5.7 and 23.6 ± 8.2 ng/ μ l, respectively), higher than with the *centri2500* and *centri13000* methods (14.5 ± 3.3 and 12.5 ± 4.5 ng/ μ l, respectively). It is remarkable that *exoquick* yields 18.1 ± 6.0 ng/ μ l of RNA, despite having isolated around 23 times more EVs than the *salting out* and *standard* methods (**Figure 2D**).

Western blot

The detection of EV markers through western blot (WB) was used as a confirmation of the presence of EVs in the solutions obtained at the end of the isolation protocols. The objective was not to perform a detailed characterization of the markers, but to look for differences in their detection between the different methods.

Great inter-method variability has been observed. Briefly, CD63 detection is better in EVs isolated from plasma than in those obtained from serum. Among the plasma-derived EVs, CD133 showed better signal for *centri2500* and *centri13000* than for the



salting out and the *standard* protocols. The detection of CD133 was also worse in serum-derived sample than in plasma-derived samples. Nonetheless, CD133 detection was better in urine-derived EVs than in the samples obtained from blood (**Figure 3B**). It is of note that the EVs isolated with *exoquick* could not be used for WB marker analysis using plasma samples due to be impossible to dissolve its pellet.

URINE

EV concentration

In the NTA analysis of the EVs isolated from urine, we have observed that the concentrations were as low as the great majority of the samples have not reached the minimum track-count. Thus, once again the interpretation of NTA data from urine-derived EVs was carried out with caution. *Exoquick* was the method that yields the highest EV concentrations from urine using either NTA or FC, followed by the *standard* protocol. The *centri2500* and *salting out* protocols yielded very similar concentrations. **Figures 2E,F** summarizes the EV concentration results from the application of the different protocols to urine as measured by NTA and FC, respectively (for p values, please see Table S1 in Supplementary Material). In summary, using both NTA and FC, we obtained a similar concentration profile to that of blood but with 10–20 times lower concentrations.

EVs size

The modes of the size distributions obtained with the different protocols were similar and, the average of these modes (207 nm)

was similar to that achieved in blood samples (228 nm). As it happened with blood samples, the smaller EVs were isolated with the *standard* method (162.5 nm) comparing to the other protocols (Figure 2G). The results of the size assessed by NTA were, once again, consistent with the observations done using EM. In most of these urine samples, the number of contaminating particles that could not be considered EVs was higher than in blood (Figure 3A).

RNA concentration in EVs

Higher RNA concentrations were obtained from EVs isolated with the *standard* (33 ng/ μ l) and *salting out* (25.9 ng/ μ l) methods and even higher than the concentrations obtained from blood samples, where the EV concentration was from 10 to 20 times higher than in urine (Figure 2H).

Western blot

The EV samples isolated from urine using *exoquick*, in contrast to the ones isolated from plasma, can be used for marker analysis with WB (Figure 3B).

In brief, CD133 detection in urine-derived samples is better with precipitant agents (*exoquick* and *salting out* methods) than with centrifugation methods, although the *standard* shows better results in urine and serum than in plasma. On the opposite, CD63 signal is weak in urine-derived samples compared to that of plasma- or serum-derived samples for all methods.

CORRELATION WITH LABORATORY PARAMETERS

We have also tested whether the EV concentration values obtained with different methods and the different types of samples (plasma, serum, or urine) could be reflected in some of the lab parameters measured in blood and urine, especially the ones that are related to the main components of EVs, i.e., lipids and proteins. Furthermore, the analysis of these correlations would serve to test a possible interference in EV quantification produced by these parameters, a phenomenon that has been previously described (31).

Interestingly, a significant correlation has been observed between the concentration, as measured by NTA, of the EVs isolated from plasma with the *centri13000* method and the total cholesterol ($R = 0.953$; $p = 0.003$) and LDL concentrations ($R = 0.935$; $p = 0.006$) in blood. We have also detected a significant correlation between the NTA-measured concentration of the plasma-derived EVs isolated using the *standard* method and the concentration of triglycerides in blood ($R = 0.789$; $p = 0.007$).

No significant correlation has been found between the concentrations of the EVs of specific cell-origins and the concentrations of the respective source cells in blood. The concentrations of CD61+ (platelet origin) or CD45+ (leukocyte origin) EVs are plotted in Figure S1 in Supplementary Material.

In regard to the EVs isolated from urine, the only significant correlation we have observed is the one between the density of urine and concentration of EVs, measured with both NTA and FC, isolated with the *salting out* protocol ($R = 0.841$; $p = 0.002$ for NTA and $R = 1.000$; $p = > 0.001$ for FC).

DISCUSSION

In the present work, we have studied and compared several widely used methods for the isolation of EVs, including differential centrifugation, agglutination, precipitation, and the one considered

the standard that includes ultracentrifugation (plus filter). All methods under study can be applied using relatively simple technology, with the exception of ultracentrifugation, which must be performed with an instrumentation that, even if it is easy to use, is not usually found in most hospital laboratories. The election of one or other method as the most suitable one to be used in a hospital setting greatly depends on the goals to be reached with the method, which could be, among others: to maximize the final EV concentration, to obtain high levels of purity as measured by markers and several classical characteristics of EVs, to select one of the three fundamental types of EVs (exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies) or to get the less time and/or money consuming protocol. We have set the first two as preferential aims, leaving the rest out of the scope of this work.

ISOLATING EVs

We have observed that, besides being the method that can be implemented most easily (it is quick and relies on very little technology), *exoquick* is also the method that yields, in a statistically significant manner, the highest concentration of EVs (as measured by NTA and FC) compared to the other four isolation protocols. The EV quantity is even higher when using serum as the starting sample. On top of that, to dissolve the pellet obtained using *exoquick* from serum-derived samples is notably easier than plasma-derived samples. Nonetheless, the considerably higher EV concentrations obtained with *exoquick* (23 times higher than those obtained with the *standard* protocol) could be linked to the aggregation and precipitation of other elements in suspension in the sample that are not necessarily EVs; as it can be observed in the images obtained by EM. Taylor and colleagues (32) demonstrated that using *exoquick* more EVs are isolated than using ultracentrifugation (*standard*), chromatography, and magnetic beads, and with a higher purity of exosomal RNA and proteins. Our results only partially coincide with the observations of Taylor and colleagues, as the RNA concentration we obtained with *exoquick* is lower than that yielded by the *standard* method. In another study that compared the *exoquick* method with the *standard* method, the authors concluded that a combination of these two methods is the protocol that yields the highest EV counts, although exosomes of higher quality were obtained combining the *standard* method with the sucrose density gradient (33). Yet, *Exoquick* is the most expensive of the methods used in the present work.

The differences in EV concentration between the two centrifugation methods (*centri2500* and *centri13000*) are not statistically significant. The sole differences are that the cluster of EVs observed by FC in the FSC/SSC dotplot shows less debris around in the case of *centri13000* and that the EVs isolated with this method also show a stronger labeling of CD63 in WB. The conclusions reached at the workshop of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Hemostasis to promote the use of these protocols (15) and aimed to reducing the variability due to a resuspension of the pellet (24). Nonetheless, in our opinion, the main drawback of this proposal is that, as the EVs are not concentrated in a pellet-like, we performed with the final centrifugation at 20,000 \times g, a pellet-washing step cannot be introduced and EVs are maintained in dissolution along with many other contaminating particles such as protein aggregates.

Regarding size, very similar EV sizes have been obtained with these two methods, even when measuring size on EM imagery. These suggest that the second centrifugation is probably not that critical and could vary, at least between 2,500 and 13,000 $\times g$, with the objective of eliminating cell debris. Moreover, these methods collect six times higher EV concentrations than the *standard* protocols, what can be explained by the fact that they are less restrictive methods. Finally, the technical requirements for the use of these methods are usually met in most basic research laboratories and they are considerably less time-consuming than the *standard* method.

Ultracentrifugation is nowadays the “*gold standard*” method for the isolation of EVs, fundamentally exosomes. With the aim of finding alternative methods to this protocol, Brownlee and colleagues (25) have recently described a new method called *salting out*, based on the precipitation of EVs using the aggregate of acetic acid. In the present study, the *salting out* method yielded the lowest EV concentrations when compared to the other protocols, although showing similar values to those obtained with the *standard* method as the authors of the aforementioned article also pointed. It has to be noted, though, that Brownlee and colleagues isolated EVs from cell culture supernatants and, thus, comparisons with the present work must be done with caution.

Although out of the main objectives of this work, we have also compared the EVs isolated from three different types of samples: plasma, serum, and urine. We have observed that higher concentrations of EVs are obtained from serum than from plasma for all methods, and 10–20 times more, depending on the method, when comparing plasma with urine. As comparisons between serum and plasma have been performed by other authors (34, 35), we just present our results.

The EV size distributions that we have obtained with the *exoquick*, *salting out*, *centri2500*, and *centri13000* methods are very similar, being the EVs with a size below 200 nm the most abundant. Nevertheless, a cluster of EVs can be observed with a size around 500–600 nm that could represent the population of microparticles. On the contrary, the *standard* method isolates smaller EVs as it uses a 0.22 μm -pore filter leaving out the bigger EVs (microparticles and apoptotic bodies). We agree with Jy and colleagues (36) that the capacity of the first four methods to isolate the bigger EVs can be useful when applying these protocols in clinical practice.

In the case of urine, very low EV concentrations have been obtained with the five methods and, thus, we recommend not to dilute or to dilute very little urine-derived samples before analyzing them by NTA, FC, and WB. Once again, *exoquick* was the method that yields the highest concentrations according to other authors' results (37). Certainly, when using urine samples, it would be of great consequence to avoid contaminating proteins such as Tamm–Horsfall, which traps EVs but it can be removed with the simple addition of dithiothreitol and heat (38). Furthermore, Rood et al. (18) suggest that the most effective method in terms of purity for urine-derived EVs to undergo downstream proteomic analysis is the combination of ultracentrifugation followed by size-exclusion chromatography. The major disadvantage of this protocol would be that it is time-consuming and it requires of specific infrastructure that make it difficult to be compatible with clinical applications.

DETECTING AND CHARACTERIZING EVs

During the processing, after the centrifugation at 20,000 $\times g$ for 20 min, a fine lipidic layer could be observed in some of the samples. This corresponded to a FC image with a higher EV density (data not shown). Nevertheless, the presence of this layer did not show correlation with NTA results. It is well known that the density and size of the EVs can overlap with these of lipoproteins and this can produce artifactual results in FC analyses (31). Besides, we have found positive correlation between the LDL levels in blood and the concentration of EVs obtained with several methods, which suggests that, when isolating the EVs, some LDL particles are also dragged and counted as EVs. One approach to measure the purity of EVs is the EV/protein ratio (39), a method that is easy to use and yield reproducible results. However, it remains out of the scope of the present work.

The most widely used methods for the quantification of EVs are NTA and FC. According to our data, the results yielded by these two methods are not interchangeable, probably because the size ranges that they can analyze are different. The correlation between the two methods would be better studied using only the concentration of EVs larger than 400 nm, as this is the minimum size for the FC analysis. Nevertheless, we have looked for correlation using concentration results for EVs larger than 400 nm in another dataset (data not shown) and we have found none. Thus, we consider that these two quantification methods do not exclude each other but are complementary, as NTA gives more accurate counts but FC allows the characterization of distinct cellular origins.

From the comparison of the methods that we have used to study the size of EVs, we can conclude that, while the NTA, as it allows to recover information from individual particles, allows to obtain and compare size distributions, EM provides more robust information on the characteristics of EVs but size distributions cannot be obtained through EM imagery. Furthermore, NTA has the advantage of performing a multiple analysis in few minutes.

Tetraspanins have been widely used as general markers of EVs; however, during the last years, some works have provided evidence that not all vesicles express them at the same levels suggesting that different EV subsets could coexist in the same pellet (40, 41). In the case of urine-derived EVs, our results present low or undetectable levels of CD63 except for those obtained with the *standard* protocol (**Figure 3B**). Both the previously described lack of CD63 in urine-derived EVs larger than 100 nm (42) and its expression in EVs obtained with the *standard* protocol (43, 44) are congruent with our results. In the other hand, we found expression of CD133 with all the methods. In agreement with other authors, we concluded that the presence of CD133+/CD63– EVs demonstrate the recovery of the large ones that usually express this pattern of markers (45–47). Moreover, Bobrie and colleagues described the CD63 as a variable marker found only in a fraction of the sucrose gradient (40), which implies questioning the use of CD63 as a standard EV marker (48). Finally, the expression of CD63 is susceptible to SCORT regulation leading to the blockage of the budding of this EV subset (49) and this mechanism could hypothetically be more frequent in urine-derived EVs. Regarding to plasma-derived EVs, the detection of the opposite pattern (CD133–/CD63+) in the EVs obtained with *standard* protocol unravel the isolation of a specific EV fraction, being probably only exosomes (46).

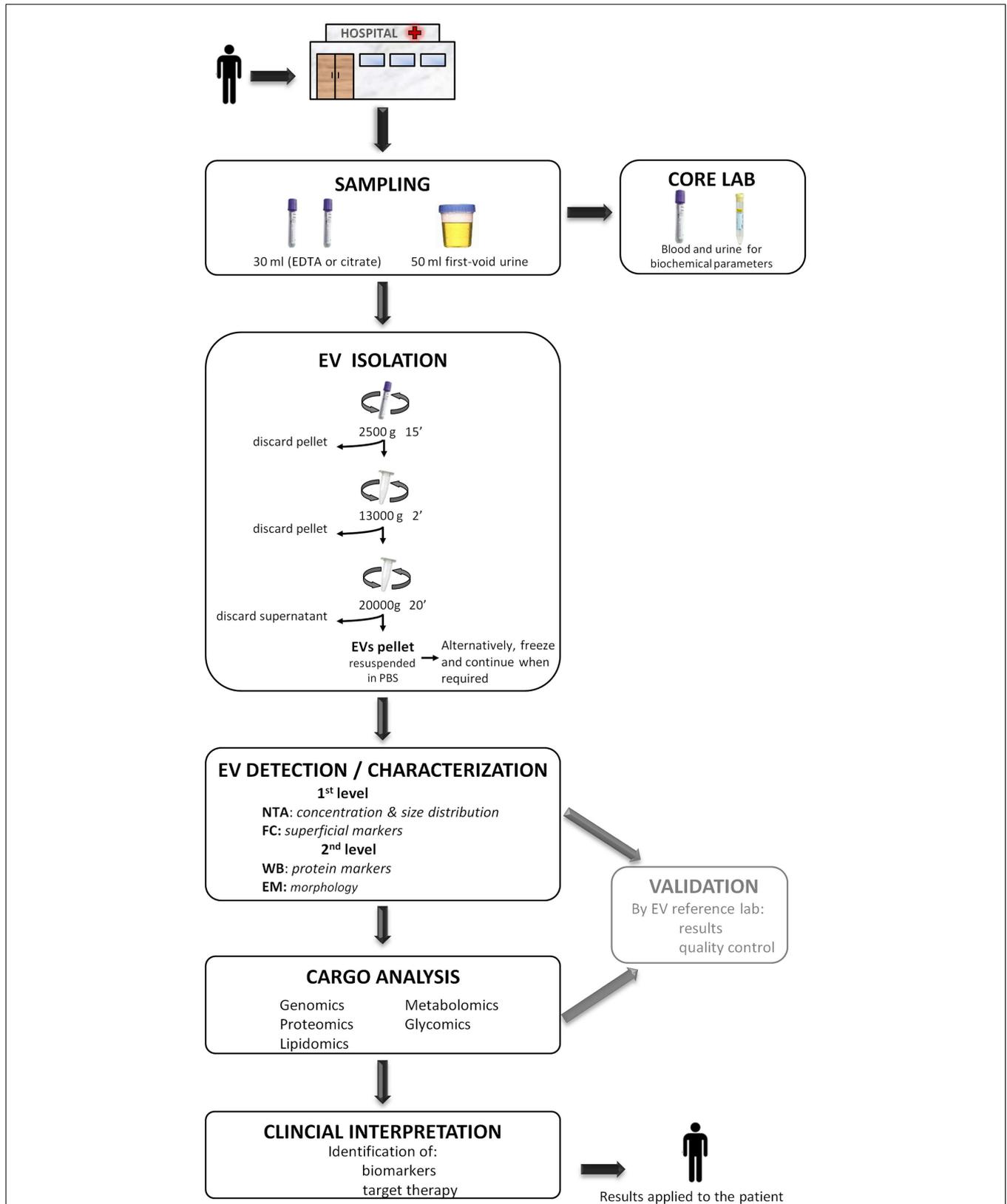


FIGURE 4 | A proposed workflow for the study of extracellular vesicles (EVs) in a hospital setting.

(Continued)

FIGURE 4 | Continued

Patients visited during the morning in the hospital, preferentially on fasting, undergo sample collection of 30 ml of blood (EDTA or citrate) and 50 ml of the first void urine. Immediately, 15 ml of blood and 40 ml of urine are destined to the EV isolation protocol to obtain a pellet and the rest 15 and 10 ml are sent to the core laboratory to analyze biochemical parameters. The obtained EV pellet resuspended in PBS could optionally be frozen at -80°C and continue when required. Next, the detection/characterization of EV is divided in two levels for quantification, size [nanoparticle tracking analysis (NTA)], and initial characterization with flow cytometry (FC) followed by an extensive

description with western blot (WB) and electronic microscopy (EM).

Subsequently, the analysis of EV cargo with several omics platforms allows the identification of specific compounds carried by EVs. EVs detection and their cargo analysis could optionally be referenced, at least during the initial setting of this workflow, to an expert EV laboratory in order to provide a validation of the results and pass a quality control test. Finally, the detected molecules are interpreted in the whole context of the patient with the aim of identifying biomarkers or a target for a putative therapy. The results provided by the study of EV are applied back to the patient improving the diagnosis or course of the disease.

Regarding the RNA concentrations yielded by the different EV isolation methods, we have observed great variability. Although Taylor and colleagues conclude that *exoquick* isolates more than, among other methods, ultracentrifugation (32), we have observed, unexpectedly, that the RNA concentrations obtained with the different methods are very similar, despite the notable differences in EV concentrations. Surprisingly, high RNA concentrations were obtained from urine (especially when using the *salting out* and *standard* methods), concentrations similar to or even higher than those obtained from plasma and serum, regardless of EV concentrations being between 10 and 20 times lower. These results lead us to think that, as we have not used RNases, we are measuring the concentration not only of the RNA contained in the EVs but of the free RNA. In a position paper of the International Society of Extracellular Vesicles, the authors suggest that the use of RNases only removes the free RNA not specifically bound to EVs, while their use in combination with proteases also removes the nucleoproteic complexes (50). In any case, if the final objective is to use the RNA as a source of potential biomarker, we believe that it would be useful to preserve not only the RNA inside the EVs but the RNA stuck to their membrane.

EVs FROM BENCH TO BEDSIDE

The importance of the study of EVs in a hospital setting to complement the diagnosis and prognosis of several diseases has been well demonstrated (51–53). Moreover, their application in therapeutic approaches has already been tested in clinical trials with promising results (54). Nonetheless, we believe that the workflows from the collection of the samples aimed at the isolation, processing, and characterization of EVs to yield significant results to be applied on patients need to be urgently standardized. Specifically, the different isolation method can yield different types of EVs and, thus, omics studies performed on them could give incomparable results. Besides, not all methods are applicable in a hospital setting.

With aim of contributing to this debate and in accordance to the results of the present work, we consider that the *centri13000* method is the most suitable one to be used in a hospital setting as (a) it requires a simple infrastructure (and does not require ultracentrifuge) that is available in any general laboratory, (b) isolates EVs with similar characteristics to the ones isolated with the *standard* method but in higher concentrations, (c) it recovers not only small EVs as standard does but also the largest, and (d) in analysis with FC and WB showed less contamination when comparing with *centri2500*. We concur with Deun and colleagues (55) in that it is necessary for a validation of the isolation procedure and we propose that this validation could be carried out in referent

laboratories lead by group with great expertise in the study of EVs. The results obtained in the hospital setting should be compared to those obtained by the reference lab to assure a quality control. On the other, for the posterior detection and characterization of EVs, we recommend to analyze them with at least one quantification method (NTA or FC) and one characterization method (WB, EM, or FC) as they provide complementary information. **Figure 4** summarizes a proposed workflow based on the discussion above.

To conclude, the isolation of EVs, at least for plasma-derived ones, through differential centrifugation at medium speed (*centri13000*) and their posterior analysis with at least one quantification method (NTA, for example) and another characterization method (FC or WB, for example) could fit in a workflow that goes from the patient to lab and all the way back to the patient and would contribute to face several health problems.

ACKNOWLEDGMENTS

We especially thank Lucía Sepúlveda for technical support. *Funding*: this work was supported partially by two grants from the Basque Government: SAIOTEK program (SAIO11-PC11BN3) and Health Department (GV-2011111028).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2015.00050/abstract>

REFERENCES

- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* (2012) **1820**(7):940–8. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* (1998) **4**(5):594–600. doi:10.1038/nm0598-594
- Peinado H, Ale M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* (2012) **18**(6):883–91. doi:10.1038/nm.2753
- Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging science of cellular “debris”. *Semin Immunopathol* (2011) **33**(5):455–67. doi:10.1007/s00281-011-0250-3
- Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* (2014) **14**(3):195–208. doi:10.1038/nri3622
- Fleury A, Martinez MC, Le Lay S. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front Immunol* (2014) **5**(August):370. doi:10.3389/fimmu.2014.00370
- García-Contreras M, Robbins PD. Exosomes and microvesicles: applications for translational research from biomarkers to therapeutic applications. 2013

- ASMEV meeting report. *CellR4* (2013) 1(2):e412; 173–5. Available from: <http://www.cellr4.org/article/412>
8. El Andaloussi S, Mager I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* (2013) 12(5):347–57. doi:10.1038/nrd3978
 9. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* (2011) 68(16):2667–88. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
 10. Santiago-Dieppa DR, Steinberg J, Gonda D, Cheung VJ, Carter BS, Chen CC. Extracellular vesicles as a platform for “liquid biopsy” in glioblastoma patients. *Expert Rev Mol Diagn* (2014) 14(7):819–25. doi:10.1586/14737159.2014.943193
 11. Heinemann ML, Ilmer M, Silva LP, Hawke DH, Recio A, Vorontsova MA, et al. Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J Chromatogr A* (2014) 1371C:125–35. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.026
 12. Yalac G, Ehrlich YH, Olsen BR. Ecto-protein kinases and phosphatases: an emerging field for translational medicine. *J Transl Med* (2014) 12(1):165. doi:10.1186/1479-5876-12-165
 13. Hood JL, Wickline SA. A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* (2012) 4(4):458–67. doi:10.1002/wnan.1174
 14. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost* (2012) 10(3):437–46. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x
 15. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the international society on thrombosis and haemostasis SSC collaborative workshop. *J Thromb Haemost* (2013) 11:1190–3. doi:10.1111/jth.12207
 16. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel P-Y, Halleck AE, Trachtenberg AJ, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* (2013) 394(10):1253–62. doi:10.1515/hsz-2013-0141
 17. 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) 2:1–25. doi:10.3402/jev.v2i0.20360
 18. Rood IM, Deegens JJK, Merchant ML, Tamboer WPM, Wilkey DW, Wetzels JFM, et al. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int* (2010) 78(8):810–6. doi:10.1038/ki.2010.262
 19. Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* (2012) 18(12):1835–40. doi:10.1038/nm.2994
 20. van der Meel R, Krawczyk-Durka M, van Solinge WW, Schiffelers RM. Toward routine detection of extracellular vesicles in clinical samples. *Int J Lab Hematol* (2014) 36(3):244–53. doi:10.1111/ijlh.12247
 21. Ashcroft BA, de Sonneville J, Yuana Y, Osanto S, Bertina R, Kuil ME, et al. Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomed Microdevices* (2012) 14(4):641–9. doi:10.1007/s10544-012-9642-y
 22. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods* (2012) 375(1–2):207–14. doi:10.1016/j.jim.2011.10.012
 23. Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag* (2010) 6:1125–33. doi:10.2147/VHRM.S13236
 24. Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J. Numeration of circulating microparticles of various cellular origin by flow cytometry. *J Thromb Haemost* (2004) 2:1844–6. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00938.x
 25. Brownlee Z, Lynn KD, Thorpe PE, Schroit AJ. A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J Immunol Methods* (2014) 407:120–6. doi:10.1016/j.jim.2014.04.003
 26. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* (2006) 30.3.22.1–29. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30
 27. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine* (2011) 7(6):780–8. doi:10.1016/j.nano.2011.04.003
 28. Sáenz-Cuesta M, Irizar H, Castillo-Triviño T, Muñoz-Culla M, Osorio-Querejeta I, Prada A, et al. Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark Med* (2014) 8(5):653–61. doi:10.2217/bmm.14.9
 29. Perez A, Loizaga A, Arceo R, Lacasa I, Rabade A, Zorroza K, et al. A pilot study on the potential of RNA-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer. *Cancers (Basel)* (2014) 6(1):179–92. doi:10.3390/cancers6010179
 30. van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* (2014) 12(7):1182–92. doi:10.1111/jth.12602
 31. van Ierssel SH, Hoymans VY, Van Craenenbroeck EM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Jorens PG, et al. Endothelial microparticles (EMP) for the assessment of endothelial function: an in vitro and in vivo study on possible interference of plasma lipids. *PLoS One* (2012) 7(2):e31496. doi:10.1371/journal.pone.0031496
 32. Taylor DD, Zacharias W, Gercel-taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods Mol Biol* (2011) 728(1):235–46. doi:10.1007/978-1-61779-068-3_15
 33. Yamada T, Inoshima Y, Matsuda T, Ishiguro N. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J Vet Med Sci* (2012) 74(11):1523–5. doi:10.1292/jvms.12-0032
 34. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* (1982) 60(4):834–40.
 35. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Front Physiol* (2012) 3:162. doi:10.3389/fphys.2012.00162
 36. Jy W, Horstman LL, Ahn YS. Microparticle size and its relation to composition, functional activity, and clinical significance. *Semin Thromb Hemost* (2010) 36(8):876–80. doi:10.1055/s-0030-1267041
 37. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* (2012) 82(9):1024–32. doi:10.1038/ki.2012.256
 38. Alvarez ML. Isolation of urinary exosomes for RNA biomarker discovery using a simple, fast, and highly scalable method. In: Alvarez ML, Nourbakhsh M, editors. *Methods in Molecular Biology RNA Mapping SE – 13*. (Vol. 1182), New York, NY: Springer (2014). p. 145–70.
 39. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles* (2013) 2(7):1–6. doi:10.3402/jev.v2i0.19861
 40. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* (2012) 1:1–11. doi:10.3402/jev.v1i0.18397
 41. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics* (2013) 12(3):587–98. doi:10.1074/mcp.M112.021303
 42. Hara M, Yanagihara T, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, et al. Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli. *Hum Pathol* (2010) 41(9):1265–75. doi:10.1016/j.humphath.2010.02.004
 43. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(36):13368–73. doi:10.1073/pnas.0403453101
 44. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* (2009) 20(2):363–79. doi:10.1681/ASN.2008040406
 45. Marzeco A-M, Janich P, Wilsch-Bräuninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* (2005) 118(Pt 13):2849–58. doi:10.1242/jcs.02439
 46. Berckmans RJ, Sturk A, Tienen LM, van Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* (2011) 117(11):3172–81. doi:10.1182/blood-2010-06-290460
 47. Dimuccio V, Ranghino A, Praticò Barbato L, Fop F, Biancone L, Camussi G, et al. Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted

- patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One* (2014) **9**(8):e104490. doi:10.1371/journal.pone.0104490
48. Jorgensen M, Rikke B, Pedersen S, Sondergaard E, Kristensen S, Varming K. Extracellular vesicle (EV) array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J Extracell Vesicles* (2013) **1**:1–9. doi:10.3402/jev.v2i0.20920
49. Gan X, Gould SJ. Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins. *Mol Biol Cell* (2011) **22**(6):817–30. doi:10.1091/mbc.E10-07-0625
50. Hill AF, Pegtel M, Lambertz U, Leonardi T, O'Driscoll L, Pluchino S, et al. ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. *J Extracell Vesicles* (2013) **1**:1–8. doi:10.3402/jev.v2i0.22859
51. Ghiran I, Kuo W. Examining the role of microvesicles to develop prognostic and diagnostic assays. *J Appl Oral Sci* (2010) **18**(5):1. doi:10.1590/S1678-77572010000500001
52. Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics* (2014) **14**(4–5):412–25. doi:10.1002/pmic.201300389
53. van der Pol E, Böing A, Harrison P. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* (2012) **64**:676–705. doi:10.1124/pr.112.005983
54. Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby M-P, Novault S, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* (2005) **3**(1):10. doi:10.1186/1479-5876-3-10
55. Deun J, Van Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandekompele J, et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles* (2014) **1**:1–14. doi:10.3402/jev.v3.24858

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 12 December 2014; paper pending published: 27 December 2014; accepted: 27 January 2015; published online: 13 February 2015.

Citation: Sáenz-Cuesta M, Arbelaz A, Oregi A, Irizar H, Osorio-Querejeta I, Muñoz-Culla M, Banales JM, Falcón-Pérez JM, Olascoaga J and Otaegui D (2015) Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front. Immunol.* **6**:50. doi: 10.3389/fimmu.2015.00050

This article was submitted to *Inflammation*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2015 Sáenz-Cuesta, Arbelaz, Oregi, Irizar, Osorio-Querejeta, Muñoz-Culla, Banales, Falcón-Pérez, Olascoaga and Otaegui. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Editorial: Novel clinical applications of extracellular vesicles

Matías Sáenz-Cuesta¹, María Mittelbrunn² and David Otaegui^{1*}

¹ Multiple Sclerosis Unit, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain, ² Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

Keywords: extracellular vesicles, protocol standardization, clinical application, exosomes, biomarkers, immunotherapy, microvesicles, omics-technologies

Cells employ several modes of communication, from direct contact to paracrine signaling. Understanding what they are whispering one to another has long been a goal for immunologists. In this scenario, the potential of a newly discovered way of sending specific messages between cell types, extracellular vesicles (EVs), has started a revolution in the field.

During recent years, research on EVs has provided new insights into the pathophysiology of several diseases. EVs are membrane-bound particles secreted by almost all cell types. Depending on their biogenesis and size, they include exosomes, microparticles/microvesicles, and apoptotic bodies (1). Characteristically, EVs carry markers from the source cell membrane and contain genetic material, lipids, and proteins. They are known to play a role in cell-to-cell communication and to produce genotypic and phenotypic modifications in the target cell including antigen presentation, apoptosis induction, cellular activation, and differentiation (2). In particular, elevated concentrations of EVs have been found in many diseases including cancer (3), and autoimmune (4) and cardiovascular diseases (5). Most research on EVs is focused on their characterization, identifying mechanisms of action, and their potential use as biomarkers, with some studies investigating therapeutic applications. In relation to the promising results obtained in the EV field; however, there are some technical issues concerning standardization to be resolved and these are being addressed by researchers. Further, even though EVs have a growing future as biomarkers, drug delivery systems, or therapeutic targets, there remain milestones to be achieved on the path to their clinical application. This research topic aims to provide a forum for the discussion of current and novel clinical applications of EVs, opening new avenues in this field.

We focus the topic on two closely related fields where EVs have produced the most impact, namely, cancer and immunology. First, de Toro et al. have summarized the current roles of EVs in physiological and pathological and physiological states, including neurodegenerative, cardiovascular, and immune diseases (6). They conclude with an interesting section on the potential applications of EVs in diagnosis and therapy.

In relation to cancer, Benito-Martín et al. have reviewed the functions of innate immune-derived EVs in relation to modification of microenvironment and the control of tumor progression (7). The authors also provide a detailed description of the role of EVs derived from innate immune cells in specific cancers (colorectal cancer, osteosarcoma, neuroblastoma, and neurofibromatosis-1-related tumors). They point to the lack of information on these EVs under physiological conditions.

The proposal suggested by Carvalho and Oliveira is the use of EVs as a “liquid biopsy” overcoming the limited information provided by a single fragment of a tumor (8). They also assert that EVs may be circulating biomarkers with a potential role in the detection of the early stages of cancer. However, they note that the identification of EVs and characterization of their cargo should be carefully analyzed depending on whether they have been isolated in a human cancer sample or in a cancer cell-line culture. Finally, they propose a longitudinal approach involving the sampling of EVs over the course of a disease.

OPEN ACCESS

Edited by:

Pietro Ghezzi,
Brighton and Sussex Medical School,
UK

Reviewed by:

Lamia Heikal,
Brighton and Sussex Medical School,
UK

*Correspondence:

David Otaegui
david.otaegui@biodonostia.org

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation, a section of the
journal *Frontiers in Immunology*

Received: 29 June 2015

Accepted: 12 July 2015

Published: 24 July 2015

Citation:

Sáenz-Cuesta M, Mittelbrunn M and
Otaegui D (2015) Editorial: Novel
clinical applications
of extracellular vesicles.
Front. Immunol. 6:381.
doi: 10.3389/fimmu.2015.00381

Moving specifically to the biomarker area, Gámez-Valero et al. have conducted a comprehensive review of urine-derived EV candidates for monitoring kidney diseases (9). These authors affirm that urinary EVs reflect the state of urinary system; however, depending on the isolation protocol used, published data are not always comparable. In relation to this, they detail current and some novel methods for isolating EVs from urine and provide a clear review of urinary EV biomarkers by type of kidney disease. They also stress the urgent need for a consensus on methods and for these to then be applied to larger cohorts.

In an attempt to respond to the aforementioned suggestion, Sáenz-Cuesta et al. have compared five different EV isolation protocols (including the standard ultracentrifugation approach), starting with blood and urine samples as these are the most readily available, and several types of analysis (flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and electronic microscopy, among others) (10). The authors propose an interesting workflow for the study of EVs in a hospital setting, taking into account the facilities of a non-specialized core laboratory and based on an easy and quick medium-speed centrifugation protocol.

The application of the study of EVs in a daily clinical setting requires suitable technologies and quality controls that could be managed by the hospital itself or delegated to specific facilities. Regarding the facilities provided by culture platforms, Aiaistui posit that they should offer a basic level of quality control for the

production of large quantities of EVs in good manufacturing practice conditions (11). For that, close collaboration between clinicians from hospitals, the biotech industry, and basic researchers is necessary to turn what is currently an idea into a product. As an example, Aiaistui suggest that according to current requirements, culture platforms should become EV sample quality control services before EV products are applied as a therapy.

Research into EV cargo is continuously growing thanks to the spread of these new technologies. One of the most recently applied omic approaches, metabolomics, is focused on metabolites, cytosolic small molecules up to 1 kDa. Palomo et al. analyze the benefits of adding this to the spectrum of omic approaches applied to EVs, discussing which platform is the most suitable and also warning about the importance of additional background controls (e.g., exosome-depleted media analysis) (12).

Finally, Romagnoli et al. hypothesize about the possibility of using dendritic cell (DC)-derived EVs as cancer immunotherapy enhancing tumor antigenicity (13). They demonstrate the boost effect of DC-derived EVs in primed T-cell activation against an adenocarcinoma cell line and conclude that both DCs and tumor cells became more immunogenic after the incorporation of specific EVs.

It is the desire of the editors that this topic should help to connect all interested authors and readers, and join our efforts to understand what and how the cells are whispering.

References

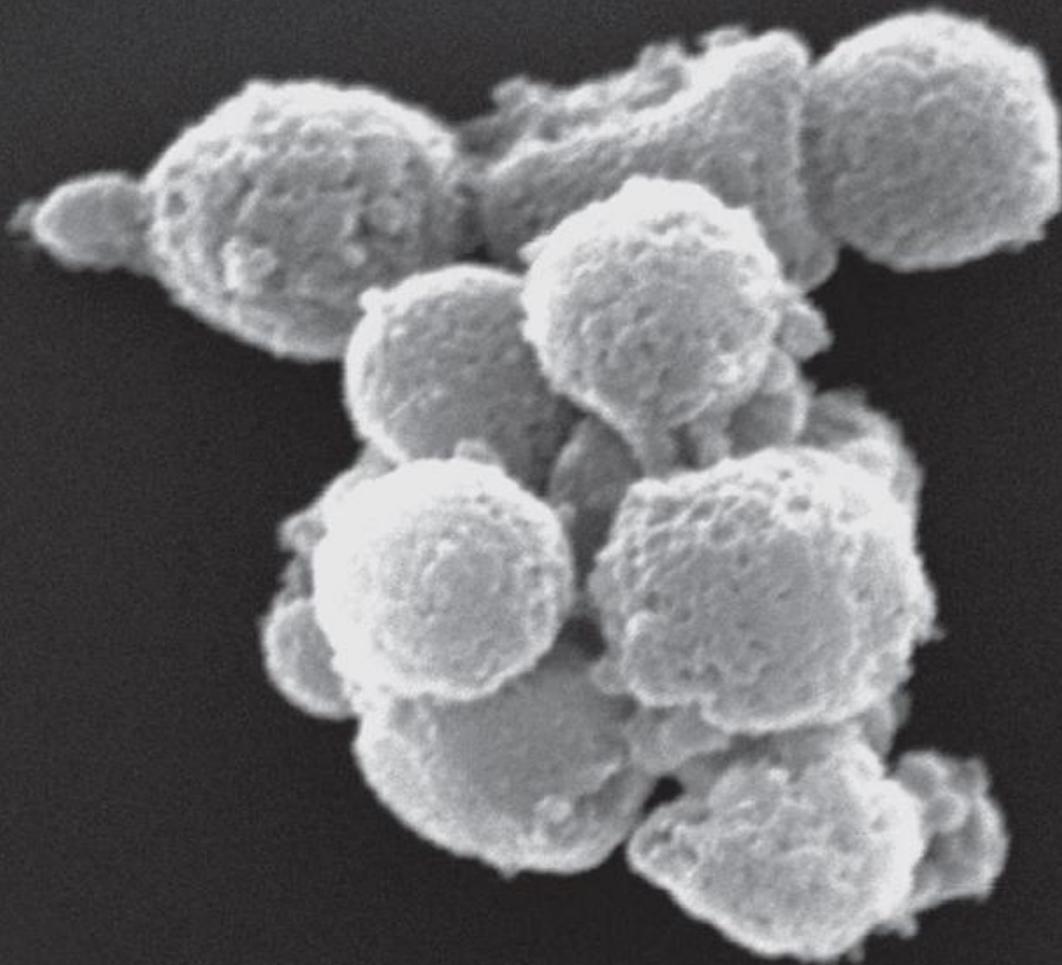
1. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* (2015) 4:27066. doi:10.3402/jev.v4.27066
2. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2009) 9(8):581–93. doi:10.1038/nri2567
3. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging science of cellular “debris”. *Semin Immunopathol* (2011) 33(5):455–67. doi:10.1007/s00281-011-0250-3
4. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* (2014) 14(3):195–208. doi:10.1038/nri3622
5. Fleury A, Martinez MC, Le Lay S. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front Immunol* (2014) 5:370. doi:10.3389/fimmu.2014.00370
6. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol* (2015) 6:203. doi:10.3389/fimmu.2015.00203
7. Benito-Martin A, Di Giannatale A, Ceder S, Peinado H. The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front Immunol* (2015) 6:66. doi:10.3389/fimmu.2015.00066
8. Carvalho J, Oliveira C. Extracellular vesicles – powerful markers of cancer evolution. *Front Immunol* (2015) 5:685. doi:10.1038/nrc3498
9. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borràs FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front Immunol* (2015) 6:6. doi:10.3389/fimmu.2015.00006
10. Sáenz-Cuesta M, Arbelaz A, Oregi A, Irizar H, Osorio-Querejeta I, Muñoz-Culla M, et al. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. *Front Immunol* (2015) 6:50. doi:10.3389/fimmu.2015.00050
11. Aiaistui A. Should cell culture platforms move towards EV therapy requirements? *Front Immunol* (2015) 6:8. doi:10.3389/fimmu.2015.00008
12. Palomo L, Casal E, Royo F, Cabrera D, Van-Liempd S, Falcon-Perez JM. Considerations for applying metabolomics to the analysis of extracellular vesicles. *Front Immunol* (2014) 5:651. doi:10.3389/fimmu.2014.00651
13. Romagnoli GG, Zelante BB, Toniolo PA, Migliori IK, Barbutto JAM. Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets. *Front Immunol* (2015) 5:692. doi:10.3389/fimmu.2014.00692

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Sáenz-Cuesta, Mittelbrunn and Otaegui. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

NOVEL CLINICAL APPLICATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES

EDITED BY: Matías Sáenz-Cuesta, David Otaegui and María Mittelbrunn
PUBLISHED IN: Frontiers in Immunology





frontiers

Frontiers Copyright Statement

© Copyright 2007-2015 Frontiers Media SA. All rights reserved.

All content included on this site, such as text, graphics, logos, button icons, images, video/audio clips, downloads, data compilations and software, is the property of or is licensed to Frontiers Media SA ("Frontiers") or its licensees and/or subcontractors. The copyright in the text of individual articles is the property of their respective authors, subject to a license granted to Frontiers.

The compilation of articles constituting this e-book, wherever published, as well as the compilation of all other content on this site, is the exclusive property of Frontiers. For the conditions for downloading and copying of e-books from Frontiers' website, please see the Terms for Website Use. If purchasing Frontiers e-books from other websites or sources, the conditions of the website concerned apply.

Images and graphics not forming part of user-contributed materials may not be downloaded or copied without permission.

Individual articles may be downloaded and reproduced in accordance with the principles of the CC-BY licence subject to any copyright or other notices. They may not be re-sold as an e-book.

As author or other contributor you grant a CC-BY licence to others to reproduce your articles, including any graphics and third-party materials supplied by you, in accordance with the Conditions for Website Use and subject to any copyright notices which you include in connection with your articles and materials.

All copyright, and all rights therein, are protected by national and international copyright laws.

The above represents a summary only. For the full conditions see the Conditions for Authors and the Conditions for Website Use.

ISSN 1664-8714

ISBN 978-2-88919-645-6

DOI 10.3389/978-2-88919-645-6

About Frontiers

Frontiers is more than just an open-access publisher of scholarly articles: it is a pioneering approach to the world of academia, radically improving the way scholarly research is managed. The grand vision of Frontiers is a world where all people have an equal opportunity to seek, share and generate knowledge. Frontiers provides immediate and permanent online open access to all its publications, but this alone is not enough to realize our grand goals.

Frontiers Journal Series

The Frontiers Journal Series is a multi-tier and interdisciplinary set of open-access, online journals, promising a paradigm shift from the current review, selection and dissemination processes in academic publishing. All Frontiers journals are driven by researchers for researchers; therefore, they constitute a service to the scholarly community. At the same time, the Frontiers Journal Series operates on a revolutionary invention, the tiered publishing system, initially addressing specific communities of scholars, and gradually climbing up to broader public understanding, thus serving the interests of the lay society, too.

Dedication to quality

Each Frontiers article is a landmark of the highest quality, thanks to genuinely collaborative interactions between authors and review editors, who include some of the world's best academicians. Research must be certified by peers before entering a stream of knowledge that may eventually reach the public - and shape society; therefore, Frontiers only applies the most rigorous and unbiased reviews.

Frontiers revolutionizes research publishing by freely delivering the most outstanding research, evaluated with no bias from both the academic and social point of view.

By applying the most advanced information technologies, Frontiers is catapulting scholarly publishing into a new generation.

What are Frontiers Research Topics?

Frontiers Research Topics are very popular trademarks of the Frontiers Journals Series: they are collections of at least ten articles, all centered on a particular subject. With their unique mix of varied contributions from Original Research to Review Articles, Frontiers Research Topics unify the most influential researchers, the latest key findings and historical advances in a hot research area! Find out more on how to host your own Frontiers Research Topic or contribute to one as an author by contacting the Frontiers Editorial Office: researchtopics@frontiersin.org

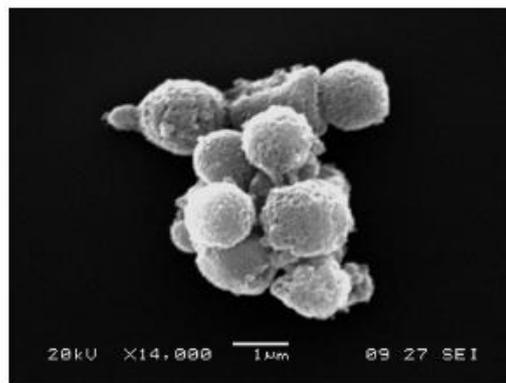
NOVEL CLINICAL APPLICATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES

Topic Editors:

Matías Sáenz-Cuesta, Biodonostia Health Research Institute, Spain

David Otaegui, Biodonostia Health Reserach Institute, Spain

María Mittelbrunn, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Spain



An electron microscopy image of an EV cluster obtained from peripheral blood.

Image by Matías Sáenz-Cuesta.

inhibition or differentiation. In particular, increasing concentrations of EVs have been found in many diseases such as cancer, autoimmune and cardiovascular diseases, among others. Most of the studies in EVs are focused on the characterization of EVs compounds, identifying mechanism of action, their potential use as biomarkers, and few of them investigate a therapeutic usage. However, there are some issues to be achieved on the path to their clinical application. This research topic offers a common place to discuss current and novel clinical applications of EVs pointing on future directions. We encouraged the submission of original articles, reviews, hypothesis, controversies, future perspectives and personal viewpoints on the following topics of interest, but not limited to:

- Contribution of EVs to better understand the pathology of immunological diseases.
- Standardization of isolation and quantification protocols in the daily clinical practice.

During the last years, the research on extracellular vesicles (EVs) has raised giving new insights into pathophysiology of several diseases. EVs are membrane-bound particles secreted by almost all cell types. Depending on their biogenesis and size they include exosomes, microparticles / microvesicles and apoptotic bodies. Characteristically, EVs carry markers from the source cell membrane and contain genetic material, lipids and proteins inside. They are known to play a role in cell-to-cell communication and to produce genotypic and phenotypic modifications in the target cell including: antigen presentation, apoptosis induction, cellular activation,

- Possible applications of EVs as clinical biomarkers (diagnostic, prognostic and evolution marker).
- Therapeutic role of EVs being vehicles of specific cargo: current clinical trials?
- Novel immunological functions of EVs.

Citation: Matías Sáenz-Cuesta, David Otaegui and María Mittelbrunn, eds. (2015). Novel clinical applications of extracellular vesicles. Lausanne: Frontiers Media. doi: 10.3389/978-2-88919-645-6