

Determinación de elementos traza en vesículas extracelulares: Evaluación de diferentes sistemas de introducción de muestra en el ICP-MS para la comparación de células control con células sometidas a estrés oxidativo

Jaime Martínez-García¹, Ana Álvarez-Barrios¹, Héctor González-Iglesias^{2,3}, Beatriz Fernández¹, Rosario Pereiro¹.

¹Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, España.

²Departamento de Tecnología y Biotecnología de productos lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Villaviciosa

³Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega 34, 33012, Oviedo, España

RESUMEN

En el presente artículo se muestra uno de los trabajos asociados a la línea de investigación del grupo de Espectrometría y Electroquímica BioNanoAnalíticas (E2BNA) de la Universidad de Oviedo centrada en el análisis de vesículas extracelulares (VEs) de muestras de interés clínico. Concretamente, el objetivo principal del trabajo está enfocado en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas empleando espectrometría de masas elemental (ICP-MS) para determinar el contenido metálico de VEs secretadas por células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Este tipo de células se han seleccionado como modelo *in vitro* a fin de estudiar mecanismos biológicos relacionados con la patología ocular denominada Degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

Palabras clave: Vesículas extracelulares, Modelos celulares *in vitro*, Métodos de purificación, ICP-MS, Metales traza, Degeneración macular asociada a la edad.

Tel.: +34 669 38 81 59

e-mail: martinezjaimegarcia@gmail.com

ACRÓNIMOS

AFM: Microscopía de fuerza atómica

CF: Citometría de flujo

CM: Citometría de masas

DLS: Análisis por dispersión dinámica de luz

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

EPR: Epitelio Pigmentario de la Retina

HR-TEM: Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

ICP-MS: Plasma de acoplamiento inductivo - Espectrometría de masas

NTA: Análisis de rastreo de nanopartículas

PEG: Polietilenglicol

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaños

SEM: Microscopía electrónica de barrido

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

VEs: Vesículas extracelulares

WB: Western blot

INTRODUCCIÓN

Las vesículas extracelulares (VEs) son cuerpos membranosos de tamaño micro- y nanométrico liberados por las células y que se encargan de la señalización intercelular y la gestión de residuos [1]. Las VEs pueden presentar tamaños muy variados, y hay mucha heterogeneidad en la bibliografía en cuanto a su clasificación según el tamaño. En cualquier caso, se suele hablar de tres tipos de VEs, clasificadas según sus dimensiones: las vesículas de menor tamaño (entre 30-200 nm) se denominan exosomas (o VEs de pequeño tamaño), las vesículas de tamaño intermedio (entre 200 nm-1 μ m) son microvesículas, y las de mayor tamaño (de 1 μ m en adelante) toman el nombre de cuerpos apoptóticos [2].

La actividad secretora celular juega un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades. Cuando una célula se ve sometida a una situación que puede comprometer su integridad (p.e., estrés), ésta modifica su actividad secretora tanto en el número de VEs como en su contenido, activando de este modo mecanismos de defensa frente a la situación de estrés en células vecinas [3]. Este comportamiento se ha observado en numerosos estudios relacionados con el cáncer o enfermedades neurodegenerativas, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) [4]. En particular, en el caso de la DMAE, la patología se caracteriza por el deterioro progresivo de diferentes estructuras de la retina a causa de la formación de depósitos de material extracelular sobre el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Dichos depósitos, denominados drusas, impiden el transporte de nutrientes al resto de células de la retina y por tanto inducen su deterioro y la pérdida de visión en la región central del ojo [5].

En el trabajo de investigación de este artículo se pretende desarrollar una nueva metodología de análisis que permita determinar el contenido metálico (Fe, Cu, y Zn) de VEs secretadas por

células del EPR al medio de cultivo empleando un plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS). Para ello se ha empleado un modelo *in vitro* de células inmortalizadas humanas de EPR.

MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE VES

Uno de los principales retos del análisis de VEs es su purificación a partir de las muestras biológicas (p.e., cultivos celulares *in vitro*, fluidos biológicos, etc.). Actualmente se describen muchos métodos de purificación de VEs en la bibliografía (p.e., precipitación, centrifugación diferencial, densidad de gradiente, inmunoprecipitación, cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, etc.), si bien cada uno de ellos presenta ciertas ventajas y limitaciones. Es por ello que a día de hoy no existe un método de purificación universal para obtener VEs (exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos) [6].

Uno de los métodos de purificación de VEs más empleado actualmente es la centrifugación diferencial. Este método se basa en la aplicación de fuerzas centrífugas sucesivas y crecientes a la muestra de interés, de manera que en cada paso de centrifugación se van sedimentando diferentes componentes de la muestra que se desechan, hasta alcanzar un último paso en la etapa de purificación en el que se sedimentan las VEs [7]. La centrifugación diferencial es un método relativamente barato y con un manejo instrumental sencillo. Sin embargo, el rendimiento de purificación es bajo, pueden co-precipitar con las VEs otros constituyentes de las células (p.e., lipoproteínas), y en algunos casos puede inducir la agregación de las VEs.

Otro de los métodos más utilizados en la bibliografía para la purificación de VEs es la precipitación. La precipitación de vesículas de muestras biológicas se consigue haciendo interaccionar éstas con agentes que reduzcan su solubilidad, generalmente soluciones poliméricas como polietilenglicol (PEG) [8]. Este método presenta un manejo instrumental muy sencillo, y la eficacia de purificación es significativamente superior a la centrifugación diferencial. Las principales limitaciones están relacionadas con su coste, ya que es significativamente más caro que la centrifugación diferencial (sobre todo si se emplean kits comerciales), y la muestra obtenida es relativamente impura.

Otro de los métodos de purificación de VEs que se pueden emplear con diferentes tipos de muestras biológicas es la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) [9]. En este caso, empleando una fase estacionaria porosa con un diámetro de poro

adecuado se puede discriminar la fracción de VEs del resto de la matriz. Los ensayos de inmunopurificación, en los que se emplean anticuerpos que reconocen selectivamente elementos de las VEs, se usan también como una alternativa eficaz para la purificación de VEs [10]. Además de los diferentes métodos descritos, existen también combinaciones de dos o más métodos de purificación. En este caso es posible mejorar la pureza de VEs aunque se incrementa el coste derivado de la etapa de purificación y se requiere de personal más cualificado [11]. En la Figura 1 se recoge a modo de resumen un diagrama con algunos de los métodos de purificación que se emplean actualmente para obtener VEs, así como una comparación de sus prestaciones en cuanto a recuperación y especificidad.

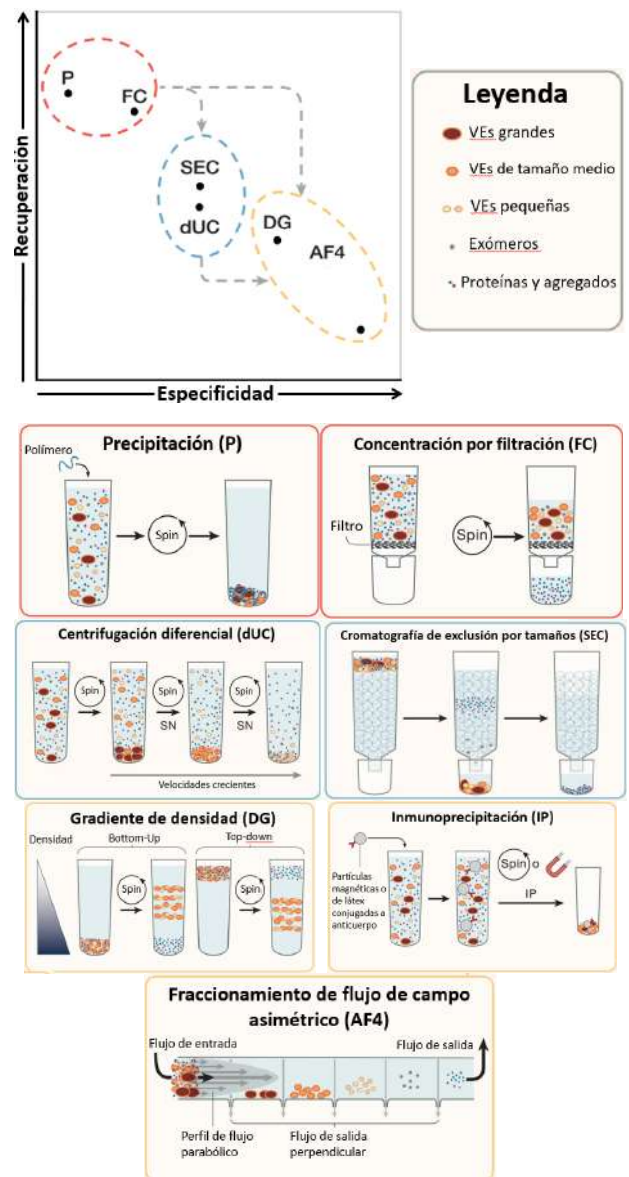


Figura 1. Esquema resumen de los diferentes métodos que se pueden emplear para la purificación de VEs. Figura modificada de F. Coccozza et al. [12].

MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE VEs

Una vez se obtiene la fracción purificada de VEs, se debe hacer una caracterización minuciosa de las mismas, con el objetivo de obtener información sobre su tamaño, morfología, así como sobre la población concreta de VEs que ha sido purificada de la muestra biológica.

Para realizar la caracterización del tamaño de las VEs se pueden usar diferentes técnicas, si bien las más empleadas actualmente son las técnicas de dispersión de radiación, como el análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS) o el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) [13]. Estas técnicas permiten aportar información sobre las diferentes poblaciones de tamaño de las VEs presentes en la muestra en base a medidas de dispersión dinámica de radiación.

Paralelamente, las técnicas de microscopía electrónica también se emplean para determinar el tamaño de las VEs presentes en una muestra purificada. Además, en este caso es posible determinar la morfología de las VEs, así como observar la presencia de posibles contaminantes y agregados. La técnica más usada suele ser la microscopía electrónica de transmisión (TEM o su versión con alta resolución; HR-TEM), aunque también se describe en la bibliografía el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) [14].

Además de caracterizar el tamaño y la morfología de las VEs, generalmente se realiza también la determinación de marcadores específicos de las VEs, para confirmar de forma inequívoca su presencia en la muestra [15]. Para cumplir este objetivo, la técnica cuyo uso está más estandarizado es Western Blot (WB), aunque también se describe en la bibliografía el uso de ensayos ELISA o citometría de flujo (CF) o de masas (CM).

ANÁLISIS ELEMENTAL DEL CONTENIDO METÁLICO DE LAS VEs

Otro de principales retos que presenta el análisis de VEs es el limitado volumen de muestra disponible para realizar tanto la caracterización como los análisis posteriores. Normalmente se dispone de un volumen de muestra inferior a 100 μL , de los cuales hay que extraer alícuotas para caracterizar el tamaño y la morfología, identificar marcadores específicos, y en nuestro caso particular disponer del volumen de muestra suficiente para realizar su análisis por ICP-MS. De este modo, se requiere de un sistema de introducción de muestra en el ICP-MS que consuma muy poco volumen, permita obtener una gran sensibilidad, así como obtener señales estables y reproducibles. Para ello, en este trabajo se ha

investigado el uso de diferentes sistemas de introducción de muestra en el ICP-MS, incluyendo el uso de micronebulizadores y cámaras de nebulización de consumo total.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL & RESULTADOS

En este estudio se ha analizado VEs secretadas por un modelo *in vitro* de una línea celular humana inmortalizada de EPR que no ha sido sometida a ningún tratamiento (células control). La purificación se ha llevado a cabo siguiendo dos protocolos: centrifugación diferencial y precipitación con un kit comercial (Figura 2). El uso de estas dos estrategias de purificación de VEs permite comparar las prestaciones de las mismas, tanto en la morfología de las VEs obtenidas como en su contenido metálico.

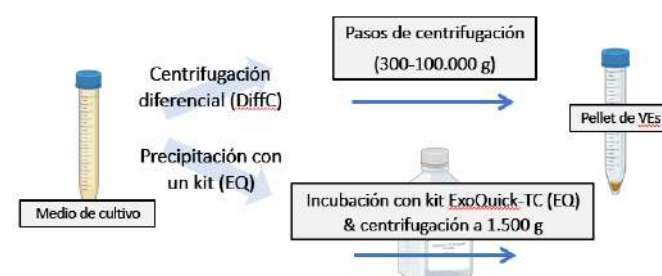


Figura 2. Esquema de los métodos de purificación empleados (centrifugación diferencial y precipitación) para obtener VEs del modelo *in vitro* de células humanas inmortalizadas de EPR.

Las muestras obtenidas se caracterizan mediante NTA y TEM, pudiendo obtener así información sobre la morfología y las poblaciones de tamaño de vesículas presentes. El análisis por NTA no requiere una preparación previa de la muestra, si bien el análisis por TEM precisa de una preparación previa de la muestra para que su análisis resulte en imágenes con buen contraste. En este estudio se ha evaluado el empleo de diferentes reactivos para obtener imágenes de las VEs mediante TEM, donde se incluye el acetato de uranilo, paraformaldehído (PFA) y tetróxido de osmio.

A modo de ejemplo, en la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de las VEs mediante NTA (Fig. 3a) y TEM (Fig. 3b).

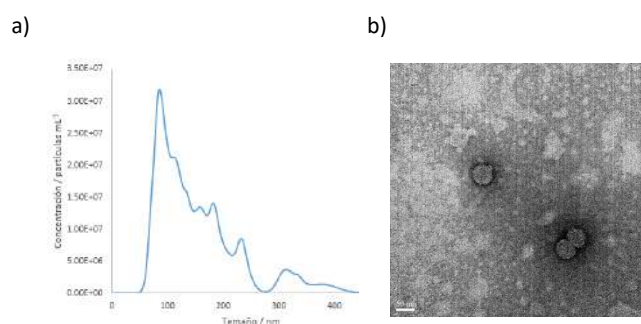


Figura 3. Caracterización de las VEs purificadas mediante centrifugación del medio de cultivo de células humanas inmortalizadas de EPR. a) Análisis por NTA, y b) Análisis por TEM.

En cuanto al análisis de las VEs purificadas por ICP-MS para determinar su contenido en metales traza, se han evaluado tres sistemas de introducción de muestra diferentes. En la Figura 4 se muestra un diagrama de los tres sistemas empleados: un micronebulizador que permite trabajar con un flujo de muestra de 66 $\mu\text{L}/\text{min}$, y dos sistemas de "single cell" con cámaras de nebulización de consumo total. Los sistemas de "single cell" permiten trabajar a flujos más bajos (en el rango entre 18-33 $\mu\text{L}/\text{min}$). Con los tres sistemas se evaluaron diferentes parámetros, donde se incluye la precisión de las medidas, estabilidad de la señal, sensibilidad y límites de detección. El sistema de "single cell" con un flujo de 18 $\mu\text{L}/\text{min}$ permitió obtener unas prestaciones analíticas comparables con los otros dos sistemas de introducción de muestra, a la vez que permite trabajar con menores volúmenes de muestra.

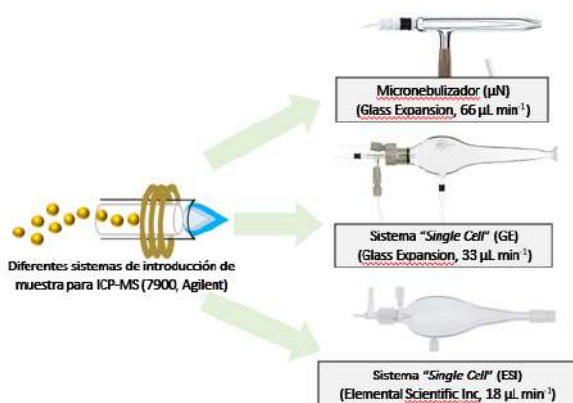


Figura 4. Representación esquemática donde se muestran los tres sistemas empleados para la introducción de muestra (suspensión de VEs en PBS) en el ICP-MS. En todos los casos se recoge el modelo empleado, así como el flujo de muestra introducido en el ICP-MS.

CONCLUSIONES

Las VEs son estructuras biológicas que han cobrado mucha importancia en los últimos años en la investigación de enfermedades, debido a su papel crucial en el desarrollo de éstas. Sin embargo, su análisis sigue siendo todavía un reto, debido a la gran cantidad de problemas experimentales que están aún

presentes en las etapas de purificación, caracterización y determinación de su contenido (tanto elemental como de biomoléculas).

En el presente artículo se describen de manera resumida las principales tareas llevadas a cabo en la línea de investigación del grupo E2BNA dedicada a la determinación de elementos traza en VEs purificadas del medio de cultivo de modelos *in vitro* de células humanas inmortalizadas de EPR. En él se muestran los procedimientos llevados a cabo para la purificación de VEs (centrifugación y precipitación), así como el empleo de diferentes técnicas de caracterización (p.e., NTA y TEM). Aunque los métodos de purificación empleados no son los que proporcionan VEs con la mayor pureza, se ha podido observar que es posible obtener VEs de las células de EPR. Además, los análisis elementales realizados mediante ICP-MS han permitido confirmar la presencia de elementos traza en las VEs secretadas a un nivel de concentración en el rango de los ng/mL.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado a través del proyecto AYUD/2021/51289 (Programa PCTI del Gobierno del Principado de Asturias y programa FEDER de la Unión Europea), y PID2019-107838RB-100/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033, en España. Además, J. Martínez García agradece a BioRender por las imágenes usadas en el presente artículo.

REFERENCIAS

- [1] Doyle, L. M. *et al.*, Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis, *Cells*, 2019, Vol. 8, No. 7, Art. 727.
- [2] Théry, C. *et al.*, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, Vol. 7, No. 1, Art. 1535750.
- [3] Shetty, A. K. *et al.*, Extracellular Vesicles in Health and Disease, *Aging and Disease*, 2021, Vol. 12, No. 6, pp. 1352-1362.
- [4] Bhutto, I. *et al.*, Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor / retinal pigment epithelium / Bruch's membrane / choriocapillaris complex,

- Molecular Aspects of Medicine, 2012, Vol. 33, No. 4, pp. 295-317.
- [5] Flores-Bellver, M. *et al.*, Extracellular vesicles released by human retinal pigment epithelium mediate increased polarized secretion of drusen proteins in response to AMD stressors. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, Vol. 10, No. 13, Art. e12165.
- [6] Stam, J. *et al.*, Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods, *Journal of Chromatography B*, 2021, Vol. 1169, Art. 122604.
- [7] Théry, C. *et al.*, Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids, *Current Protocols in Cell Biology*, 2006, Protocols 3.22.1-3.22.29.
- [8] Ludwig, A. *et al.*, Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, Vol. 7, Art. 1528109.
- [9] Vanderboom, P. *et al.*, A size-exclusion-based approach for purifying extracellular vesicles from human plasma, *Cell Reports Methods*, 2021, Vol. 1, No. 3, Art. 100055.
- [10] Brett, S. *et al.*, Immunoaffinity based methods are superior to kits for purification of prostate derived extracellular vesicles from plasma samples, *Prostate*, 2017, Vol. 13, pp. 1335-1343.
- [11] Brennan, K. *et al.*, A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum, *Scientific Reports*, 2020, Vol. 10, Art. 1039.
- [12] Coccozza, F. *et al.*, SnapShot: Extracellular Vesicles, *Cell*, 2019, Vol. 182, pp. 262.
- [13] Hou, J. *et al.*, Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles, *Journal of Hazardous Materials*, 2018, Vol. 360, pp. 319-328.
- [14] Chuo, S. *et al.*, Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods, *Journal of Biomedical Science*, 2018, Vol. 25, Art. 91.
- [15] Kowal, E. *et al.*, Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting, *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 2017, Vol. 1660, pp. 143-152.