

# **ANEXO I. PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS**

## **1. PROTOCOLO DE ULTRACENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL**

### **1.1. MATERIALES**

- Muestras de plasma humano
- Solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS; Thermo Fisher, N° de catálogo 14190144), a 4°C
- Microcentrífuga (Sorvall™ Legend™ Micro 21), a 4°C
- Frascos de policarbonato de 10,4 ml (Beckman Coulter, n° de catálogo 355603)
- Rotor Beckman Coulter tipo 70.1 (factor k 42; Beckman Coulter, n° de catálogo 342184), a 4°C
- Ultracentrífuga preparativa Beckman Coulter L-80, a 4°C
- Tubos cónicos polialoméricos de 1,5 ml (Beckman Coulter, n° de catálogo 358152)
- Adaptadores para rotor SW60 (Beckman Coulter, n° de catálogo 358152), a 4°C
- Rotor Beckman Coulter SW60 -factor k 31; Beckman Coulter, n° de catálogo 335650), a 4°C
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml

### **1.2. PROTOCOLO**

Las muestras de plasma humano deben ser tratadas como si contuvieran patógenos transmitidos por la sangre. Utilice gabinetes de bioseguridad, centrifugadoras cerradas y procedimientos de laboratorio BSL2 adecuados.

0. Antes de generar preparaciones estériles, los cubos para el rotor SW60 se deben autoclavar, y los frascos y tubos se esterilizan con lejía al 10% (v / v), etanol al 70% (v / v) y lavados con PBS 1x.

1. Centrifugar cada muestra de plasma humano de 250 µl en una microcentrífuga durante 10 min a 30×g, 4°C.

2. Recoger el sobrenadante y transferirlo a una botella de policarbonato de 10,4 ml etiquetada. La botella debe ser adecuada para su uso en un rotor Tipo 70.1.

3. Llenar cada botella con PBS 1x frío e igualar las masas de las botellas. Colocar las botellas en un rotor Beckman Coulter Tipo 70.1 preenfriado de modo que las etiquetas

miren hacia el exterior del rotor. Esta ubicación permite una fácil visualización del sedimento de la vesícula.

4. Centrifugar en ultracentrífuga preparativa Beckman Coulter L-80 durante 30 min a 10.000xg, 4°C, con máxima aceleración y sin freno para la fase de desaceleración. La desaceleración debe ser lo más lenta posible para evitar perturbar el pellet. Esta configuración debe usarse para todos los pasos de ultracentrifugación.

5. Transferir el sobrenadante a nuevos frascos de policarbonato de 10,4 ml etiquetados. Resuspender el sedimento (sedimento de 10K) en 100µl de PBS 1x frío y almacenar a -80°C.

6. Equilibrar las masas de las botellas con PBS 1x frío y orientarlas como se describe en el paso 3.

7. Centrifugar en ultracentrífuga preparativa durante 2 horas a 100.000xg, a 4°C.

8. Resuspender el sedimento en 1,5 ml de PBS 1x frío y transferir la muestra a un tubo cónico de polialómero de 1,5 ml con un adaptador preenfriado para el rotor SW60. Almacenar el sobrenadante (fracción libre de EV) a -80°C para su uso posterior como control negativo de la fracción EV. Es necesario instalar adaptadores especiales para utilizar tubos cónicos en la cuchara del rotor SW60.

9. Colocar los tubos cónicos y los adaptadores en las cubetas preenfriadas del Beckman Coulter a 4°C para lavar el sedimento de EVs.

10. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento (sedimento de 100 K) en 150 µl de PBS 1x frío. Transferir la resuspensión a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y almacenar a -80 ° C. Se recomienda la alícuota de las muestras para evitar ciclos de congelación-descongelación de los vehículos eléctricos. La duración máxima de almacenamiento de los exosomas probados hasta ahora es de 1 año.

## 2. PROTOCOLO DE CENTRIFUGACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD CON IODIXANOL

### 2.1. MATERIALES

- Preparación de medio con cultivo concentrado o CCM (<0,1  $\mu\text{m}$ ) (500  $\mu\text{l}$ , 1,5 mg de proteína).
- SW40Ti oscilante (gran escala) —Tubos de polipropileno de pared delgada (Beckman Coulter, nº de catálogo 331374).
- Ultracentrífuga y rotor emparejado (Beckman Coulter, Optima TM XPN).
- Solución stock OptiPrep™: iodixanol acuoso al 60% (p / v). Prepare gradiente de iodixanol discontinuo: soluciones de 40% (p / v), 20% (p / v), 10% (p / v) y 5% (p / v) de iodixanol diluyendo el stock con sacarosa 0,25 M, Tris 10 mM –HCl, pH 7,5.
- PBS estéril / filtrado.
- Ángulo fijo TLA-55 (pequeña escala / lavado) —Tubo de polipropileno para microcentrífuga (Beckman Coulter, nº de catálogo 357448).

### 2.2. PROTOCOLO

1. La preparación de medio con cultivo concentrado (500  $\mu\text{l}$ , 1,5 mg de proteína) se superpone sobre el gradiente discontinuo de iodixanol. El gradiente se genera diluyendo una solución madre de OptiPrep™ (60% (p / v)) con sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 (40% (p / v), 20% (p / v), soluciones al 10% (p / v) y 5% (p / v) de iodixanol). Estas soluciones se preparan inmediatamente antes de la centrifugación y permiten un tiempo de mezcla de hasta 30 minutos para cada solución. El gradiente se formó añadiendo 3 ml de solución de yodixanol al 40%, seguido de capas cuidadosas de 3 ml de cada una de las soluciones al 20% y al 10%, y 2 ml de la solución al 5%.

Se ha demostrado que los exosomas flotan a densidades que oscilan entre 1,09 y 1,15 g / ml en un gradiente de densidad continuo de sacarosa o iodixanol después de la centrifugación. Los gradientes de velocidad OptiPrep™ tienen gradientes isoosmóticos de baja viscosidad que proporcionan una separación rápida y eficiente de las vesículas extracelulares. Se ha demostrado que los gradientes de velocidad OptiPrep™ separan eficientemente los exosomas de las partículas del VIH-1.

2. Esta solución combinada de densidad OptiPrep™ se centrifuga a 100.000 $\times$ g (cubeta oscilante SW40Ti) durante 18 horas, a 4°C.

Los tubos de ultracentrífuga tienen paredes delgadas y colapsarán si se llenan incorrectamente. Todos los tubos deben tener al menos un 80% de capacidad para garantizar que el tubo no colapse. Las especificaciones del tubo deben consultarse con el fabricante antes de su uso. Tenga en cuenta que debe agregar PBS adicional si es necesario. Asegúrese de que el rotor esté asentado correctamente dentro de la centrífuga.

3. Después de la centrifugación, se recogen manualmente 12 fracciones de gradiente individuales de 1 ml (con densidad creciente, recogida de arriba a abajo). Para este cuidadoso procedimiento se utiliza una pipeta de 1 ml y se aísla del menisco.

Siguiendo el gradiente de densidad OptiPrep™, las fracciones de proteína aisladas (en este caso 12 fracciones) se pueden evaluar para determinar la densidad (por ejemplo, un rango de 1,01 a 1,30 g / ml) y el rendimiento de proteína mediante tinción con SYPRO® Ruby y evaluar la expresión de marcadores exosomales análisis de inmunotransferencia.

4. Las fracciones se diluyen con 2 ml de PBS y se centrifugan a 100.000xg durante 3 horas, a 4°C, seguido de lavado con 1 ml de PBS y resuspensión en 50 µl de PBS.

5. Para determinar la densidad de cada fracción, un gradiente OptiPrep™ de control que contenga 500 µl de sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 también debe ejecutarse en paralelo.

### **3. PROTOCOLO DE ULTRAFILTRACIÓN CON EXOTIC KIT**

#### **3.1. MATERIALES**

- Muestras de sangre
- EDTA
- PBS 1x
- Jeringa de 10mL
- Dispositivo ExoTIC Kit
- Microtubo de 1,5ml

#### **3.2. PROTOCOLO**

1. Se recoge sangre de donantes humanos sanos en el Stanford Blood Center en tubos que contienen anticoagulante de potasio EDTA
2. Se centrifuga a 1000xg durante 10 min a 4°C para eliminar las plaquetas, y se utilizan 100 µL del plasma resultante para los pasos posteriores.
3. Se añaden cuatrocientos microlitros de tampón PBS 1x a 100 µl de plasma y se mezclan.
4. La muestra de 500 µl se filtra luego usando un filtro unión a proteínas de baja afinidad (tamaño de poro: 200 nm) y el flujo se recoge en un microtubo de 1,5 ml. Se utiliza tampón PBS o agua desionizada (1 ml) para lavar el filtro de la jeringa y el flujo se recoge en el mismo microtubo.
5. Se extraen aproximadamente 1,5 ml de solución plasmática de PBS con una jeringa de 10 ml y se conectan al dispositivo ExoTIC.
6. Después de fijarse en una bomba de jeringa, se aplica una velocidad de bombeo de 1,5 ml / h para enriquecer las EVs en el dispositivo ExoTIC y eliminar las proteínas libres, los ácidos nucleicos y los restos celulares
7. Cuando quedan aproximadamente 500 µL, la jeringa con el dispositivo ExoTIC se gira 180°, de modo que la entrada del dispositivo ExoTIC esté por encima de la salida, para recoger las EVs en la cámara del dispositivo ExoTIC.
8. Después de girar, el bombeo continúa a la misma velocidad hasta que el medio restante se filtre por completo. La recolección de la solución de EVs tarda aproximadamente 5 minutos.

9. El dispositivo ExoTIC, que contiene solución EV, se desconecta cuidadosamente de la jeringa. Se utiliza una pipeta de 200  $\mu$ L para recoger toda la solución EV a través de la entrada del dispositivo ExoTIC.

10. La muestra de EV recolectada se mantiene en un microtubo de 1,5 ml y se almacena a 4°C para su posterior análisis.

## **4. PROTOCOLO DE CAPTURA POR INMUNOAFINIDAD CON EXOTENPO CHIP**

### **4.1. MATERIALES**

- Micropartículas de anti-biotina ultrapura (Miltenyi Biotec) y anticuerpos biotinilados para el marcaje magnético.
- Para los ratones, se usaron el anticuerpo anti-CD9 de biotina (BioLegend) y el anticuerpo anti-CD81 de biotina (BioLegend, 104903). Para los seres humanos se usaron el anticuerpo CD9 antihumano de biotina (eBioscience, 13-0098-80), anticuerpo CD63 antihumano de biotina (BioLegend, 353017), y anticuerpo anti-CD81 de biotina (conjugado personalizado por BioLegend)
- Jeringa programable (Braintree Scientific)

### **4.2. PROTOCOLO**

Todas las muestras se agitan en el vortex antes del aislamiento de exosomas para resuspender cualquier exosoma que se haya podido agregar por su almacenamiento a temperatura de congelación.

1. Primero, se agregan anticuerpos biotinilados (2,5 µl de anticuerpo por 20 ml medio o por 1 ml de plasma) a la muestra y se incuban durante 20 min a temperatura ambiente con agitación.
2. Se añaden las microperlas ultrapuras anti-biotina a las muestras y se incuban durante 20 min a temperatura ambiente con agitación.
3. Se agregan las muestras al ExoTENPO Chip, y jeringa provoca una presión negativa.
4. Mientras las muestras pasan a través del chip, los exosomas marcados magnéticamente son capturados en el borde de los poros del chip.

El tiempo total para procesar una muestra de 3 ml, a 10 ml/h, incluyendo el tiempo de preparación de la muestra, es de 40 min.

## 5. PROTOCOLO DE PRECIPITACIÓN EXTRAPEG

### 5.1. MATERIALES

- Polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 6000 (Sigma, 81260)
- Agua filtrada (18.3 Mega-ohm system; ELGA Purelab flex purification system)
- Cloruro de sodio (1 M)
- Cultivo de células embrionarias de riñón 293T (HEK293T; ATCC® CRL-11268™) en DMEM (Lonza, 12-604Q) suplementado con FBS (Seradigm, 1400–500)
- Centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R con rotor basculante S-4-104; 3214 g)
- PBS libre de partículas (pH 7,4)

### 5.2. PROTOCOLO

0. Se mezclan el PEG junto con el agua filtrada y cloruro de sodio para crear una solución al 2x.

1. El medio se centrifuga a 500xg durante cinco minutos seguido de 2.000xg durante treinta minutos a 4°C para eliminar los restos celulares y los grandes cuerpos apoptóticos.

2. Una vez centrifugado, el medio se añade a un volumen igual de una solución de 2xPEG a 4°C, para lograr la concentración final deseada de PEG (5-15%).

3. Después, las muestras se mezclan completamente mediante inversión y se incuban a 4°C durante la noche (al menos 12 horas).

4. Al día siguiente, las muestras se centrifugan en una centrífuga a máxima velocidad durante 1 hora a 4°C.

5. Se decantan los tubos cónicos y se dejan escurrir durante cinco minutos, golpeando ocasionalmente para eliminar el exceso de PEG.

6. El sedimento resultante se suspende en 50-500 µL de PBS.

7a. Se almacenan subconjuntos de muestras a -80°C

7b. Se purifican adicionalmente mediante precipitación con PEG por segunda vez utilizando una concentración más baja de PEG

7c. Se resuspenden en PBS y se centrifugan a 100.000 g para lavar y volver a sedimentar las vesículas.

8a. El sedimento resultante se diluye en 5 ml de PBS y se añade un volumen igual de solución de 2x PEG, esta vez hasta una concentración final de PEG inferior al 5%.

8c. Las últimas muestras se suspenden en 1 ml de PBS y se ultracentrifugan (100.000xg) durante 70 minutos para lavar las partículas de proteína contaminante y PEG.

9. Todas las muestras se resuspenden finalmente en PBS sin partículas, agitando a temperatura ambiente durante hasta 30 minutos.