



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia - Programa de Doctorado en Ciencias y
Tecnología Analítica**

TITULO DE LA TESIS

**OPTIMIZACIÓN DE UNA PLATAFORMA ANALÍTICA PARA EL
AISLAMIENTO Y CARGA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
PEQUEÑAS PARA EL TRANSPORTE DE DOXORRUBICINA**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al grado académico de Doctor en Ciencias y
Tecnología Analítica

**POR HÉCTOR ANTONIO CONTRERAS MORAGA
PROFESOR GUÍA DR. FELIPE ANDRÉS ZÚÑIGA ARBALTI
PROFESORA CO-GUÍA DRA. CAROLA VERGARA ROSALES**

Noviembre 2023
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

*Para Diego y Pilar. Gracias por su apoyo, amor y paciencia.
Amado hijo. Nunca dejes de alcanzar tu sueños.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Dios, por ayudarme a iluminar mi camino en la ciencia.

A mi familia, Pilar y Diego. Por ser mi soporte diario.

A mis padres y hermanos, por enseñarme que “Nada se consigue sin
esfuerzo”.

A los Drs. Felipe Zúñiga y Valeska Ormazábal, por ser una verdadera guía y
apoyo, y por ser el pilar que motivó el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mi amigo Pedro Felipe, por estar ahí y darme esas palabras de aliento.

A Daniel, por todos esos desayunos y largas conversaciones de ciencia y
actualidad.

Al programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica. Gracias por
confiar en mi.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 CONCEPTUALIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	1
1.2 DESCRIPCIÓN Y ORIGEN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	6
1.2.1 Exosomas.....	6
1.2.1.1 Biogénesis de los exosomas.....	7
1.2.2 Ectosomas o Microvesículas.....	10
1.2.2.1 Biogénesis de los Ectosomas.....	11
1.2.3 Cuerpos apoptóticos.....	12
1.3 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y SEPARACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUEÑAS.....	14
1.3.1 Consideraciones generales para los estudios en vesículas extracelulares.....	19
1.3.2 Ultrafiltración y Cromatografía por exclusión por tamaño para el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas.....	23
1.4 APLICACIONES Y AVANCES TERAPÉUTICOS BASADOS EN VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	28
1.4.1 Biomarcadores de enfermedades.....	29
1.4.1.1 Vesículas extracelulares como sistemas de transporte de drogas.....	31
1.4.1.1.1 Métodos pre-carga.....	35
1.4.1.1.2 Métodos post-carga de carga activa o carga pasiva.....	36
1.5 LA ELECTROPORACIÓN COMO SISTEMA DE CARGA EFECTIVA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	40
1.5.1 Pulsos de onda exponencial y cuadrada.....	41
1.6 MEJORAS EN LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE DOXORRUBICINA.....	44
1.7 OPTIMIZACIÓN DE LA CARGA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES BASADO EN EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	48
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
2.2 Hipótesis.....	51
2.3 Objetivo General.....	52

2.4 Objetivos Específicos	52
CAPÍTULO 3: ESTRATEGIA ANALÍTICA	53
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	86
4.1 Estudio comparativo de la cromatografía de exclusión por tamaño para el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas a partir de medio de cultivo celular, plasma, orina y saliva	86
4.1.1 Abstract	89
4.1.2 Introduction.....	91
4.1.3 Materials and methods	95
4.1.3.1 Cell culture	95
4.1.3.2 EVs isolation from human biological fluids	97
4.1.3.3 Preparation of In-house columns	99
4.1.3.4 Size exclusion chromatography	99
4.1.3.5 Extracellular vesicles characterization.....	101
4.1.3.6 Flow cytometry analysis	104
4.1.3.7 Transmission electron microscopy.....	105
4.1.3.8 Statistical Analysis	106
4.1.4 Results.....	107
4.1.4.1 Optimization and performance comparison of SEC columns.....	107
4.1.4.2 Analysis of EV collection medium.	107
4.1.4.3 Plasma samples analyses.....	112
4.1.4.4 Flow cytometry analysis	118
4.1.4.5 DLS and TEM analysis	121
4.1.4.6 Discussion	124
4.1.5 References.....	129
4.2 Pulsos de onda cuadrada vs pulsos de decaimiento exponencial: Un enfoque desde el diseño experimental para mejorar la incorporación de doxorubicina en pequeñas vesículas extracelulares mediante electroporación.....	138
4.2.1 Abstract	140
4.2.2 Introduction.....	141
4.2.3 Materials and Methods.....	144
4.2.3.1 Small extracellular vesicle (small EVs) isolation	144
4.2.3.2 Electroporation loading of Doxorubicin	145

4.2.3.3 EV size distribution.....	146
4.2.3.4 Design of Experiments (DoE) for data analysis.....	146
4.2.3.4.1 Screening design.....	146
4.2.3.4.2 Optimization of the model:.....	147
4.2.4 Results and Discussion	148
4.2.4.1 Exponential decay pulse.....	150
4.2.4.1.1 Screening analysis for Doxorubicin incorporation.....	150
4.2.4.1.2 Response surface methodology analysis for Doxorubicin incorporation	156
4.2.4.1.3 Analysis of Response surface methodology for small EV aggregation	160
4.2.4.2 Square wave pulse.....	164
4.2.4.2.1 Screening analysis for Doxorubicin incorporation.....	164
4.2.4.2.2 Response surface methodology analysis for Doxorubicin incorporation and small EV aggregation.....	169
4.2.5 Conclusions.....	180
4.2.6 References.....	183
CONCLUSIÓN GENERAL	189
PRODUCTIVIDAD.....	202
ANEXOS	206
4.2 Supplementary Figures.....	206

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.1: Clasificación de las vesículas extracelulares según su origen.	3
Tabla 1.3.2 Comparación de las técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares.....	18
Tabla 1.4.2: Estrategias descritas en la literatura para la carga, aislamiento y detección de moléculas en vesículas extracelulares.	39
Table 4.1.1: Physicochemical characterization of small EVs	121
Table 4.2.1: Experimental design matrix for screening and results.	149
Table 4.2.2: Normalized regression coefficients obtained by MLR analysis for exponential decay electroporation.....	153
Table 4.2.3: Experimental data of the Central Composite Face Centered (CCF) design for DOXin optimization after exponential decay electroporation.....	158
Table 4.2.4: Normalized regression coefficients for Doxorubicin incorporation after exponential decay electroporation obtained by RSM analysis by CCF model.....	159
Table 4.2.5: Normalized regression coefficients (b) by MLR analysis for square wave pulse electroporation.	166
Table 4.2.6: Experimental data of the Central Composite Face Centered (CCF) design for DOXin optimization after Square pulse electroporation.	171
Table 4.2.7: Normalized regression coefficients (b) by PLS analysis for square wave pulse electroporation.	172

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1.1.1: Clasificación de las vesículas extracelulares según tamaño.....	5
Figura 1.2.1: Biogénesis de los exosomas	9
Figura 1.3.1: Cromatografía de Exclusión por Tamaño.....	25
Figura 1.4.1: Potenciales aplicaciones terapéuticas de las vesículas extracelulares.....	31
Figura 1.4.2: Ingeniería de vesículas extracelulares.	32
Figura 1.4.3: Clasificación de los métodos de carga de las vesículas extracelulares.	34
Figura 1.6.1: Estructura de la Doxorubicina	45
Figura 3.1A: Estrategia analítica para el aislamiento de VEs.....	59
Figura 3.1B: Estrategia analítica para la incorporación de Doxorubicina.....	60
Figure 4.1.1: Schematic workflow for small EVs isolation by SEC.....	107
Figure 4.1.2: Protein profile and TSG101 expression in EV collection medium.	110
Figure 4.1.3: Nanoparticle tracking analysis of fractions from EV collection medium	111
Figure 4.1.4: Protein profile fractions and Western blot analysis from the plasma sample.	113
Figure 4.1.5: Nanoparticle tracking analysis of the plasma fractions.	115
Figure 4.1.6: Flow cytometry analysis of EVs isolated from cell culture media and plasma fractions.	119
Figure 4.1.7: Representative TEM images of multiple extracellular vesicles.	123
Figure 4.2.1: Evaluation of the experimental design model using an exponential decay pulse for screening analysis.	152
Figure 4.2.2: Interactions plots between variables for Doxorubicin incorporation after the exponential decay electroporation.....	155
Figure 4.2.3: Two-Dimensional Response Contour Plot and Three-Dimensional Response Surface Plot for Doxorubicin incorporation after exponential decay electroporation.....	156
Figure 4.2.4: Interaction plot between variables FE and NEV at different initial Doxorubicin concentrations after exponential decay electroporation.....	160
Figure 4.2.5: Small EV size and distribution following exponential decay pulse electroporation.....	163

Figure 4.2.6: Coefficient plot response applying square wave pulse for screening analysis.....	165
Figure 4.2.7: Interaction graph between variables NEV and FE for the Doxorubicin incorporation after the square wave pulse electroporation.	168
Figure 4.2.8: Two-Dimensional Response Contour Plot and Three-Dimensional Response Surface Plot for Doxorubicin Incorporation After Square Wave Pulse Electroporation.....	169
Figure 4.2.9: Interaction graph between variables DOX and NEV, and NEV and FE for the aggregation response following square wave pulse electroporation.....	175
Figure 4.2.10: Size and distribution of small EV after square pulse electroporation. ..	176
Figure 4.2.11: Response surface plot 3D for Doxorubicin incorporation response and small EV aggregation response.....	178
Supplementary Figure 4.2.1: Analysis of some major protein contaminants on EVs plasma fractions.	206

RESUMEN

Las vesículas extracelulares (VEs) son pequeñas estructuras de origen celular. Participan en la comunicación intercelular y tienen gran un potencial como biomarcadores y para el transporte de moléculas. Sin embargo, los métodos de aislamiento y carga no están uniformemente establecidos.

En esta tesis, se optimizaron las condiciones para purificar VEs pequeñas menores a 200 nm y cargarlas con Doxorubicina. Se aplicó una metodología basada en ultrafiltración acoplada a cromatografía de exclusión por tamaño, y la carga por electroporación, mediante el Diseño de Experimentos (DoE).

El método optimizado permitió aislar sobre un 70% de VEs entre 30-150 nm, siendo positivas para marcadores exosomales. Además, las fracciones de suero ricos en VEs exhibieron bajos niveles de Albúmina y Apo-B100. Durante la carga, el DoE reveló la importancia de la concentración inicial de la droga (DOX), demostrando la presencia de interacciones entre los factores que modifican su incorporación (DOXin). Además, se demostró que la agregación no sólo depende del campo eléctrico aplicado, sino

también de la forma del pulso. En su conjunto, estos resultados sientan las bases de futuras investigaciones para lograr la carga efectiva y eficiente de moléculas en VEs.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are small cellular structures that play a pivotal role in intercellular communication and exhibit significant potential as biomarkers and drug delivery systems. However, methods for their isolation and loading are not uniformly established. In this thesis, conditions were optimized to purify small EVs smaller than 200 nm, and load them with Doxorubicin. We employed a methodology based on ultrafiltration coupled with size-exclusion chromatography, and loading by electroporation, using a Design of Experiments (DoE) approach. The optimized method enabled the isolation of over 70% of EVs in the 30-150 nm size range, which were positive for exosomal markers. Furthermore, serum pools rich in small EVs exhibited low levels of Albumin and Apo-B100 contamination. During the loading process, the DoE revealed the significance of the initial drug concentration (DOX), demonstrating the presence of interactions among factors that modify its incorporation (DOXin). Additionally, it was demonstrated that EV aggregation is not solely dependent on the applied

electric field but also on the pulse shape. Together, these results lay the foundation for future research endeavours aimed at achieving effective and efficient loading of molecules into EVs.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 CONCEPTUALIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

La "Vesícula extracelular" (VE) es el término genérico adoptado por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, www.isev.org) para referirse a un conjunto heterogéneo de partículas. Estas partículas están delimitadas por una bicapa fosfolipídica, carecen de la habilidad para replicarse y son liberadas activa y naturalmente tanto por células eucariotas como procariontas, normales y anormales, al espacio extracelular (Gujrati & Jon, 2014; Thery et al., 2002). Las VEs son distintas a aquellas procedentes del interior de la célula y que pudieran haberse liberado como consecuencia de su disrupción (Thery et al., 2018).

En el pasado las VEs sólo se les consideraba como estructuras celulares residuales, encargadas de la eliminación y reciclaje de lípidos y proteínas que provenían desde el interior de la célula (Pan & Johnstone, 1983). Sin embargo, actualmente se les reconoce la capacidad de inducir cambios fenotípicos mediante la reprogramación de sus células receptoras ubicadas

en la proximidad o a distancia de su fuente de origen (Jung et al., 2020). Esta función estaría dada por sus perfiles de carga y su composición proteica y lipídica, que definen su papel en la comunicación intercelular dentro de la fisiología normal y la progresión de enfermedades (Carnino et al., 2023; S. Liu et al., 2022; Salomon et al., 2022). Por esta razón, en la actualidad las VEs representan una herramienta clínica importante tanto para el diagnóstico, como para la monitorización de diferentes enfermedades.

Las VEs pueden ser aisladas desde diferentes fluidos extracelulares. Son liberadas activamente al medio de cultivo celular y así como también están presentes en una gran variedad de líquidos biológicos como la sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, leche materna, linfa y líquido sinovial (Lässer et al., 2011). Por este motivo, su clasificación tejido específica suele ser compleja, siendo identificadas con diferentes nombres en la literatura (Colombo et al., 2014; Morello et al., 2013). Ante esta situación, la ISEV propone una clasificación más general la cual depende de su origen compartimental o biogénesis (Thery et al., 2018).

Como es posible observar en la Tabla 1.1.1 las VEs se clasifican en a) Exosomas, de un tamaño entre 30 – 150 nm y que son liberadas desde el

Endosoma Multivesicular (*Multivesicular body, MVB*) luego de la fusión de esta estructura con la membrana plasmática; b) los Ectosomas o Microvesículas, que representan un grupo más heterogéneo de VEs y comprenden un tamaño entre 50 nm – 1 µm, siendo liberadas por gemación de la membrana celular (Allelein et al., 2021; Raposo & Stoorvogel, 2013) y c) los Cuerpos apoptóticos, definidas como VEs que provienen exclusivamente desde células apoptóticas (Battistelli & Falcieri, 2020).

Tabla 1.1.1: Clasificación de las vesículas extracelulares según su origen.

Subtipos de VE	Tamaño	Biogénesis	Componentes
Exosomas	30-150 nm	Originados por vía endosomal en los cuerpos multivesiculares (MVB) y liberados tras la fusión de MVB con la membrana plasmática	Proteínas del complejo ESCRT (Alix, TSG-101), proteínas de estrés térmico (HSP-A8/-70/-90) y tetraspaninas CD63, CD9, CD81
Ectosomas (microvesículas, micropartículas)	50- 1000 nm	Liberados por gemación directa desde la membrana plasmática	Proteínas del citoesqueleto, enzimas glicolíticas, integrinas, anexinas y microdominios de colesterol
Cuerpos apoptóticos	50-5000 nm	Liberado de células apoptóticas	Proteína Anexina V lipo-fosfatidilserina
Oncosomas	1000-10000 nm	Liberados desde células tumorales	

Información obtenida y adaptada de (Salomon et al., 2022)

Sin embargo, la alta heterogeneidad de las VEs y las limitaciones técnicas de las metodologías utilizadas para su purificación, hacen que sea común el

coislamiento de poblaciones mixtas de vesículas. A la fecha, no hay un consenso sobre cuál los métodos es el más apropiado para lograr una mejor purificación. Esto implica que sea un desafío muy complejo determinar con certeza el origen endosomal de los aislados de VEs en este emergente campo de investigación (Ludwig et al., 2019).

De esta manera, la presencia o ausencia de los componentes descritos en la Tabla 1.1.1 en los aislados de VEs, no asegura que estos estén constituidos exclusivamente por un subgrupo particular de vesículas, sino más bien, sólo revelaría su existencia en dichos aislados (Kowal et al., 2016). Por consiguiente, con el propósito de establecer una caracterización más precisa de las VEs, la ISEV a través de las recomendaciones publicadas en la guía “Minimal Information for Studies of EVs 2018” (MISEV2018) sugiere su clasificación en función de su rango de tamaños. De esta manera, se define que aquellas VEs con diámetros entre 30 nm y menos de 200 nm se denominan de manera general como VEs pequeñas (small EVs), incorporando así a los exosomas, una porción de ectosomas, y otras vesículas de tamaño similar (Thery et al., 2018). Por otro lado, aquellas VEs que superen los 200 nm se clasifican genéricamente como VEs grandes/medianas (large/medium EVs), donde se incluyen el resto de las

ectosomas y una población más grande de VEs denominada oncosomas grandes (large oncosomes), que tienen un tamaño entre 1 y 10 μm y son liberados exclusivamente por células tumorales (Di Vizio et al., 2009).

Al adoptar esta nomenclatura, se fomenta una mayor precisión y claridad en la descripción y estudio de las diferentes poblaciones de vesículas extracelulares (Figura 1.1.1).

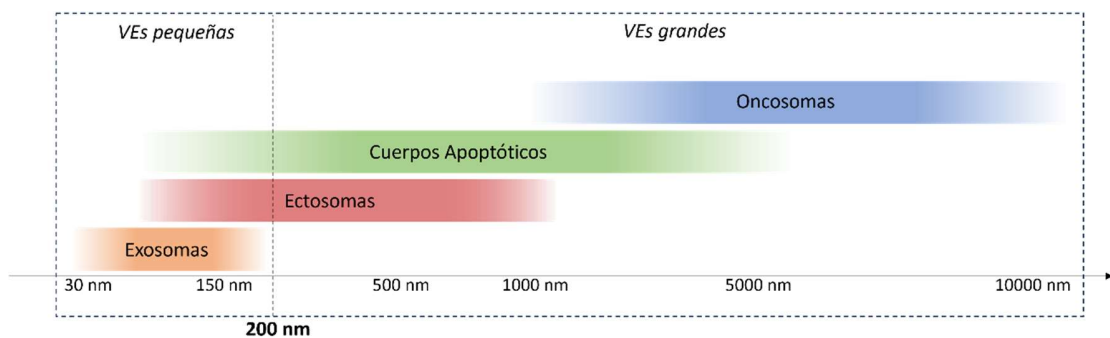


Figura 1.1.1: Clasificación de las vesículas extracelulares según tamaño. Las VEs pequeñas incluyen a los exosomas, una fracción de Ectosomas (Microvesículas y Micropartículas) y en mucha menor medida a una porción de Cuerpos apoptóticos; mientras que las VEs grandes incluye al resto de Ectosomas, Cuerpos apoptóticos y grandes oncosomas. (Elaboración propia)

1.2 DESCRIPCIÓN Y ORIGEN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

1.2.1 Exosomas

Fueron descritos por primera vez en los primeros estudios de Chargaff y West como parte de una fracción particulada de productos de desecho celular, capaz de sedimentar a altas velocidades de centrifugación, y que son secretadas al espacio extracelular con el fin de mantener la homeostasis (Chargaff & West, 1946; Couch et al., 2021). Posteriormente, los exosomas fueron caracterizados como partículas alargadas y esféricas de 30 a 60 nm de diámetro, ricos en componentes lipídicos. Aunque no fue posible establecer una función definida, se encontraron estructuras similares en el sobrenadante de líneas celulares y en el suero bovino fetal en suspensión, sugiriéndose una amplia distribución en diferentes fluidos biológicos (Chargaff & West, 1946; Dalton, 1975; Wolf, 1967). No fue hasta las investigaciones de Raposo y Zitvogel, quienes describieron un rol fisiológico de estas vesículas en los mecanismos de modulación de la respuesta inmune, lo que condujo al auge de artículos científicos en esta materia (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998).

1.2.1.1 Biogénesis de los exosomas

Los exosomas poseen un origen endosomal, hecho que es primordial para definirlos como tal (Thery et al., 2018).

El proceso comienza con la invaginación de la membrana celular originando una pequeña vesícula llamada Endosoma, las que son compartimentos intracelulares que contienen moléculas internalizadas desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Estas estructuras (*early endosomes, EE*) pueden fusionarse con vesículas provenientes del Golgi (*trans-Golgi network*) incorporando lípidos y proteínas de la célula de origen, así como otras moléculas desde el citosol. Durante la endocitosis, se forman invaginaciones de estas membranas que dan origen a las vesículas intraluminales (*intraluminal vesicles, ILV*). Durante su recorrido, los EE maduran en endosomas tardíos (*late endosomes, LE*) en el espacio intracelular, los que posteriormente se transformarán en los MVB conteniendo múltiples vesículas intraluminales en su interior y donde se producirá la maduración final de estas (Y. Zhang et al., 2019).

Las ILV maduras en el MVB que se encuentran enriquecidas en subconjuntos de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos pueden tener 3 diferentes destinos de acuerdo a como se observa en la Figura 1.2.1: A) fusionarse con la membrana del lisosoma para degradar su contenido a través de hidrolasas, B) participar en la formación de los autofagosomas, o C) los MVB se transportan a la membrana plasmática a través de la red citoesquelética y microtubular y se someten a exocitosis tras fusionarse con la superficie celular, por lo que los ILV son secretados como exosomas (Colombo et al., 2014).

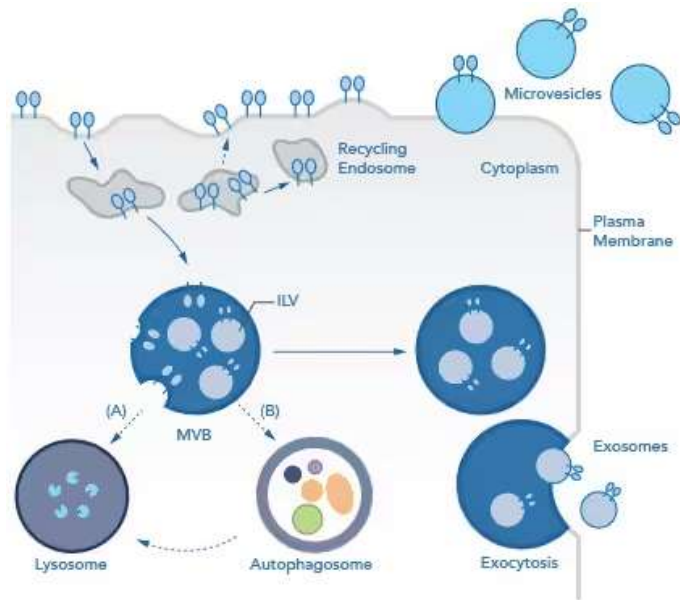


Figura 1.2.1: Biogénesis de los exosomas

La formación de los exosomas depende del destino final de los endosomas que dan origen a los MVB. Los mecanismos que llevan a su degradación son A) la fusión directa con el lisosoma, y B) la formación de autofagosomas. La liberación del exosoma por exocitosis C) ocurre gracias a la movilización del MVB a través del citoesqueleto y su posterior fusión con la membrana celular para liberar a las ILV maduras. (Obtenida de ©2023 Novus Biologicals, www.novusbio.com.)

En general, en la superficie de los exosomas se describe la expresión de una amplia variedad de proteínas de membrana (ver Tabla 1.1.1) como las moléculas de MHC-I y MHC-II, las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63, las proteínas de choque térmico-A8, -70 y -90 (HSP-A8/-70/-90) entre muchas otras (Lauwers et al., 2018; Y. Zhang et al., 2019). Además, presentan proteínas del complejo ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) como TSG-101 y Alix, cuya presencia define la biogénesis endosomal (Meister et al., 2017).

Interesantemente, la expresión de estas proteínas exosomales se modifican en condiciones patológicas, lo que sugiere que estas vesículas podrían ser utilizadas como biomarcadores de un gran número de enfermedades (Jankovičová et al., 2020; Keller et al., 2009; Koh et al., 2023; Logozzi et al., 2009; Nilsson et al., 2009; Pike et al., 2023; Zhou et al., 2006).

1.2.2 Ectosomas o Microvesículas

A diferencia de los exosomas, los ectosomas o microvesículas, son estructuras generadas y liberadas directamente por gemación de la membrana plasmática. Presentan un diámetro entre 50 nm a 1 μ m, por lo

que se agrupan en una población mucho más heterogénea que los exosomas (Arraud et al., 2014).

La liberación de estas estructuras es constitutiva al igual que los exosomas, pero en una proporción muchísimo menor. Este proceso puede aumentar drásticamente por estímulos que induzcan la liberación de calcio intracelular, la generación de ATP y la activación de las proteínas quinasas promoviendo así fuertes respuestas de gemación (Cocucci & Meldolesi, 2015).

Estudios recientes han demostrado que los ectosomas también participan como vectores de intercambio de señales biológicas e información intercelular, mediando la activación, la modificación fenotípica y la reprogramación de la función celular, tal como los exosomas, aunque los mecanismo exactos no están del todo descritos (Harding et al., 2013).

1.2.2.1 Biogénesis de los Ectosomas

A diferencia de los exosomas, se ha descrito que para la liberación de ectosomas se requiere del ensamblaje de microdominios de colesterol (*lipid raft*) en la membrana de la célula de origen. Durante este proceso, se

remueven componentes de la membrana plasmática, por lo que estas vesículas también contienen estructuras de membrana que pertenecen a su célula de origen, como proteínas del citoesqueleto, enzimas glicolíticas, integrinas y anexinas. Además, en estos microdominios se acumulan proteínas citosólicas y ácidos nucleicos (principalmente ARNm y miARN) que entran en contacto con la porción citosólica de la membrana plasmática, las que son incorporan selectivamente. Este proceso requiere del aporte energético, síntesis de ARN y traducción de proteínas, regulando así su biogénesis (Sadallah et al., 2011).

1.2.3 Cuerpos apoptóticos

Los cuerpos apoptóticos son estructuras de un rango de tamaño entre 500 nm - 2 μ m, que son liberadas al espacio extracelular luego de una muerte celular fisiológicamente programada (Ihara et al., 1998). La apoptosis es un punto de control crítico en el desarrollo celular, ya que promueve su diferenciación e induce la regeneración de los tejidos a través de la eliminación de las células senescentes (Li et al., 2020).

Durante la apoptosis ocurre la segmentación del contenido celular en distintas vesículas membranosas denominadas cuerpos apoptóticos. Su función es la rápida eliminación del material apoptótico por parte de las células fagocíticas (Povea-Cabello et al., 2017). Cada cuerpo apoptótico puede contener una gran variedad de componentes celulares: micronúcleos, restos de cromatina, porciones de citosol, proteínas degradadas, fragmentos de ADN o incluso orgánulos intactos, lo que sugiere que estas estructuras también pueden facilitar la comunicación intercelular (Wickman et al., 2013).

En general, las VEs constituyen un único sistema de comunicación no convencional sumamente complejo en términos funcionales y altamente heterogéneo. Este sistema ha abierto nuevos caminos para la comprensión de la comunicación intracelular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Cocucci & Meldolesi, 2015). Sin embargo, su aislamiento es complejo y altamente dependiente del método de seleccionado (Thery et al., 2018). En consecuencia, se hace necesario abordar estos aspectos con un enfoque multidisciplinario y una innovadora combinación de técnicas analíticas. La implementación de estrategias que permitan la separación más precisa de subpoblaciones vesiculares y el desarrollo de métodos

optimizados para su caracterización molecular específica resultan imperativos. Solo a través de estos esfuerzos se podrán superar los obstáculos actuales y aprovechar plenamente el potencial de las VEs como biomarcadores y herramientas terapéuticas en el ámbito biomédico.

1.3 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y SEPARACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUEÑAS

Los fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, el suero y la leche, contienen una mayor concentración de VEs pequeñas en comparación con otros fluidos biológicos, lo que los convierte en matrices candidatas para su uso como fuentes de VEs en producción a gran escala (Ter-Ovanesyan et al., 2021). Sin embargo, estos fluidos también presentan altas concentraciones de otras proteínas de la matriz, como albúmina, caseína y grasas, lo que dificulta su aislamiento y purificación. En estas matrices complejas, tanto las proteínas como las lipoproteínas pueden coaislarse con las VEs independientemente de la técnica aplicada, resultando en una menor abundancia relativa de VEs y un menor grado de pureza en los

aislados obtenidos (Böing et al., 2014; Ter-Ovanesyan et al., 2023; Ter-Ovanesyan et al., 2021).

Aunque en condiciones fisiológicas las características y la proporción de los componentes lipídicos y proteicos de estas VEs pequeñas dependen principalmente de su origen celular (Hagey et al., 2023), también se ha demostrado que estos resultados son altamente dependientes de la estrategia aplicada para su recuperación (Chen et al., 2021; Zhao et al., 2021).

Existen diversas técnicas y metodologías de aislamiento para estudiar las VEs que se basan principalmente en sus propiedades físicas. Cuando se trata de 1) Tamaño, la mayoría de las técnicas empleadas se basan en ultracentrifugación diferencial (UC), ultrafiltración (UF), filtración secuencial, y la cromatografía por exclusión por tamaño (SEC). Cuando se separan de acuerdo a 2) Densidad, se emplean estrategias como la ultracentrifugación por gradiente de densidad (dUC) y los dispositivos acústico-microfluídicos integrados (MF) (Dooley et al., 2021; Wu et al., 2017). Otras técnicas de separación como 3) Inmunofinidad y 4) Precipitación con polímeros como el polietilenglicol (PEG) utilizan la expresión selectiva de moléculas en la superficie de las VEs (Chung et al., 2020; Newman et al., 2022). En la actualidad, las técnicas basadas en

captura inmuno-magnética y filtración de flujo tangencial son las estrategias que ofrecen los mejores rendimientos en términos de escalabilidad, recuperación y especificidad (evaluado como la proporción de VEs extraídas en relación con la proteína total) para el aislamiento de las VEs (Kimiz-Gebologlu & Oncel, 2022; Yamashita et al., 2016).

En varias de estas estrategias se han descrito amplios rangos de recuperación y grados de pureza, siendo algunas donde algunas técnicas son más laboriosas que otras. Sin embargo, muchos de los procedimientos de aislamiento descritos requieren equipos de alto costo, personal altamente capacitado o simplemente no son adaptables para usos clínicos (Li et al., 2017; Salomon et al., 2022). Por ejemplo, la UC, una de las metodologías más utilizada para la recuperación de VE pequeñas, favorece el coaislamiento de lipoproteínas como HDL y LDL (Onódi et al., 2018; Yuana et al., 2014), provoca la deformación de las vesículas y promueve la agregación de proteínas en estas vesículas al ser expuestas a velocidades de centrifugación superiores a 100.000 x g (Gyorgy et al., 2011). Por otra parte, las estrategias basadas sólo en Ultrafiltración (UF) reportan la presencia de contaminantes proteicos y pérdidas de VEs en la membrana de filtrado, mientras que las estrategias basadas en su densidad o la expresión

de moléculas en la superficie, sólo son capaces de aislar una fracción de las poblaciones de VEs pequeñas generando un sesgo por pérdidas de muestras (Cvjetkovic et al., 2014; Konoshenko et al., 2018).

Aunque la mayoría de estos métodos permiten una rápida obtención de vesículas, su abundancia y grado de purificación sigue siendo un tema controvertido. El uso de agentes precipitantes, podría solucionar gran parte de estos inconvenientes, ya que ayudarían a eliminar las proteínas contaminantes. Sin embargo, estas moléculas pueden inducir efectos tóxicos en las aplicaciones clínicas, como las terapias basadas en el uso de estas VEs (Martins et al., 2018).

Así, aún no se ha alcanzado un consenso definitivo sobre cuál estrategia de purificación sería la más adecuada para el aislamiento de las VEs pequeñas. A pesar de esto, recientes publicaciones sugieren que en el ámbito diagnóstico, no sería imprescindible obtener aislados de VEs de alta pureza, sino más bien es necesario lograr un alto rendimiento en su recuperación (Liangsupree et al., 2021; Veerman et al., 2021). Por otra parte, para su uso en aplicaciones terapéuticas específicas como en el caso de la administración de fármacos, la inmunoterapia o la reprogramación celular, lograr obtener subpoblaciones de VEs bien definidas e intactas podría ser de

mayor utilidad (Gomari et al., 2018; Gomari et al., 2019). De esta manera, es crucial considerar el propósito del uso final de las VEs para decidir el nivel de pureza requerido en el aislamiento, asegurando así su adecuado aprovechamiento tanto en diagnóstico como en terapia.

La tabla 1.3.2 muestra una comparación de las técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares y sus principales características reportadas.

Tabla 1.3.1 Comparación de las técnicas de aislamiento de vesículas extracelulares

Principio del Método	Tiempo de procesado	Volumen de muestra	% Recuperación	Grado de Pureza
Ultracentrifugación	2 - 20 h	500 µL - 1 mL	5 - 70%	Baja - Moderada
Centrifugación por gradiente de densidad	>21 h	500 µL - 1 mL	5-25%	Similar a la UC
Precipitación	13 h	1 mL	-	Baja
Inmunoprecipitación	<2 h	<400 µL	Bajo	-
Filtración	18 h	100 - 500 µL	<90%	Mejor que UC
Conjugación	1 h	2 mL	81%	Alta
Inmunocaptura	0.5 - >24h	100 µL - 2 mL	5 - 99%	Baja - Similar a UC
Ondas de ultrasonido	<30 min	50 µL	>80%	-
Microfluidos	<5 min - 2h	30 - <100 µL	>80%	>90%
Microfluidos + Inmunocaptura	20 - 2h	20 - 100 µL	40-99%	-

Adaptado de (Akbar et al., 2022)

1.3.1 Consideraciones generales para los estudios en vesículas extracelulares

La ISEV estableció en el año 2014 una serie de directrices mínimas para los estudios de VEs que deben ser reportados en todas las investigaciones en este campo, con el objetivo de proporcionar una orientación para la estandarización de protocolos e informes. Esta guía cubre aspectos como la separación/aislamiento, la caracterización y estudios funcionales de las VEs. De esta manera, se espera estimular una mayor fiabilidad y reproducibilidad de los resultados publicados sobre VEs, y para fomentar la promesa de que las VE pueden ser utilizadas como biomarcadores o para aplicaciones terapéuticas (Lötvall et al., 2014).

En su actualización (MISEV2018), además de incorporar algunos cambios en la terminología de las VEs, se establece que no existe un único método de separación de VEs que permita aislarlas desde diferentes fluidos biológicos con una especificidad óptima, con alto grado de pureza y en un corto período de tiempo (Thery et al., 2018). Por este motivo, para establecer efectivamente la presencia de VE y valorar la calidad de la separación, se proporcionan ejemplos de marcadores de VEs que deben ser reportados para demostrar su presencia, pero también se destaca la

necesidad de informar la ausencia de marcadores "negativos" o de moléculas contaminantes provenientes de la matriz.

Por esta razón, al seleccionar el método de recuperación de las VEs, o la combinación de ellos, es crucial contemplar detenidamente factores tales como el tiempo de procesamiento, la capacidad de la técnica para manejar diferentes volúmenes de muestra, el porcentaje de recuperación, el nivel de pureza alcanzado y, especialmente, la simplicidad operativa.

En particular, cualquier técnica desarrollada o aplicada para el aislamiento de VEs debe indicar a qué objetivo apunta (alto porcentaje de recuperación, alta especificidad en el aislamiento, o ambos), y proporcionar información de caracterización. Por ejemplo, la UC o la UF son técnicas que permiten aislar un alto número de vesículas en un volumen reducido, pero presentan una baja especificidad. Por otro lado, las técnicas basadas en captura por inmuno-afinidad ofrecen una alta especificidad, pero una baja tasa de recuperación de VEs. Esto permitirá que el método seleccionado pueda ser incorporado de manera rutinaria en diversas aplicaciones que contribuyan al avance y la aplicación efectiva de las VEs en otras áreas de investigación y terapia.

En relación a la caracterización de las VEs aisladas por cualquiera de los métodos utilizados, debe demostrarse no sólo la expresión de marcadores proteicos, sino que además se debe evidenciar su presencia a través de imágenes de alta resolución, y utilizar técnicas complementarias que permitan estimar las características biofísicas de las partículas recuperadas (como la dispersión de la luz, entre otras).

En particular, la MISEV2018 establece que deben presentarse la mayor cantidad de información posible sobre la fuente de origen de las VEs, así como también las características de la matriz en donde ellas se encuentran. Establecer características generales como la concentración total de proteínas, el número de partículas, la concentración total de lípidos, entre otras, ayudarán a los investigadores definir y establecer las condiciones iniciales de trabajo que permitan evaluar la reproducibilidad de las técnicas y estrategias utilizadas.

En relación a la caracterización proteica de las VEs recuperadas, se debe entregar evidencia de:

A) al menos una **proteína transmembrana** para demostrar directamente sobre la capa lipídica de la vesícula, si ellas brotan

directamente de la membrana plasmática o presentan un origen endosomal (Tetraspaninas CD63, CD81, C82; MHC-I; Integrinas, receptores, etc.)

B) al menos una **proteína citosólica** para demostrar que en la preparación analizada se encuentran estructura de bicapas lipídicas que encierran material intracelular, como cabe esperar de cualquier VEs (proteínas con capacidad de unión a lípidos o a proteínas de membrana como TSG-101, CHMP, proteínas accesorias como ALIX, proteínas de choque térmico como HSP70, entre otras).

C) la ausencia de componentes que no pertenecen a las estructuras de las VEs, pero que son co-aisladas con ellas. En este ámbito, los mejores marcadores negativos hasta la fecha son las lipoproteínas producidas por el hígado, apolipoproteínas A1/2 y B, y albúmina.

Finalmente, la caracterización individual de las VEs aisladas debe alcanzarse través de imágenes de alta resolución empleando la Microscopía de Transmisión Electrónica, Microscopía Electrónica de Barrido, la Microscopía de Fuerza Atómica, etc. También se deben estimar las características biofísicas de las VE como el tamaño medido por detección de impulsos resistivos (desplazamiento del campo eléctrico), o propiedades

de dispersión de la luz [análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), citometría de flujo de alta resolución, dispersión de la luz multiángulo acoplada al fraccionamiento asimétrico campo-flujo (AF4)]; o propiedades de fluorescencia [espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), citometría de flujo de alta resolución] o la composición química medida por espectroscopia Raman.

Con esta última actualización, la ISEV establece que la caracterización de las VEs utilizando técnicas múltiples y complementarias es importante para evaluar la gran cantidad de resultados obtenidos a través de los diversos métodos de separación propuestos y, con esto, lograrestablecer la probabilidad de que los biomarcadores o las funciones estén asociados efectivamente a las VE y no a otros compuestos que pudieran ser co-aislados.

1.3.2 Ultrafiltración y Cromatografía por exclusión por tamaño para el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas

La cromatografía de exclusión por tamaño (Size Exclusion Chromatography, SEC), también conocida como Cromatografía por filtración en gel es una técnica analítica cromatográfica utilizada para la separación de moléculas en función de su tamaño a lo largo de la columna

(Figura 1.3.1). Las partículas pequeñas presentes en la muestra entran en los poros de la fase estacionaria siendo retenidas por ella, mientras que las partículas más grandes recorren un camino más directo a través del gel y por lo tanto, eluyen primero (Pharmacia Fine Chemicals, 1976; Skoog et al., 2008). La muestra se deposita en una columna con matriz de gel previamente preparada y equilibrada. La matriz de gel de poliacrilamida, generalmente esta formada por una red reticular de agarosa, dextrano o una combinación de ambas (comercialmente reconocidas como Sepharosa y Sephacryl o Sephadex). Estas resinas son preparadas al 2%, 4% o 6% (refiriéndose al porcentaje de agarosa reticulada), ofreciendo un tamaño de partícula entre 60 - 200 μm (Duong-Ly & Gabelli, 2014).

Entre las resinas más utilizadas para el aislamiento de VEs pequeñas por SEC, se encuentran los geles formados por Sepharose CL-2B y 4B. Sin embargo, muchos trabajos indican que aún empleando estas resinas, pueden coislar VEs y determinadas lipoproteínas (Lane et al., 2019; Liu et al., 2020). Estas dificultades son inherentes al proceso de la SEC y toman mayor relevancia cuando se trata de muestras que provienen de matrices complejas. La recomendación general para este tipo de muestras es incluir pasos preparatorios para eliminar los contaminantes de mayor tamaño,

utilizando técnicas secuenciales para lograr una completa separación (Wei et al., 2020). La optimización de procesos es un tema cada vez más actual en el área de investigación de las VEs y en particular, en los métodos de separación y aislamiento (Sidhom et al., 2020).

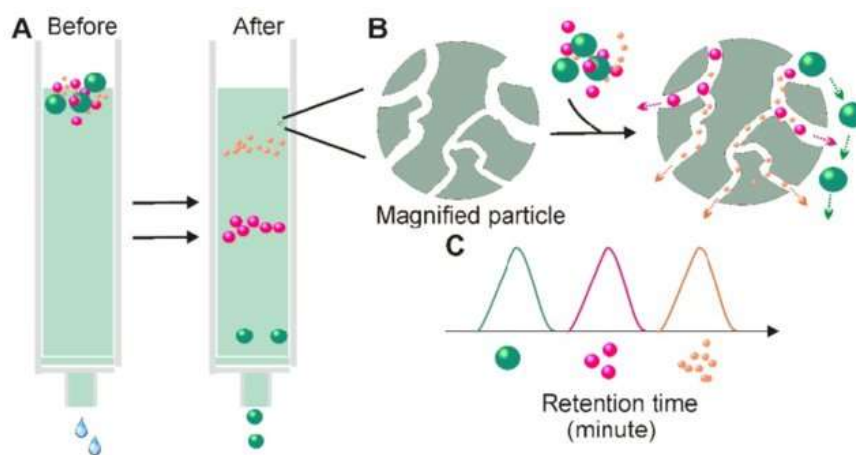


Figura 1.3.1: Cromatografía de Exclusión por Tamaño.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un tipo de cromatografía líquida en la que (A) las moléculas presentes en la muestra se separan (B) por la inclusión o exclusión de ellas en una fase estacionaria porosa según su tamaño hidrodinámico. De esta manera, (C) las moléculas de mayor tamaño son excluidas de los poros debido a un efecto estérico y pasan rápidamente a través de la matriz por lo cual eluyen primero. Las biomoléculas más pequeñas, tienen mayor accesibilidad a las cavidades de la matriz porosa, por lo que presentan tiempos de retención superiores en la columna. Obtenida de (Yang et al., 2020)

Mediante una evaluación sistemática de los métodos UC, dUC, UF, precipitación basada en PEG, captura por inmunoafinidad, microfluidos y

SEC, la recomendación general sugiere la optimización de protocolos combinados, cuya elección dependerán de los objetivos que se deseen alcanzar con la investigación y de la complejidad de la matriz desde donde provengan las VEs.

La combinación de diferentes técnicas parece ser la mejor estrategia para obtener aislados de VEs más puros y confiables. En este sentido, tanto la UF como la SEC presentan características que pueden complementarse para favorecer el aislamiento de las VEs más puras y en mayor concentración.

La UF es un proceso de separación de partículas a través de una membrana porosa. De esta forma permite la separación mecánica de sólidos suspendidos o disueltos mediante un tamiz, utilizando la presión hidrostática para forzar el agua a través de una membrana semipermeable. La separación se logra a través del tamizado (es decir, tamaño exclusión) en función del tamaño de poro y corte de peso molecular (MWCO) expresado en kilodaltons (kDa). Al emplear una membrana con un MWCO adecuado, se pueden eliminar eficazmente las moléculas de mayor tamaño, como residuos y agregados proteicos lo que permite obtener una muestra más limpia antes de la SEC. Esto ayuda a mejorar la pureza de la población de EV aisladas.

De esta manera, el empleo de un método combinado entre UF/SEC ofrece

- a) una mejor separación de moléculas grandes en relación a las de menor tamaño, b) una gran flexibilidad en la elección de eluyentes y tampones, lo que hace que la UF/SEC sea adecuada para una amplia gama de aplicaciones, c) preservación de la actividad biológica de las moléculas separadas manteniendo su función, ya que ambas se describen como métodos de aislamiento suave, d) tiempos de separación relativamente cortos y bien definidos frente a otros métodos y e) ofrece una mínima pérdida de muestras ya que durante la UF/SEC no ocurren interacciones fuertes entre los solutos, las fases estacionaria y móvil, e) además del bajo costo de implementación y sin necesidad de utilizar equipos especializados (Held & Kilz, 2021).

1.4 APLICACIONES Y AVANCES TERAPÉUTICOS BASADOS EN VESÍCULAS EXTRACELULARES

En los últimos 20 años se ha demostrado que las VEs pequeñas poseen propiedades prometedoras como posibles nuevos sistemas de administración de fármacos, biomarcadores y dianas terapéuticas.

Debido a su secreción constitutiva y su membrana compuesta por una bicapa lipídica, estas VEs tienen una habilidad natural para atravesar eficazmente barreras biológicas (Alvarez-Erviti et al., 2011).

Interesantemente, su carga se mantiene resguardada por largo tiempo quedando protegida de la degradación por agentes externos (Cully, 2021; Herrmann et al., 2021). Görgens y colaboradores evaluaron la estabilidad estructural de las VEs y de su contenido bajo diferentes condiciones de almacenamiento (Görgens et al., 2022). Establecieron que cuando las VEs son almacenadas en bajo ciertas condiciones apropiadas [Buffer Fosfato Salino suplementado con albúmina de suero humano y trehalosa (PBS-HAT)] a -80°C , no se observan cambios significativos ni en la morfología ni en el contenido de las vesículas hasta por 2 años, estableciendo así las bases para la producción de lotes EV consistentes para uso terapéutico.

En otro estudio se evaluó la estabilidad del Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (*PEGF; pigment epithelium-derived factor*) incorporado en VEs. El PEGF es un potente inhibidor de la neovascularización patológica, pero con una estabilidad limitada y una vida media corta lo que reduce su utilidad terapéutica. Recientemente, Fan y colaboradores (Fan et al., 2023) demostraron que la encapsulación de PEGF en VEs ofrece una mayor captación y estabilidad superior de la droga comparado con su forma libre en las células diana de modelos *in-vitro* e *in-vivo*.

Gracias a estas características las VEs son candidatos ideales para ser utilizados como biomarcadores en diversas patologías o formando parte importante de una estrategia terapéutica como vehículos de administración de fármacos y de una amplia variedad de moléculas bioactivas (Ciferri et al., 2021; Garcia-Manrique et al., 2018; Thietart & Rautou, 2020).

1.4.1 Biomarcadores de enfermedades

En la actualidad se está experimentando un aumento en la demanda por biomarcadores capaces de detectar enfermedades en sus etapas tempranas, además de servir como nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, los

exosomas has sido objeto de un amplio estudio como VEs pequeñas que desempeñan un papel crucial. A partir de ellos, se puede obtener ADN tumoral circulante (ADNtc) y otros marcadores tumorales derivados de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o metabolitos lo que resulta fundamental para identificar tumores previamente inaccesibles (Haraszti et al., 2016).

Se considera que los exosomas tienen un gran potencial como biomarcadores para la detección temprana de enfermedades no transmisibles, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las neurodegenerativas, las alteraciones metabólicas lipídicas y las enfermedades renales, entre otras afecciones (Rezaie et al., 2022). También existe amplia evidencia sobre la contribución de las VEs en la activación y supresión inmunitaria de patologías relacionadas con enfermedades autoinmunes, la inflamación crónica y la medicina regenerativa (Casella et al., 2018; Rutman et al., 2018). La figura 1.4.1 describe a modo general las áreas de aplicación de las VEs como agentes de apoyo en el ámbito clínico-terapéutico.



Figura 1.4.1: Potenciales aplicaciones terapéuticas de las vesículas extracelulares

Potencial diagnóstico y terapéutico de las vesículas extracelulares (VE). (i) VE como biomarcadores: sus múltiples características fisiológicas permiten recoger desde distintas fuentes biológicas. (ii) Las VE como dianas terapéuticas: numerosos estudios han demostrado su utilidad para ayudar en la reparación ósea, la regeneración del músculo esquelético y la regeneración del cartílago. (iii) VE como sistemas transportadores de fármacos: gracias a las herramientas de ingeniería de vesículas el cargo de estas estructuras puede ser modificado para transportar moléculas con potencial terapéutico. (iv) Las VE en inmunoterapia: son capaces de modular la respuesta inmune y en particular a las células dendríticas. (v) Terapia dirigida de VE: las vesículas pueden ser funcionalizadas en su superficie para la distribución en dianas específicas. Elaboración propia

1.4.1.1 Vesículas extracelulares como sistemas de transporte de drogas

Debido a su biogénesis natural, las VEs presentan una gran biocompatibilidad con diversos tejidos, lo que les otorga un enorme

potencial terapéutico como sistemas de transporte de fármacos (drug delivery systems, DDS) ya que ofrecen una mayor estabilidad y una respuesta inmunológica limitada (Meng et al., 2020).

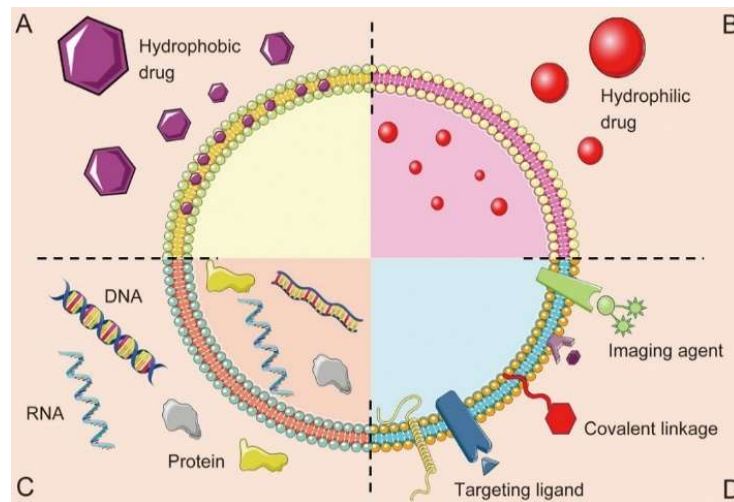


Figura 1.4.2: Ingeniería de vesículas extracelulares.

La bicapa lipídica encierra un núcleo acuoso que pueden incorporar compuestos (A) hidrofóbicos o (B) hidrofílicos, respectivamente. (C) Las VEs pueden utilizarse para transportar ADN, ARN, proteínas o moléculas exógenas para ser utilizadas como sistemas de transporte de drogas. (D) Gracias a la Ingeniería de Vesículas ha sido posible acoplar estructuras y moléculas sobre la superficie de las VEs que favorecen la entrega selectiva de la carga. Obtenida de (Luan et al., 2017)

Diversos estudios han demostrado que aplicando estrategias de ingeniería de vesículas, éstas pueden ser adaptadas para el transporte de moléculas exógenas como fármacos, productos naturales/sintéticos o ARN silenciadores/bloqueadores (Luan et al., 2017) (Figura 1.4.2). El objetivo principal de estas aplicaciones ha sido el desarrollo de terapias enfocadas en la lucha contra el cáncer y la modulación de la respuesta inmune (O'Brien et al., 2015; Yuan et al., 2017). Sin embargo, el éxito de estas estrategias depende en gran medida de la eficiencia de su carga (Sutaria et al., 2017).

Para abordar este desafío, se han diseñado enfoques diversos, que pueden agruparse en dos categorías principales: estrategias de pre-carga y post-carga (Figura 1.4.3.). Cada una de estas aproximaciones ofrece ventajas y desafíos únicos en su intento de optimizar el potencial terapéutico de las VEs (Luan et al., 2017).

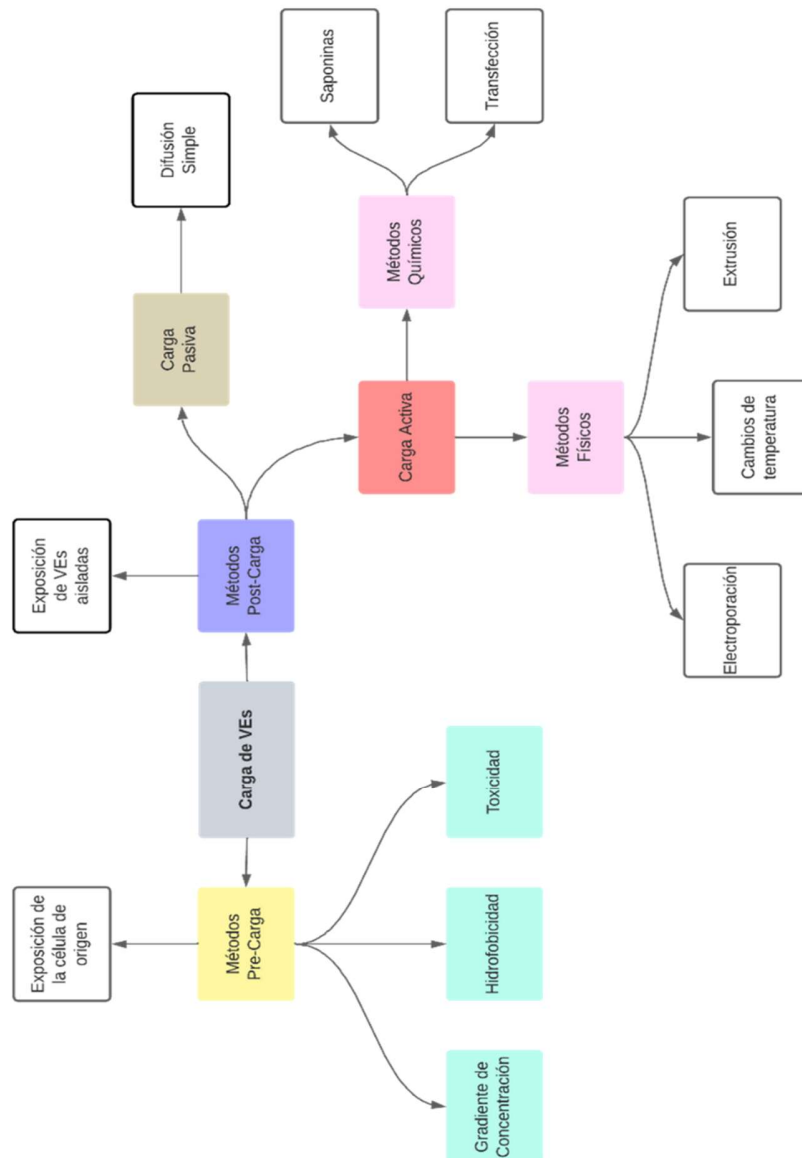


Figura 1.4.3: Clasificación de los métodos de carga de las vesículas extracelulares.

Los métodos de carga de vesículas extracelulares (VEs) se pueden dividir en dos categorías: Pre-Carga y Post-Carga. Los métodos Pre-Carga (caja amarilla) implican la introducción de las moléculas de interés en el interior de la célula productora de VEs. Esto puede lograrse mediante procesos como la difusión o la transfección. Por otro lado, los métodos Post-Carga (caja violeta) se centran en incorporar las moléculas de interés en VEs que han sido previamente aisladas. Este proceso puede realizarse mediante difusión simple o a través de modificaciones en la membrana de las VEs inducidas de por métodos químicos o físicos. Elaboración propia

- En las estrategias pre-carga, son las propias células de origen de las VEs quienes son expuestas a la droga en condiciones subtóxicas, para posteriormente recuperar las VEs cargadas desde el medio extracelular.
- Por otro lado, las estrategias post-carga se basan principalmente en aplicaciones ex vivo, donde primero se aíslan las VEs y luego se cargan con moléculas terapéuticas mediante la manipulación directa o indirecta de su membrana.

Estas dos estrategias ofrecen enfoques diferentes para lograr la carga eficiente de las VEs con moléculas exógenas. La elección entre ellas dependerá del contexto específico de la investigación y los objetivos terapéuticos en cuestión.

1.4.1.1 Métodos pre-carga

Las estrategias de pre-carga pueden proporcionar una producción continua y sencilla de VEs cargadas, sin comprometer la integridad de la membrana.

Sin embargo, estos procesos suelen tomar más tiempo y son difíciles de controlar. En estas instancias, la cantidad de fármaco que ingresa y se carga, depende de la eficacia de la transfección y la posible citotoxicidad asociada a la molécula de interés, lo que incluso podría inducir la liberación de otras VEs no deseadas (Y. F. Zhang et al., 2019).

En estas estrategias, la eficacia de carga está condicionada por el gradiente de concentración y la hidrofobicidad de las moléculas. Los mejores resultados se han obtenido con moléculas hidrófobas y de bajo peso molecular, ya que interactúan preferentemente con las capas lipídicas de la membrana de las vesículas (Piffoux et al., 2019)

1.4.1.1.2 Métodos post-carga de carga activa o carga pasiva

En el contexto de los métodos de post-carga, las VEs son aisladas y purificadas para luego ser cargadas con las moléculas de interés (Hood, 2016). Esta estrategia de carga exógena, se divide en métodos de carga pasiva y métodos de carga activa.

- a) La carga pasiva se refiere a métodos que no requieren la adición de sustancias que permeabilicen la membrana, lo que los convierte una forma simple de carga. Sin embargo, su principal desventaja radica en la baja capacidad de carga.
- b) En los métodos de carga activa, se requiere algún tipo de interrupción de la membrana que induce un aumento de su permeabilidad. Este cambio puede ser inducido por métodos químicos o métodos físicos.
 - b.1) La carga inducida químicamente utiliza agentes como saponinas o reactivos de transfección que ayudan a permeabilizar la membrana de las VEs. No obstante, se ha indicado que este método de carga parece inadecuado para fines terapéuticos debido a la adición de agentes incompatibles con la salud.
 - b.2) Los métodos de carga físicos provocan la ruptura de las membranas a través de fuerzas externas inducidas por campos eléctricos (electroporación), ondas de sonido de alta frecuencia (sonicación), cambios en la temperatura (ciclos de congelación-descongelación) y acciones mecánicas (extrusión).

Un ejemplo de las moléculas que han sido exitosamente cargadas en las VEs pequeñas con estas estrategias se presentan en las tablas 1.4.1 y 1.4.2.

Tabla 1.4.1: Estrategias de carga pasiva y activa usadas en ingeniería de vesículas.

TIPO DE CARGA	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	DROGA CARGADA	REF
Carga pasiva	Incubación de VEs con droga libre.	Difusión simple. No compromete la integridad de la membrana.	Baja eficiencia de carga.	Paclitaxel Docetaxel Curcumina Catalasa Witaferina A, antocianidinas	(Sutaria et al., 2017) (Sun et al., 2010) (Munagala et al., 2016)
	Incubación de la célula productora de VEs con droga libre.	Simple No compromete la integridad de la membrana.	Baja eficiencia de carga. Citotoxicidad asociada a la droga.	Paclitaxel Doxorrubicina	(Pascucci et al., 2014) (Farhat et al., 2022; Fu et al., 2020)
Carga activa	Sonicación	Carga eficiente	Compromete la integridad de la membrana.	Paclitaxel Catalasa	(Haney et al., 2015; Kim et al., 2016)
	Extrusión	Carga eficiente	Compromiso importante de la integridad y composición de la membrana. Cambios en el tamaño de las vesículas	Proteínas Porfirina Catalasa	(Haney et al., 2015)
	Cambios de temperatura	Fusión y formación de liposomas	Agregación de las VEs. Cambios en la composición de la membrana. Degradación del contenido.	Proteínas Moléculas pequeñas	(Walker et al., 2019)
	Electroporación	Permite cargar moléculas largas	Agregación celular. Precipitación.	siRNA miRNA Taxol	(Melzer et al., 2019; Pomatto et al., 2019)
	Incubación con saponinas	Carga muy eficiente	Tóxico, Depende de la polaridad de la droga	Catalasa	(Haney et al., 2015) (Sutaria et al., 2017)
	Transfección	Carga eficiente de ácidos nucleicos	Agregación micelar	siRNA	(Hood, 2016) (Walker et al., 2019)

Adaptado de (Luan et al., 2017)

Tabla 1.4.1: Estrategias descritas en la literatura para la carga, aislamiento y detección de moléculas en vesículas extracelulares.

MOLÉCULA	ESTRATEGIA DE CARGA	AISLAMIENTO	DETECCIÓN	REF
Curcumina	Difusión Simple	gradiente de Sacarosa y centrifugación a 36.000 rpm	Espectrofotometría HPLC	(Sun et al., 2010; Zhuang et al., 2011)
Paclitaxel	Difusión Simple	Ultracentrifugación 170.000 ×g por 2 h	HPLC - UV	(Saari et al., 2015)
Paclitaxel o Doxorrubicina	Difusión Simple Electroporación Sonicado	Cromatografía de exclusión de tamaño	HPLC-UV	(Kim et al., 2016)
Curcumina	Electroporación	Ultracentrifugación 120.000 x g por 90 min	Espectrofotometría	(Jia et al., 2018)
siRNA	Electroporación	Ultracentrifugación 100.000 g por 3 hrs	RT-PCR	(Mendt et al., 2018)
Doxorrubicina	Electroporación	Ultrafiltración en AMICON 100-KDa	Espectrofotometría	(Gomari et al., 2019)
Doxorrubicina	Difusión simple	Ultracentrifugación	HPLC-UV	(Kanchanapally et al., 2019)
Paclitaxel	Difusión Simple	Ultracentrifugación	LC-MS/MS	(Melzer et al., 2019)
Paclitaxel	Difusión simple Sonicado	Exo-spin™	HPLC-UV	(Salarpour et al., 2019)
Doxorrubicina	Ultrasonido	Tubo de diálisis de 3500 Da de corte	Fluorimetría Espectrofotometría	(Mutlu et al., 2020)
Quercetina	Sonicado	Ultracentrifugación	HPLC-UV	(Qi et al., 2020)
Doxorrubicina	Electroporación	Ultracentrifugación 120.000 x g por 90 min	Fluorimetría Espectrofotometría	(Tian et al., 2014)
Doxorrubicina	Electroporación	No reportado	Fluorimetría	(Schindler et al., 2019)
Doxorrubicina	Electroporación	Ultracentrifugación 120.000g por 90 min.	Espectrofotometría UV-Vis	(Bagheri et al., 2020)
Doxorrubicina	Difusión Simple	Ultracentrifugación 1000000 × g por 70 min a 4°C	No reportado	(Gong et al., 2019)
Doxorrubicina y Paclitaxel	DOX: Difusión Simple Sonicado PTX Difusión Simple Sonicado	Cromatografía de exclusión de tamaño	DOX Fluorimetría PTX HPLC Fluorimetría	(Haney et al., 2020)
Cisplatino	Difusión Simple Sonicado	Cromatografía de exclusión de tamaño	HPLC-UV	(Zhang et al., 2020)

Elaboración propia

1.5 LA ELECTROPORACIÓN COMO SISTEMA DE CARGA EFECTIVA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

La electroporación, o electropermeabilización, es un método tradicional de post-carga activa utilizado para transferir moléculas a través de las membranas celulares (Shi et al., 2018).

Durante la electroporación, se aplica un campo eléctrico transitorio capaz de superar la capacitancia de la membrana celular. Esto permite la formación de poros temporales, que pueden recuperarse una vez que el pulso finaliza. Además, al realizarse en ausencia de agentes químicos, minimiza la perturbación de ligandos y receptores acoplados a la membrana (Gehl, 2003).

La electroporación se ha utilizado para cargar vesículas con moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, como ácidos nucleicos exógenos (Alvarez-Erviti et al., 2011), fármacos (Kanchanapally et al., 2019) y proteínas. Sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es que el proceso puede desencadenar la fusión entre las membranas de las VEs (Hood et al., 2014; Johnsen et al., 2016).

La electroporación puede ser regulada modificando las características del pulso eléctrico. Estas características comprenden la tensión, la amplitud, la

duración del impulso, el número de pulsos, la frecuencia de repetición y forma de la onda aplicada. Al modificar estas condiciones, es posible controlar de mejor manera la permeabilización de la membrana, permitiéndole una carga eficiente de las moléculas de interés. Así también se pueden minimizar las perturbaciones provocadas en la membrana, disminuyendo la posibilidad de fusión o aglomeración de las vesículas electroporadas (Stankevic et al., 2020).

1.5.1 Pulsos de onda exponencial y cuadrada

Los actuales electroporadores comerciales presentan la capacidad de aplicar pulsos de onda cuadrada o de decaimiento exponencial. Ambos pulsos son dos formas de onda distintas que proporcionan una transfección óptima (Novickij et al., 2022).

- Los pulsos de onda cuadrada se basan en la aplicación de una carga constante sobre las membranas durante un tiempo determinado permitiendo la aplicación de múltiples pulsos similares en un corto período de tiempo. Los pulsos de onda cuadrada se establecen por

cambios de la tensión, el tiempo del pulso, la duración entre pulsos y el número total de pulsos.

- Durante los pulsos de decaimiento exponencial, se establece un voltaje inicial que puede optimizarse sólo variando el voltaje inicial y capacitancia. Con esto es posible conseguir un amplio gradiente de pulsos, mientras que la duración del decaimiento (constante de tiempo) es el producto del ajuste de la capacitancia y la resistencia de la muestra, el cual no puede regularse.

Esto brinda a los usuarios la flexibilidad de ajustar varios parámetros según las necesidades y características de la membrana que se desee electroporar. Sin embargo, todavía no se ha logrado un entendimiento completo acerca de los efectos que pueden surgir al modificar estos parámetros y aún menos si existen interacciones entre ellos (Lennaard et al., 2021; Novickij et al., 2022).

En general, las estrategias más comunes empleadas para la electroporación de VEs utilizan preferentemente pulsos de tipo exponencial aplicando condiciones que varían en un amplio rango de voltaje y capacitancia (150 a 1500 V y 100 a 500 μ F) (Fu et al., 2020; Rankin-Turner et al., 2021).

Por otro lado, se ha comprobado que los pulsos de onda cuadrada brindan una eficiencia de carga superior en comparación con los pulsos exponenciales en diversos tipos de células de mamíferos, sin afectar la viabilidad celular (Hyder et al., 2020; Jordan et al., 2008; Takahashi et al., 1991). Dado que las VEs presentan este mismo origen, existe la inquietud si es que la electroporación con pulsos de onda cuadrada ayudaría a minimizar la alteración morfológica de las vesículas electroporadas (Novickij et al., 2022).

Aunque los parámetros de onda cuadrada y decaimiento exponencial pueden convertirse teóricamente entre sí, ningún estudio ha comparado los efectos de los distintos tipos de pulso en la electroporación sobre las VEs. Es por esto que existe una necesidad de investigaciones más profundas que consideren tanto los efectos de la intensidad del campo eléctrico, como de la forma del pulso aplicado sobre la eficiencia de carga y la inducción en la fusión o aglomeración de las vesículas. Un estudio enfocado en esta área permitiría obtener una comprensión más completa de los resultados y permitir un refinamiento en las estrategias de electroporación de VEs (Salipante & Vlahovska, 2014).

1.6 MEJORAS EN LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE DOXORRUBICINA

La Doxorubicina (DOX) es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado en el manejo de neoplasias malignas (Licata et al., 2000). Como derivado de las antraciclinas, DOX es un antibiótico con una potente actividad citotóxica. Aunque sus mecanismos de acción aún no están del todo descritos, esta droga ejerce su efecto a través de i) la intercalación en el ADN con los anillos D, C y B de la figura 1.6.1, ii) la interacción del azúcar (Daunosamina) con el sitio catalítico de topoisomerasa-II lo que interrumpe los mecanismos de reparación celular mediados por esta enzima, y iii) la oxidación de la quinona (anillo C) que promueve la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales inducen un daño en las membranas mediado por estrés oxidativo y peroxidación lipídica (Thorn et al., 2011).

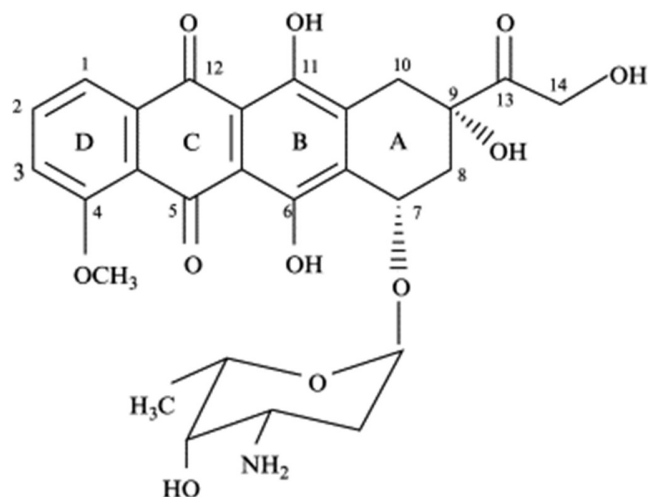


Figura 1.6.1: Estructura de la Doxorubicina

La Doxorubicina (DOX), es un fármaco citotóxico de amplio espectro derivado de la familia de las antraciclinas. Se utiliza para la terapia del cáncer y es uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos. Los anillos D, C y B se unen fuertemente al ADN bloqueando su reparación mediada por Topoisomerasa II, mientras que el anillo A y la porción del azúcar (Daunosamina) se asocia al sitio catalítico de la enzima. La quinona (anillo C) es oxidada a semi-quinona promoviendo la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Si bien esta droga ha contribuido a mejorar la esperanza de vida de innumerables pacientes afectados por distintos carcinomas, uno de sus principales inconvenientes es su bioacumulación en tejidos periféricos, particularmente en corazón e hígado, lo que limita de por vida al paciente a una reexposición a DOX (Ichikawa et al., 2014; Volkova & Russell, 2011).

Se ha propuesto que gran parte de los efectos no deseados derivados del tratamiento, ocurren tanto por la bioacumulación del fármaco así como por los productos de su metabolización. Si bien aún no existe suficiente evidencia que permita asegurar esta hipótesis, algunos estudios han

demostrado que cuando esta molécula es encapsulada en liposomas, disminuye significativamente la toxicidad cardíaca y gastrointestinal manteniendo su eficacia antitumoral en comparación a la molécula libre original (Allen et al., 2005). De esta manera, la encapsulación de la droga mejora su distribución y farmacocinética en comparación a su forma libre, incrementando así su índice terapéutico (Gabizon, 2003; Gabizon et al., 2003).

Sin embargo, los liposomas son estructuras muy variadas en cuanto a su carga y tamaño, propiedades que dependen en gran medida del método de fabricación y de los tipos de fosfolípidos empleados. La incorporación de medicamentos en liposomas está relacionada con una eficiencia de encapsulación reducida, la posibilidad de que los fármacos escapen durante el almacenamiento (P. Liu et al., 2022), además de una notable inestabilidad fisicoquímica de las membranas, que depende de un delicado balance de colesterol (Nakhaei et al., 2021).

Por otro lado, sin un estímulo que los conduzca hacia el intersticio tumoral, los liposomas sólo pueden difundir pasivamente a través de la vasculatura tumoral permeable, siendo en su mayoría retirados por el sistema reticuloendotelial.

Para solucionar estos inconvenientes, las formulaciones de DOX liposomal pueden ser químicamente modificadas con moléculas de polietilenglicol (PEG). La fijación PEG a la membrana del liposoma aumenta el tiempo en circulación de la droga y reduce la captación inespecífica por el sistema reticuloendotelial, favoreciendo la extravasación de la droga a través de la vasculatura en dirección hacia el tumor (Aloss & Hamar, 2023). No obstante, la presencia de PEG en circulación también induce a la acumulación de los liposomas en los capilares de la piel provocando una toxicidad mucocutánea denominada Eritrodisestesia Palmo-Plantar, razón por la cual se debe limitar su exposición (Lorusso et al., 2007).

Se han propuesto algunas alternativas al uso del PEG como el uso de anticuerpos, péptidos, aptámeros, carbohidratos o potenciadores de la penetración celular (Aloss & Hamar, 2023; Popilski et al., 2021). Sin embargo, aún presentan algunas limitaciones, como elevados costes de producción, la sofisticada preparación, la elevada inmunogenicidad y la insuficiente penetración debido a su gran tamaño, por lo que aún se requieren más estudios y mejoras de los procesos productivos para validar su uso como agentes alternativos.

1.7 OPTIMIZACIÓN DE LA CARGA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES BASADO EN EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Por estas razones se ha propuesto que el transporte de DOX utilizando VEs pequeñas podría mejorar su tasa de captación celular, ejerciendo así un efecto más potente con una menor dosis de administración lo que reduciría los efectos adverso de esta droga (Zhang et al., 2022). No obstante, es imprescindible perfeccionar los métodos de carga de moléculas exógenas en estas vesículas a fin de lograr un uso exitoso de esta plataforma.

Para comprender cómo los diferentes factores que intervienen en el proceso de optimización afectan al producto final, se pueden utilizar herramientas estadísticas como el Diseño de Experimentos (DoE). El enfoque del DoE permite obtener información precisa sobre los factores que influyen en un proceso y su interacciones, ayudando a identificar el potencial sinérgico de estos factores que, en su conjunto, controlan la captación de fármacos por VE pequeñas. Esta aproximación estadística utiliza un número limitado de ensayos experimentales, ahorrando así tiempo y recursos. El DoE es más ventajoso que los enfoques de ensayo y error de un factor a la vez (one factor at time, OFAT) porque ayuda a comprender cómo actúan los factores de entrada de manera aislada o en combinación. Además, permite

determinar la mejor respuesta deseada para optimizar los procesos, respaldado por evidencia estadística (Benedetti et al., 2022).

En resumen, el uso del diseño de experimentos DoE ofrece ventajas como la obtención confiable de información, mejoras en los procesos y reducción de costos en la manufactura. Los métodos de DoE más utilizados incluyen el Diseño de Cribado (Plackett-Burman, Diseño Factorial Fraccional y Diseño Factorial Completo) y la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) (Tavares Luiz et al., 2021). Mientras que los diseños de cribado ayudan a identificar estadísticamente las variables que afectan a las respuestas, la metodología RSM ayuda a construir y explorar modelos empíricos que pueden pronosticar los efectos deseados (Myers et al., 2016). Todas las evidencias expuestas sugieren que las VEs, pueden ser utilizadas como sistemas de transporte de Doxorubicina ya que:

- Al ser de origen natural, no inducen una activación de la respuesta inmune.
- El cargo de las vesículas se mantiene protegido frente a modificaciones químicas o físicas durante largos períodos de tiempo, tanto en condiciones de almacenamiento como en circulación.

- Su superficie puede ser modificada para conferir especificidad de orientación al tipo de célula diana.
- Son reconocidas naturalmente por las células diana, por lo que su captación e incorporación al espacio intracelular es innata.
- Son liberadas naturalmente por todas las células en condiciones fisiológicas en diferentes fluidos biológicos pudiendo establecerse una metodología para su producción continua.

Sin embargo, es importante seguir investigando para mejorar los procesos de aislamiento de estas vesículas y estandarizar los procesos de producción de vesículas cargadas para emplearlas como sistemas de administración de fármacos.

Es por esto que, mediante las estrategias metodológicas y estadísticas descritas, el presente trabajo de investigación plantea desarrollar y optimizar una plataforma analítica para el aislamiento y carga de vesículas extracelulares pequeñas que pueda ser utilizada como vehículo para el transporte de Doxorubicina.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.2 Hipótesis

Si se optimizan los parámetros para el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas desde sangre periférica, empleando la técnica de ultrafiltración acoplada con cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una fase estacionaria G200, se obtendrá un aumento en la pureza de las vesículas extracelulares pequeñas.

La optimización de una metodología de post-carga basada en electroporación, permitirá un incremento en la eficiencia de carga de Doxorubicina en vesículas extracelulares pequeñas aisladas de sangre periférica, y al mismo tiempo reducirá la agregación de estas vesículas, lo que fortalecería su viabilidad para ser utilizados como sistemas de transporte de fármacos con potencial terapéutico.

2.3 Objetivo General

Desarrollar una estrategia para la separación y purificación reproducible de vesículas extracelulares pequeñas a partir de fluidos biológicos y evaluar la eficiencia de carga con Doxorubicina mediante la optimización de una estrategia post-carga basada en electroporación.

2.4 Objetivos Específicos

OE1: Implementar una metodología para purificar vesículas extracelulares pequeñas que incorpore una evaluación analítica comparativa de los procesos de purificación por cromatografía de exclusión por tamaño.

OE2: Evaluar y optimizar la incorporación de Doxorubicina en vesículas extracelulares pequeñas purificadas desde sangre periférica aplicando una estrategia post-carga basada en la modificación de los factores que gobiernan la electroporación y que minimizan la agregación de las vesículas.

CAPÍTULO 3: ESTRATEGIA ANALÍTICA

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal el desarrollo de una plataforma analítica destinada al aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas procedentes de diversos líquidos biológicos, con el fin de optimizar la eficiencia de su carga con la droga Doxorubicina mediante una estrategia post-carga.

Para alcanzar este objetivo, se han establecido una serie de condiciones fundamentales que guíen el proceso de desarrollo de esta plataforma. Estas condiciones son esenciales para garantizar la efectividad y utilidad final de la metodología propuesta:

1. **Asequibilidad:** Se busca que la plataforma a desarrollar sea económica y accesible, lo que implica que los materiales y equipos necesarios no deben ser prohibitivamente costosos, permitiendo su aplicabilidad tanto en el laboratorio de investigación como en el clínico.
2. **Reproducibilidad:** La metodología debe ser capaz de producir resultados consistentes y replicables para garantizar que otros

investigadores puedan aplicar la misma técnica obteniendo resultados similares.

3. **Operación simplificada:** La plataforma debe minimizar la posibilidad de errores humanos facilitando su adopción por parte de investigadores con menor experiencia en el campo.
4. **Rango de tamaño de vesículas:** La metodología debe permitir el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas definidas con un rango de tamaño específico menor a 200 nm
5. **Cumplimiento de criterios MISEV2018:** La metodología debe ajustarse a los criterios establecidos en la pauta MISEV2018, definido como estándar en la investigación de vesículas extracelulares.
6. **Criterios de carga:** Se debe alcanzar una óptima capacidad de carga, en ausencia de reactivos tóxicos que afecten la seguridad del transportador, para ser utilizados como posibles vehículos de administración.
7. **Minimización de la agregación:** La metodología debe minimizar la agregación de las VEs pequeñas, para preservar su integridad y función durante el proceso de carga.

Gracias a la combinación de estos criterios, se espera que el desarrollo de esta plataforma analítica no sólo contribuya a una mejor comprensión del aislamiento y la carga de las vesículas extracelulares pequeñas, sino que también represente una valiosa contribución y una herramienta esencial para la investigación en el campo de la biomedicina de VEs, así como para su posible aplicación en la administración de fármacos.

- I. Para llevar a cabo el aislamiento de las VEs, se seleccionó una metodología basada en la combinación de las técnicas ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño (UF/SEC). Ambos métodos se caracterizan por minimizar la deformación de las vesículas, razón por la cual se identifican como métodos de aislamiento suave. Con el propósito de optimizar la separación cromatográfica, se utilizaron vesículas extracelulares provenientes de la línea celular derivada de riñón de embrión humano (HEK293). Estas vesículas, presentan características biofísicas similares y al provenir de medio de cultivo celular están presentes en una matriz menos compleja en comparación con otros fluidos biológicos de origen humano.

Con ello, se evaluó el comportamiento de dos resinas en el perfil de elusión proteica y el contenido de VEs, siguiendo los criterios establecidos en la guía MISEV2018 (Thery et al., 2018). Así, se analizó la distribución de tamaño por Análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) y la presencia de los marcadores clásicos exosomales TSG-101, Alix, CD63, CD81 y CD9 por análisis de Western blot y Citometría de Flujo.

A continuación, estos resultados se compararon con muestras de plasma humano, y se optimizaron las condiciones de separación con el objetivo de lograr:

- a) Obtener un conjunto de fracciones enriquecidas en VEs pequeñas, con un tamaño menor a 200 nm.
- b) Alcanzar un alto grado de pureza, definido como la relación entre el recuento de vesículas y la concentración de proteínas.
- c) Garantizar la ausencia de proteínas contaminantes comunes, como Albúmina y colesterol-HDL, que a menudo son co-aisladas en muestras de suero.

Finalmente, el método optimizado se puso a prueba con muestras reales de plasma, orina y saliva. Las VEs aisladas fueron analizadas utilizando técnicas de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y *Dynamic Light Scattering* (DLS), para evaluar su tamaño, morfología e índice de polidispersidad (PDI).

II. A continuación, se procedió al estudio de la carga de VEs con Doxorubicina mediante una estrategia post-carga. Se utilizaron VEs previamente aisladas a partir de plasma humano, empleando la metodología de separación previamente optimizada.

Se evaluó el comportamiento de la carga de las VEs sometidas a electroporación utilizando dos formas de onda eléctrica: el Pulso de Onda Exponencial y el Pulso de Onda Cuadrada. El proceso de carga con ambos tipos de onda fue analizado aplicando una estrategia basada en el Diseño de Experimento. Esto nos permitió identificar los factores críticos que influyen en la carga de estas VEs con cada tipo de pulso.

Para diseñar y evaluar el modelo experimental se utilizó el software MODDE® Pro 13.0.2. Para establecer un modelo inicial

de la respuesta, se utilizó un modelo *Full Factorial Design* (FFD) en donde se evaluaron las condiciones dependientes del número de VE pequeñas (NEV), la concentración de fármaco (DOX) y la intensidad del campo eléctrico (FE). La respuesta analizada fue la captación de DOX por las VEs luego de aplicar cada tipo de pulso.

Posteriormente, el modelo fue optimizado utilizando un diseño *Central Composite Face Centered* (CCF), en donde además de la carga de DOX, se evaluó simultáneamente el efecto de cada condición sobre la agregación de VEs.

La carga de VEs se analizó mediante la fluorescencia intrínseca de DOX y la agregación de las VEs después de la electroporación mediante DLS.

La estrategia analítica general de esta tesis doctoral se puede visualizar en la Figura 3.1 A y B.

Isolation and purification of small extracellular vesicles.

A

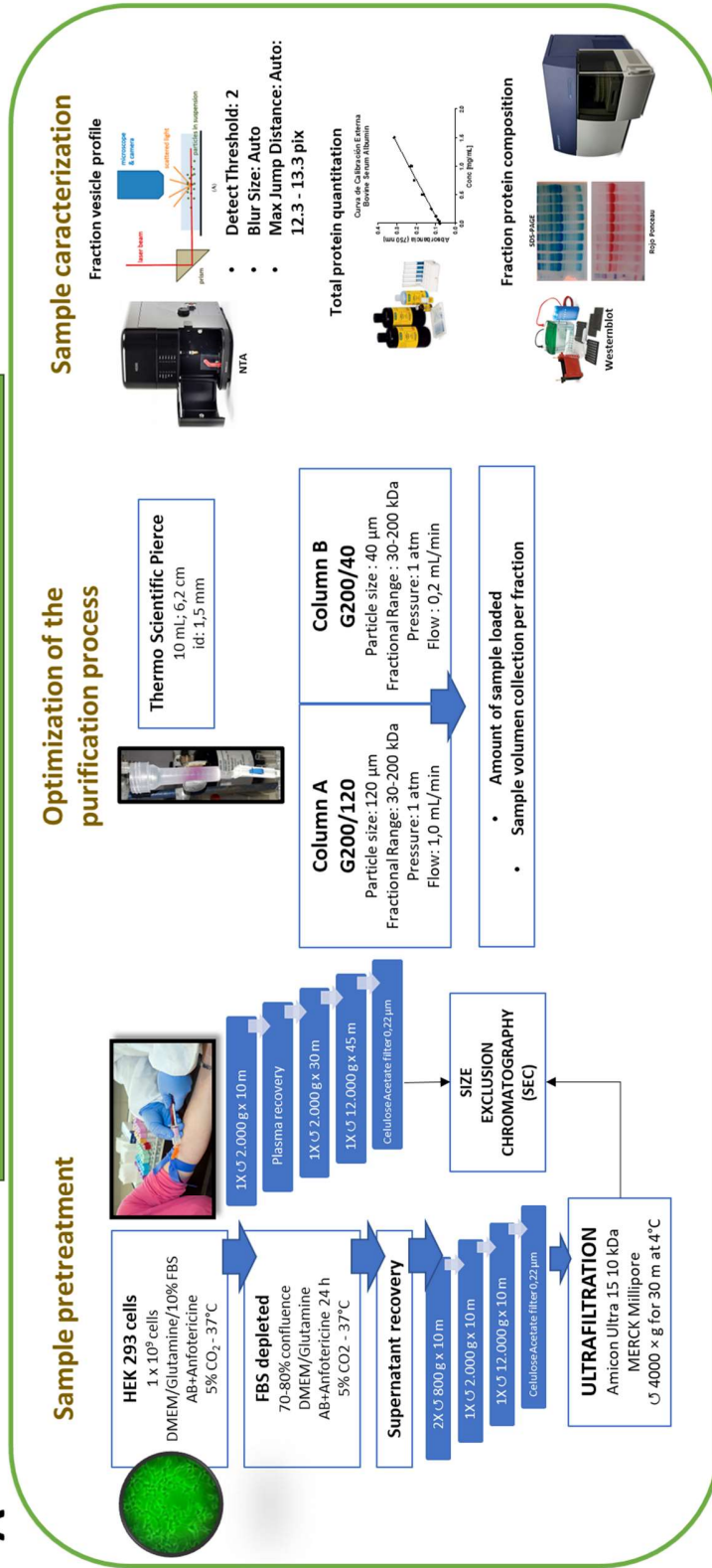


Figura 3.1A: Estrategia analítica para el asilamiento de VEs.

REFERENCIAS

- Akbar, A., Malekian, F., Baghban, N., Kodam, S. P., & Ullah, M. (2022). Methodologies to Isolate and Purify Clinical Grade Extracellular Vesicles for Medical Applications. *Cells*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/cells11020186>
- Allelein, S., Medina-Perez, P., Lopes, A. L. H., Rau, S., Hause, G., Kölsch, A., & Kuhlmeier, D. (2021). Potential and challenges of specifically isolating extracellular vesicles from heterogeneous populations. *Scientific Reports*, *11*(1), 11585. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91129-y>
- Allen, T. M., Mumbengegwi, D. R., & Charrois, G. J. (2005). Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates. *Clin Cancer Res*, *11*(9), 3567-3573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-04-2517>
- Aloss, K., & Hamar, P. (2023). Recent Preclinical and Clinical Progress in Liposomal Doxorubicin. *Pharmaceutics*, *15*(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030893>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, *29*(4), 341-345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J.-M., Mornet, S., & Brisson, A. R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *12*(5), 614-627. <https://doi.org/10.1111/jth.12554>

- Bagheri, E., Abnous, K., Farzad, S. A., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., & Alibolandi, M. (2020). Targeted doxorubicin-loaded mesenchymal stem cells-derived exosomes as a versatile platform for fighting against colorectal cancer. *Life Sci*, 261, 118369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118369>
- Baranyai, T., Herczeg, K., Onódi, Z., Voszka, I., Módos, K., Marton, N., Nagy, G., Mäger, I., Wood, M. J., El Andaloussi, S., Pálincás, Z., Kumar, V., Nagy, P., Kittel, Á., Buzás, E. I., Ferdinandy, P., & Giricz, Z. (2015). Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PloS one*, 10(12), e0145686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145686>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/1/21>
- Benedetti, B., Caponigro, V., & Ardini, F. (2022). Experimental Design Step by Step: A Practical Guide for Beginners. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(5), 1015-1028. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1848517>
- Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 10.3402/jev.v3403.23430. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
- Carnino, J. M., Miyawaki, S., & Rampam, S. (2023). The Role of Extracellular Vesicles in Diseases of the Ear, Nose, and Throat. *Medical Sciences*, 11(1), 6. <https://www.mdpi.com/2076-3271/11/1/6>

- Casella, G., Colombo, F., Finardi, A., Descamps, H., Ill-Raga, G., Spinelli, A., Podini, P., Bastoni, M., Martino, G., Muzio, L., & Furlan, R. (2018). Extracellular Vesicles Containing IL-4 Modulate Neuroinflammation in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Mol Ther*, 26(9), 2107-2118. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.06.024>
- Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of Wood. *Journal of Biological Chemistry*, 166, 189-197.
- Chen, J., Li, P., Zhang, T., Xu, Z., Huang, X., Wang, R., & Du, L. (2021). Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 811971. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971>
- Chen, J., Li, P., Zhang, T., Xu, Z., Huang, X., Wang, R., & Du, L. (2022). Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification [Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971>
- Chung, K. Y., Quek, J. M., Neo, S. H., & Too, H. P. (2020). Polymer-Based Precipitation of Extracellular Vesicular miRNAs from Serum Improve Gastric Cancer miRNA Biomarker Performance. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 22(5), 610-618. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.01.016>
- Ciferri, M. C., Quarto, R., & Tasso, R. (2021). Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Tools: From Pre-Clinical to Clinical Applications. *Biology (Basel)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biology10050359>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*, 25(6), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>

- Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Couch, Y., Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lötvall, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Thery, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. (2021). A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 10(14), e12144. <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>
- Cully, M. (2021). Exosome-based candidates move into the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov*, 20(1), 6-7.
- Cvjetkovic, A., Lotvall, J., & Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>
- Dalton, A. J. (1975). Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus-like” particles. *J Natl Cancer Inst*, 54(5), 1137-1148.
- Di Vizio, D., Kim, J., Hager, M. H., Morello, M., Yang, W., Lafargue, C. J., True, L. D., Rubin, M. A., Adam, R. M., & Beroukhi, R. (2009). Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res*, 69(13), 5601-5609.
- Dooley, K., McConnell, R. E., Xu, K., Lewis, N. D., Haupt, S., Youniss, M. R., Martin, S., Sia, C. L., McCoy, C., Moniz, R. J., Burenkova, O., Sanchez-Salazar, J., Jang, S. C., Choi, B., Harrison, R. A., Houde, D., Burzyn, D., Leng, C., Kirwin, K., . . . Williams, D. E. (2021). A versatile platform for generating engineered extracellular vesicles with defined

- therapeutic properties. *Molecular Therapy*, 29(5), 1729-1743.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.020>
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods Enzymol*, 541, 105-114. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420119-4.00009-4>
- Fan, R., Su, L., Zhang, H., Jiang, Y., Yu, Z., Zhang, X., & Li, X. (2023). Enhanced therapeutic effect of PEDF-loaded mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles against oxygen-induced retinopathy through increased stability and penetrability of PEDF. *J Nanobiotechnology*, 21(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02066-z>
- Farhat, W., Yeung, V., Kahale, F., Parekh, M., Cortinas, J., Chen, L., Ross, A. E., & Ciolino, J. B. (2022). Doxorubicin-Loaded Extracellular Vesicles Enhance Tumor Cell Death in Retinoblastoma. *Bioengineering (Basel)*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110671>
- Fu, S., Wang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2020). Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. *NanoImpact*, 20, 100261.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100261>
- Gabizon, A. (2003). Emerging role of liposomal drug carrier systems in cancer chemotherapy. *J Liposome Res*, 13(1), 17-20.
<https://doi.org/10.1081/lpr-120017484>
- Gabizon, A., Shmeeda, H., & Barenholz, Y. (2003). Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet*, 42(5), 419-436. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342050-00002>

- Garcia-Manrique, P., Matos, M., Gutierrez, G., Pazos, C., & Blanco-Lopez, M. C. (2018). Therapeutic biomaterials based on extracellular vesicles: classification of bio-engineering and mimetic preparation routes. *J Extracell Vesicles*, 7(1), 1422676. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1422676>
- Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*, 177(4), 437-447. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x>
- Gomari, H., Forouzandeh Moghadam, M., & Soleimani, M. (2018). Targeted cancer therapy using engineered exosome as a natural drug delivery vehicle. *Onco Targets Ther*, 11, 5753-5762. <https://doi.org/10.2147/OTT.S173110>
- Gomari, H., Forouzandeh Moghadam, M., Soleimani, M., Ghavami, M., & Khodashenas, S. (2019). Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *Int J Nanomedicine*, 14, 5679-5690. <https://doi.org/10.2147/IJN.S210731>
- Gong, C., Tian, J., Wang, Z., Gao, Y., Wu, X., Ding, X., Qiang, L., Li, G., Han, Z., Yuan, Y., & Gao, S. (2019). Functional exosome-mediated co-delivery of doxorubicin and hydrophobically modified microRNA 159 for triple-negative breast cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 17(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0526-7>
- Görgens, A., Corso, G., Hagey, D. W., Jawad Wiklander, R., Gustafsson, M. O., Felldin, U., Lee, Y., Bostancioglu, R. B., Sork, H., Liang, X., Zheng, W., Mohammad, D. K., van de Wakker, S. I., Vader, P., Zickler, A. M., Mamand, D. R., Ma, L., Holme, M. N., Stevens, M. M., . . . EL Andaloussi, S. (2022). Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(6), e12238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jev2.12238>

- Gujrati, V. B., & Jon, S. (2014). Bioengineered bacterial outer membrane vesicles: what is their potential in cancer therapy? *Nanomedicine (Lond)*, 9(7), 933-935. <https://doi.org/10.2217/nmm.14.56>
- Gyorgy, B., Modos, K., Pallinger, E., Paloczi, K., Pasztoi, M., Misjak, P., Deli, M. A., Sipos, A., Szalai, A., Voszka, I., Polgar, A., Toth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, A., & Buzas, E. I. (2011). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 117(4), e39-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307595>
- Hagey, D. W., Ojansivu, M., Bostancioglu, B. R., Saher, O., Bost, J. P., Gustafsson, M. O., Gramignoli, R., Svahn, M., Gupta, D., Stevens, M. M., Görgens, A., & EL Andaloussi, S. (2023). The cellular response to extracellular vesicles is dependent on their cell source and dose. *Science Advances*, 9(35), eadh1168. <https://doi.org/doi:10.1126/sciadv.adh1168>
- Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release*, 207, 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>
- Haney, M. J., Zhao, Y., Jin, Y. S., Li, S. M., Bago, J. R., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2020). Macrophage-Derived Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems for Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Therapy. *J Neuroimmune Pharmacol*, 15(3), 487-500. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09884-9>
- Haraszti, R. A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., Gao, F., Narain, N. R., DiFiglia, M., Kiebish, M. A., Aronin, N., & Khvorova, A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5, 10.3402/jev.v5.32570. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32570>

- Harding, C. V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol*, 200(4), 367.
- Held, D., & Kilz, P. (2021). Size-exclusion chromatography as a useful tool for the assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties. *Chemistry Teacher International*, 3(2), 77-103. <https://doi.org/doi:10.1515/cti-2020-0024>
- Herrmann, I. K., Wood, M. J. A., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nature Nanotechnology*, 16(7), 748-759. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00931-2>
- Hood, J. L. (2016). Post isolation modification of exosomes for nanomedicine applications. *Nanomedicine (Lond)*, 11(13), 1745-1756. <https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0102>
- Hood, J. L., Scott, M. J., & Wickline, S. A. (2014). Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Analytical Biochemistry*, 448, 41-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.001>
- Hyder, I., Eghbalsaied, S., & Kues, W. A. (2020). Systematic optimization of square-wave electroporation conditions for bovine primary fibroblasts. *BMC Mol Cell Biol*, 21(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00254-5>
- Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Prasad, S. V. N., Mutharasan, R. K., Naik, T. J., & Ardehali, H. (2014). Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 617-630. <https://doi.org/10.1172/JCI72931>

- Ihara, T., Yamamoto, T., Sugamata, M., Okumura, H., & Ueno, Y. (1998). The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Archiv*, 433, 443-447.
- Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., & Antalíková, J. (2020). Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *Int J Mol Sci*, 21(20).
<https://doi.org/10.3390/ijms21207568>
- Jia, G., Han, Y., An, Y., Ding, Y., He, C., Wang, X., & Tang, Q. (2018). NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 178, 302-316. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.029>
- Johnsen, K. B., Gudbergsson, J. M., Skov, M. N., Christiansen, G., Gurevich, L., Moos, T., & Duroux, M. (2016). Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes. *Cytotechnology*, 68(5), 2125-2138.
<https://doi.org/10.1007/s10616-016-9952-7>
- Jordan, E. T., Collins, M., Terefe, J., Ugozzoli, L., & Rubio, T. (2008). Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *J Biomol Tech*, 19(5), 328-334.
- Jung, Y. J., Kim, H. K., Cho, Y., Choi, J. S., Woo, C. H., Lee, K. S., Sul, J. H., Lee, C. M., Han, J., Park, J. H., Jo, D. G., & Cho, Y. W. (2020). Cell reprogramming using extracellular vesicles from differentiating stem cells into white/beige adipocytes. *Sci Adv*, 6(13), eaay6721.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6721>
- Kanchanapally, R., Deshmukh, S. K., Chavva, S. R., Tyagi, N., Srivastava, S. K., Patel, G. K., Singh, A. P., & Singh, S. (2019). Drug-loaded exosomal preparations from different cell types exhibit distinctive loading capability, yield, and antitumor efficacies: a comparative

- analysis. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 531-541.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S191313>
- Keller, S., Konig, A. K., Marme, F., Runz, S., Wolterink, S., Koensgen, D., Mustea, A., Sehouli, J., & Altevogt, P. (2009). Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett*, 278(1), 73-81.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.028>
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 655-664.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
- Kimiz-Gebologlu, I., & Oncel, S. S. (2022). Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake. *Journal of Controlled Release*, 347, 533-543.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.027>
- Koh, H. B., Kim, H. J., Kang, S. W., & Yoo, T. H. (2023). Exosome-Based Drug Delivery: Translation from Bench to Clinic. *Pharmaceutics*, 15(8).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082042>
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int*, 2018, 8545347.
<https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Thery, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl*

Acad Sci U S A, 113(8), E968-977.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>

Kuypers, S., Smisdom, N., Pintelon, I., Timmermans, J.-P., Ameloot, M., Michiels, L., Hendrix, J., & Hosseinkhani, B. (2021). Unsupervised Machine Learning-Based Clustering of Nanosized Fluorescent Extracellular Vesicles. *Small*, 17(5), 2006786.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sml.202006786>

Lane, R. E., Korbie, D., Trau, M., & Hill, M. M. (2019). Optimizing Size Exclusion Chromatography for Extracellular Vesicle Enrichment and Proteomic Analysis from Clinically Relevant Samples. *Proteomics*, 19(8), e1800156. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800156>

Lässer, C., Alikhani, V. S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötvall, J., & Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med*, 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>

Lauwers, E., Wang, Y. C., Gallardo, R., Van der Kant, R., Michiels, E., Swerts, J., Baatsen, P., Zaiter, S. S., McAlpine, S. R., Gounko, N. V., Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Verstreken, P. (2018). Hsp90 Mediates Membrane Deformation and Exosome Release. *Mol Cell*, 71(5), 689-702.e689. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.016>

Lennaard, A. J., Mamand, D. R., Wiklander, R. J., El Andaloussi, S., & Wiklander, O. P. B. (2021). Optimised Electroporation for Loading of Extracellular Vesicles with Doxorubicin. *Pharmaceutics*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010038>

Li, M., Liao, L., & Tian, W. (2020). Extracellular Vesicles Derived From Apoptotic Cells: An Essential Link Between Death and Regeneration

- [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573511>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789-804.
<https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Liangsupree, T., Multia, E., & Riekkola, M. L. (2021). Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A*, 1636, 461773. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461773>
- Licata, S., Saponiero, A., Mordente, A., & Minotti, G. (2000). Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction [Article]. *Chem Res Toxicol*, 13(5), 414-420. <https://doi.org/10.1021/tx000013q>
- Liu, D. S. K., Upton, F. M., Rees, E., Limb, C., Jiao, L. R., Krell, J., & Frampton, A. E. (2020). Size-Exclusion Chromatography as a Technique for the Investigation of Novel Extracellular Vesicles in Cancer. *Cancers*, 12(11), 3156. <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3156>
https://mdpi-res.com/d_attachment/cancers/cancers-12-03156/article_deploy/cancers-12-03156-v2.pdf?version=1603882679
- Liu, P., Chen, G., & Zhang, J. (2022). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules*, 27(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
- Liu, S., Wu, X., Chandra, S., Lyon, C., Ning, B., jiang, L., Fan, J., & Hu, T. Y. (2022). Extracellular vesicles: Emerging tools as therapeutic agent carriers. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(10), 3822-3842.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.05.002>

- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M. L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., & Fais, S. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS one*, *4*(4), e5219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005219>
- Lorusso, D., Di Stefano, A., Carone, V., Fagotti, A., Pisconti, S., & Scambia, G. (2007). Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome). *Ann Oncol*, *18*(7), 1159-1164. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl477>
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, *3*, 26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>
- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H. S., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery [Review]. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*, 754. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.12>
- Ludwig, N., Whiteside, T. L., & Reichert, T. E. (2019). Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, *20*(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194684>
- Martins, T. S., Catita, J., Rosa, I. M., Silva, O. A. B. D. E., & Henriques, A. G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PloS one*, *13*(6). <https://doi.org/ARTN e0198820> 10.1371/journal.pone.0198820

- Meister, M., Bänfer, S., Gärtner, U., Koskimies, J., Amaddii, M., Jacob, R., & Tikkanen, R. (2017). Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo. *Oncogenesis*, 6(6), e344-e344. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.47>
- Melzer, C., Rehn, V., Yang, Y., Bahre, H., von der Ohe, J., & Hass, R. (2019). Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060798>
- Mendt, M., Kamerkar, S., Sugimoto, H., McAndrews, K. M., Wu, C.-C., Gagea, M., Yang, S., Blanco, E. V. R., Peng, Q., Ma, X., Marszalek, J. R., Maitra, A., Yee, C., Rezvani, K., Shpall, E., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2018). Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight*, 3(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99263>
- Meng, W., He, C., Hao, Y., Wang, L., Li, L., & Zhu, G. (2020). Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug delivery*, 27(1), 585-598. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1748758>
- Morello, M., Minciacchi, V., de Candia, P., Yang, J., Posadas, E., Kim, H., Griffiths, D., Bhowmick, N., Chung, L., Gandellini, P., Freeman, M., Demichelis, F., & DiVizio, D. (2013). Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*, 12(22), 3526-3536. <https://doi.org/10.4161/cc.26539>
- Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., & Gupta, R. C. (2016). Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett*, 371(1), 48-61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.020>

- Mutlu, E. C., Kaya, Ö., Wood, M., Mager, I., Topkara, K., Çamsarı, Ç., Birinci Yildirim, A., Çetinkaya, A., Acarel, D., & Odabaşı Bağcı, J. (2020). Efficient Doxorubicin Loading to Isolated Dexosomes of Immature JAWSII Cells: Formulated and Characterized as the Bionanomaterial. *Materials (Basel)*, *13*(15).
<https://doi.org/10.3390/ma13153344>
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
- Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front Bioeng Biotechnol*, *9*, 705886.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>
- Newman, L. A., Useckaite, Z., Johnson, J., Sorich, M. J., Hopkins, A. M., & Rowland, A. (2022). Selective Isolation of Liver-Derived Extracellular Vesicles Redefines Performance of miRNA Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biomedicines*, *10*(1).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10010195>
- Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. O., & Widmark, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*, *100*(10), 1603-1607. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605058>
- Novickij, V., Rembalkowska, N., Szlasa, W., & Kulbacka, J. (2022). Does the shape of the electric pulse matter in electroporation? *Front Oncol*, *12*, 958128. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.958128>

- O'Brien, K., Lowry, M. C., Corcoran, C., Martinez, V. G., Daly, M., Rani, S., Gallagher, W. M., Radomski, M. W., MacLeod, R. A., & O'Driscoll, L. (2015). miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity. *Oncotarget*, 6(32), 32774-32789. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5192>
- Onódi, Z., Pelyhe, C., Terézia Nagy, C., Brenner, G. B., Almási, L., Kittel, Á., Manček-Keber, M., Ferdinandy, P., Buzás, E. I., & Giricz, Z. (2018). Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma. *Front Physiol*, 9, 1479. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01479>
- Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.
- Pascucci, L., Cocce, V., Bonomi, A., Ami, D., Ceccarelli, P., Ciusani, E., Viganò, L., Locatelli, A., Sisto, F., Doglia, S. M., Parati, E., Bernardo, M. E., Muraca, M., Alessandri, G., Bondiolotti, G., & Pessina, A. (2014). Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release*, 192, 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.042>
- Pharmacia Fine Chemicals, A. (1976). *Gel Filtration: Theory and Practice*. Pharmacia Fine Chemicals. <https://books.google.cl/books?id=9vFnsWEACAAJ>
- Piffoux, M., Nicolás-Boluda, A., Mulens-Arias, V., Richard, S., Rahmi, G., Gazeau, F., Wilhelm, C., & Silva, A. K. A. (2019). Extracellular vesicles for personalized medicine: The input of physically triggered production, loading and theranostic properties. *Adv Drug Deliv Rev*, 138, 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.009>

- Pike, S., Peng, C. C., Neviani, P., Berry, J. L., & Xu, L. (2023). CD63/81 Small Extracellular Vesicles in the Aqueous Humor are Retinoblastoma Associated. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 64(10), 5.
<https://doi.org/10.1167/iovs.64.10.5>
- Pomatto, M. A. C., Bussolati, B., D'Antico, S., Ghiotto, S., Tetta, C., Brizzi, M. F., & Camussi, G. (2019). Improved Loading of Plasma-Derived Extracellular Vesicles to Encapsulate Antitumor miRNAs. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 13, 133-144.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.001>
- Popilski, H., Feinshtein, V., Kleiman, S., Mattarei, A., Garofalo, M., Salmaso, S., & Stepensky, D. (2021). Doxorubicin liposomes cell penetration enhancement and its potential drawbacks for the tumor targeting efficiency. *Int J Pharm*, 592, 120012.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120012>
- Povea-Cabello, S., Oropesa-Ávila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Villanueva-Paz, M., De la Mata, M., Suárez-Rivero, J. M., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Cotán, D., & Ybot-González, P. (2017). Dynamic reorganization of the cytoskeleton during apoptosis: the two coffins hypothesis. *Int J Mol Sci*, 18(11), 2393.
- Qi, Y., Guo, L., Jiang, Y., Shi, Y., Sui, H., & Zhao, L. (2020). Brain delivery of quercetin-loaded exosomes improved cognitive function in AD mice by inhibiting phosphorylated tau-mediated neurofibrillary tangles. *Drug delivery*, 27(1), 745-755.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1762262>
- Rankin-Turner, S., Vader, P., O'Driscoll, L., Giebel, B., Heaney, L. M., & Davies, O. G. (2021). A call for the standardised reporting of factors affecting the exogenous loading of extracellular vesicles with therapeutic cargos. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 479-491.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.012>

- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183(3), 1161-1172.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192324/pdf/je18331161.pdf>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Redgrave, T. G., Roberts, D. C., & West, C. E. (1975). Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem*, 65(1-2), 42-49. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90488-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90488-1)
- Rezaie, J., Feghhi, M., & Etemadi, T. (2022). A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 145.
<https://doi.org/10.1186/s12964-022-00959-4>
- Rutman, A. K., Negi, S., Gasparri, M., Hasilo, C. P., Tchervenkov, J., & Paraskevas, S. (2018). Immune response to extracellular vesicles from human islets of Langerhans in patients with Type 1 diabetes. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00649>
- Saari, H., Lázaro-Ibáñez, E., Viitala, T., Vuorimaa-Laukkanen, E., Siljander, P., & Yliperttula, M. (2015). Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *Journal of Controlled Release*, 220, 727-737.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.031>
- Sadallah, S., Eken, C., & Schifferli, J. (2011). Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical & Experimental Immunology*, 163(1), 26-32.

- Salarpour, S., Forootanfar, H., Pournamdari, M., Ahmadi-Zeidabadi, M., Esmaeeli, M., & Pardakhty, A. (2019). Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *Daru*, 27(2), 533-539.
<https://doi.org/10.1007/s40199-019-00280-5>
- Salipante, P. F., & Vlahovska, P. M. (2014). Vesicle deformation in DC electric pulses [10.1039/C3SM52870G]. *Soft Matter*, 10(19), 3386-3393. <https://doi.org/10.1039/C3SM52870G>
- Salomon, C., Das, S., Erdbrugger, U., Kalluri, R., Kiang Lim, S., Olefsky, J. M., Rice, G. E., Sahoo, S., Andy Tao, W., Vader, P., Wang, Q., & Weaver, A. M. (2022). Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*, 43(3), 441-468.
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnac009>
- Schindler, C., Collinson, A., Matthews, C., Pointon, A., Jenkinson, L., Minter, R. R., Vaughan, T. J., & Tighe, N. J. (2019). Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry and enhanced in vitro potency. *PloS one*, 14(3), e0214545-e0214545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214545>
- Shi, J., Ma, Y., Zhu, J., Chen, Y., Sun, Y., Yao, Y., Yang, Z., & Xie, J. (2018). A Review on Electroporation-Based Intracellular Delivery. *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23113044>
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *Int J Mol Sci*, 21(18), 6466. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6466>
- Skoog, D. A., Crouch, S. R., Holler, F. J., & Anzures, M. B. (2008). *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental*

Analysis. Cengage Learning.

<https://books.google.cl/books?id=7FOyZbb7q8UC>

- Stankevic, V., Simonis, P., Zurauskiene, N., Stirke, A., Dervinis, A., Bleizgys, V., Kersulis, S., & Balevicius, S. (2020). Compact Square-Wave Pulse Electroporator with Controlled Electroporation Efficiency and Cell Viability. *Symmetry*, *12*(3), 412. <https://www.mdpi.com/2073-8994/12/3/412>
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Barnes, S., Grizzle, W., Miller, D., & Zhang, H. G. (2010). A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther*, *18*(9), 1606-1614. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.105>
- Sutaria, D. S., Badawi, M., Phelps, M. A., & Schmittgen, T. D. (2017). Achieving the Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles: The Devil is in Details of Therapeutic Loading. *Pharm Res*, *34*(5), 1053-1066. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2123-5>
- Takahashi, M., Furukawa, T., Saitoh, H., Aoki, A., Koike, T., Moriyama, Y., & Shibata, A. (1991). Gene transfer into human leukemia cell lines by electroporation: experience with exponentially decaying and square wave pulse. *Leuk Res*, *15*(6), 507-513. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(91\)90062-x](https://doi.org/10.1016/0145-2126(91)90062-x)
- Tavares Luiz, M., Santos Rosa Viegas, J., Palma Abriata, J., Viegas, F., Testa Moura de Carvalho Vicentini, F., Lopes Badra Bentley, M. V., Chorilli, M., Maldonado Marchetti, J., & Tapia-Blacido, D. R. (2021). Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, *165*, 127-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.011>

- Taylor, D. D., Zacharias, W., & Gercel-Taylor, C. (2011). Serum/plasma proteomics. *Simpson RJ, Greening DW*, 728, 235-246.
- Ter-Ovanesyan, D., Gilboa, T., Budnik, B., Nikitina, A., Whiteman, S., Lazarovits, R., Trieu, W., Kalish, D., Church, G. M., & Walt, D. R. (2023). Improved isolation of extracellular vesicles by removal of both free proteins and lipoproteins. *Elife*, 12.
<https://doi.org/10.7554/eLife.86394>
- Ter-Ovanesyan, D., Norman, M., Lazarovits, R., Trieu, W., Lee, J. H., Church, G. M., & Walt, D. R. (2021). Framework for rapid comparison of extracellular vesicle isolation methods. *Elife*, 10.
<https://doi.org/10.7554/eLife.70725>
- They, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., . . . Zuba-Surma, E. K. (2018). 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*, 7(1), 1535750.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- They, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function [Review Article]. *Nature Reviews Immunology*, 2, 569. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Thietart, S., & Rautou, P.-E. (2020). Extracellular vesicles as biomarkers in liver diseases: A clinician's point of view. *Journal of hepatology*, 73(6), 1507-1525.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways:

- pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21(7), 440-446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J., & Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383-2390. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>
- Toffoli, G., Hadla, M., Corona, G., Caligiuri, I., Palazzolo, S., Semeraro, S., Gamini, A., Canzonieri, V., & Rizzolio, F. (2015). Exosomal doxorubicin reduces the cardiac toxicity of doxorubicin. *Nanomedicine (Lond)*, 10(19), 2963-2971. <https://doi.org/10.2217/nmm.15.118>
- Veerman, R. E., Teeuwen, L., Czarnewski, P., Güclüler Akpınar, G., Sandberg, A., Cao, X., Pernemalm, M., Orre, L. M., Gabrielsson, S., & Eldh, M. (2021). Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(9), e12128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jev2.12128>
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, 13(4), 423-433.
- Volkova, M., & Russell, R. (2011). Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Current Cardiology Reviews*, 7(4), 214-220. <https://doi.org/10.2174/157340311799960645>
- Walker, S., Busatto, S., Pham, A., Tian, M., Suh, A., Carson, K., Quintero, A., Lafrence, M., Malik, H., Santana, M. X., & Wolfram, J. (2019). Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Theranostics*, 9(26), 8001-8017. <https://doi.org/10.7150/thno.37097>

- Wei, R., Zhao, L., Kong, G., Liu, X., Zhu, S., Zhang, S., & Min, L. (2020). Combination of Size-Exclusion Chromatography and Ultracentrifugation Improves the Proteomic Profiling of Plasma-Derived Small Extracellular Vesicles. *Biological Procedures Online*, 22(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00125-5>
- Wickman, G., Julian, L., Mardilovich, K., Schumacher, S., Munro, J., Rath, N., Zander, S. A., Mleczak, A., Sumpton, D., & Morrice, N. (2013). Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death & Differentiation*, 20(10), 1293-1305.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13(3), 269-288.
- Wu, M., Ouyang, Y., Wang, Z., Zhang, R., Huang, P.-H., Chen, C., Li, H., Li, P., Quinn, D., Dao, M., Suresh, S., Sadovsky, Y., & Huang, T. J. (2017). Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709210114>
- Yamashita, T., Takahashi, Y., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2016). Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, 1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.10.017>
- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcher, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R. N., & Wang, T. (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics [Review]. *Theranostics*, 10(8), 3684-3707. <https://doi.org/10.7150/thno.41580>

- Yuan, Z., Kolluri, K. K., Gowers, K. H., & Janes, S. M. (2017). TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. *J Extracell Vesicles*, 6(1), 1265291. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1265291>
- Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23262.
- Zhang, G., Yang, X., Su, X., An, N., Yang, F., Li, X., Jiang, Y., & Xing, Y. (2022). Understanding the Protective Role of Exosomes in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2852251. <https://doi.org/10.1155/2022/2852251>
- Zhang, X., Liu, L., Tang, M., Li, H., Guo, X., & Yang, X. (2020). The effects of umbilical cord-derived macrophage exosomes loaded with cisplatin on the growth and drug resistance of ovarian cancer cells. *Drug Dev Ind Pharm*, 46(7), 1150-1162. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1776320>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9, 19-19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhang, Y. F., Shi, J. B., & Li, C. (2019). Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: Current status and the way forward. *Cytotherapy*, 21(11), 1122-1136. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.10.002>
- Zhao, Z., Wijerathne, H., Godwin, A. K., & Soper, S. A. (2021). Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs). *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids*, 2, 80-103. <https://doi.org/10.20517/evcna.2021.07>

Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A., Yuen, P. S., Hoffert, J. D., Yasuda, H., Hu, X., Chawla, L., Shen, R. F., Knepper, M. A., & Star, R. A. (2006). Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int*, 70(10), 1847-1857. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001874>

Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R. C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., Miller, D., & Zhang, H. G. (2011). Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther*, 19(10), 1769-1779. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.164>

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*, 4(5), 594-600.

1 **CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

2 **4.1 Estudio comparativo de la cromatografía de exclusión por**
3 **tamaño para el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas a**
4 **partir de medio de cultivo celular, plasma, orina y saliva**
5

6 *Article*

7 **Comparative study of size exclusion chromatography for isolation of**
8 **small extracellular vesicle from cell-conditioned media, plasma, urine,**
9 **and saliva.**

10 **Contreras H¹, Alarcón-Zapata P^{1,2}, Nova-Lamperti E¹, Ormazabal V³,**
11 **Varas-Godoy M^{4,5}, Salomon C^{6,7}, Zuniga FA^{1*}.**

12 ¹Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Biochemistry and
13 Immunology, University of Concepcion, Concepción, Chile.

14 ²Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad
15 Santo Tomás, Concepción, Chile.

16 ³Faculty of Biological Sciences, Pharmacology Department, University of
17 Concepcion, Concepción, Chile.

18 ⁴Cancer Cell Biology Lab., Centro de Biología Celular y Biomedicina
19 (CEBICEM), Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián,
20 Lota 2465, Santiago 7510157, Chile

21 ⁵Centro Ciencia & Vida, Fundación Ciencia & Vida, Avda. Zanartu 1482
22 Nunoa, Santiago 7780272, Chile.

23 ⁶Exosome Biology Laboratory, Centre for Clinical Diagnostics, University
24 of Queensland Centre for Clinical Research, Royal Brisbane and Women's
25 Hospital, The University of Queensland.

26 ⁷Departamento de Investigación, Postgrado y Educación Continua (DIPEC),
27 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Alba, Santiago, Chile.

28 *Corresponding Author fzuniga@udec.cl

29

30 **Keywords: Small extracellular vesicles, extracellular vesicles, exosomes,**
31 **optimization, isolation, purification, plasma, size-exclusion**
32 **chromatography.**

33

34 **4.1.1 Abstract**

35 Extracellular vesicles (EVs) are secreted from all types of cells and are
36 involved in the trafficking of proteins, metabolites, and genetic material
37 from cell to cell. According to their biogenesis and physical properties, EVs
38 are often classified as small EVs (including exosomes) or large EVs, and
39 large oncosomes. A variety of methods are used for isolated EVs; however,
40 they have several limitations, including vesicle deformation, reduced
41 particle yield, and co-isolate protein contaminants.

42 Here we present an optimized fast and low-cost methodology to isolate
43 small EVs (30 to 150 nm) from biological fluids comparing two SEC
44 stationary phases, G200/120 and G200/140 columns. The optimization
45 parameters considered were a) the selection of the stationary phase, b) the
46 eluate volume per fraction, and c) the selection of the enriched 30 to 150
47 nm EVs-fractions. The efficiency and separation profile of each UF/SEC
48 fraction was evaluated by Nanoparticle tracking analysis (NTA), flow
49 cytometry, total protein quantification, and Western blot.

50 The results suggest that both columns can isolate predominantly small EVs
51 with low protein contaminants from plasma, urine, saliva, and HEK293-

52 derived EV from collection medium. Column G200/40 offers a more
53 homogeneous enrichment of vesicles between 30 and 150 nm than
54 G200/120 [$76.1 \pm 4.4\%$ with an average size of 85.9 ± 3.6 nm (Mode: 72.8
55 nm)] in the EV collection medium. The enrichment, estimated as the
56 vesicle-to-protein ratio, was 1.3×10^{10} particles/mg protein for G200/40,
57 obtaining a more significant EVs enrichment compared to G200/120. The
58 optimized method delivers 0.8 mL of an EVs-enriched-outcome, taking
59 only 30 mins per sample.

60 Using plasma, the enrichment of small EVs from the optimized method was
61 $70.5 \pm 0.18\%$, with an average size of 119.4 ± 6.9 nm (Mode: 120.3 nm),
62 and the enrichment of the vesicle isolation was 4.8×10^{11} particles/mg
63 protein. The average size of urine and saliva -EVs samples was 147.5 ± 3.4
64 and 111.9 ± 2.5 nm, respectively. All the small EVs isolated from the
65 samples exhibit the characteristic cup-shaped morphology observed by
66 Transmission electron microscopy (TEM). This study suggests that the
67 combination of methods is a robust, fast, and improved strategy for
68 isolating small EVs.

69

70 **4.1.2 Introduction**

71 Extracellular Vesicles or EVs are often classified as small EVs (including
72 exosomes and a fraction of microvesicles) or large EVs (including
73 ectosomes or microvesicles, migrasomes, apoptotic bodies) and large
74 oncosomes. Small extracellular vesicles are double membrane-enclosed
75 vesicles that conventionally display a size of ~30 to 150 nm in diameter [1-
76 5]. They are generated constitutively by all types of normal as well as
77 abnormal cells, and their composition is dependent on cell type and status.
78 Based on their biogenesis, small EVs can be derived from the late
79 endosome pathway in the multi-vesicular bodies or be released through
80 direct budding into the extracellular space upon fusion with the plasma
81 membrane. These are the two majors but not only biogenesis pathways [6-
82 9]. Actual classification is based on the differences in size, surface markers
83 of EVs, pathways of origin, as well as the different strategies for its
84 isolation. Because they are highly heterogeneous, the International Society
85 for Extracellular Vesicles (ISEV) published Minimal information for studies
86 of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018) [10] that recommend the use of
87 “small EVs” as the current term [11, 12].

88 In recent times, EVs have become increasingly important as they may help
89 monitor and evaluate the progression of various chronic high-risk diseases
90 such as cancer, neurodegenerative disorders, and atherosclerosis [13-16].
91 They have a natural ability to pass through biological barriers and are
92 responsible for the trafficking of proteins, metabolites, and genetic material,
93 to nearby or distant recipient cells [17]. Once there, they release their cargo
94 and induce changes in the cell phenotype through cellular reprogramming.
95 Thus, it has been proposed that they can be used as natural drug delivery
96 systems (DDS), transporting several hydrophobic drugs, preventing
97 degradation, and increasing medium-half-life in circulation [18, 19].

98 Isolation and analysis of EVs could give important clues about the early
99 development of several diseases [20-23]. However, there is still no optimal
100 isolation method that allows high recovery rates and specificity of EVs, so
101 the choice should be based on the downstream applications, reporting all
102 details of the method for reproducibility [10, 24, 25]. Small EVs isolation is
103 based on different methodologies such as ultracentrifugation, acoustic-
104 micro fluidic integrated devices [26], density gradient techniques, or
105 immunoaffinity-capture, and ultrafiltration systems (UF) [27-30]. Many of
106 these strategies are laborious, involve time-consuming isolation procedures

107 [31], and/or require high-cost equipment that is not readily adaptable or
108 affordable for clinical uses [32]. Moreover, it has been reported that many
109 of them cause vesicle deformation [33, 34], generate protein aggregates
110 [35], or isolate only a small portion of the total vesicle content, biasing
111 compositional and functional characterization by sample loss [36].
112 Although most of these methods enable the quick acquisition of small EVs,
113 the abundance and purification grades remains contentious. Many of these
114 strategies co-isolate contaminant proteins, referred as soluble proteins that
115 are normally found in the biological fluid, which can affect the final clinical
116 interpretation or application [37]. Furthermore, precipitant agents that help
117 remove contaminant proteins might induce toxic effects in clinical
118 applications for small EV-based therapies [38].

119 Size Exclusion Chromatography (SEC) has recently been proposed to
120 remove most of the non-vesicles macromolecules while preserving the
121 vesicular structure, activity and conformation of the molecules of interest
122 [39, 40]. Furthermore, Ultrafiltration (UF) and SEC combined produce
123 higher enrichment of EV fractions [27] because UF employs Nominal
124 Molecular Weight Limit (NMWL) filters, removing large EV aggregates
125 and concentrating the EV content into a less volume [28, 41]. Many SEC

126 methodologies mention the use of Sepharose bead-formed gels prepared
127 from 2%, 4%, or 6%-agarose, that range in particle size between 60 – 200
128 μm . [37, 39]. Meanwhile, agarose resins (Sepharose) require heated water
129 to dissolve them, whereas the G-dextran polymers (Sephadex) do not, and
130 therefore, they can be used directly in gel chromatography. The G-types of
131 Sephadex differ in their degree of cross-linking, their degree of swelling,
132 and their fractionation range. The G200/40 and G200/120 are two stationary
133 phases that offer a similar particle fractional range between 30 and 200 kDa
134 but present a different particle size (G200/40: 40 μm versus G200/120: 120
135 μm). This way, the efficiency of EV purification according to particle size
136 can be studied. However, there is little information about using Sephadex
137 resins in small EVs purification.

138 This study describes a low-cost, high-efficient method for isolating
139 EVs with diameters ranging from 30 to 150 nm from cell culture
140 supernatant, plasma, urine, and saliva using UF/SEC without the use of
141 specialized equipment such as an ultracentrifuge. We evaluate the efficiency
142 and purification profile of two in-house packed columns with silica of two-
143 particle sizes (G200/40 versus G200/120). We optimize the small EVs
144 isolation by UF/SEC using FBS-free EV collection medium recovered from

145 the cancer cell line HEK-293 [42-44]. We analyze the efficacy of UF/SEC
146 method in separating EVs between 30 to 150 nm from proteins
147 contaminants. Small EVs preparations were characterized in terms of size,
148 morphology, and yield by Nanoparticle tracking analysis (NTA), dynamic
149 light scattering (DLS) size, immunoaffinity capture, flow cytometry,
150 Western blot, and transmission electron microscopy (TEM). We used this
151 optimized protocol to characterize small EVs isolated from plasma, urine,
152 and saliva samples.

153 Our results suggest that both columns can efficiently isolate EVs between
154 30 to 150 nm derived from the EV collection medium and biological
155 samples. However, the SEC G200/40 column offers better performance
156 with a less broad elution peak, fewer protein contaminants, and small EVs
157 rich fractions without altering the vesicle size and shape.

158

159 **4.1.3 Materials and methods**

160 **4.1.3.1 Cell culture**

161 Extracellular vesicles were collected from commercially available cell lines
162 from Human Embryonic Kidney (HEK-293) cells. The cells were grown in

163 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) culture media in 100 mm
164 plates and supplemented with 10% FBS, 1x L-glutamine (GlutaMAX-I
165 100x, Gibco), and 1x Antibiotic Antimycotic Solution (penicillin,
166 streptomycin, and amphotericin B) (hereafter referred to as *complete*
167 *DMEM*). Seven (7) mL per plate was used as growing media, and the cell
168 line was kept at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. When cells reached 70 to
169 80% confluence (4-5 x 10⁶ HEK293 cells per plate), they were passed to a
170 second passage and renewed with *complete DMEM*. Prior to total media
171 collection, cell cultures were washed twice with sterile PBS 1X and kept
172 with FBS-free medium for no more than 24 hours at 37°C with 5% CO₂, as
173 previously recommended [44]. After that, all the EV collection medium
174 were recovered from the plates and stored at 4°C for no more than one
175 week until the SEC isolation procedure. Total volume collected from HEK-
176 293 cells, was 140 mL of EV collection medium from 100 x 10⁶ cells.

177 Finally, small EVs were isolated from the EV collection medium by
178 ultrafiltration (UF) and Size Exclusion Chromatography (SEC). Briefly, the
179 recovered collection medium was centrifuged in an Eppendorf centrifuge
180 5403 in a swing bucket rotor (16A4-44) at 4°C (i) twice at 800 × g for 10
181 min, (ii) once at 2000 × g for 10 min, and (iii) once at 12000 × g for 30 min.

182 The supernatant was recovered each time, and contaminating products
183 (cells, apoptotic bodies, cell debris, and microvesicles) were removed in
184 each step. Then, the total centrifuged media was filtered using a 0.22- μ m
185 cellulose acetate (CA) syringe filter. The filtered solution was divided into
186 two equal portions and concentrated using two 10 kDa Nominal Molecular
187 Weight Limit (NMWL) Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck
188 Millipore) by centrifugation at $4000 \times g$ for 30 min at 4°C . Each Amicon
189 Ultra-15 tube delivers 250 μ l of concentrate to achieve a final EVs
190 concentrate volume of 500 μ l.

191

192 **4.1.3.2 EVs isolation from human biological fluids**

193 Six (6) mL of venous blood sample was collected in EDTA/K3 tube by
194 venipuncture, ten (10) mL of saliva sample was collected through the
195 spitting method [45], and fifty (50) mL of urine sample was obtained from
196 three control healthy subjects. All individuals provided informed consent
197 for biological fluids donation, and the study was performed with the
198 approval of the Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy at the
199 University of Concepción, Chile. All samples were centrifuged at $2000 \times g$

200 for 10 min at room temperature in an Eppendorf centrifuge 5403, Rotor
201 16F24-11, to separate the supernatant from the cellular components.

202 The plasma and saliva samples were aliquoted in 700 μ l volumes and stored
203 at -20°C until use. Frozen plasma and saliva specimens were thawed and
204 centrifuged at i) 2000 x g for 30 min at 4°C and ii) 12000 x g for 45 min at
205 4°C, and then passed through a 0.22- μ m CA syringe filter to remove cell
206 debris and large extracellular vesicles, and used for small EVs isolation by
207 SEC.

208 The supernatant of the centrifuged urine sample was transferred to a new
209 conical centrifuge tube and processed as for the cell culture medium
210 (centrifugated in Eppendorf centrifuge 5403 in a swing bucket rotor (16A4-
211 44) at 4°C (i) twice at 800 \times g for 10 min, (ii) once at 2000 \times g for 10 min,
212 and (iii) once at 12000 \times g for 30 min. Then, the total centrifuged media
213 was filtered using the 0.22- μ m cellulose acetate (CA) syringe filter. The
214 filtered solution was divided into two equal portions and concentrated using
215 two 10 kDa Nominal Molecular Weight Limit (NMWL) Amicon Ultra-15
216 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore) by centrifugation at 4000 \times g for
217 30 min at 4°C. Each Amicon Ultra-15 tube delivers 250 μ l of concentrate to
218 achieve a final EVs concentrate volume of 500 μ l.

219 **4.1.3.3 Preparation of In-house columns**

220 For the Size Exclusion Chromatography (SEC) method, 0.5 g of Sephadex
221 G200/120 or G200/40 resin (Sigma® Chemical Company, MO, USA) was
222 washed twice with 40 mL of NaCl solution (0.9% w/v, 0.22 µm filtered and
223 degassed by sonication). Between each wash, the resin was allowed to settle
224 and kept at rest for 24 hours. The next day, the liquid supernatant was
225 removed until the top of the washed resin, taking care not to remove or
226 disturb the resin. The washed resin was transferred into a 10 ml disposable
227 polypropylene column containing a bottom polypropylene filter with a 30
228 µm pore size (Cat. N°89898, Thermo Scientific Pierce), allowing it to settle,
229 to create a column with a 16 mm inner diameter and 62 mm height. Finally,
230 at room temperature, SEC columns were washed once with 300 mL of
231 filtered mobile phase (NaCl solution) for at least 8 hrs to allow proper
232 column packing.

233

234 **4.1.3.4 Size exclusion chromatography**

235 To perform SEC, 500 µl of the concentrated sample (EV collection
236 medium, Plasma, Urine, or Saliva) was loaded onto the Sephadex column.

237 After the sample was at the top of the column bed, the elution with NaCl
238 solution was performed. The eluate was collected by gravity. The collection
239 volume per fraction was 400 µl for EV collection medium and 200 µl for
240 the biological samples. Thirty fractions were collected and stored at -20°C
241 until use. Total protein concentration was measured for each fraction using
242 the DC TM Protein Assay Kit (BioRad) according to manufacturer
243 instructions. A Nanoparticle tracking analysis (NTA) was performed to get
244 the quantification and size distribution of the vesicles isolated.

245 Finally, at the end of each separation, SEC columns were washed with 30
246 ml of NaOH 0.1 M solution (0.22 µm filtered and degassed by sonication),
247 60 ml of PBS, and 100 ml of the filtered and degassed mobile phase for re-
248 use.

249 The fractions obtained from G200/120 and G200/40 columns were analyzed
250 by gel electrophoresis with Coomassie Blue Staining. Samples were loaded
251 on 6% or 10% tris-glycine-SDS gels and run at 180 V and 40 mA for 100
252 min. The gels were then stained with Coomassie Stain at room temperature
253 for two hours. Excess stain was removed through bleaching solution washes
254 (Methanol 20 %, Acetic Acid 10 %, in distilled water). For Albumin
255 detection, Bovine Serum Albumin (BSA-50, Rockland Immunochemicals,

256 Pottstown, PA) was used at the concentration of 0.1 mg/ml. HDL
257 Cholesterol was determined using the colorimetric reagent Cholesterol HDL
258 direct (COD 12557, BioSystems S.A., Spain) as per manufacturer's
259 instructions. This assay specifically detects HDL-associated cholesterol [46]
260 with a detection limit reported by the kit of 16 µg/ml. A normal human
261 calibrator was used as positive HDL-cholesterol control at the reported lot
262 concentration of 69.1 mg/dL (COD 18044, Biosystem S.A., Spain)

263

264 **4.1.3.5 Extracellular vesicles characterization**

265 Each fraction was evaluated by size distribution using Nanoparticle tracking
266 analysis (NTA). The detection of EVs-associated proteins was performed by
267 Western blot analysis, according to recommendations by the International
268 Society of Extracellular Vesicles (ISEV). The enrichment of the EVs
269 fractions between 30 to 150 nm was assessed by the ratio of vesicle counts
270 to protein concentration.

271 For EVs protein content, 50 µl of the sample was mixed with the same
272 volume of Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA, Sigma–Aldrich)
273 and sonicated for 30 min to open the vesicle membranes. The homogenized

274 solution was spun at $15000 \times g$, and total cellular proteins were quantified
275 using the DCTM Protein Assay Kit.

276 LDL-cholesterol and chylomicron were evaluated through Apo B-100
277 lipoprotein (ApoB100, 513 kDa), meanwhile the chylomicrons through
278 ApoB-48 lipoprotein (ApoB-48, 210 kD) in the plasma sample fractions.
279 For Western blot analysis, 40 μ l of non-standardized protein-homogenized
280 from each fraction were separated by 10% SDS/PAGE gel and transferred
281 to PVDF membranes. Membranes were blocked with nonfat milk (5% w/v,
282 in TBS) for 1 h at room temperature. Primary antibodies were diluted in
283 blocking buffer and incubated overnight at 4°C with mouse anti-ALIX
284 (1:500, SC-53540), polyclonal goat anti-TSG 101 (1:1000, SC-6037), and
285 mouse anti-CD9 (1:500, SC-13118) purchased from Santa Cruz
286 Biotechnology, and rabbit polyclonal antibody anti-Apolipoprotein B
287 (Human), supplied by Abcam (1:500, ab20737). Then, the membranes were
288 washed three times with TBS-T (0.05% w/v, TBS-Tween 20) for 10 min
289 each and incubated with secondary antibody Donkey Anti-Goat IgG H&L
290 (HRP) (1:1500, ab97110), Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (1:1000,
291 ab97023) or Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) (1:1500, ab97051).

292 Size distribution and concentration of isolated vesicles were measured using
293 NanoSight NS 300 instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK),
294 and data were analyzed with the NTA software (version 3.2 Dev Build
295 3.2.16). The detection threshold was set to 2, and blur and Max Jump
296 Distance were set to auto. Background measurements were performed with
297 an ultrafiltered NaCl solution, which revealed the absence of any kind of
298 particles. Samples processed by SEC were diluted in sterile and filtered
299 NaCl solution to reduce the number of particles in the field of view below
300 140/frame. Readings were taken five times, captured over 60 s at 25 frames
301 per second (fps), at a camera level set to 13, and with manual temperature
302 monitoring.

303 To check the nominal size values, particle diameter was measured by
304 dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano-ZS90. Each
305 suspension was diluted 10X in ultrapure water, and measurements were
306 carried out in triplicate at 25°C. Finally, the isolated small EVs were
307 quantified using the ExoELISA-Ultra CD63 kits (SBI, Palo Alto, CA,
308 United States) according to the manufacturer's instructions and as recently
309 described [47].

310 **4.1.3.6 Flow cytometry analysis**

311 To evaluate the enrichment of small EVs isolated from the G200/40
312 column, a flow cytometry analysis of the fractions was performed using the
313 Exosome–Human CD63 Isolation/Detection Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA,
314 USA) according to manufacturer recommendations. Briefly, to isolate the
315 CD63+ vesicles, 25 µg of total protein from pre-enriched small EVs were
316 diluted with the same NaCl 0.9% solution employed during SEC isolation
317 until 100 µl of final volume. Then, 25 µl of Dynabeads® coated with a
318 primary monoclonal antibody anti-CD63, was added to the diluted sample,
319 and incubated overnight at 4°C. The beads-bounded to small EVs were
320 washed, isolated with a magnetic separator, and resuspended in 100 µl of
321 NaCl 0.9% solution. Isolated small EVs were stained with anti-CD63-APC,
322 anti-CD9-FITC or anti-CD81-APC and incubated for 45–60 min at room
323 temperature, protected from light on a sample shaker. Unbound antibody
324 was removed by washing the beads-bounded to small EVs twice on the
325 magnet. For the controls, Dynabeads® were incubated at similar conditions
326 with the mentioned primary monoclonal antibody, but no sample was
327 added. Flow cytometry analysis was performed on a BD LSR Fortessa™ X-

328 20 to achieve 5000 events, and data were analyzed with the software FloJo
329 7.6 (version 7.6, Tree Star).

330

331 **4.1.3.7 Transmission electron microscopy**

332 Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis was performed in the
333 Spectroscopy and Electron Microscopy Centre at the University of
334 Concepción (CESMI-UDEC). Freshly prepared small EVs were isolated, as
335 described in Fig 1 and fixed in 200 μ l of 2% paraformaldehyde. Twenty
336 (20) μ l of EVs preparations were allowed to adsorb for 30 min at room
337 temperature in a 75 mesh Formvar/carbon-coated grid. Grids were washed
338 with PBS (membrane side faced down) and dried using filter paper. A wash
339 with distilled water 3 times for 2 minutes was also incorporated. For
340 negative staining, EVs-grids were transferred to a 50 μ l drop of 3%
341 phosphotungstic acid solution (pH 7) for 10 min and then wicked off with
342 filter paper. TEM visualizations were performed using a JEOL JEM-1200
343 EXII transmission electron microscope at 120 kV, and images were
344 captured using a slow-scan CCD camera.

345

346 **4.1.3.8 Statistical Analysis**

347 All results were expressed as arithmetic means and standard errors. Data
348 were subjected to one-way ANOVA to evaluate the statistical significance
349 of intergroup differences with Bonferroni post hoc tests, considering $\alpha <$
350 0.05. Graphics were performed using GraphPad Prism software version 9.1.

351

352

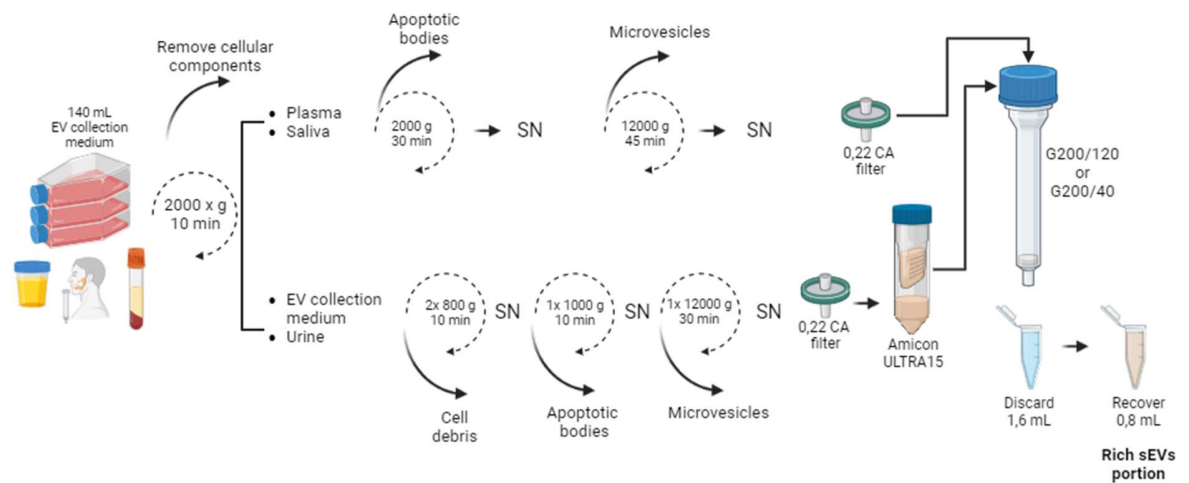
4.1.4 Results

353

4.1.4.1 Optimization and performance comparison of SEC

354

columns



355

356 **Figure 4.1.1:** Schematic workflow for small EVs isolation by SEC.

357 The samples were centrifuged and filtered. Only EV collection medium and
358 urine samples were concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter
359 Unit (Merck Millipore). Five hundred (500) μ l of the pre-treated samples
360 were loaded onto the column. Collected fractions were analyzed to
361 determine protein content and EV number. SN: supernatant.

362

363

364

4.1.4.2 Analysis of EV collection medium.

365 In order to isolate small EVs from HEK-293 cells, we collected 140 mL of
366 EV collection medium (100×10^6 cells). Pre-treatment of the sample was
367 performed as indicated in Materials and Methods and Figure 4.1.1. At the

368 end of the treatment, we obtained 500 μ l of concentrated media with a total
369 protein concentration of 1.87 ± 0.01 mg/ml. We packed two columns filled
370 with different particle size resins that offer a similar particle fractional range
371 between 30 and 200 kDa: a) the G200/40 (Particle size: 40 μ m), and b) the
372 G200/120 (Particle size: 120 μ m). The total volume of the sample was
373 loaded into the columns. At 1 atm of pressure, the flow rate of the G200/120
374 column was 1.0 ml/min and 0.02 ml/min for the G200/40 column. In each
375 column, 400 microliters of eluate per fraction were collected, and the total
376 protein was measured (Figure 4.1.2A).

377 We observed different protein elution profiles between G200/120 and
378 G200/40 resins with a marked increase of protein elution for G200/120
379 from F4 to F8 compared with G200/40 column. Since the small EVs
380 purification aims to obtain the highest number of fractions rich in EVs with
381 low protein contaminant, referred as soluble proteins that are normally
382 found in the biological fluid isolated and that can be co-isolated with the
383 population of vesicles, we analyze the expression of a known exosome
384 marker TSG-101 by Western blot [48]. Figure 4.1.2 right shows that EVs
385 elution begins from fraction F4 for both columns. However, the fractions
386 from G200/120 column also coelute with more protein contaminant than

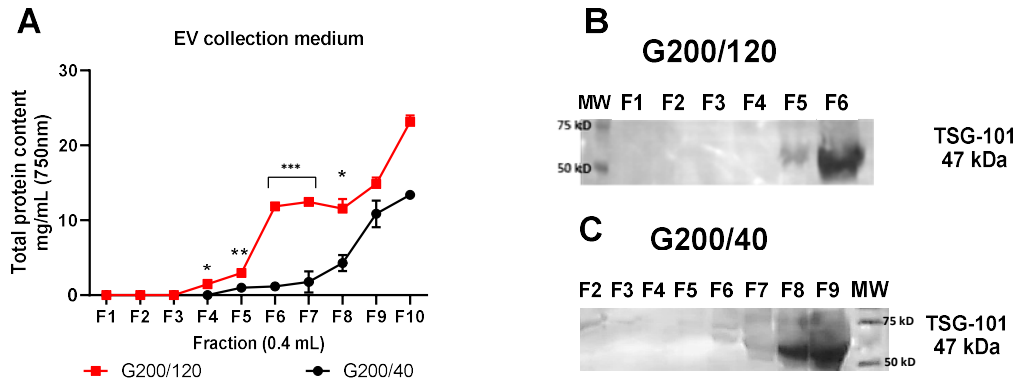
387 those from the G200/40 column. A high expression of TSG-101 protein was
388 evident in fraction F6 from G200/120 column (Figure 4.1.2B) and fraction
389 F9 from G200/40 column (Figure 2C). However, these fractions also
390 coelute with a high amount of protein which could affect the final small
391 EVs isolation quality. Thus, we combined the fractions F4 to F6, which
392 would give us a high number of extracellular vesicles with less protein
393 contaminants.

394 We used the NTA to measure the number of EVs isolated from both
395 columns and evaluated the expected size for the small EVs (30-150 nm).
396 Within each fraction, the average size and mode are in the expected size for
397 small EVs. Column G200/120 delivers isolated small EV with an average
398 size of 103.2 ± 10.6 nm (Mode: 93.7 nm) compared to 85.9 ± 3.6 nm
399 (Mode: 72.8 nm) from the G200/40 column (Figure 4.1.3 A and B).

400

401

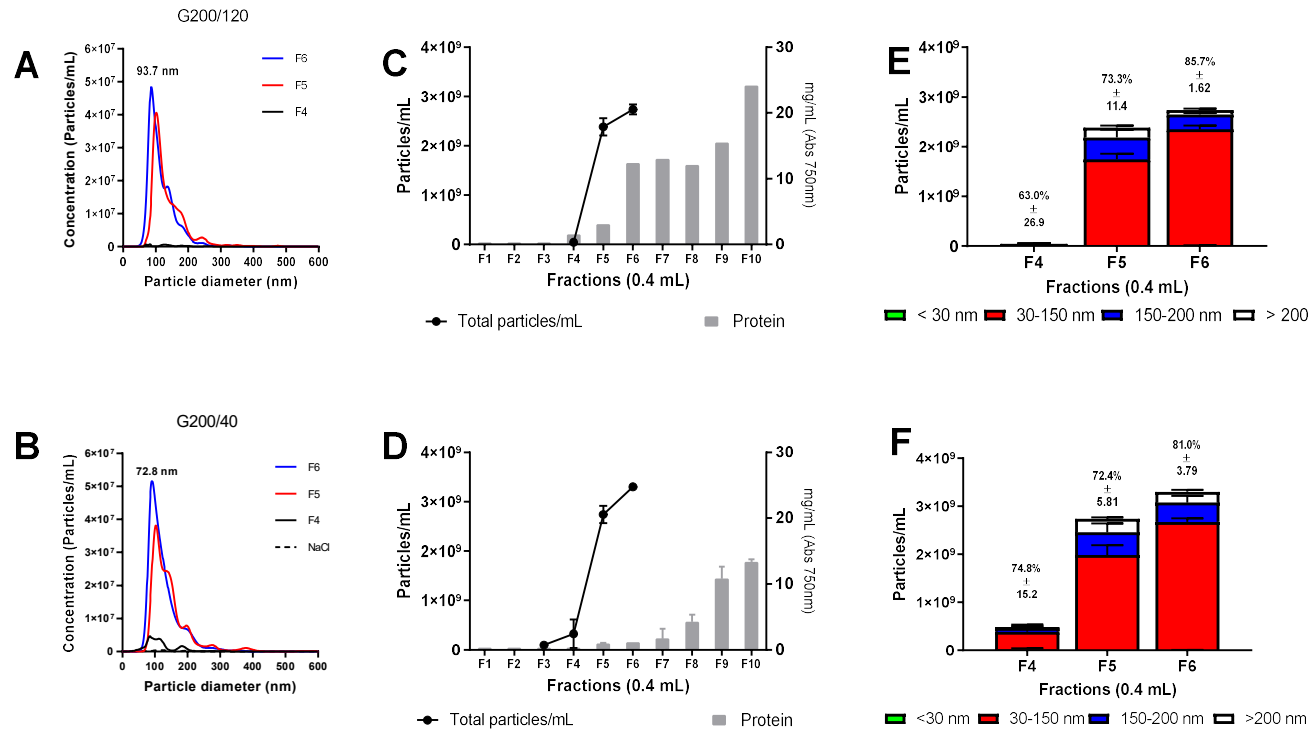
402



403

404 **Figure 4.1.2:** Protein profile and TSG101 expression in EV collection
 405 medium.

406 Two consecutive fractions were collected to complete 400 μ l elution
 407 volume per fraction. Each combined fraction was concentrated in a
 408 centrifugal rotary evaporator at 4°C overnight and resuspended in 200 μ l.
 409 Statistical differences were observed between fractions F4 to F8 in the total
 410 protein content from G200/120 versus G200/40 columns. (*) P<0.05, (**)
 411 P<0.01, (***) P<0.005. Images represent TSG-101 expression, obtained
 412 from RIPA-lysate fractions. MW: molecular weight ladder. n=6 for each
 413 column.



414

415 **Figure 4.1.3:** Nanoparticle tracking analysis of fractions from EV collection medium

416 Columns G200/120 and G200/40, 20 plates, and 400 μ l of volume fraction. A, B: representative NTA of
 417 small EVs isolated from cell media with G200/120(A) and G200/40(B) column. C, D: particle and protein
 418 distribution in the collected fractions. E, F: size distribution of the isolated EVs. The percentage over each
 419 column represents the fraction of 30 to 150 nm vesicles. NTA indicates Nanoparticle tracking analysis. Bar
 420 colors represent the subpopulation of EVs isolated in terms of size. n=6 for each column.

421 We used vesicle-to-protein ratio to measure the non-EV protein
422 contamination [49]. The purity of the vesicle was 3.4×10^8 for G200/120
423 and 1.3×10^{10} particles/mg protein for G200/40 column (Figure 4.1.3 C and
424 D), obtaining better purification of small EVs from the G200/40 than those
425 purified using the G200/120 column. Moreover, the G200/40 column shows
426 a higher enrichment of vesicles between 30 and 150 nm ($76.1 \pm 4.4\%$) than
427 G200/120 ($74.0 \pm 11.4\%$, Figure 4.1.3 F, and E).

428 For both columns, fractions F4 to F6 show that more than 70% of vesicles
429 collected in each fraction are within the expected size for small EVs. In the
430 EV collection medium, fraction F4 had the lowest small EVs content.
431 Although this fraction does not have a homogeneous particle distribution, it
432 contains more than 60% of the vesicles of interest. In a medium with a low
433 number of vesicles, this contribution can be significant compared to another
434 fluid with a higher number of vesicles.

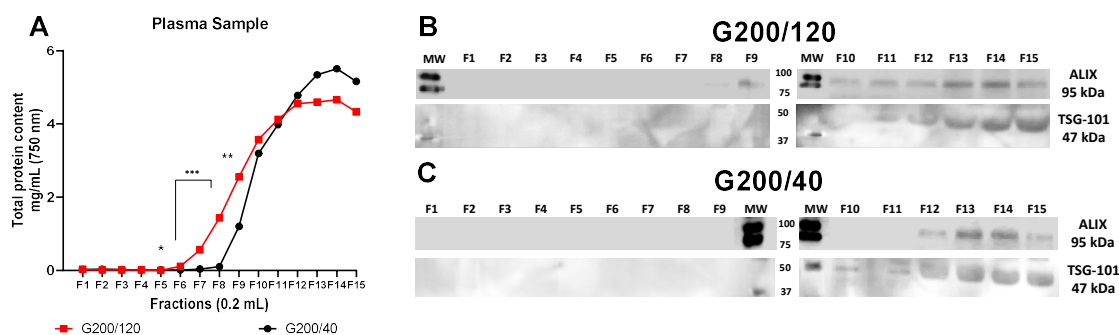
435

436 **4.1.4.3 Plasma samples analyses**

437 We used 500 μ l of plasma to evaluate the performance of SEC columns in
438 biological samples. Pre-treatment of the sample was performed as indicated

439 in Materials and Methods and Figure 4.1.1. To increase the resolution of
 440 plasma small EVs isolations due high protein contaminants [50], we
 441 decided to collect and analyze fractions of 200 μ L.

442



443
 444

445

446 **Figure 4.1.4:** Protein profile fractions and Western blot analysis from the
 447 plasma sample.

448 Plasma was pre-treated according to Material and Methods, and 500 μ l of
 449 the sample was loaded on G200/120 and G200/40 columns. For each
 450 fraction (200 μ l), the total protein was measured. A) Protein elution profile
 451 for the plasma sample collected fractions. B) Western blot analysis for
 452 ALIX and TSG-101 of the collected fractions. Statistical differences were
 453 observed between fractions F6 to F10. (*) P<0.05, (**) P<0.01, (***)
 454 P<0.005. Images represent ALIX and TSG-101 expression, obtained from
 455 RIPA-lysate fractions. MW: molecular weight ladder. n=6 for each column.

456

457

458

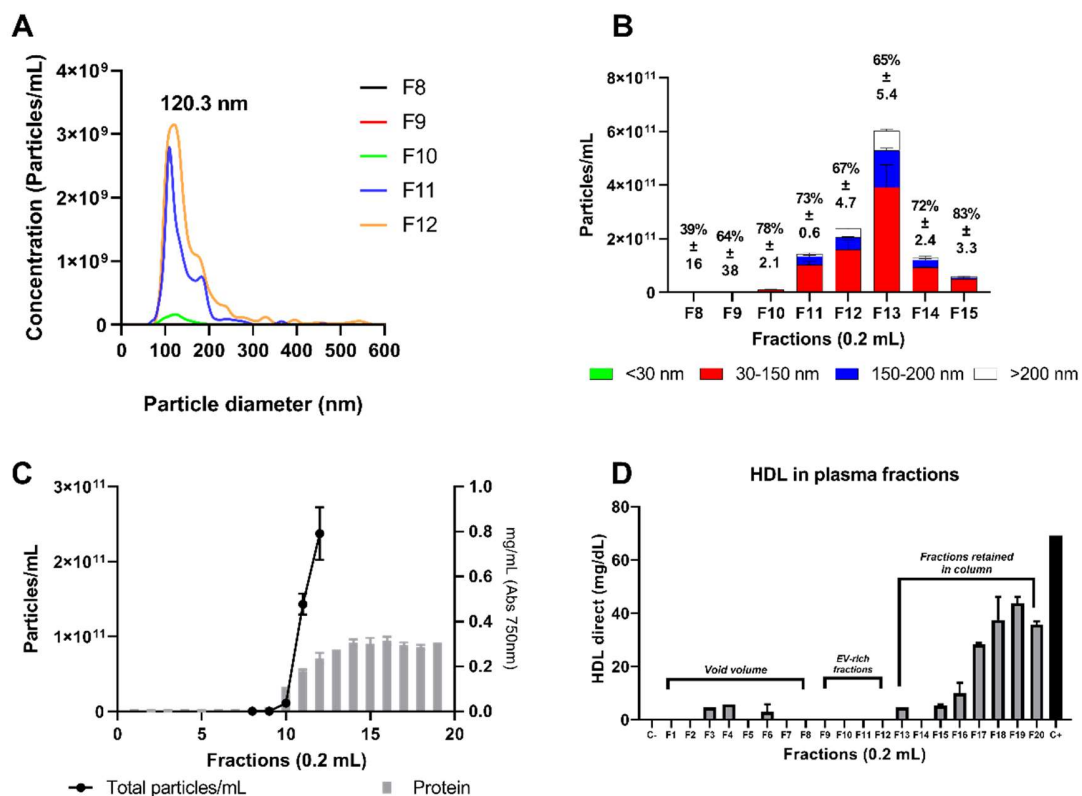
459 As observed in the previous experiment, the protein chromatogram of the
460 plasma sample (Figure 4.1.4 A) showed a similar pattern to the EV
461 collection medium from HEK-293 cells (Figure 4.1.2 A). The G200/40
462 column provided significantly higher retention of total protein content in the
463 first few fractions (between F6 and F11) than the G200/120 column.

464 Figure 4B shows that ALIX (also known as PDCD6IP, 95 kDa), another
465 exosome protein marker [51], in the fractions from the G200/120 column
466 was present in fractions 8 to 15, but TSG-101 (47 kDa) was only present in
467 fractions 11 to 15. In contrast, in fractions collected with the G200/40
468 column, ALIX, and TSG-101 were present from fractions 12 to 15 and 10 to
469 15, respectively. The double-positive vesicle markers delivered by the
470 G200/40 column were concentrated in a small number of fractions and,
471 therefore, into a small elution volume.

472 Overall, better performance was obtained using the G200/40 column. This
473 column has improved purification rates, almost 100 times higher than the
474 G200/120 column and less protein contaminants. For all these reasons, we
475 used the G200/40 column for further analyses of plasma and biological
476 samples.

477

478



479

480 **Figure 4.1.5:** Nanoparticle tracking analysis of the plasma fractions.

481 Size distribution curves from the plasma samples were determined by NTA.
482 Each curve represents the average of 3 technical replicate measurements for
483 each small EVs fraction collected with the column G200/40. A, B) Particle
484 and size distribution obtained from NTA analysis. The percentage over each
485 column represents the fraction of vesicles from 30 to 150 nm. C) Particle
486 and protein content present in the fractions from the G200/40 column. D)
487 Evaluation of HDL-cholesterol concentration measured by colorimetric
488 assay. C-: HDL-negative control. C+: HDL-positive control (69.1 mg/dL).

489

490 We used NTA to check that the low resolution of the Western blot was not
491 underestimating the presence of small EVs in the selected fractions.
492 Nanoparticle tracking analysis of plasma sample fractions F8 to F12
493 showed a population of small EV with higher mode tendency with an
494 average size of 119.4 ± 6.9 nm (mode: 120.3 nm) than EVs collected from
495 the cell media (Figure 4.1.5A vs. Figure 4.1.3B). The size distributions of
496 EVs between 30 and 150 nm correspond to nearly $70.5 \pm 0.18\%$ of the total
497 vesicle content (Figure 4.1.5 B) with a relatively low co-elution of protein
498 contaminants.

499 Many studies have reported that during EV isolation, some lipoproteins and
500 other major protein contaminants may also be present in the EVs-isolated
501 [39, 45, 52, 53]. In order to address some classical contaminants, we
502 decided to evaluate the presence of HDL-cholesterol, LDL-cholesterol,
503 chylomicrons, and Albumin in those fractions collected from the plasma
504 sample with the G200-40 column (Figure 4.1.5 and Supplementary Figures
505 4.2.1 A and B). We found that HDL-cholesterol was not present in the
506 plasma sample fractions between F8 to F12, and a minor content of LDL-
507 cholesterol, chylomicrons, and albumin was detected most of them retained
508 by the column.

509 Regarding small EV content, the plasma fraction F8 had the lowest number
510 of small EVs (3.8×10^8 particles/ml). Similar to previous results, it does not
511 have a homogeneous particle distribution. Since this fraction does not
512 contribute significantly to the total number of vesicles isolated by the
513 method or the particle distribution at the expected size range, it was decided
514 not to include it in the pool. Finally, vesicle isolation enrichment between
515 F9 to F12 from the G200/40 column was 4.8×10^{11} particles/mg protein
516 (Figure 4.1.5C), supporting the decision for the type of column selected.

517 On the other hand, we can observe a high concentration of small EV in
518 fraction thirteen. However, this fraction exhibits large EVs (above 150 nm)
519 and a high protein concentration. While this fraction may enrich the number
520 of small EVs, the high protein content reduces its enrichment. Similarly,
521 Albumin and ApoB-100 and soluble high molecular weight proteins begin
522 to rise from fraction thirteen. This protein contaminant increases correlates
523 with the rise of total proteins observed in Figure 4.1.4A.

524

525

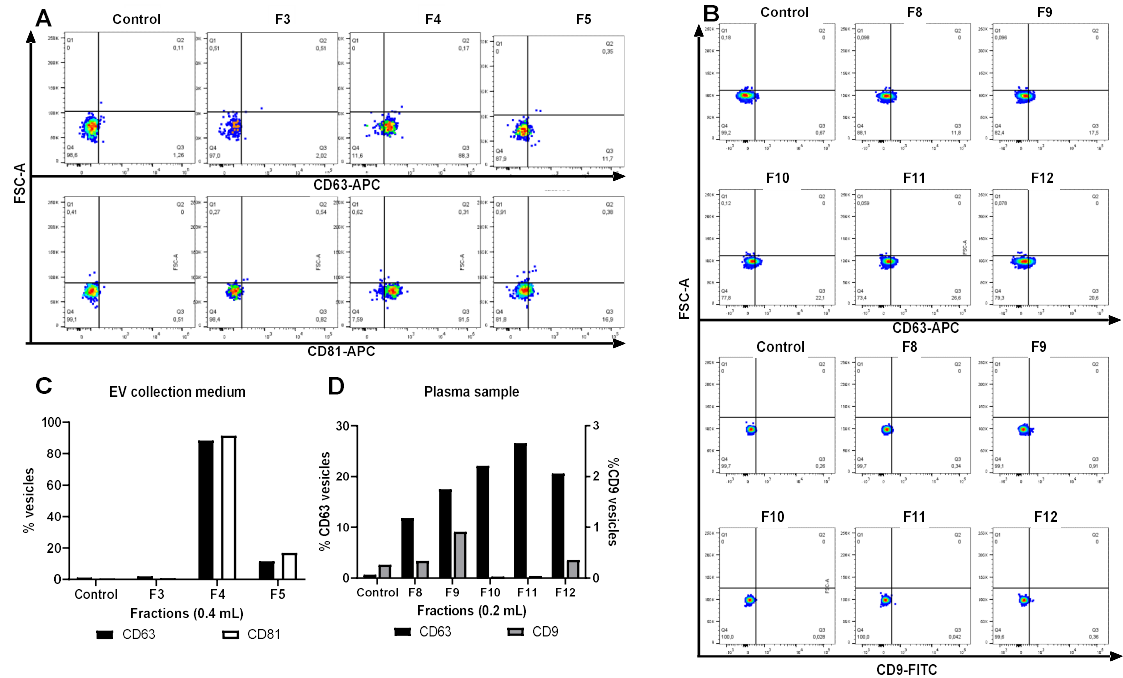
526

527 **4.1.4.4 Flow cytometry analysis**

528 The Western blot did not reveal whether the analyzed markers are present
529 on the same or different vesicles, and therefore, we utilized the Exosome–
530 Human CD63 Isolation kit to further determine the presence of CD63,
531 CD81, and CD9 on individual isolated small EVs by flow cytometry (FC).
532 The combined-cell media fractions and the plasma sample derived from the
533 G200/40 column were mixed with Dynabeads coated with anti-human
534 CD63 and stained for the typical small EV markers, tetraspanins CD63,
535 CD81, or CD9, to identify positive populations (Figure 4.1.6A and 4.1.6B).
536 In all the collected fractions, the tetraspanins CD63, CD81, or CD9 were
537 present. The FC analysis showed that the fractions derived from EV
538 collection medium express CD63⁺ and CD81⁺ markers. The vesicles with
539 this phenotype have a higher presence between fractions F4 to F5 in
540 HEK293-derived small EVs and F8 to F9 (Figure 6C and 6D) and, to a
541 lesser extent, in fractions collected from plasma (F10 to F12). In cell media-
542 derived small EV, the CD81 marker was highly enriched and correlated
543 with the CD63 expression in all the fractions collected.

544

545



546
547

548 **Figure 4.1.6:** Flow cytometry analysis of EVs isolated from cell culture
549 media and plasma fractions.

550 Small EVs were isolated from A) cell media and B) plasma from the
551 G200/40 column. C) Frequency of HEK293-derived small EVs CD63⁺ and
552 CD81⁺, D) plasma-derived small EVs CD63⁺ and CD9⁺. Small CD63
553 positive EVs were captured from each fraction employing Dynabeads®
554 coated with anti-CD63 and stained with anti CD63-APC (Upper panel) or
555 anti CD81-APC or anti CD9-FITC (Lower panel). Q3 represents small EV-
556 beads-CD63 positive staining.

557

558

559

560 Differential expressions for small EVs markers CD63 and CD9 were found

561 in all the plasma-derived fractions. However, both markers CD63 and CD9

562 are co-expressed in all of them. This result confirms that EVs exhibit a high

563 heterogeneity in their size and constituent components [7], which involve
564 the transmembrane proteins of the vesicles released by the same cell line.
565 The double labelling of CD63+CD81+ and CD63+CD9+ of the isolated
566 vesicles suggests that some of the isolated vesicles may have an endosomal
567 origin in agreement with that recently reported by Théry's group [54].
568 However, we cannot exclude that also other EVs may be present that may
569 have other biogenesis pathways [6-9].

570 Therefore, with the proposed optimized method, it is possible to obtain
571 small EV-rich fractions with low protein contaminants. Although two
572 different volumes per fraction were collected (400 μ l and 200 μ l) using 500
573 μ l of EV collection medium or plasma, collecting and combining fractions
574 F5 to F6 for the EV collection medium or fractions F9 to F12 for the plasma
575 sample, we achieved the same overall result. In practice, after loading 500
576 μ l of the sample at the G200/40 column, the first 1.6 mL of eluate are
577 discarded (corresponding to 200 μ L fractions F1 to F8; or 400 μ L fractions
578 F1 to F4). Then we collect 0.8 ml of eluate (representing 200 μ L fractions
579 F9 to F12; or 400 μ L fraction F5 to F6) that contains the small EV-rich
580 fractions. The combination of these fractions allows us to obtain an small
581 EV-rich pool with nearly 1.9×10^9 vesicles \pm 20.9% between 30 to 150 nm

582 from the EV collection medium and 2.7×10^{11} vesicles \pm 13.7% from the
583 plasma sample.

584 **4.1.4.5 DLS and TEM analysis**

585 We evaluate the performance of the optimized method on other biological
586 matrices, 0.8 mL of small EV-rich eluates were obtained as above from
587 plasma, saliva, and urine samples. The samples were analyzed using
588 Dynamic light scattering (DLS) and TEM.

589

590

591 **Table 4.1.1:** Physicochemical characterization of small EVs

	EV Collection medium	Plasma sample	Urine sample	Saliva sample
DLS (d.nm) \pm SEM	58.3 \pm 3.7	93.9 \pm 13.1	147.5 \pm 3.4	111.9 \pm 2.5
Peak intensity %	96	66	100	90
PDI \pm SEM	0.39 \pm 0.05	0.53 \pm 0.03	0.47 \pm 0.04	0.81 \pm 0.07 (*)

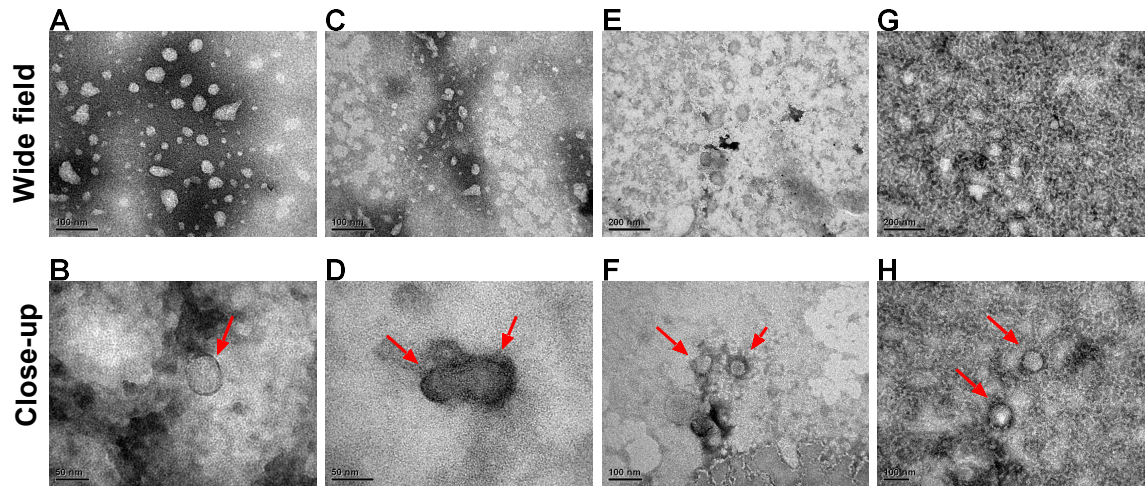
592

593

594 DLS measurement indicates that all the small EVs preparations have the
595 accepted size range of less than 150 nm. Indeed, the optimized method

596 isolated small EVs predominantly between 58 to 147.5 nm from all the
597 small EV purification samples, consistent with previously reported small
598 EV size distribution [55].

599 The polydispersity index (PDI) is a dimensionless number used to describe
600 the degree of non-uniformity of a distribution of size populations within a
601 given sample [56]. Table 4.1.1 shows that the collection medium yielded
602 small EVs of the smallest average size with a PDI of 0.39 ± 0.05 ,
603 suggesting that this sample had the most homogeneous size distribution. No
604 significant differences were present between EV collection medium,
605 plasma, or urine. On the other hand, the EVs from the saliva sample showed
606 a more significant PDI (0.81 ± 0.07 nm), indicating that the small EV
607 preparation was significantly more heterogeneous than the others ($P < 0.05$).
608 However, the small EVs isolated from the saliva sample represent nearly
609 90% of the vesicles.



610
611

612 **Figure 4.1.7:** Representative TEM images of multiple extracellular
613 vesicles.

614 Representative images for small EVs from CM (A, B), plasma (C, D), urine
615 (E, F), and saliva (G, H) in the wide and close-up field. Scale bars (E and
616 G), 200 nm; (A, C, F, H), 100 nm; (B, D), 50 nm. The shape and size of
617 small EVs extracted from the different samples were identified through
618 TEM. Small EVs are marked by red arrows.

619

620

621 After the enrichment, the size and morphology of isolated small EVs were
622 verified via TEM. Figure 4.1.7 shows representative images of EVs isolated
623 with the optimized method. The ultrastructural results confirmed the
624 characteristic sphere-shaped vesicles (“cupping”) with sizes ranging from

625 30-150 nm, with a clearly defined and intact membrane bilayer, which were
626 the same as the previously known morphology of small EVs [57-59].

627

628 **4.1.4.6 Discussion**

629 Here we demonstrate that our proposed method was able to isolate
630 preferably EVs between 30 to 150 nm (small EVs or exosomes). We
631 optimized a UF/SEC method to isolate EVs by comparing two Sephadex
632 resins, G200/120 and G200/40, as recommended by the Boing group [39].
633 These results reveal that more than 60% of the vesicles collected from
634 fractions 9 to 12 from EV culture medium have a size from 30-150 nm.
635 Besides, the isolated EVs express the tetraspanins TSG-101 and Alix and
636 the surface proteins CD63, CD81, and CD9. The G200/40 column offers a
637 better vesicle-to-protein ratio than the G200/120 column. This result is
638 significant because low protein contaminant avoids misinterpretation of
639 their effects on cells or for detecting disease-relevant small EVs in
640 clinically relevant samples [37].

641 Later fractions also deliver EVs between 30-150 nm and high protein
642 content. There is a loss of plasma-associated EVs that are left out. But also,

643 other techniques such as filtration, charge-based, and affinity-based display
644 a loss of EVs in a major or lower way [60, 61]. The literature describes that
645 even the commercially available SEC columns left out some EV-rich
646 fractions to obtain a higher particle-to-protein ratio than other techniques
647 [62-64]. In SEC, whether a fraction should be considered for inclusion into
648 the small-EV rich pool will depend on the purpose of the subsequent
649 analysis, which is a commitment to be made when it comes to the purity of
650 the isolated vesicles. For example, a proteomics analysis from Lane et al
651 [37], demonstrated a loss of nearly 66% of EVs-proteins derived from the
652 conditioned medium from MDA-MB-231 cells when they were 10% spiked
653 into pooled healthy plasma, versus the MDA-MB-231 EVs alone. This
654 confirms that matrix effect derived from the plasma content should be
655 considered.

656 Interestingly, not all fractions uniformly express the exosomes markers
657 ALIX and TSG-101 when assessed by Western blot. This result could be
658 due to the low resolution offered by the technique when low protein
659 concentrations are loaded. This observation was corroborated when we
660 analyzed other surface markers by flow cytometry. The results obtained
661 from these strategies were similar to Hsieh's group [65], confirming that the

662 heterogeneity of small EV populations represents a significant challenge
663 that must be further studied.

664 In the plasma-derived EVs purification, we confirm G200/40 column as the
665 appropriate method. As expected, a higher number of small EVs were
666 isolated from plasma. Similar to previous results, differential expressions
667 for the small EVs markers CD63 and CD9 were found in all plasma-derived
668 fractions. However, double-positive- small EVs were present in all of them.
669 These results confirm that within the same fraction, there is high
670 heterogeneity in size and vesicle components, which involve the
671 transmembrane proteins of the vesicles released by the same cell line [65].
672 Interestingly our study shows that the EV-rich fractions collected from the
673 plasma sample contained low protein contamination with HDL-cholesterol,
674 LDL-cholesterol, chylomicrons, and Albumin. This is particularly
675 important, because many studies have reported that during EV isolation,
676 some apolipoproteins and other mayor protein contaminants may be also
677 present in the EVs-isolated [39, 45, 52, 53]. This protein contaminants are
678 soluble proteins that are normally found in the biological fluid, which can
679 affect the final clinical interpretation or application [37]. The utility of this
680 method was further illustrated by the isolation of EVs lesser than 150 nm

681 directly from healthy undiluted plasma, urine, and saliva. Particle size is
682 one of the main parameters employed to target therapeutic agents passively
683 [66]. In this context, PDI values smaller than 0.05 are classified as
684 monodisperse particles, whilst values between 0.05 to 0.7 as polydisperse
685 particles. The PDI values from biological samples agree with the size
686 variation characteristic of small EVs, and yield a relatively heterogeneous
687 population of extracellular vesicles. The saliva-derived EVs showed the
688 highest PDI. This result may be due to the kind of matrix used from the
689 buccal cavity that is morphologically heterogeneous and thus so are their
690 EVs. Besides, the EV surface may have mucins radiating from the surface
691 of the vesicles with variable distance, as reported by the Gupta group [67].
692 Another explanation may be related by the limitations of the DLS
693 technique. The method is less accurate in suspensions of particles varying in
694 size (polydispersed suspensions), in addition to the fact that the vesicles
695 tend to stick together and hence appear larger than they are.

696 When SEC is compared with other protocols for isolating extracellular
697 vesicles, it is classified as fast, cheap technique, and compatible with
698 clinical laboratory procedures [31, 68, 69]. Moreover, many authors suggest
699 that the combination of different EV isolation methods is superior to single

700 EV isolation methods and that Size-exclusion chromatography also might
701 be part of a combined method to improves EV purity [69]. In our
702 experience, the vesicle isolation takes approximately 30 minutes, compared
703 to 2-96 hours for ultracentrifugation, and does not modify the classical
704 vesicle cup-shaped morphology, getting, at least a priori, an almost intact
705 membrane bilayer as was visualized by TEM images [70]. In the case of the
706 clinical samples (plasma and saliva), pre-processing and filtering steps take
707 at most 20-30 additional minutes. For more dilute or larger volume samples,
708 such as EV-collection medium and urine, the additional time required to
709 concentrate the sample will depend on the volume that needs to be
710 concentrated and the availability of more Amicon units. In our case, the
711 time to concentrate the 50 ml of urine was 1.5 hours employing 2 Amicon
712 Ultra-15 Centrifugal Filter Unit.

713

714

715

716

717

4.1.5 References

- 718 1. Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen HS, Yuan H, Sun D.
719 Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug
720 delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017;38:754. doi:
721 10.1038/aps.2017.12.
- 722 2. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and
723 function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & therapeutics*.
724 2018;188:1-11. Epub 2018/02/25. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.013.
725 PubMed PMID: 29476772.
- 726 3. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of
727 transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The*
728 *Journal of cell biology*. 1983;97(2):329-39. Epub 1983/08/01. PubMed
729 PMID: 6309857; PubMed Central PMCID: PMC2112509.
- 730 4. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle
731 formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane
732 activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological*
733 *chemistry*. 1987;262(19):9412-20. Epub 1987/07/05. PubMed PMID:
734 3597417.
- 735 5. Möller A, Lobb RJ. The evolving translational potential of small
736 extracellular vesicles in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(12):697-
737 709. doi: 10.1038/s41568-020-00299-w.
- 738 6. Record M. Intercellular communication by exosomes in placenta: A
739 possible role in cell fusion? *Placenta*. 2014;35(5):297-302. doi:
740 <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.009>.
- 741 7. Salomon C, Das S, Erdbrugger U, Kalluri R, Kiang Lim S, Olefsky
742 JM, et al. Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular
743 Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement.
744 *Endocr Rev*. 2022;43(3):441-68. doi: 10.1210/endrev/bnac009. PubMed
745 PMID: 35552682.
- 746 8. Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annual review of biochemistry*.
747 2019;88:487-514.
- 748 9. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-
749 Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to

- 750 characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes.
751 Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(8):E968-E77.
- 752 10. They C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD,
753 Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular
754 vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International
755 Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.
756 Journal of Extracellular Vesicles. 2018;7(1):1535750. doi:
757 10.1080/20013078.2018.1535750.
- 758 11. Lai RC, Tan SS, Yeo RWY, Choo ABH, Reiner AT, Su Y, et al. MSC
759 secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane
760 lipid, protein and RNA. Journal of extracellular vesicles. 2016;5(1):29828.
- 761 12. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson
762 RJ. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon
763 carcinoma cell-derived organoids. Molecular & Cellular Proteomics.
764 2013;12(3):587-98.
- 765 13. Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, et
766 al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in
767 cancer cells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.
768 2016;12(3):655-64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>.
- 769 14. El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C,
770 et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. Nature
771 protocols. 2012;7(12):2112-26. Epub 20121115. doi:
772 10.1038/nprot.2012.131. PubMed PMID: 23154783.
- 773 15. Salomon C, Scholz-Romero K, Sarker S, Sweeney E, Kobayashi M,
774 Correa P, et al. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in
775 the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in
776 Maternal Circulation Across Gestation. Diabetes. 2016;65(3):598-609.
777 Epub 2016/01/01. doi: 10.2337/db15-0966. PubMed PMID: 26718504.
- 778 16. Conlan RS, Pisano S, Oliveira MI, Ferrari M, Mendes Pinto I.
779 Exosomes as Reconfigurable Therapeutic Systems. Trends in Molecular
780 Medicine. 2017;23(7):636-50. doi:
781 <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.05.003>.
- 782 17. Lara P, Palma-Florez S, Salas-Huenuleo E, Polakovicova I, Guerrero
783 S, Lobos-Gonzalez L, et al. Gold nanoparticle based double-labeling of
784 melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by

785 cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. *Journal*
786 *of nanobiotechnology*. 2020;18(1):20. Epub 20200123. doi:
787 10.1186/s12951-020-0573-0. PubMed PMID: 31973696; PubMed Central
788 PMCID: PMC6979068.

789 18. Tian T, Zhang HX, He CP, Fan S, Zhu YL, Qi C, et al. Surface
790 functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral
791 ischemia therapy. *Biomaterials*. 2018;150:137-49. Epub 20171004. doi:
792 10.1016/j.biomaterials.2017.10.012. PubMed PMID: 29040874.

793 19. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ.
794 Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted
795 exosomes. *Nature biotechnology*. 2011;29(4):341-5. Epub 20110320. doi:
796 10.1038/nbt.1807. PubMed PMID: 21423189.

797 20. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes:
798 proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*.
799 2009;6(3):267-83. Epub 2009/06/06. doi: 10.1586/ep.09.17. PubMed
800 PMID: 19489699.

801 21. Ma C, Jiang F, Ma Y, Wang J, Li H, Zhang J. Isolation and Detection
802 Technologies of Extracellular Vesicles and Application on Cancer
803 Diagnostic. *Dose-response : a publication of International Hormesis*
804 *Society*. 2019;17(4):1559325819891004. Epub 2019/12/17. doi:
805 10.1177/1559325819891004. PubMed PMID: 31839757; PubMed Central
806 PMCID: PMC6902397.

807 22. Alharbi M, Lai A, Guanzon D, Palma C, Zuniga F, Perrin L, et al.
808 Ovarian cancer-derived exosomes promote tumour metastasis in vivo: an
809 effect modulated by the invasiveness capacity of their originating cells.
810 *Clinical science (London, England : 1979)*. 2019;133(13):1401-19. Epub
811 2019/06/23. doi: 10.1042/cs20190082. PubMed PMID: 31227603.

812 23. Merino-Gonzalez C, Zuniga FA, Escudero C, Ormazabal V, Reyes C,
813 Nova-Lamperti E, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular
814 Vesicles Promote Angiogenesis: Potential Clinical Application. *Frontiers in*
815 *physiology*. 2016;7:24. Epub 2016/02/24. doi: 10.3389/fphys.2016.00024.
816 PubMed PMID: 26903875; PubMed Central PMCID: PMC6902397.

817 24. Ludwig N, Whiteside TL, Reichert TE. Challenges in Exosome
818 Isolation and Analysis in Health and Disease. *International journal of*
819 *molecular sciences*. 2019;20(19). Epub 20190921. doi:

- 820 10.3390/ijms20194684. PubMed PMID: 31546622; PubMed Central
821 PMCID: PMC6801453.
- 822 25. Yamashita T, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Effect of
823 exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and
824 clearance of exosomes from the blood circulation. *European journal of
825 pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of
826 Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2016;98:1-
827 8. Epub 2015/11/08. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.10.017. PubMed PMID:
828 26545617.
- 829 26. Wu M, Ouyang Y, Wang Z, Zhang R, Huang P-H, Chen C, et al.
830 Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and
831 microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. doi:
832 10.1073/pnas.1709210114.
- 833 27. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, Mager I, Johansson HJ, Heusermann W, et
834 al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield
835 isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and
836 functional properties. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and
837 medicine*. 2015;11(4):879-83. Epub 2015/02/11. doi:
838 10.1016/j.nano.2015.01.003. PubMed PMID: 25659648.
- 839 28. Benedikter BJ, Bouwman FG, Vajen T, Heinzmann ACA, Grauls G,
840 Mariman EC, et al. Ultrafiltration combined with size exclusion
841 chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture
842 media for compositional and functional studies. *Scientific Reports*.
843 2017;7(1):15297. doi: 10.1038/s41598-017-15717-7.
- 844 29. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmanns AP, Leimgruber
845 A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant
846 and human plasma. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27031. Epub 2015/07/22.
847 doi: 10.3402/jev.v4.27031. PubMed PMID: 26194179; PubMed Central
848 PMCID: PMC64507751.
- 849 30. Visan KS, Lobb RJ, Ham S, Lima LG, Palma C, Edna CPZ, et al.
850 Comparative analysis of tangential flow filtration and ultracentrifugation,
851 both combined with subsequent size exclusion chromatography, for the
852 isolation of small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*.
853 2022;11(9):e12266. doi: 10.1002/jev2.12266. PubMed PMID: 36124834;
854 PubMed Central PMCID: PMC9486818.

- 855 31. Martins TS, Vaz M, Henriques AG. A review on comparative studies
856 addressing exosome isolation methods from body fluids. *Analytical and*
857 *bioanalytical chemistry*. 2022. doi: 10.1007/s00216-022-04174-5.
- 858 32. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation
859 Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789-804. doi: 10.7150/thno.18133.
860 PubMed PMID: PMC5327650.
- 861 33. Cvjetkovic A, Lotvall J, Lässer C. The influence of rotor type and
862 centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal*
863 *of extracellular vesicles*. 2014;3. doi: 10.3402/jev.v3.23111.
- 864 34. Taylor DD, Shah SJM. Methods of isolating extracellular vesicles
865 impact down-stream analyses of their cargoes. 2015;87:3-10.
- 866 35. Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M. Proteomic analysis of
867 exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Molecular*
868 *bioSystems*. 2016;12(5):1407-19. Epub 2016/04/01. doi:
869 10.1039/c6mb00082g. PubMed PMID: 27030573.
- 870 36. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation
871 of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of*
872 *immunological methods*. 2014;411:55-65. Epub 20140618. doi:
873 10.1016/j.jim.2014.06.007. PubMed PMID: 24952243; PubMed Central
874 PMCID: PMC4260336.
- 875 37. Lane RE, Korbie D, Trau M, Hill MM. Optimizing Size Exclusion
876 Chromatography for Extracellular Vesicle Enrichment and Proteomic
877 Analysis from Clinically Relevant Samples. *Proteomics*.
878 2019;19(8):e1800156. Epub 2019/01/12. doi: 10.1002/pmic.201800156.
879 PubMed PMID: 30632691.
- 880 38. Martins TS, Catita J, Rosa IM, Silva OABDE, Henriques AG.
881 Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-
882 based approaches. *Plos One*. 2018;13(6). doi: ARTN e0198820
883 10.1371/journal.pone.0198820. PubMed PMID: WOS:000434786600054.
- 884 39. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A,
885 Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-
886 exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*.
887 2014;3:10.3402/jev.v3.23430. doi: 10.3402/jev.v3.23430. PubMed PMID:
888 PMC4159761.

- 889 40. Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L,
890 Franquesa M, Beyer K, Borràs FE. Size-Exclusion Chromatography-based
891 isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared
892 to precipitating agents. *Scientific Reports*. 2016;6:33641. doi:
893 10.1038/srep33641. PubMed PMID: PMC5027519.
- 894 41. Xu L, Faruqu FN, Liam-Or R, Abu Abed O, Li D, Venner K, et al.
895 Design of experiment (DoE)-driven in vitro and in vivo uptake studies of
896 exosomes for pancreatic cancer delivery enabled by copper-free click
897 chemistry-based labelling. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1779458. Epub
898 20200619. doi: 10.1080/20013078.2020.1779458. PubMed PMID:
899 32944169; PubMed Central PMCID: PMCPMC7480572.
- 900 42. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J. Importance of exosome
901 depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing
902 extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
903 Epub 20140930. doi: 10.3402/jev.v3.24783. PubMed PMID: 25317276;
904 PubMed Central PMCID: PMCPMC4185091.
- 905 43. Abramowicz A, Marczak L, Wojakowska A, Zapotoczny S,
906 Whiteside TL, Widlak P, et al. Harmonization of exosome isolation from
907 culture supernatants for optimized proteomics analysis. *PloS one*.
908 2018;13(10):e0205496-e. doi: 10.1371/journal.pone.0205496. PubMed
909 PMID: 30379855.
- 910 44. They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and
911 characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological
912 fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3 22. Epub 2008/01/30.
913 doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30. PubMed PMID: 18228490.
- 914 45. Lehrich BM, Liang Y, Fiandaca MS. Foetal bovine serum influence
915 on in vitro extracellular vesicle analyses. *Journal of Extracellular Vesicles*.
916 2021;10(3):e12061. doi: <https://doi.org/10.1002/jev2.12061>.
- 917 46. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for
918 measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous
919 assays. *Clin Chem*. 2001;47(9):1579-96. PubMed PMID: 11514391.
- 920 47. Bier A, Hong X, Cazacu S, Goldstein H, Rand D, Xiang CL, et al.
921 miR-504 modulates the stemness and mesenchymal transition of glioma
922 stem cells and their interaction with microglia via delivery by extracellular

- 923 vesicles. *Cell Death Dis.* 2020;11(10). doi: ARTN 899 10.1038/s41419-020-
924 03088-3. PubMed PMID: WOS:000586517300009.
- 925 48. Hu C, Jiang W, Lv M, Fan S, Lu Y, Wu Q, et al. Potentiality of
926 Exosomal Proteins as Novel Cancer Biomarkers for Liquid Biopsy.
927 *Frontiers in Immunology.* 2022;13. doi: 10.3389/fimmu.2022.792046.
- 928 49. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *Journal of*
929 *extracellular vesicles.* 2013;2:10.3402/jev.v2i0.19861. doi:
930 10.3402/jev.v2i0.19861. PubMed PMID: 24009896.
- 931 50. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A,
932 et al. A comparison of methods for the isolation and separation of
933 extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum.
934 *Scientific Reports.* 2020;10(1):1039. doi: 10.1038/s41598-020-57497-7.
- 935 51. Odorizzi G. The multiple personalities of Alix. *Journal of Cell*
936 *Science.* 2006;119(15):3025-32. doi: 10.1242/jcs.03072.
- 937 52. Wu M, Chen C, Wang Z, Bachman H, Ouyang Y, Huang PH, et al.
938 Separating extracellular vesicles and lipoproteins via acoustofluidics. *Lab*
939 *on a chip.* 2019;19(7):1174-82. doi: 10.1039/c8lc01134f. PubMed PMID:
940 30806400; PubMed Central PMCID: PMC6453118.
- 941 53. Simonsen JB. What Are We Looking At? Extracellular Vesicles,
942 Lipoproteins, or Both? *Circulation Research.* 2017;121(8):920-2. doi:
943 doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311767.
- 944 54. Mathieu M, Névo N, Jouve M, Valenzuela JI, Maurin M, Verweij FJ,
945 et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by
946 live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature communications.*
947 2021;12(1):4389. doi: 10.1038/s41467-021-24384-2.
- 948 55. Tkach M, They C. Communication by Extracellular Vesicles: Where
949 We Are and Where We Need to Go. *Cell.* 2016;164(6):1226-32. doi:
950 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>.
- 951 56. Worldwide MI. Dynamic light scattering, common terms defined.
952 Inform White Paper Malvern, UK: Malvern Instruments Limited. 2011:1-6.
- 953 57. Kruger S, Elmageed ZYA, Hawke DH, Wörner PM, Jansen DA,
954 Abdel-Mageed AB, et al. Molecular characterization of exosome-like
955 vesicles from breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014;14(1):44. doi:
956 10.1186/1471-2407-14-44.

- 957 58. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes,
958 microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013;200(4):373-83.
959 doi: 10.1083/jcb.201211138. PubMed PMID: 23420871; PubMed Central
960 PMCID: PMC3575529.
- 961 59. Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New
962 Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev*.
963 2018;118(4):1917-50. Epub 20180131. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00534.
964 PubMed PMID: 29384376; PubMed Central PMCID: PMC6029891.
- 965 60. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and
966 separation techniques for extracellular vesicles. *Journal of chromatography*
967 *A*. 2021;1636:461773. Epub 20201203. doi:
968 10.1016/j.chroma.2020.461773. PubMed PMID: 33316564.
- 969 61. Meggiolaro A, Moccia V, Brun P, Pierno M, Mistura G, Zappulli V, et
970 al. Microfluidic Strategies for Extracellular Vesicle Isolation: Towards
971 Clinical Applications. *Biosensors*. 2023;13(1):50. PubMed PMID:
972 doi:10.3390/bios13010050.
- 973 62. Veerman RE, Teeuwen L, Czarnewski P, Güclüler Akpınar G,
974 Sandberg A, Cao X, et al. Molecular evaluation of five different isolation
975 methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and
976 subcellular origin. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(9):e12128. Epub
977 20210722. doi: 10.1002/jev2.12128. PubMed PMID: 34322205; PubMed
978 Central PMCID: PMC8298890.
- 979 63. Stranska R, Gysbrechts L, Wouters J, Vermeersch P, Bloch K,
980 Dierickx D, et al. Comparison of membrane affinity-based method with
981 size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from
982 human plasma. *J Transl Med*. 2018;16(1):1. Epub 20180109. doi:
983 10.1186/s12967-017-1374-6. PubMed PMID: 29316942; PubMed Central
984 PMCID: PMC5761138.
- 985 64. Takov K, Yellon DM, Davidson SM. Comparison of small
986 extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-
987 exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J Extracell*
988 *Vesicles*. 2019;8(1):1560809. Epub 20181228. doi:
989 10.1080/20013078.2018.1560809. PubMed PMID: 30651940; PubMed
990 Central PMCID: PMC6327926.

- 991 65. Wu S-C, Kuo P-J, Rau C-S, Wu Y-C, Wu C-J, Lu T-H, et al.
992 Subpopulations of exosomes purified via different exosomal markers carry
993 different microRNA contents. *International Journal of Medical Sciences*.
994 2021;18(4):1058-66. doi: 10.7150/ijms.52768.
- 995 66. Mozafari MR, Pardakhty A, Azarmi S, Jazayeri JA, Nokhodchi A,
996 Omri A. Role of nanocarrier systems in cancer nanotherapy. *Journal of*
997 *liposome research*. 2009;19(4):310-21. doi: 10.3109/08982100902913204.
998 PubMed PMID: 19863166.
- 999 67. Kesimer M, Gupta R. Physical characterization and profiling of
1000 airway epithelial derived exosomes using light scattering. *Methods*.
1001 2015;87:59-63. Epub 20150327. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.03.013.
1002 PubMed PMID: 25823850; PubMed Central PMCID: PMC4584172.
- 1003 68. Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman Md, Singh
1004 S, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture
1005 supernatant for optimum yield, purity and downstream applications.
1006 *Scientific Reports*. 2019;9(1):5335. doi: 10.1038/s41598-019-41800-2.
- 1007 69. Stam J, Bartel S, Bischoff R, Wolters JC. Isolation of extracellular
1008 vesicles with combined enrichment methods. *Journal of chromatography B,*
1009 *Analytical technologies in the biomedical and life sciences*.
1010 2021;1169:122604. Epub 20210227. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122604.
1011 PubMed PMID: 33713953.
- 1012 70. Rikkert LG, Nieuwland R, Terstappen L, Coumans FAW. Quality of
1013 extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator
1014 and protocol dependent. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1555419. Epub
1015 20190109. doi: 10.1080/20013078.2018.1555419. PubMed PMID:
1016 30651939; PubMed Central PMCID: PMC6327933.
- 1017

1018 Article

1019 **4.2 Pulsos de onda cuadrada vs pulsos de decaimiento exponencial:**

1020 **Un enfoque desde el diseño experimental para mejorar la**

1021 **incorporación de doxorubicina en pequeñas vesículas extracelulares**

1022 **mediante electroporación**

1023

1024

1025

1026 **Square Wave vs. Exponential Decay Pulses: A Design of Experiment**
1027 **Approach to Improve Doxorubicin Incorporation into Small**
1028 **Extracellular Vesicles via Electroporation**

1029 Contreras H¹, Alarcón-Zapata P^{1,2}, Acevedo M¹, Ormazabal V³, Valenzuela
1030 F¹, Tapia K¹, Toledo K¹, Aguayo C¹, Nova-Lamperti E¹, Zúñiga FA^{1*}.

1031 ¹Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica Clínica e
1032 Inmunología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

1033 ²Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad
1034 Santo Tomás, Concepción, Chile.

1035 ³Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Farmacología,
1036 Universidad de Concepcion, Concepción, Chile.

1037 *Corresponding Author: fzuniga@udec.cl

1038

1039 **Keywords: extracellular vesicle cargo, drug delivery, square wave pulse**
1040 **electroporation, exponential wave pulse electroporation, design of**
1041 **experiment (DoE), Doxorubicin, small extracellular vesicles.**

1042

1043 **4.2.1 Abstract**

1044 Small extracellular vesicles (small EVs), which include exosomes and
1045 microvesicles, are secreted by all cell types. They play an essential role in
1046 the intercellular transport of proteins, metabolites, and genetic material.
1047 Notably, their ability to evade rapid immune clearance and lower
1048 immunogenicity highlights their immense potential as next-generation drug
1049 delivery vehicles. Electroporation represents an effective strategy for
1050 incorporating drug molecules into small EVs. However, the process
1051 parameters and pulse form significantly impact the effectiveness of drug
1052 incorporation and vesicle stability. This study employed a design of
1053 experiments approach, followed by response surface methodology (RSM),
1054 to optimize the incorporation of Doxorubicin into small EVs and limit
1055 vesicle aggregation after electroporation. Initial screening identified
1056 significant parameters, including the number of small EVs (NEV), drug
1057 concentration (DOX), and electrical field strength (FE). RSM further
1058 optimized these parameters for two distinct electroporation pulse forms:
1059 exponential decay and square wave. The data suggest that the square wave
1060 pulse maximizes Doxorubicin incorporation and minimizes vesicle
1061 aggregation. These findings provide insight into the electroporation process

1062 for drug loading into small EVs, highlighting the importance of pulse form
1063 and process parameters in maximizing drug incorporation and maintaining
1064 vesicle integrity.

1065

1066 **4.2.2 Introduction**

1067 Cancer remains a significant global health issue, requiring the development
1068 of advanced and efficient treatment methods. Doxorubicin (DOX), an
1069 anthracycline antibiotic, is among the most effective cancer
1070 chemotherapeutic agents currently available [1]. However, its clinical use is
1071 limited due to severe side effects such as myelosuppression, cardiotoxicity,
1072 and nephrotoxicity [2-4]. Multiple strategies for mitigating doxorubicin-
1073 induced cardiotoxicity, including coadministration with iron chelators or
1074 natural products, have been explored but remain insufficient [5-7]. Notably,
1075 nanoparticles loaded with Doxorubicin demonstrate the potential to
1076 attenuate damage to heart tissues [8-12].

1077 Extracellular Vesicles (EVs) are classified into two main categories: small
1078 EVs, comprising exosomes and a subset of microvesicles, and large EVs,
1079 which include ectosomes or microvesicles, migrasomes, apoptotic bodies,

1080 and large oncosomes [13]. Small EVs can deliver proteins, lipids, and
1081 nucleic acids to recipient cells, inducing changes in their behavior [14].
1082 Given their ability to evade immune clearance [15], low immunogenicity
1083 [16], and absence of pathological transformation compared to other carriers
1084 [17], small EVs demonstrate significant potential as drug delivery systems
1085 (DDS). They integrate the benefits of both synthetic and cell-mediated
1086 carriers while avoiding the corresponding biotoxicity, underscoring their
1087 immense potential for clinical applications [18, 19].

1088 Small EV cargo can be loaded *ex vivo* in a process where drugs are
1089 integrated by cells cultured under sub-lethal conditions before releasing via
1090 small EVs [20, 21]. Although this strategy provides continuous production
1091 without damaging membrane integrity, it can be time-consuming and offers
1092 little control over drug quantity [22]. Alternately, post-loading methods
1093 involve isolating small EVs and loading them with the therapeutic molecule
1094 of interest, often using external forces like electroporation, sonication,
1095 freeze-thaw cycles, and extrusion [23-25]. However, these methods require
1096 careful control to avoid compromising small EVs functionality.

1097 Electroporation, which applies an electrical field to create temporary
1098 pores in cell membranes, has been utilized for loading exosomes with

1099 exogenous nucleic acids, drugs, and proteins [25-31]. This technique
1100 applies a transient electric field, leading to the formation of temporary pores
1101 [32-34]. This process minimizes disruption to sensitive components, such as
1102 ligands and receptors, since it doesn't involve chemical modifications.
1103 However, one of its main disadvantages is the possibility of fusion between
1104 small EV membranes [35-37]. The electroporation process highly depends
1105 on several factors, such as the strength of the applied electrical field, the
1106 pulse duration, and the nature of the target cell or vesicle [38].
1107 Electroporation efficiency can be optimized by adjusting the electrical
1108 pulse's characteristics, thus enhancing drug loading into small EVs [34, 39,
1109 40]. However, to date, no studies have directly compared the impacts of
1110 these distinct pulse types on the electroporation of EVs. Despite this,
1111 converting parameters between square wave and exponential decay
1112 waveforms remains theoretically possible.

1113 In this study, we employed the design of experiments (DoE) and response
1114 surface methodology (RSM) to systematically evaluate and optimize
1115 electroporation parameters for DOX incorporation into small EVs. Two
1116 pulse forms, exponential decay, and square wave were compared. Our
1117 results indicate that the square wave pulse is more efficient for DOX

1118 incorporation while preserving vesicle integrity post-electroporation. This
1119 work provides essential insights into optimizing electroporation parameters
1120 for efficient therapeutic drug loading into EVs. Such enhancements could
1121 potentially boost their therapeutic efficacy and mitigate side effects, thus
1122 improving strategies for cancer treatment.

1123 **4.2.3 Materials and Methods**

1124 **4.2.3.1 Small extracellular vesicle (small EVs) isolation**

1125 Based on previous research in our laboratory [41], Small EVs were isolated
1126 using Size Exclusion Chromatography/Ultrafiltration (SEC/UF). Briefly, 6
1127 mL of venous blood samples were collected from a healthy volunteer donor
1128 at the University of Concepción, Chile, via venipuncture into EDTA/K3
1129 tubes following the Declaration of Helsinki. The samples were centrifuged
1130 at $2000 \times g$ for 10 min at room temperature using an Eppendorf centrifuge
1131 5403 (Rotor 16F24-11) to separate the supernatant from the cellular
1132 components. The plasma was further centrifuged at i) $2000 \times g$ for 30 min
1133 at 4°C and ii) $12000 \times g$ for 45 min at 4°C followed by passing through a
1134 $0.22\text{-}\mu\text{m}$ CA syringe filter to remove cell debris and large extracellular
1135 vesicles. This preparation was used for the isolation of small EVs by SEC.

1136 To perform SEC, 500 μ L of the sample was loaded onto a Sephadex
1137 G200/40 column and eluted with a filtered and degassed 0.9% NaCl
1138 solution. The eluate was collected using gravity. The initial 1.6 mL of the
1139 eluate was discarded, and the subsequent 0.8 mL was collected to represent
1140 the small EV-rich portion.

1141 **4.2.3.2 Electroporation loading of Doxorubicin**

1142 Small EVs were diluted in 0.9% NaCl to a volume of 200 μ L. Doxorubicin
1143 (Sigma-Aldrich) was added, followed by an equal volume of cold 2x
1144 electroporation buffer (600 mM sucrose in 0.9% NaCl). All electroporation
1145 procedures were carried out in precooled 4°C, 4 mm gap cuvettes (Bio-Rad
1146 N°165-2088) in a Gene Pulser II Electroporator (Bio-Rad) at the desired
1147 voltage. Samples were subjected to either exponential decay or square wave
1148 pulses to assess their effects on drug incorporation and small EV
1149 aggregation. Exponential wave electroporation was performed at 125 μ F
1150 [26, 42]. Square wave pulse electroporation parameters were set at 6 pulses
1151 of 100 μ s pulse length and with a pulse interval of 0.1 sec. The small EVs
1152 were then allowed to recover for 20 min at 37 °C. Unincorporated
1153 Doxorubicin was removed by passing the electroporated sample through a

1154 10-KDa Amicon filter to eliminate free DOX [28, 42, 43]. Then, the loaded
1155 vesicles in the same Amicon unit were washed twice with 800 μ l of 0.9%
1156 NaCl solution and spun at 4000 x g for 15 min each at 4°C using an
1157 Eppendorf centrifuge 5403; Rotor 16A4-44. Drug incorporation was
1158 measured using the intrinsic fluorescence of Doxorubicin on a Qubit 2.0
1159 Fluorimeter (Invitrogen), with the following settings: Blue 470 nm SP,
1160 em:510–580 nm. Concentrations were determined in relation to an external
1161 standard curve.

1162 **4.2.3.3 EV size distribution**

1163 The particle diameter was measured using Dynamic Light
1164 Scattering (DLS) with a Malvern Zetasizer Nano-ZS90 to assess nominal
1165 size values. Each suspension was diluted 10-fold in ultrapure water, and
1166 measurements were performed in triplicate at a temperature of 25°C.

1167 **4.2.3.4 Design of Experiments (DoE) for data analysis**

1168 **4.2.3.4.1 Screening design**

1169 Design of Experiment (DoE) studies were conducted to evaluate the
1170 synergistic outcome of the combination and interaction studies. The DoE
1171 model was prepared and evaluated using MODDE® Pro 13.0.2 (Umetrics

1172 AB, Umea, Sweden). Data fitting and the calculation of statistical
1173 parameters (R^2 , Q^2 , and reproducibility) were performed. Screening models
1174 were fitted with Multiple Linear Regression (MLR), and optimization
1175 models were created using Partial Least Squares (PLS). All models were
1176 refined by removing non-significant terms. To identify the input parameters
1177 that led to the highest Doxorubicin incorporation (DOXin), screening
1178 experiments were conducted using a Full Factorial Design (FFD). The
1179 evaluated variables were: 1) the number of small EVs in the sample (NEV),
1180 2) the initial Doxorubicin concentration (DOX), and 3) the applied
1181 electrical field strength (FE). The design consisted of three variables at two
1182 levels, resulting in a total of 11 experiments. These included three central
1183 points, which were carried out randomly. The central points were
1184 determined in triplicate for variance calculation.

1185 **4.2.3.4.2 Optimization of the model:**

1186 Next, the significant parameters were optimized by a Response Surface
1187 Methodology (RSM) through a Central Composite Face Centered (CCF)
1188 design. The design incorporated star points placed on the faces of the sides,
1189 along with three central points.

1190

1191

1192

1193 **4.2.4 Results and Discussion**

1194 For the initial screening study, a two-level (2k) full factorial design (FFD)
1195 encompassing three variables was implemented. The design generated
1196 eleven random experimental runs for the screening process to identify the
1197 variables that could significantly influence drug incorporation into small
1198 EVs (as shown in Table 4.2.1). The variables assessed were as follows: 1)
1199 the number of small EV in the sample (NEV, X_1), 2) the Doxorubicin
1200 concentration in the solution (DOX, X_2), and 3) the electrical field strength
1201 applied (FE, X_3). Each variable was evaluated at two levels, denoted as (-)
1202 and (+), to represent the low and high levels, respectively. A central level
1203 (0) was included in the design for each variable in triplicate to detect
1204 nonlinear relationships in the middle of the interval of the studied levels,
1205 calculate the variance of the model, and determine the confidence intervals.

1206 Moreover, this type of experimental design not only facilitates the
1207 determination of the influence and impact of these variables on the

1208 measured response but also provides a robust framework to identify any
 1209 significant interactions between the investigated variables.

1210

1211

1212 **Table 4.2.1:** Experimental design matrix for screening and results.

	X_1	X_2	X_3	<i>Exponential wave pulse</i>	<i>Square wave pulse</i>
<i>Exp. N°</i>	<i>NEV</i>	<i>DOX</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>FE</i> (<i>V</i>)	<i>DOXin</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>DOXin</i> ($\mu\text{g/mL}$)
1	3.0×10^{10} (-1)	4 (-1)	250 (-1)	2.74×10^{-03}	1.86×10^{-02}
2	1.5×10^{11} (+1)	4 (-1)	250 (-1)	2.15×10^{-02}	7.57×10^{-03}
3	3.0×10^{10} (-1)	40 (+1)	250 (-1)	1.07×10^{-00}	$5.12 \times 10^{+00}$
4	1.5×10^{11} (+1)	40 (+1)	250 (-1)	1.54×10^{-00}	$5.02 \times 10^{+00}$
5	3.0×10^{10} (-1)	4 (-1)	400 (+1)	3.54×10^{-03}	7.42×10^{-03}
6	1.5×10^{11} (+1)	4 (-1)	400 (+1)	1.60×10^{-02}	9.56×10^{-02}
7	3.0×10^{10} (-1)	40 (+1)	400 (+1)	5.42×10^{-02}	$1.56 \times 10^{+00}$
8	1.5×10^{11} (+1)	40 (+1)	400 (+1)	4.68×10^{-02}	$6.22 \times 10^{+00}$
9	9.0×10^{10} (0)	22 (0)	325 (0)	1.79×10^{-02}	5.90×10^{-01}
10	9.0×10^{10} (0)	22 (0)	325 (0)	9.80×10^{-02}	3.23×10^{-01}
11	9.0×10^{10} (0)	22 (0)	325 (0)	9.34×10^{-02}	$1.11 \times 10^{+00}$ (a)

1213 (a) Excluded data. The matrix design's coded values are denoted in
 1214 parentheses: (-1) represents the minor corner point level, (0) stands for the
 1215 central level, and (+1) signifies the major corner point level. Factors
 1216 definition: X_1 , NEV: number of small EVs initially present in the sample, X_2 ,
 1217 DOX: Doxorubicin concentration in the solution, X_3 , FE: electrical field
 1218 strength applied. Responses definition: DOXin: Doxorubicin incorporation
 1219 after exponential or square wave pulse applied.

1220

1221

1222

1223 The response dataset, expressed as the concentration of Doxorubicin
1224 incorporated (DOXin), underwent a logarithmic signal to enhance the
1225 model quality and to provide a close-to-normal distribution. The size
1226 response of the small EV was not transformed. The models were adjusted to
1227 get better-fit values, and a difference between R^2 and Q^2 was no more
1228 significant than 0.3 for the predictive power.

1229 **4.2.4.1 Exponential decay pulse**

1230 **4.2.4.1.1 Screening analysis for Doxorubicin incorporation**

1231 The evaluation of the experimental design, in which the small EVs were
1232 exposed to an exponential decay pulse, verified that the model fits the
1233 experimental response. Figure 4.2.1A illustrates the correlation between the
1234 experimental and model-predicted values, which had an R^2 value of 0.774,
1235 indicating a good fit and predictive power ($Q^2 = 0.560$). The statistical
1236 validation of the model was performed using ANOVA and a lack-of-fit test.
1237 The significance of the regression model has a p-value < 0.001 and a lack-

1238 of-fit value of $p = 0.428$ ($p > 0.05$), demonstrating an optimal data fit by the
1239 model.

1240 The analysis indicated that the initial concentration of Doxorubicin (DOX,
1241 X_2) and the applied electrical field strength (FE, X_3) were significant factors
1242 ($p=0.001$ and 0.03 , respectively) in the system response, and the interaction
1243 NEV*DOX ($p=0.04$). In contrast, the interactions NEV*FE and DOX*FE
1244 were found to be statistically non-significant ($p=0.41$ and 0.07 ,
1245 respectively) and hence were omitted from the model. Notably, while the
1246 isolated impact of NEV on the predictive model is not significant (NEV:
1247 $p=0.08 >0.05$), it remains integral to the model due to its interaction with
1248 the DOX concentration, which significantly influences the response.

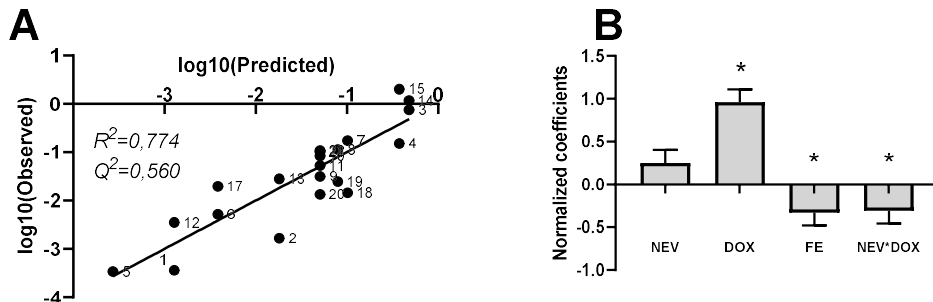
1249

1250

1251

1252

1253



1254

1255 **Figure 4.2.1:** Evaluation of the experimental design model using an
 1256 exponential decay pulse for screening analysis.

1257 Effects of the three variables on the incorporation of Doxorubicin (DOXin).
 1258 A) Assessing the prediction power of the model in a plot of predicted versus
 1259 observed values. B) Normalized regression coefficients for incorporated
 1260 Doxorubicin (DOXin) response concentration, calculated using MLR. The
 1261 bars represent a 95% confidence level. NEV: Number of small extracellular
 1262 vesicles, DOX: Doxorubicin concentration in the solution, and FE:
 1263 electrical field applied, NEV*DOX: NEV and DOX interaction. (*) p-value
 1264 < 0.05

1265

1266

1267

1268 Following the validation of the model, the normalized coefficients derived
 1269 from the model's regression analysis were used to estimate the significance
 1270 of each factor. According to the normalized coefficient plot (Figure 4.2.1B),
 1271 the initial concentration of Doxorubicin in the solution (DOX, X_2) was the
 1272 most critical factor, making a highly significant and positive contribution

1273 ($X_2 = 0.953$) to the model response ($p < 0.05$). This suggests that with high
 1274 concentrations of DOX in the medium, an increase in drug incorporation
 1275 into the small EV occurs when exponential decay pulse electroporation is
 1276 applied. The electrical field and the interaction NEV*DOX display a
 1277 negative yet lower final effect. Even though the number of small EVs
 1278 initially present in the sample (NEV) by itself has a low influence on the
 1279 model, it cannot be excluded because it showed a significant interaction
 1280 with the drug concentration (X_{12}).

1281

1282

1283 **Table 4.2.2:** Normalized regression coefficients obtained by MLR analysis
 1284 for exponential decay electroporation.

<i>Term of the polynomial</i>			<i>b</i>	\pm	<i>Std. Err.</i>	<i>p-value</i>
X_0	Constant	k	-1.649	\pm	0.119	0.000*
X_1	Number of small EV	NEV	0.256	\pm	0.139	0.083
X_2	Doxorubicin concentration	DOX	0.953	\pm	0.137	0.030*
X_3	Electric field applied	FE	-0.330	\pm	0.139	0.030*
X_{12}	Number of small EV x Doxorubicin concentration	NEV*DOX	-0.308	\pm	0.139	0.041*

1285 *Normalized regression coefficient \pm standard error, (*) p-value < 0.05*

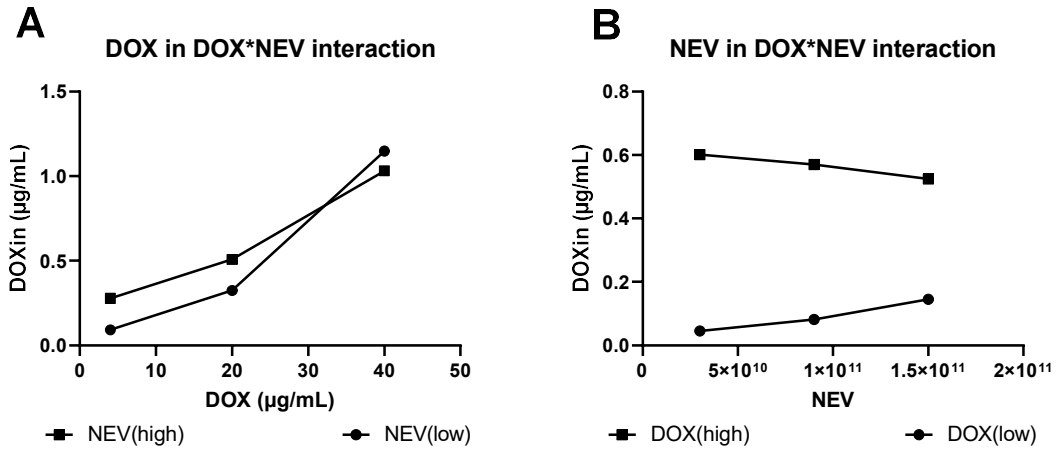
1286

1287 The interaction plots show more clearly the interaction effects between
1288 small EV number and drug concentration in the sample on drug
1289 incorporation. Figure 4.2.2A shows that the number of vesicles exerts
1290 minimal influence on the final response when the small EVs are exposed to
1291 high drug concentrations. Conversely, Figure 4.2.2B demonstrates that at
1292 high DOX concentrations, a lower vesicle count is requisite to achieve
1293 higher levels of drug incorporation.

1294 In summary, during exponential decay electroporation, the factors most
1295 significantly impacting the drug's incorporation into small EVs are the
1296 initial DOX concentration in the medium and the electrical field strength
1297 applied. There is an inverse relationship between the DOX concentration
1298 and the number of EVs present in the medium, with the DOX concentration
1299 being the most influential factor that affects drug incorporation. The
1300 response contour plot (Figure 4.2.3A) shows the conditions under which
1301 maximum drug incorporation can be achieved, specifically at lower
1302 electrical field strengths and higher drug concentrations in the medium (as
1303 indicated by the red zone). The curvature in the response surface plot
1304 (Figure 4.2.3B) illustrates the interactive effect between these two factors.

1305

1306



1307
1308

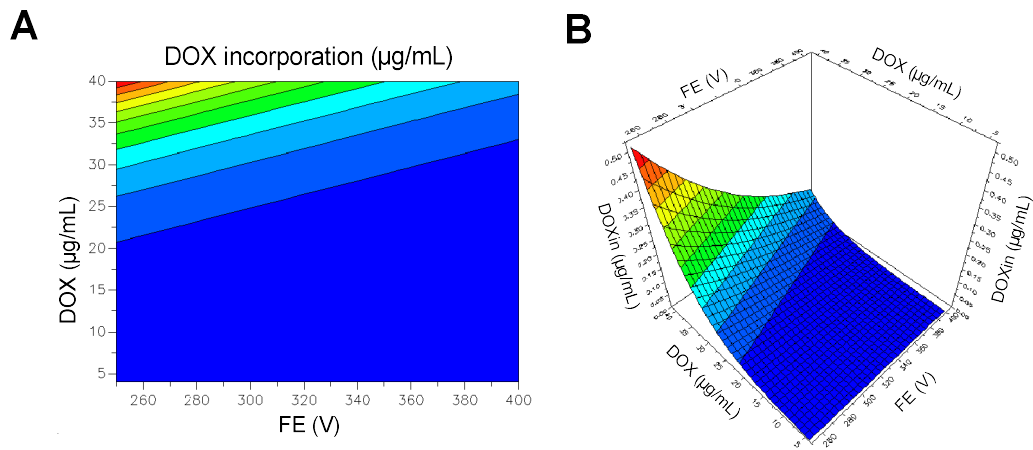
1309 **Figure 4.2.2:** Interactions plots between variables for Doxorubicin
1310 incorporation after the exponential decay electroporation.

1311 A) Contribution of the number of extracellular vesicles (NEV) on the
1312 incorporation of Doxorubicin (DOXin) into vesicles, B) contribution of the
1313 initial Doxorubicin concentration (DOX) on the incorporation of
1314 Doxorubicin (DOXin) into vesicles.

1315

1316

1317



1318

1319 **Figure 4.2.3:** Two-Dimensional Response Contour Plot and Three-
 1320 Dimensional Response Surface Plot for Doxorubicin incorporation after
 1321 exponential decay electroporation.

1322 A) Contour plot relating the effect of the electrical field strength applied
 1323 (FE) and the initial Doxorubicin concentration (DOX) on Doxorubicin
 1324 incorporation response (DOXin). B) "twisted" shape Response Surface Plot
 1325 indicates an interaction between the variables. The red and darkest blue
 1326 colors represent the highest and lowest responses.

1327

1328

1329

1330 **4.2.4.1.2 Response surface methodology analysis for** 1331 **Doxorubicin incorporation**

1332 To understand the influence of the factors on the response, and based on the
 1333 findings from the screening analysis, the significant variables were further
 1334 scrutinized during the optimization process using a Central Composite
 1335 Face-centered (CCF) design. The design included star points positioned on

1336 the faces of the cube to optimize the most critical parameters. The screening
1337 analysis revealed that high DOX concentrations and low electrical field
1338 strengths enhance the incorporation of Doxorubicin into the small EV. It
1339 indicated that a high concentration of DOX correlate to a lower number of
1340 vesicles. Given these observations, new parameters were introduced, as
1341 detailed in Table 4.2.3.

1342 The validity of the PLS model for Doxorubicin incorporation (DOXin)
1343 following the application of exponential decay electroporation is
1344 demonstrated by an R^2 value of 0.809, indicating a strong fit for the
1345 response and a predictive power value (Q^2) of 0.688. An Analysis of
1346 Variance (ANOVA) shows the significance of the regression model with a
1347 p-value <0.001 and a lack-of-fit value of $p = 0.453$ ($p > 0.05$), illustrating
1348 an optimal fit for the data.

1349

1350

1351

1352

1353

1354 **Table 4.2.3:** Experimental data of the Central Composite Face Centered
 1355 (CCF) design for DOXin optimization after exponential decay
 1356 electroporation.

Exp No	X_1	X_2	X_3	<i>Exponential decay</i>	
	<i>DOX</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>NEV</i>	<i>CE</i> (V)	<i>DOXin</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>% vesicles</i> ($<200\text{ nm}$)
1	40 (-1)	$7,00 \times 10^{+09}$ (-1)	150 (-1)	$1,98 \times 10^{-02}$	100
2	100 (+1)	$7,00 \times 10^{+09}$ (-1)	150 (-1)	$6,28 \times 10^{-01}$	30
3	40 (-1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	150 (-1)	$3,00 \times 10^{-01}$	22
4	100 (+1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	150 (-1)	$1,15 \times 10^{+00}$	23
5	40 (-1)	$7,00 \times 10^{+09}$ (-1)	200 (+1)	$3,69 \times 10^{-03}$	100
6	100 (+1)	$7,00 \times 10^{+09}$ (-1)	200 (+1)	$3,90 \times 10^{-02}$	100
7	40 (-1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	200 (+1)	$2,79 \times 10^{-01}$	19
8	100 (+1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	200 (+1)	$5,54 \times 10^{-01}$	17
9	40 (-1)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	175 (0)	$5,80 \times 10^{-03(a)}$	6
10	100 (0)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	175 (0)	$1,92 \times 10^{+00}$	0 ^(a)
11	70 (0)	$7,00 \times 10^{+09}$ (-1)	175 (0)	$6,57 \times 10^{-02}$	100
12	70 (0)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	175 (0)	$2,32 \times 10^{+00}$	21
13	70 (0)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	150 (-1)	$1,26 \times 10^{-01}$	17
14	70 (0)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	200 (+1)	$3,63 \times 10^{-01}$	100
15	70 (0)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	175 (0)	$3,74 \times 10^{-01}$	10
16	70 (0)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	175 (0)	$7,15 \times 10^{-01}$	20
17	70 (0)	$7,85 \times 10^{+10}$ (0)	175 (0)	$1,67 \times 10^{-01}$	15

1357 (a)Excluded data. (-) Non reported data. (-1) = minor corner point level,
 1358 (0) = star points, (+1) = major corner point level. Factors definition: X_1 ,
 1359 *NEV*: number of small EVs initially present in the sample, X_2 , *DOX*:
 1360 Doxorubicin concentration in the solution, X_3 , *FE*: electrical field strength
 1361 applied. Responses definition: *DOXin*: Doxorubicin incorporation after a
 1362 pulse is applied, *%vesicles*: percentage of electroporated vesicles with sizes
 1363 less than 200 nm.

1364

1365 **Table 4.2.4:** Normalized regression coefficients for Doxorubicin
 1366 incorporation after exponential decay electroporation obtained by RSM
 1367 analysis by CCF model.

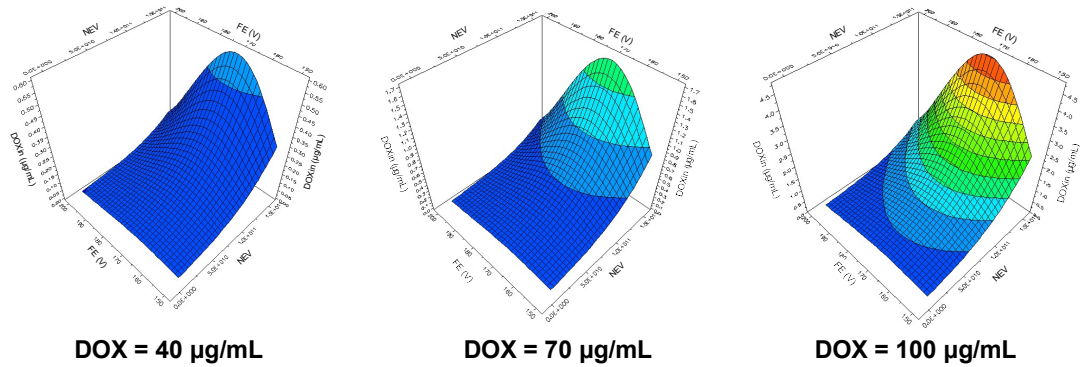
<i>Term of the polynomial</i>			<i>b</i>	\pm	<i>Std. Err.</i>	<i>p-value</i>
X_0	Constant	k	-0.421	\pm	0.209	0.069
X_1	Doxorubicin concentration	DOX	0.488	\pm	0.132	0.006*
X_2	Number of EV	NEV	0.637	\pm	0.132	0.000*
X_3	Electrical field strength applied	FE	-0.217	\pm	0.132	0.128
X_{33}	Electrical field strength applied x Electrical field strength applied	FE*FE	-0.465	\pm	0.176	0.023*

1368 *Normalized regression coefficient \pm standard error, (*) p-value < 0.05*

1369

1370 As observed during the screening analysis, the interaction between DOX
 1371 and NEV significantly affects the DOXin response. Table 4.2.4 showed that,
 1372 by PLS analysis, both factors could substantially modify the drug's
 1373 incorporation into the small EVs, thereby qualifying as essential model
 1374 components.

1375 The applied electric field strength (FE, X_3) itself has a negative impact on
 1376 DOXin. Although the model shows a significant quadratic term for FE
 1377 (X_{33}), it merely signifies the presence of a curvature that provides
 1378 information about the maximal response. However, its overall effect does
 1379 not alter the reaction regarding drug incorporation into small EVs (Figure
 1380 4.2.4).



1381
1382

1383 **Figure 4.2.4:** Interaction plot between variables FE and NEV at different
1384 initial Doxorubicin concentrations after exponential decay electroporation.

1385 The optimal electrical field strength applied (FE) condition is observed
1386 between 170 – 180 V under all three conditions. Both higher and lower FE
1387 values have a negative impact on the DOXin. NEV: number of small EV
1388 initially present in the sample, FE: electrical field strength applied, DOX:
1389 initial Doxorubicin concentration in the solution. Response definition:
1390 DOXin: Doxorubicin incorporation after pulse applied.

1391

1392

1393 **4.2.4.1.3 Analysis of Response surface methodology for small**
1394 **EV aggregation**

1395 It has been demonstrated that electroporation can negatively impact the
1396 structural integrity of exosomes [23, 30, 31, 44]. Furthermore, applying
1397 high-voltage pulses can result in the aggregation of small EVs [30, 45, 46].
1398 To assess whether the electrical field strength (FE) might influence drug
1399 incorporation by altering the hydrodynamic particle size in dispersion and
1400 hence evaluating the degree of small EV aggregation, we opted to examine

1401 the vesicle size distribution in the electroporated samples using Dynamic
1402 Light Scattering (DLS).

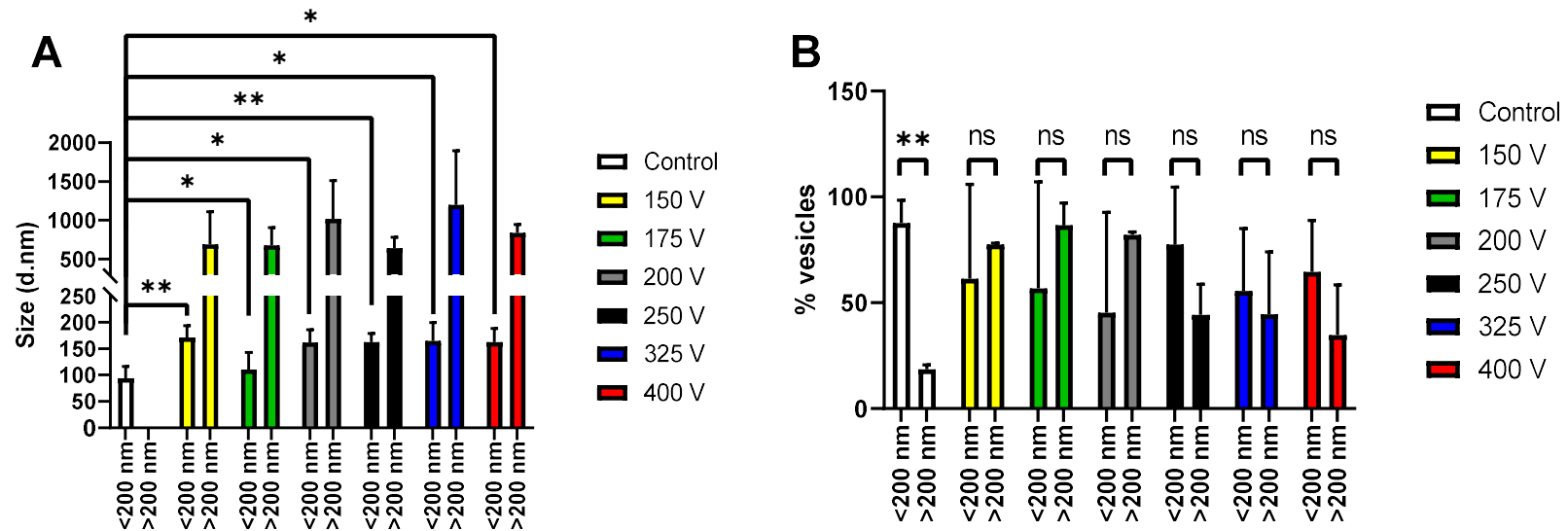
1403 The previous PLS model parameters for the aggregation response were $R^2 =$
1404 0.659 and $Q^2 = 0.455$. According to the ANOVA, the significance of the
1405 regression model has a p-value of 0.020 . However, for this particular
1406 response, the model exhibits a statistically significant lack of fit ($p=0.03$).
1407 These values suggest that while the model is well-suited to evaluate
1408 Doxorubicin incorporation following exponential decay electroporation, it
1409 cannot accurately predict the aggregation response.

1410 Figure 4.2.5A shows that after applying the exponential decay
1411 electroporation pulse, larger EVs appear in addition to smaller than 200 nm
1412 vesicles, which were absent in the control sample. Differences in the
1413 average size were observed between the vesicles smaller than 200 nm in the
1414 unelectroporated control sample and all the electroporated samples
1415 ($p<0.05$). This shows a significant increase in vesicle size post-
1416 electroporation, which aligns with previous findings [42, 47].
1417 Electroporation shifts the distribution of the small EV population relative to
1418 the control sample, suggesting a significant aggregation of larger vesicles
1419 (Figure 4.2.5B). Furthermore, it seems that when vesicles are exposed to

1420 higher electric fields, the degree of aggregation also increases. However, no
1421 significant differences were observed in the aggregation levels during
1422 exponential decay electroporation with the applied electrical field strength.
1423 This suggests that the degree of aggregation is more dependent on the form
1424 of the applied electrical field rather than the intensity of the electrical field
1425 itself.

1426

1427



1428
1429

1430 **Figure 4.2.5:** Small EV size and distribution following exponential decay pulse electroporation.

1431 A) Size distribution of the vesicles post-electroporation, as measured by DLS. B) Percentage of vesicles
 1432 smaller (<) and larger (>) than 200 nanometers. (*) p-value <0.05; (**) p-value <0.01; (ns), non-statistically
 1433 significant differences.

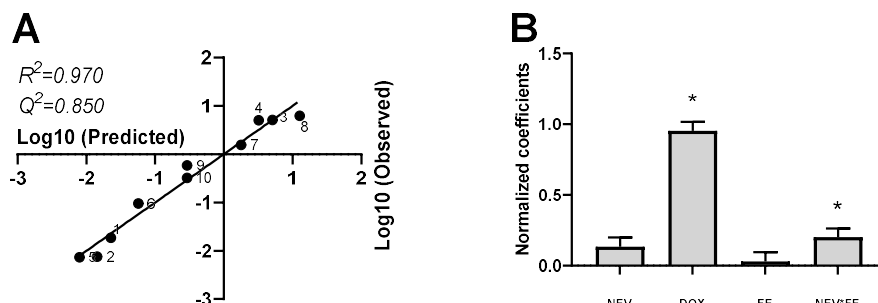
1434

1435

1436 **4.2.4.2 Square wave pulse**

1437 **4.2.4.2.1 Screening analysis for Doxorubicin incorporation**

1438 Next, we decide to evaluate the effect of square wave pulse electroporation
1439 on Doxorubicin incorporation under similar screening conditions (Table
1440 4.2.1). After the removal of outliers and the statistically insignificant
1441 interactions DOX*NEV ($p = 0.876$) and DOX*CE ($p=0.158$), the
1442 evaluation of the experimental design model obtained shows that the model
1443 fits well with the experimental response (Figure 4.2.6A). The correlation
1444 between the observed and the predicted values, as derived from the model,
1445 has an R^2 of 0.970, indicating a good fit and predictive power ($Q^2 = 0.850$).
1446 The significance of the regression model, with a p-value < 0.001 and a lack
1447 of fit value of $p = 0,444$ ($p > 0.05$), demonstrates an optimal fit of the data
1448 as assessed by ANOVA. Although the FE does not have a significant role in
1449 the model ($p=0.731$), the interactions NEV*FE are significant ($p=0.040$);
1450 hence it was not removed from the model.



1451

1452 **Figure 4.2.6:** Coefficient plot response applying square wave pulse for
 1453 screening analysis.

1454 The effects of the three factors on the Doxorubicin signal detected in the
 1455 mixture are depicted. A) The predictive power of the model is assessed in a
 1456 plot of predicted versus observed values. B) Normalized regression
 1457 coefficients for the Doxorubicin incorporated response (DOXin) are
 1458 calculated by MLR. The bars denote a 95% confidence level. NEV: Number
 1459 of small extracellular vesicles, DOX: Doxorubicin concentration in the
 1460 solution, FE: Applied electrical field strength, NEV*FE: interaction
 1461 between NEV and FE. (*) p-value < 0.05

1462

1463

1464

1465 The normalized coefficients obtained from the regression analysis of the
 1466 model were used to estimate the significance of the factors (Table 4.2.5).

1467 According to the coefficient plot (Figure 4.2.6B), the Doxorubicin
 1468 concentration in the solution (DOX, X_2) was the most important factor that
 1469 significantly and positively ($X_2 = 1.001$) contributed to the model response

1470 ($p < 0.05$). This suggests that when high DOX concentrations are present in
 1471 the medium, increased drug incorporation into the small EVs is observed
 1472 when a square wave pulse type is applied. In this model, neither the number
 1473 of small EVs (NEV, X_1) nor the applied electrical field strength (FE, X_3)
 1474 individually affect drug incorporation into the small EV, but they
 1475 significantly do.

1476

1477

1478

1479 **Table 4.2.5:** Normalized regression coefficients (b) by MLR analysis for
 1480 square wave pulse electroporation.

<i>Term of the polynomial</i>			<i>b</i>	\pm <i>Std. Err.</i>	<i>p-value</i>
X_0	Constant	k	-0,457	\pm 0.074	0.001*
X_1	Number of small EV	NEV	0.141	\pm 0.082	0.148
X_2	Doxorubicin concentration	DOX	1,001	\pm 0.082	0,000*
X_3	Electrical field strength applied	FE	0.030	\pm 0.082	0.731
X_{13}	Number of small EV x Electrical field strength applied	NEV* FE	0.227	\pm 0.082	0.040*

1481 *Normalized regression coefficient \pm standard error, (*) p-value < 0.05*

1482

1483

1484

1485 From the interactions plots, it can be observed that when small EVs are
1486 exposed to high electrical field strength (FE), the number of small EVs
1487 (NEV) present in the sample becomes significant, unlike when they are
1488 exposed to low FE using square wave electroporation (Figure 4.2.7A). To
1489 enhance the incorporation of Doxorubicin (DOXin) into the vesicles, a high
1490 number of small EVs should be present in the electroporation medium
1491 (Figure 4.2.7B).

1492 Based on this data obtained from the screening analysis after applying a
1493 square wave electroporation pulse, the initial concentration of DOX present
1494 in the electroporation medium is the most significant factor enhancing
1495 Doxorubicin's incorporation. However, the interaction plots suggest that the
1496 FE, the NEV, or a combination of both are crucial in determining the final
1497 response.

1498

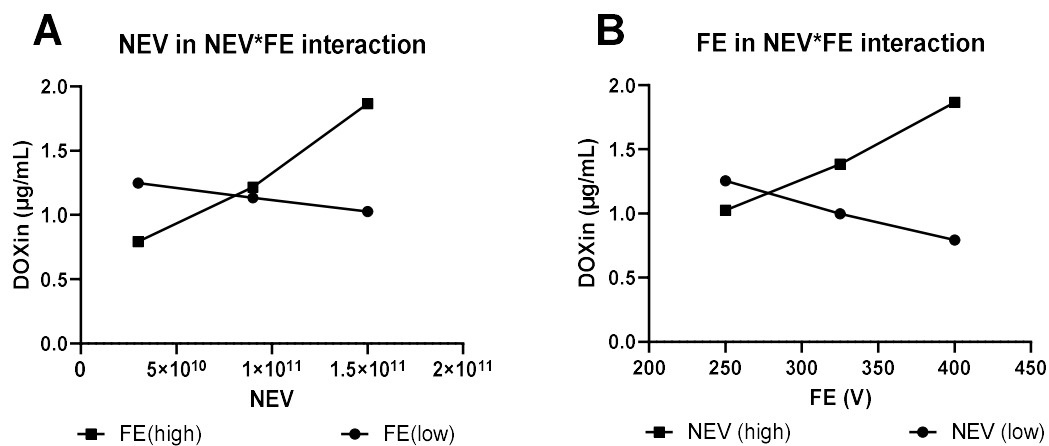
1499

1500

1501

1502

1503



1504
1505

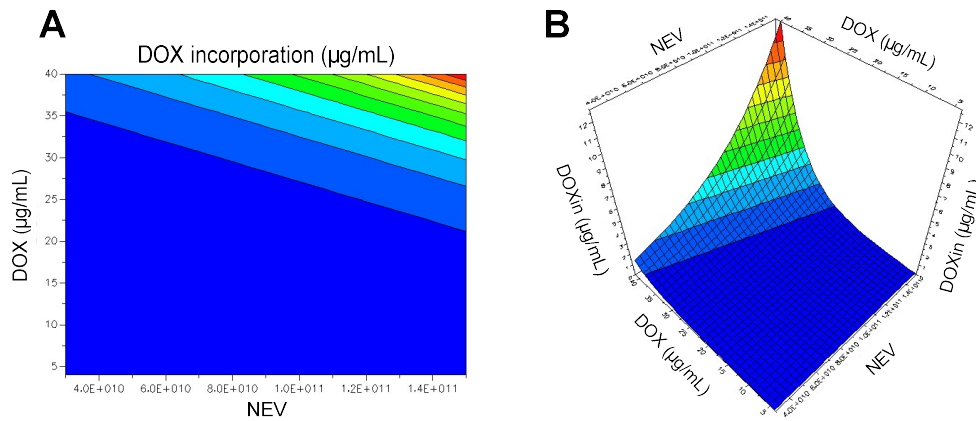
1506 **Figure 4.2.7:** Interaction graph between variables NEV and FE for the
1507 Doxorubicin incorporation after the square wave pulse electroporation.

1508 *A) Contribution of the Electrical field strength applied (FE) on the*
1509 *incorporation of Doxorubicin (DOXin) into vesicles, B) contribution of the*
1510 *number of extracellular vesicles (NEV) on the incorporation of Doxorubicin*
1511 *(DOXin) into vesicles.*

1512

1513

1514



1515

1516 **Figure 4.2.8:** Two-Dimensional Response Contour Plot and Three-
 1517 Dimensional Response Surface Plot for Doxorubicin Incorporation After
 1518 Square Wave Pulse Electroporation.

1519 A) Contour plot relating the effect of the number of extracellular vesicles
 1520 (NEV) and the initial Doxorubicin concentration (DOX) and their effect on
 1521 the Doxorubicin incorporation response (DOXin). B) "twisted" shape of the
 1522 Response Surface Plot indicates an interaction between the variables. The
 1523 red and darkest blue colors signify the highest and lowest responses.

1524

1525

1526

1527 **4.2.4.2.2 Response surface methodology analysis for**
 1528 **Doxorubicin incorporation and small EV aggregation.**

1529 The significant variables identified through the screening analysis were
 1530 further examined using a Central Composite Face-centered (CCF) design.

1531 This was conducted to optimize drug incorporation after applying square

1532 wave pulse electroporation. DOX concentrations were studied at high

1533 levels. Since NEV should be considered the limiting reactant under non-
1534 ideal conditions, only FE was adjusted to evaluate the interaction between
1535 NEV and FE. The RSM parameters evaluated are presented in Table 4.2.6.

1536 The Partial Least Squares (PLS) model developed for Doxorubicin
1537 incorporation (DOXin) after applying square pulse decay electroporation
1538 displays strong validity, as indicated by an R^2 value of 0.930. This suggests
1539 a good fit of the model to the response data. The model also exhibits a
1540 strong predictive power, as shown by a Q^2 value of 0.697. An ANOVA
1541 revealed the model's statistical significance, indicated by a p-value of less
1542 than 0.001 and a lack-of-fit value of p-value of 0.184 ($p > 0.05$), thus
1543 supporting the model's optimal fit to the data. For the aggregation response
1544 (% vesicle), the PLS model parameters were an R^2 value of 0.931 and a Q^2
1545 value of 0.688, further indicating the model's good fit and predictive
1546 capacity. ANOVA demonstrated the model's significance, with a p-value
1547 less than 0.001.

1548

1549

1550

1551

1552 **Table 4.2.6:** Experimental data of the Central Composite Face Centered
 1553 (CCF) design for DOXin optimization after Square pulse electroporation.

Exp No	X_1	X_2	X_3	Square pulse decay	
	DOX ($\mu\text{g/mL}$)	NEV	CE (V)	DOXin ($\mu\text{g/mL}$)	% vesicles <200 nm
1	40 (-1)	$3,00 \times 10^{+10}$ (-1)	350 (-1)	$2,02 \times 10^{+00}$	75
2	100 (+1)	$3,00 \times 10^{+10}$ (-1)	350 (-1)	$1,44 \times 10^{+01}$	100
3	40 (-1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	350 (-1)	$3,59 \times 10^{+00}$	86
4	100 (+1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	350 (-1)	$1,79 \times 10^{+01}$	87
5	40 (-1)	$3,00 \times 10^{+10}$ (-1)	500 (+1)	$4,08 \times 10^{+00}$	81
6	100 (+1)	$3,00 \times 10^{+10}$ (-1)	500 (+1)	$1,98 \times 10^{+01}$	95
7	40 (-1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	500 (+1)	$1,93 \times 10^{+00}$	95
8	100 (+1)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	500 (+1)	$2,57 \times 10^{+01(a)}$	98
9	40 (-1)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	425 (0)	$3,49 \times 10^{+00}$	85
10	100 (+1)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	425 (0)	$1,62 \times 10^{+01}$	100
11	70 (0)	$3,00 \times 10^{+10}$ (-1)	425 (0)	$6,33 \times 10^{+00}$	100
12	70 (0)	$1,50 \times 10^{+11}$ (+1)	425 (0)	$2,76 \times 10^{+01(a)}$	94
13	70 (0)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	350 (-1)	$1,22 \times 10^{+01}$	100
14	70 (0)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	500 (+1)	$1,27 \times 10^{+01}$	100
15	70 (0)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	425 (0)	$1,21 \times 10^{+01}$	100
16	70 (0)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	425 (0)	$1,39 \times 10^{+01}$	100
17	70 (0)	$9,00 \times 10^{+10}$ (0)	425 (0)	$1,05 \times 10^{+01}$	100

1554 (a) Excluded data. (-) Non reported data. (-1) = minor corner point level,
 1555 (0) = star points, (+1) = major corner point level. Factors definition: X_1 ,
 1556 NEV: number of small EVs initially present in the sample, X_2 , DOX:
 1557 Doxorubicin concentration in the solution, X_3 , FE: applied electrical field
 1558 strength. Responses definition: DOXin: Doxorubicin incorporation after a
 1559 pulse is applied, and %vesicles: percentage of electroporated vesicles
 1560 measuring less than 200 nm.

1561

1562

1563

1564

1565

1566 **Table 4.2.7:** Normalized regression coefficients (b) by PLS analysis for
 1567 square wave pulse electroporation.

<i>Term of the polynomial</i>			<i>DOXin ($\mu\text{g/mL}$)</i>			<i>% vesicles (<200 nm)</i>				
			<i>b</i>	\pm	<i>Std. Err.</i>	<i>p-value</i>	<i>b</i>	\pm	<i>Std. Err.</i>	<i>p-value</i>
X_0	Constant	k	2.920	\pm	0.140	0.000*	12.09	\pm	0.138	0.000*
X_1	Number of small EV	NEV	0.063	\pm	0.088	0.497	0.099	\pm	0.087	0.286
X_2	Doxorubicin concentration	DOX	0.900	\pm	0.088	0.000*	0.595	\pm	0.087	0.000*
X_3	Electrical field strength applied	FE	0.088	\pm	0.088	0.341	0.214	\pm	0.087	0.037*
X_{12}	Number of small EV * Doxorubicin concentration	NEV*DOX	0.093	\pm	0.076	0.251	-0.310	\pm	0.075	0.003*
X_{13}	Number of small EV * Electrical field strength applied	NEV*FE	- 0.096	\pm	0.076	0.236	0.197	\pm	0.754	0.028*
X_{22}	Doxorubicin concentration * Doxorubicin concentration	DOX*DOX	- 0.363	\pm	0.118	0.013*	-0.817	\pm	0.117	0.000*

1568 *Normalized regression coefficient \pm standard error, (*) p-value < 0.05*

1569

1570

1571 The information from Table 4.2.7 confirms the previous findings from the
 1572 screening experiments, where the initial Doxorubicin concentration in the
 1573 solution (DOX, X_2) was identified as the most significant factor that
 1574 positively impacts the model response ($p < 0.05$). This observation is

1575 demonstrated by a high and positive coefficient ($X_2 = 0.906$), signifying that
1576 higher DOX concentrations in the medium result in increased drug
1577 incorporation into small EV when a square wave pulse type is applied. The
1578 significance of the negative quadratic term for DOX (X_{22}) implies that the
1579 maximum response for Doxorubicin incorporation was achieved under the
1580 tested DOX conditions. This underlines the importance of the Doxorubicin
1581 concentration in the medium for effective drug incorporation into small
1582 EVs.

1583 For the small EV aggregation response (% vesicles), Doxorubicin
1584 concentration in the solution (DOX, X_2) emerges as the most significant
1585 factor, contributing positively and significantly ($X_2 = 0.595$) to the model
1586 response ($p < 0.05$). The presence of the DOX quadratic term in the
1587 polynomial (X_{22}) suggests a curvature, providing information about the
1588 maximum response that can be achieved under the given NEV and FE
1589 conditions.

1590 For the aggregation response, the model reveals the presence of two
1591 significant interactions that could contribute to the aggregation: the
1592 interaction between the number of EVs and the Doxorubicin concentration
1593 (NEV*DOX, $p=0.003$) and the interaction between the number of small

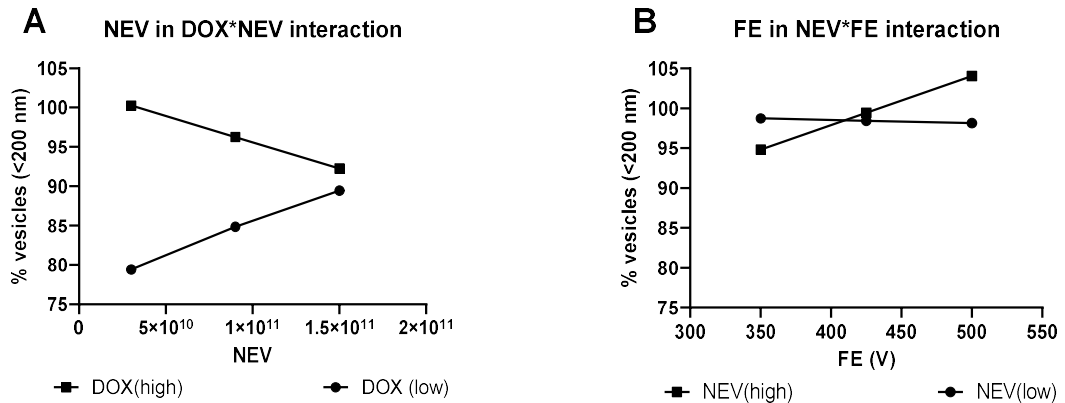
1594 EVs and the electrical field strength (NEV*FE, $p=0.028$). The behavior of
1595 these interactions on the aggregation response can be analyzed further using
1596 the interaction graphs presented in Figure 9.

1597 Figure 4.2.9A demonstrates the inverse relationship between the number of
1598 vesicles and the Doxorubicin concentration needed to obtain the lowest
1599 level of vesicle aggregation. Low vesicle numbers coupled with high
1600 concentrations of Doxorubicin in the medium favor non-aggregation of
1601 vesicles after exposure to square pulse electroporation. Conversely, Figure
1602 9B indicates that the square wave electric field strength has a minimal effect
1603 on vesicle aggregation, regardless of the initial number of vesicles present
1604 at the start of the electroporation process.

1605

1606

1607



1608
1609

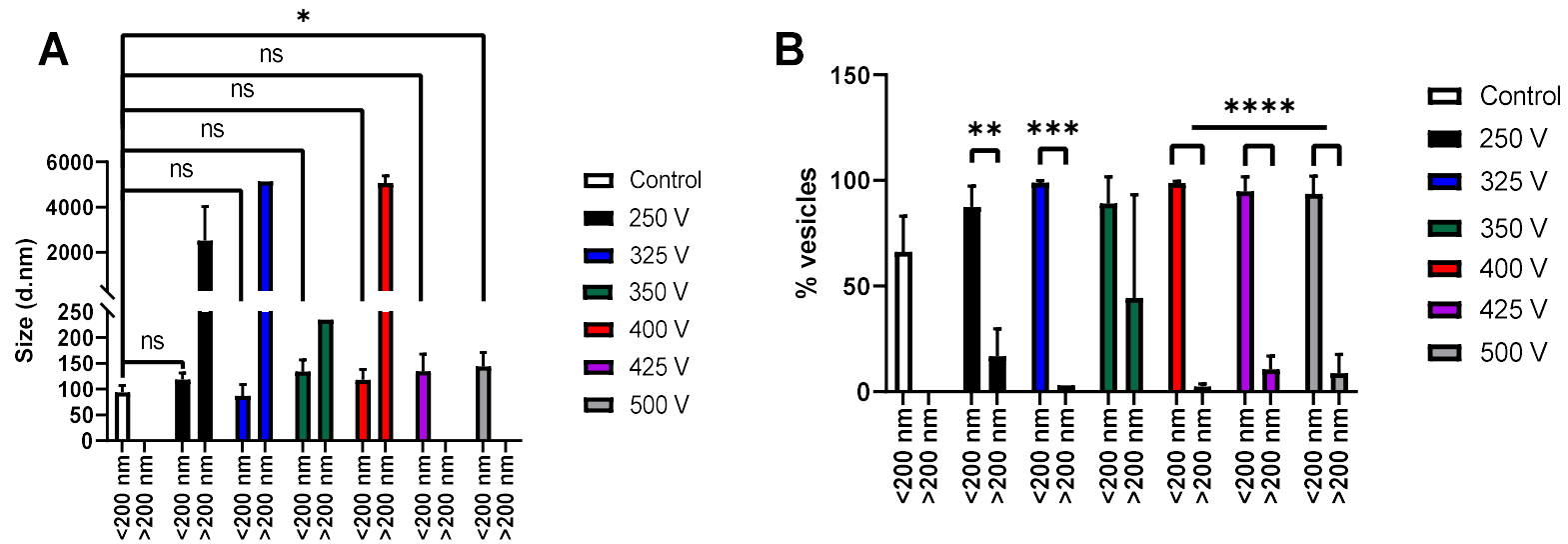
1610 **Figure 4.2.9:** Interaction graph between variables DOX and NEV, and NEV
1611 and FE for the aggregation response following square wave pulse
1612 electroporation.

1613 A) Contribution of the initial Doxorubicin concentration (DOX) to the
1614 percentage of vesicles smaller than 200 nm, B) contribution of the number
1615 of small extracellular vesicles (NEV) on the percentage of vesicles smaller
1616 than 200 nm.

1617

1618

1619 To determine if the shape of the pulse, irrespective of its intensity, is
1620 the main factor causing the reduced aggregation of vesicles, we examined
1621 the size differences among vesicles smaller than 200 nm. We compared the
1622 distribution of populations after each electroporation against a consistent
1623 initial number of small EVs.



1624
1625

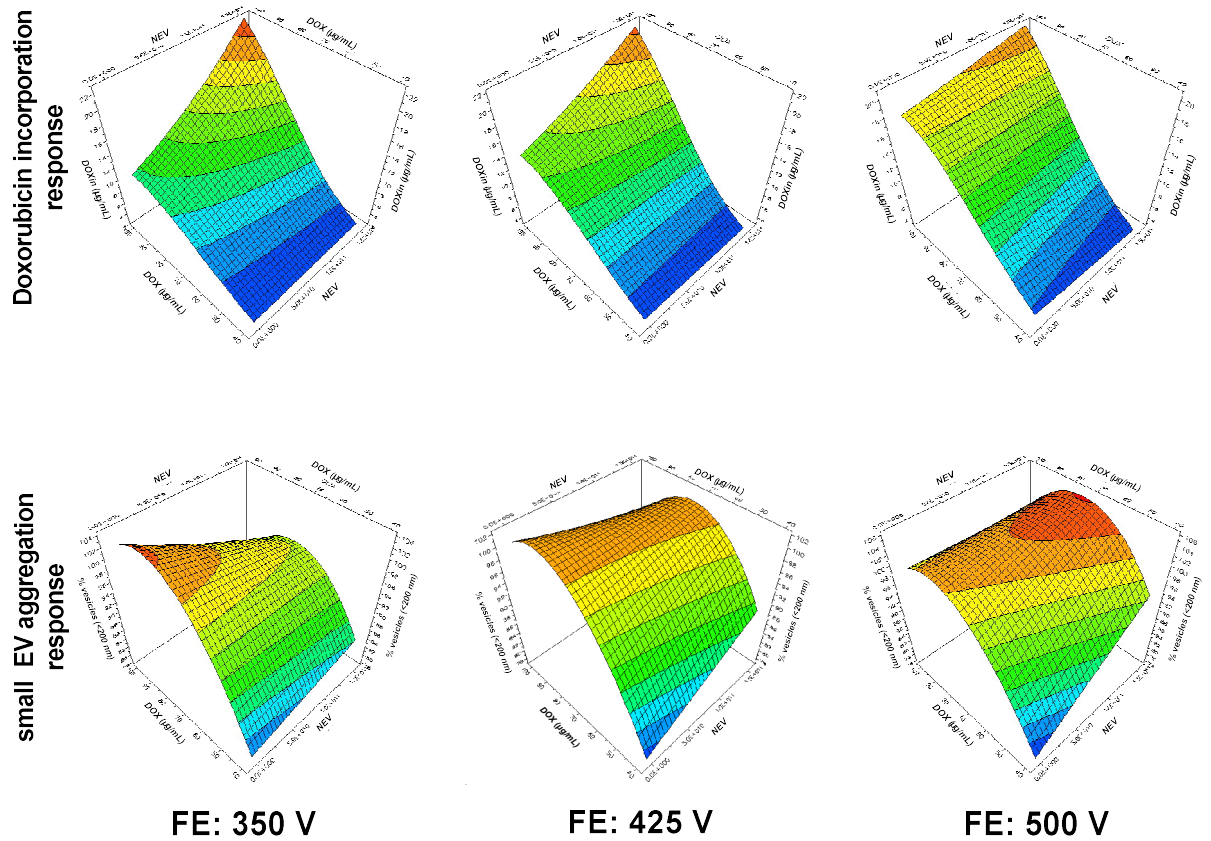
1626 **Figure 4.2.10:** Size and distribution of small EV after square pulse electroporation.

1627 A) Size distribution of the vesicles after electroporation, measured by DLS. B) Percentage of vesicles
 1628 smaller than (<) and higher than (>) than 200 nanometers. (*) p-value <0.05; (**) p-value <0.01; (***) p-
 1629 value <0.005; (****) p-value <0.001; (ns), non-statistically significant differences.

1630

1631

1632 No differences were observed in EV size between the control and most of
1633 the electrical field strength applying conditions after the square wave pulse
1634 decay electroporation (Figure 4.2.10A). In contrast to what was observed
1635 when an exponential decay pulse was applied, electroporation did not
1636 significantly modify the distribution of the small initial EV population.
1637 Even though particles bigger than 200 nm are still present in each of the
1638 electroporated samples, they represent only a small fraction overall,
1639 suggesting that the decay of the square wave pulse did not promote particle
1640 aggregation (Figure 4.2.10B).



1641
1642

1643 **Figure 4.2.11:** Response surface plot 3D for Doxorubicin incorporation
1644 response and small EV aggregation response.

1645

1646

1647

1648 Finally, Figure 4.2.11 shows the interaction of all contributing factors via a
1649 3D surface plot for Doxorubicin incorporation and small EV aggregation, as
1650 determined by RSM modeling. Each graphic delineates the relationship

1651 between the input variables (number of small extracellular vesicles - NEV,
1652 and initial drug concentration - DOX) and the output variable (level of drug
1653 incorporation - DOXin) under specific electrical field conditions (FE). In
1654 the upper panel, the graphs display a curved surface that peaks at 350 V
1655 when a high number of small EVs and high initial drug concentrations are
1656 utilized, indicating that this combination correlates with the maximum level
1657 of drug incorporation into the extracellular vesicles. Nevertheless, minor
1658 differences in the DOXin response are observed at higher FE levels.

1659 In the lower panels, the graphics showed a curved surface, indicating that
1660 aggregation is induced at lower FE, thus reducing the percentage of
1661 particles smaller than 200 nm when present in high numbers. This suggests
1662 that when a high number of small EVs is initially present in the sample, the
1663 applied FE must be sufficient to allow the formation of temporary pores in
1664 all of them. Otherwise, the FE will merely perturb the membrane,
1665 promoting vesicle aggregation.

1666 When a higher electrical field strength is applied, the electroporation
1667 response is reversed, indicating that a greater number of small EVs require
1668 more energy for proper electroporation and pore formation. Under these
1669 conditions, a significant drug concentration can be incorporated into the

1670 vesicles without inducing vesicle aggregation following exposure to square
1671 wave electroporation, which occurs before drug incorporation.

1672 **4.2.5 Conclusions**

1673 In this study, we report findings on the differential encapsulation of
1674 Doxorubicin following the application of exponential decay wave pulse and
1675 square wave pulse electroporation. Our primary goal was optimizing small
1676 EVs as cargo for efficient drug delivery. We utilized a Design of
1677 Experiments (DoE) approach to gain comprehensive insights into the
1678 process. By maintaining identical initial conditions for screening analysis,
1679 we discerned variations in the factors and their interactions that govern the
1680 drug's incorporation into the small EVs.

1681 Although the concentration of Doxorubicin in the electroporation solution
1682 was a critical factor in both models, our optimization studies revealed a
1683 contrasting interplay when applying different wave pulses. During
1684 exponential decay electroporation, a negative relationship was established
1685 between the electrical field strength and the initial drug concentration.
1686 However, a strong positive correlation was observed between Doxorubicin

1687 incorporation and the initial drug concentration in the medium. We also
1688 found that lower electric fields enhance drug incorporation into the vesicles.
1689 Our findings also corroborated previous reports indicating that
1690 electroporation affects the structural integrity of vesicles. Evaluation of
1691 vesicle size distribution showed a significant increase following
1692 electroporation, potentially due to the formation of more temporary pores in
1693 smaller vesicles at higher electrical field strengths. These results highlight
1694 this effect's primary dependence on the pulse shape rather than the electrical
1695 field strength.

1696 In subsequent experiments involving square wave pulse electroporation, the
1697 initial Doxorubicin concentration emerged as the most crucial factor
1698 positively affecting the drug's incorporation into the vesicles. Interestingly,
1699 only a small fraction of vesicles larger than 200 nm were observed in all
1700 electrical field strength conditions, but these were significantly larger than
1701 those observed in previous experiments.

1702 The study findings underscore the potential of synthetic nanoparticle-based
1703 Drug Delivery Systems (DDS) in resolving solubility issues with many
1704 therapeutic drugs. However, several challenges, such as drug-release

1705 kinetics, nanoparticle-associated toxicity, and the DDS's ability to penetrate
1706 the heterogeneous tumor environment, still need to be addressed.

1707 In conclusion, our study has provided a deeper understanding of the factors
1708 influencing drug incorporation into EVs during electroporation, shedding
1709 light on the differential impact of exponential decay wave pulse and square
1710 wave pulse electroporation on Doxorubicin encapsulation. Our findings
1711 underscore the importance of optimizing electroporation parameters to
1712 ensure efficient drug encapsulation and could guide the design of more
1713 effective drug delivery strategies using small EVs. Future research should
1714 focus on elucidating the precise mechanisms underlying the observed
1715 changes in vesicle size and the effect of pulse shape on drug encapsulation,
1716 aiming to improve the therapeutic potential of EVs as drug delivery
1717 vehicles.

1718

1719

1720

4.2.6 References

- 1721 1. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested
1722 anticancer drug doxorubicin. *Life Sci.* 2021;278:119527. Epub 20210420.
1723 doi: 10.1016/j.lfs.2021.119527. PubMed PMID: 33887349.
- 1724 2. Zhao N, Woodle MC, Mixson AJ. Advances in delivery systems for
1725 doxorubicin. *J Nanomed Nanotechnol.* 2018;9(5). Epub 20181104. doi:
1726 10.4172/2157-7439.1000519. PubMed PMID: 30613436; PubMed Central
1727 PMCID: PMC6319900.
- 1728 3. Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin
1729 metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic
1730 deglycosidation and carbonyl reduction. *Chemical research in toxicology.*
1731 2000;13(5):414-20. doi: 10.1021/tx000013q. PubMed PMID: 10813659.
- 1732 4. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from
1733 the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular*
1734 *diseases.* 2007;49(5):330-52. Epub 2007/03/03. doi:
1735 10.1016/j.pcad.2006.10.002. PubMed PMID: 17329180.
- 1736 5. Fojtu M, Gumulec J, Stracina T, Raudenska M, Skotakova A,
1737 Vaculovicova M, et al. Reduction of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity
1738 Using Nanocarriers: A Review. *Curr Drug Metab.* 2017;18(3):237-63. doi:
1739 10.2174/1389200218666170105165444. PubMed PMID: 28059036.
- 1740 6. Kaiserova H, Simunek T, van der Vijgh WJ, Bast A, Kvasnickova E.
1741 Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron
1742 chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase.
1743 *Biochimica et biophysica acta.* 2007;1772(9):1065-74. Epub 20070521. doi:
1744 10.1016/j.bbadis.2007.05.002. PubMed PMID: 17572073.
- 1745 7. Kalyanaraman B. Teaching the basics of the mechanism of
1746 doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong
1747 tree? *Redox Biol.* 2020;29:101394. Epub 20191126. doi:
1748 10.1016/j.redox.2019.101394. PubMed PMID: 31790851; PubMed Central
1749 PMCID: PMC6909145.
- 1750 8. Liang J, Jin X, Chen B, Hu J, Huang Q, Wan J, et al. Doxorubicin-
1751 loaded pH-responsive nanoparticles coated with chlorin e6 for drug delivery
1752 and synergetic chemo-photodynamic therapy. *Nanotechnology.*

- 1753 2020;31(19):195103. Epub 20200124. doi: 10.1088/1361-6528/ab6fd5.
1754 PubMed PMID: 31978912.
- 1755 9. Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Liposomal drug
1756 formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug discovery*
1757 *today*. 2012;17(3-4):160-6. Epub 20110929. doi:
1758 10.1016/j.drudis.2011.09.015. PubMed PMID: 21983329.
- 1759 10. Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, et al.
1760 Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain
1761 cancer therapy in Danio rerio. *Pharmaceutical research*. 2015;32(6):2003-
1762 14. Epub 20150122. doi: 10.1007/s11095-014-1593-y. PubMed PMID:
1763 25609010; PubMed Central PMCID: PMC4520542.
- 1764 11. Xing M, Yan F, Yu S, Shen P. Efficacy and Cardiotoxicity of
1765 Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer:
1766 A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS One*.
1767 2015;10(7):e0133569. Epub 20150723. doi: 10.1371/journal.pone.0133569.
1768 PubMed PMID: 26204517; PubMed Central PMCID: PMC4512701.
- 1769 12. Keener A. How extracellular vesicles can enhance drug delivery.
1770 *Extracellular RNA*. 2020;582.
- 1771 13. Salomon C, Das S, Erdbrugger U, Kalluri R, Kiang Lim S, Olefsky
1772 JM, et al. Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular
1773 Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement.
1774 *Endocr Rev*. 2022;43(3):441-68. doi: 10.1210/endrev/bnac009. PubMed
1775 PMID: 35552682.
- 1776 14. Liao W, Du Y, Zhang C, Pan F, Yao Y, Zhang T, et al. Exosomes: The
1777 next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery
1778 and therapy. *Acta Biomater*. 2019;86:1-14. Epub 20181228. doi:
1779 10.1016/j.actbio.2018.12.045. PubMed PMID: 30597259.
- 1780 15. Zhou X, Xie F, Wang L, Zhang L, Zhang S, Fang M, et al. The
1781 function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune
1782 regulation. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020;17(4):323-34. doi:
1783 10.1038/s41423-020-0391-1.
- 1784 16. Gao Y, Qin Y, Wan C, Sun Y, Meng J, Huang J, et al. Small
1785 Extracellular Vesicles: A Novel Avenue for Cancer Management. *Front*
1786 *Oncol*. 2021;11:638357. Epub 20210315. doi: 10.3389/fonc.2021.638357.
1787 PubMed PMID: 33791224; PubMed Central PMCID: PMC8005721.

- 1788 17. Namee NM, O'Driscoll L. Extracellular vesicles and anti-cancer drug
1789 resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870(2):123-36. Epub
1790 20180710. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.07.003. PubMed PMID: 30003999.
- 1791 18. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular
1792 vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;106(Pt A):148-56.
1793 Epub 20160227. doi: 10.1016/j.addr.2016.02.006. PubMed PMID:
1794 26928656.
- 1795 19. Arrondeau J, Gan HK, Razak AR, Paoletti X, Le Tourneau C.
1796 Development of anti-cancer drugs. *Discovery medicine*. 2010;10(53):355-
1797 62. Epub 2010/11/03. PubMed PMID: 21034677.
- 1798 20. Shen S, Wu Y, Liu Y, Wu D. High drug-loading nanomedicines:
1799 progress, current status, and prospects. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4085-
1800 109. Epub 20170531. doi: 10.2147/IJN.S132780. PubMed PMID:
1801 28615938; PubMed Central PMCID: PMC5459982.
- 1802 21. Mehryab F, Rabbani S, Shahhosseini S, Shekari F, Fatahi Y,
1803 Baharvand H, et al. Exosomes as a next-generation drug delivery system:
1804 An update on drug loading approaches, characterization, and clinical
1805 application challenges. *Acta Biomater*. 2020;113:42-62. Epub 20200702.
1806 doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.036. PubMed PMID: 32622055.
- 1807 22. Walker S, Busatto S, Pham A, Tian M, Suh A, Carson K, et al.
1808 Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment.
1809 *Theranostics*. 2019;9(26):8001-17. Epub 20191017. doi:
1810 10.7150/thno.37097. PubMed PMID: 31754377; PubMed Central PMCID:
1811 PMC6857056.
- 1812 23. Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen H, Yuan H, Sun D.
1813 Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug
1814 delivery. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(6):754-63. Epub 20170410. doi:
1815 10.1038/aps.2017.12. PubMed PMID: 28392567; PubMed Central PMCID:
1816 PMC5520184.
- 1817 24. Sutaria DS, Badawi M, Phelps MA, Schmittgen TD. Achieving the
1818 Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles: The Devil is in Details of
1819 Therapeutic Loading. *Pharmaceutical research*. 2017;34(5):1053-66. Epub
1820 20170317. doi: 10.1007/s11095-017-2123-5. PubMed PMID: 28315083;
1821 PubMed Central PMCID: PMC5565485.

- 1822 25. Somiya M, Yoshioka Y, Ochiya T. Drug delivery application of
1823 extracellular vesicles; insight into production, drug loading, targeting, and
1824 pharmacokinetics. *AIMS Bioengineering*. 2017;4(1):73-92. doi:
1825 10.3934/bioeng.2017.1.73.
- 1826 26. Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, et al. A doxorubicin
1827 delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for
1828 targeted tumor therapy. *Biomaterials*. 2014;35(7):2383-90. Epub 20131215.
1829 doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.083. PubMed PMID: 24345736.
- 1830 27. Schindler C, Collinson A, Matthews C, Pointon A, Jenkinson L,
1831 Minter RR, et al. Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry
1832 and enhanced in vitro potency. *PloS one*. 2019;14(3):e0214545-e. doi:
1833 10.1371/journal.pone.0214545. PubMed PMID: 30925190.
- 1834 28. Gomari H, Forouzandeh Moghadam M, Soleimani M. Targeted
1835 cancer therapy using engineered exosome as a natural drug delivery vehicle.
1836 *Onco Targets Ther*. 2018;11:5753-62. Epub 20180912. doi:
1837 10.2147/OTT.S173110. PubMed PMID: 30254468; PubMed Central
1838 PMCID: PMC6140699.
- 1839 29. Hood JL, Scott MJ, Wickline SA. Maximizing exosome colloidal
1840 stability following electroporation. *Analytical Biochemistry*. 2014;448:41-9.
1841 doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.001>.
- 1842 30. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Christiansen G, Gurevich
1843 L, Moos T, et al. Evaluation of electroporation-induced adverse effects on
1844 adipose-derived stem cell exosomes. *Cytotechnology*. 2016;68(5):2125-38.
1845 Epub 20160208. doi: 10.1007/s10616-016-9952-7. PubMed PMID:
1846 26856590; PubMed Central PMCID: PMC6140699.
- 1847 31. Ayed Z, Cuvillier L, Dobhal G, Goreham RV. Electroporation of
1848 outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* with gold
1849 nanoparticles. *SN Applied Sciences*. 2019;1(12):1600. doi:
1850 10.1007/s42452-019-1646-2.
- 1851 32. Sherba JJ, Hogquist S, Lin H, Shan JW, Shreiber DI, Zahn JD. The
1852 effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-
1853 transfection efficiency. *Scientific Reports*. 2020;10(1):3053. doi:
1854 10.1038/s41598-020-59790-x.
- 1855 33. Lennaard AJ, Mamand DR, Wiklander RJ, El Andaloussi S,
1856 Wiklander OPB. Optimised Electroporation for Loading of Extracellular

- 1857 Vesicles with Doxorubicin. *Pharmaceutics*. 2021;14(1). Epub 20211224.
1858 doi: 10.3390/pharmaceutics14010038. PubMed PMID: 35056933; PubMed
1859 Central PMCID: PMCPMC8780628.
- 1860 34. Novickij V, Rembalkowska N, Szlasa W, Kulbacka J. Does the shape
1861 of the electric pulse matter in electroporation? *Front Oncol*.
1862 2022;12:958128. Epub 20220914. doi: 10.3389/fonc.2022.958128. PubMed
1863 PMID: 36185267; PubMed Central PMCID: PMCPMC9518825.
- 1864 35. Sugar IP, Forster W, Neumann E. Model of cell electrofusion.
1865 Membrane electroporation, pore coalescence and percolation. *Biophys*
1866 *Chem*. 1987;26(2-3):321-35. doi: 10.1016/0301-4622(87)80033-9. PubMed
1867 PMID: 3607233.
- 1868 36. Sato YT, Umezaki K, Sawada S, Mukai SA, Sasaki Y, Harada N, et
1869 al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci*
1870 *Rep*. 2016;6(1):21933. Epub 20160225. doi: 10.1038/srep21933. PubMed
1871 PMID: 26911358; PubMed Central PMCID: PMCPMC4766490.
- 1872 37. Morandi MI, Busko P, Ozer-Partuk E, Khan S, Zarfati G, Elbaz-Alon
1873 Y, et al. Extracellular vesicle fusion visualized by cryo-electron microscopy.
1874 *PNAS Nexus*. 2022;1(4):pgac156. Epub 20220816. doi:
1875 10.1093/pnasnexus/pgac156. PubMed PMID: 36714848; PubMed Central
1876 PMCID: PMCPMC9802263.
- 1877 38. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug
1878 delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(4):437-
1879 47. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x. PubMed PMID: 12648161.
- 1880 39. Stankevic V, Simonis P, Zurauskiene N, Stirke A, Dervinis A,
1881 Bleizgys V, et al. Compact Square-Wave Pulse Electroporator with
1882 Controlled Electroporation Efficiency and Cell Viability. *Symmetry*.
1883 2020;12(3):412. PubMed PMID: doi:10.3390/sym12030412.
- 1884 40. Shi J, Ma Y, Zhu J, Chen Y, Sun Y, Yao Y, et al. A Review on
1885 Electroporation-Based Intracellular Delivery. *Molecules*. 2018;23(11). Epub
1886 20181121. doi: 10.3390/molecules23113044. PubMed PMID: 30469344;
1887 PubMed Central PMCID: PMCPMC6278265.
- 1888 41. Contreras H, Alarcón-Zapata P, Nova-Lamperti E, Ormazabal V,
1889 Varas-Godoy M, Salomon C, et al. Comparative study of size exclusion
1890 chromatography for isolation of small extracellular vesicle from cell-

1891 conditioned media, plasma, urine, and saliva. *Frontiers in Nanotechnology*.
1892 2023;5. doi: 10.3389/fnano.2023.1146772.

1893 42. Schindler C, Collinson A, Matthews C, Pointon A, Jenkinson L,
1894 Minter RR, et al. Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry
1895 and enhanced in vitro potency. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214545. Epub
1896 20190329. doi: 10.1371/journal.pone.0214545. PubMed PMID: 30925190;
1897 PubMed Central PMCID: PMC6440694.

1898 43. Hosseini NF, Amini R, Ramezani M, Saidijam M, Hashemi SM,
1899 Najafi R. AS1411 aptamer-functionalized exosomes in the targeted delivery
1900 of doxorubicin in fighting colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*.
1901 2022;155:113690. Epub 20220912. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113690.
1902 PubMed PMID: 36099793.

1903 44. Hood JL, Scott MJ, Wickline SA. Maximizing exosome colloidal
1904 stability following electroporation. *Anal Biochem*. 2014;448:41-9. Epub
1905 20131209. doi: 10.1016/j.ab.2013.12.001. PubMed PMID: 24333249;
1906 PubMed Central PMCID: PMC3954633.

1907 45. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of
1908 Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted
1909 Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6917-34. Epub
1910 20200922. doi: 10.2147/IJN.S264498. PubMed PMID: 33061359; PubMed
1911 Central PMCID: PMC7519827.

1912 46. Xi XM, Xia SJ, Lu R. Drug loading techniques for exosome-based
1913 drug delivery systems. *Pharmazie*. 2021;76(2):61-7. doi:
1914 10.1691/ph.2021.0128. PubMed PMID: 33714281.

1915 47. Toffoli G, Hadla M, Corona G, Caligiuri I, Palazzolo S, Semeraro S,
1916 et al. Exosomal doxorubicin reduces the cardiac toxicity of doxorubicin.
1917 *Nanomedicine (London, England)*. 2015;10(19):2963-71. Epub 20150930.
1918 doi: 10.2217/nnm.15.118. PubMed PMID: 26420143.

1919
1920
1921

1922 **CONCLUSIÓN GENERAL**

1923 Las vesículas extracelulares (VEs) han despertado un gran interés en la
1924 comunidad biomédica debido a su papel fundamental como un mecanismo
1925 alternativo de comunicación entre células. Estas estructuras tienen la
1926 capacidad de transportar una gran variedad de moléculas biológicas, como
1927 proteínas, ARN, lípidos y metabolitos. Son liberadas por todas las células
1928 del organismo hacia el medio extracelular y viajan por el torrente sanguíneo
1929 hasta su célula blanco, donde ejercen su función.

1930 Aunque las VEs muestran una alta heterogeneidad en cuanto a su origen y
1931 tamaño, se ha prestado una atención especial a las VEs de tamaño pequeño,
1932 que tienen un diámetro menor a los 200 nm, y que incluye a los exosomas y
1933 las microvesículas. Estas VEs tienen un papel importante en la
1934 comunicación célula a célula, participando activamente en la regulación del
1935 sistema inmunológico, el desarrollo embrionario y la respuesta a lesiones.
1936 Esto las convierte en potenciales biomarcadores, útiles para el diagnóstico y
1937 pronóstico de diversas enfermedades.

1938 Uno de los aspectos más destacados de las VEs pequeñas es, sin duda, su
1939 baja inmunogenicidad y la posibilidad de ser manipuladas de manera

1940 exógena. Esta característica, sumada a su capacidad de transporte y
1941 almacenamiento, ha llevado a que se les considere como prometedores
1942 vehículos para la entrega de un gran número de moléculas, como material
1943 genético, proteínas o sustancias con potencial terapéutico a células o tejidos
1944 específicos en el organismo, con importantes implicancias en el campo de la
1945 terapia génica y celular.

1946 Sin embargo, el aislamiento de VEs a partir de cualquier fluido biológico
1947 representa un desafío considerable. Los estudios muestran que separarlas de
1948 las proteínas y partículas lipídicas del medio que las rodea, es una tarea
1949 compleja. Dada la falta de métodos normalizados para este propósito, se
1950 abre la oportunidad valiosa para el estudio y desarrollo de métodos
1951 innovadores que puedan tener un impacto significativo en el campo y
1952 propiciar avances substanciales.

1953 Durante este trabajo doctoral, se llevó a cabo la implementación y
1954 optimización de un método de aislamiento de VEs pequeñas utilizando
1955 UF/SEC. La elección de esta combinación se basó principalmente en
1956 técnicas de aislamiento suave de las VEs, lo que finalmente arrojó
1957 resultados satisfactorios. Después de llevar a cabo la optimización, fue
1958 posible obtener un volumen de 800 μL de una población rica en VEs con

1959 tamaños comprendidos principalmente en el rango entre 30-150 nm,
1960 provenientes de diferentes fluidos biológicos como medio de cultivo
1961 celular, plasma, orina y saliva. Las VEs recuperadas de estas muestras, han
1962 mantenido la morfología clásica en forma de copa de la vesícula al ser
1963 visualizadas a través del TEM, indicando la preservación, al menos *a priori*,
1964 de una membrana casi intacta.

1965 Además, las VEs aisladas de las muestras de medio de cultivo y sangre
1966 periférica, exhibieron los marcadores clásicos de exosomas como TSG-101,
1967 Alix, CD9, CD81 y CD63 lo que sugiere la presencia de VEs pequeñas de
1968 origen endosomal en los concentrados. Es importante destacar que, gracias
1969 a la optimización de esta metodología de aislamiento, nuestro estudio
1970 representa uno de los primeros trabajos que logra obtener exitosamente VEs
1971 pequeñas utilizando la metodología SEC, no sólo con un bajo grado
1972 contaminación proteica, sino además con niveles casi ausentes de moléculas
1973 de HDL-colesterol, LDL-colesterol, quilomicrones y albúmina.

1974 El aislamiento de VEs <200 nm a partir de plasma se ve dificultado por la
1975 viscosidad y densidad del plasma, así como por la similitud que presentan
1976 algunas lipoproteínas en términos de diámetro y densidad con estas VEs.
1977 Varios reportes demuestran que el aislamiento de vesículas mediante dUC

1978 da como resultado el co-aislamiento de lipoproteínas de alta densidad
1979 (HDL) (Redgrave et al., 1975; Vickers et al., 2011).

1980 Este hecho ha sido quizás el motor más fuerte para la búsqueda de nuevas
1981 estrategias de separación. Los primeros estudios que buscaron aislar VEs
1982 por cromatografía SEC se remontan a los ensayos reportados por Taylor y
1983 colaboradores aislando porciones vesiculares de la membrana plasmática de
1984 sangre periférica de mujeres diagnosticadas con cáncer de ovario utilizando
1985 columnas comerciales Bio-Gel A50m (1.5 × 45 cm). Sin embargo, en
1986 trabajos posteriores recomendaron el uso de agentes precipitantes para
1987 obtener una mejor calidad en la separación (Taylor et al., 2011).

1988 La primera evidencia de columnas SEC preparadas *in-house* se atribuye al
1989 grupo de Böing y colaboradores. En sus trabajos reportan el uso de
1990 columnas de 10 mL rellenas con resina CL-2B, para recuperar VEs desde el
1991 sobrenadante de un concentrado libre de plaquetas. Si bien la columna
1992 demostró ser capaz de aislar VEs derivadas de fluidos biológicos en tan solo
1993 un paso, también se observó la presencia de moléculas de HDL-colesterol
1994 dentro de algunas fracciones (Böing et al., 2014). En otro trabajo, se evaluó
1995 el comportamiento de tres columnas SEC diferentes (Sephacryl S-400,
1996 Sepharose 4B, Sepharose CL-2B) para comparar la eficacia de la separación

1997 de las VE del plasma sanguíneo con múltiples rondas de UC. Los resultados
1998 mostraron que la Sephacryl S-400 y la Sepharose 4B, pero no la Sepharose
1999 CL-2B, separaban eficazmente las VE de la albúmina (Baranyai et al.,
2000 2015).

2001 Recientemente, Kuypers y colaboradores lograron aislar VEs <200nm
2002 procedentes de sangre periférica mediante el uso de la resina Sepharose CL-
2003 2B. Sin embargo, en estas fracciones también reportan la presencia de Apo-
2004 A1 (apolipoproteína asociada al HDL-colesterol), la cual sólo pudo ser
2005 removida luego de aplicar dUC (Kuypers et al., 2021) .

2006 En nuestra práctica, las muestras fueron sometidas a 3 procesos
2007 consecutivos de centrifugación y posteriormente, filtradas a través de un
2008 filtro de 220 nm. Tras la concentración de las muestras más diluidas, se
2009 cargaron 500 µL de la muestra en la columna G200/40. Los primeros 1,6 ml
2010 del eluido, fueron descartados, seguido de la recolección de 0,8 ml, que es
2011 en donde se concentran las fracciones ricas en VEs pequeñas y con baja
2012 contaminación proteica y libres de HDL-colesterol.

2013 Se ha descrito que otras técnicas de separación como la UC requieren
2014 tiempos superiores a las 4 horas de centrifugación a velocidades cercanas a

2015 los 120.000 xg, lo que induciría cambios en la morfología de las VEs. Para
2016 evitar el daño sobre la membrana, la dUC emplea velocidades menores,
2017 pero requiere sobre 16 horas de centrifugación. La separación por
2018 columnas de inmuno-afinidad, que se destaca como una de las estrategias
2019 con mayor especificidad para el aislamiento de subpoblaciones de VEs,
2020 pero el proceso completo toma entre 4 y 20 horas en conseguir una
2021 separación con alto grado de pureza, mientras que la precipitación con
2022 polímeros es la técnica que requiere de menos tiempo (entre 1 a 8 horas),
2023 pero existe el riesgo de dejar residuos poliméricos potencialmente tóxicos e
2024 inmunogénicos (Chen et al., 2022).

2025 La metodología propuesta nos permitió obtener de forma rápida y sencilla
2026 VEs pequeñas no tan sólo a partir de medio de cultivo celular y plasma,
2027 sino también desde muestras de orina y saliva en tan sólo 30 minutos desde
2028 la elusión y con un alto grado de pureza. Los tiempos adicionales que sean
2029 necesarios emplear dependerán exclusivamente del pre-procesamiento de
2030 las muestras en lo que respecta al volumen que sea necesario filtrar o
2031 concentrar, como ocurre en el caso de las muestras de orina.

2032

2033 El siguiente objetivo de este trabajo tuvo por objetivo optimizar la
2034 incorporación de DOX en vesículas extracelulares pequeñas purificadas
2035 desde sangre periférica aplicando una estrategia post-carga. Para ello, se
2036 evaluaron los factores que influyen en la carga de DOX mediante
2037 electroporación. Se realizó un análisis independiente de dos tipos de pulso:
2038 Exponencial y de forma Cuadrada. Ambos pulsos fueron evaluados en
2039 términos de su impacto en la respuesta del sistema, permitiendo así una
2040 comparación exhaustiva de sus efectos individuales.

2041 Se aplicó una estrategia basada en el Diseño de Experimentos, el cual
2042 permite en un número limitado de experimentos establecer las condiciones
2043 óptimas de carga y determinar las relaciones entre variables, de manera
2044 eficiente y sistemática.

2045 En este estudio, se logró establecer la factibilidad para determinar la
2046 presencia directa de DOX en VEs post-electroporadas mediante la
2047 utilización de la técnica de Fluorimetría. Concretamente, una vez que las
2048 VEs fueron sometidas al campo eléctrico y cargadas con DOX, estas fueron
2049 lavadas y concentradas en tubos 10 kDa Amicon. Esta estrategia, presentada
2050 inicialmente por Toffoli, Schindler y Gomari (Gomari et al., 2019;
2051 Schindler et al., 2019; Toffoli et al., 2015), permite la lectura de la DOX

2052 encapsulada midiendo su intensidad de Fluorescencia a 595 nm (excitación
2053 a 480 nm) de una manera rápida y específica directamente en el
2054 concentrado.

2055 A pesar de que existen alternativas que podrían proporcionar una
2056 cuantificación más precisa y reproducible de la DOX, como la
2057 cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la citometría de flujo, es
2058 imperativo tener en consideración que la preparación de las muestras
2059 utilizando estos métodos puede resultar en una prolongada duración del
2060 proceso, lo cual favorecería la degradación de la molécula de interés. No
2061 obstante, es importante destacar que, incluso utilizando estas estrategias de
2062 manera óptima, no se lograría discernir de manera concluyente entre el
2063 material de DOX contenido en el interior de las VEs y el que está unido a su
2064 superficie. Por esta razón, la Fluorimetría se establece como una opción
2065 viable y expedita para la detección de DOX en VEs tras la electroporación.

2066 Los resultados de este estudio revelan que la electroporación puede ser un
2067 método sumamente eficiente para introducir la DOX en las VEs pequeñas
2068 aisladas desde plasma, una vez que se optimiza el número de VE pequeñas
2069 (NEV), la concentración de fármaco (DOX) y la intensidad del campo
2070 eléctrico (FE) como condiciones iniciales.

2071 Además, este trabajo buscó minimizar la agregación de las vesículas dada
2072 por la electroporación. Se pudo observar que la agregación de las VEs tiene
2073 una estrecha relación con el tipo de pulso al cual son expuestas. En este
2074 sentido, las VEs pequeñas electroporadas con un pulso del tipo de onda
2075 cuadrada, exhiben una menor nivel de agregación, incluso a potenciales más
2076 altos, que aquellas VEs tratadas con el pulso de decaimiento exponencial.

2077 Este estudio representa uno de los primeros intentos de comparar de manera
2078 independiente la carga de esta droga favorecida por la electroporación en
2079 VEs aplicando estos dos tipos de pulso. En este análisis se evaluó de
2080 manera simultánea tanto la incorporación como el nivel de agregación de
2081 las vesículas, lo que aporta una comprensión más completa de los efectos de
2082 los diferentes pulsos en el proceso de carga de las VEs. Sin embargo, en
2083 este trabajo aún faltan por incorporar los estudios funcionales de las VEs
2084 cargadas con DOX, ya sea sobre líneas celulares o modelos derivados de
2085 xenoinjertos. No obstante, experimentos llevados a cabo con dexosomas
2086 (exosomas derivados de células dendríticas inmaduras) y cargados con
2087 DOX, demostraron tener un efecto citotóxico más potente sobre una línea
2088 celular de cáncer de pulmón humano, que las dosis de DOX administradas
2089 en forma libre (Mutlu et al., 2020). Del mismo modo, Lennaard y

2090 colaboradores, utilizando VEs cargadas con DOX por electroporación,
2091 demostraron una disminución de la viabilidad casi a la mitad en células
2092 B16F10, en comparación con la droga libre (Lennaard et al., 2021).

2093 En este contexto, las VEs han surgido como sistemas altamente eficaces
2094 para el transporte de moléculas de interés, lo que acentúa la relevancia de
2095 emplear estrategias basadas en el DoE. La aplicación de esta estrategia para
2096 lograr la carga efectiva y eficiente de moléculas en VEs conlleva la
2097 meticulosa identificación de variables críticas, tales como la concentración
2098 y solubilidad de las moléculas, el tamaño y concentración de las VEs, así
2099 como los tiempos y condiciones de exposición, entre una serie de
2100 parámetros adicionales que potencialmente influyen en el proceso de carga.

2101 Mediante la cuidadosa manipulación controlada de estas variables, es
2102 posible discernir su impacto en la eficiencia de carga de las VEs. Esta
2103 aproximación no solo permite la optimización de la estrategia de carga en sí
2104 misma, sino también brinda un valioso conjunto de datos relacionados con
2105 el proceso de carga, lo que enriquece significativamente nuestra
2106 comprensión de las interacciones entre las moléculas de interés y las VEs.

2107 Por este motivo, este estudio no solo se centra en la estrategia de carga en
2108 sí, sino que también busca que en futuras investigaciones se consideren
2109 otros posibles factores, así como también el conjunto de posibles
2110 interacciones que puedan influir en el proceso, tal como ya se ha planteado
2111 en el desarrollo de nuevas nanoformulaciones en la industria farmacéutica.

2112

2113 Finalmente, respondiendo a la hipótesis planteada en esta tesis doctoral, es
2114 posible destacar que:

- 2115 • La optimización de una metodología analítica basadas en el
2116 aislamiento suave de las VEs, utilizando UF acoplada a SEC,
2117 permitió la recuperación de VEs pequeñas menores a 200 nm no sólo
2118 desde sangre periférica, sino también de muestras provenientes del
2119 medio cultivo celular, orina y saliva, sin afectar la morfología de las
2120 VEs aisladas.
- 2121 • Cuando se compararon dos resinas con diferente tamaño de partícula,
2122 aquella de menor tamaño presentó una mayor eficacia en la
2123 purificación de VE pequeñas, evaluado como la razón entre el
2124 número de vesículas y la concentración de proteínas en cada fracción.

2125 La elección de las fracciones que formarán parte del pool final, rico
2126 en VE pequeñas, requiere de un compromiso entre obtener un pool
2127 con un mayor número de VEs o con un mayor grado de pureza. La
2128 elección de cualquiera de ambos dependerá del objetivo de la
2129 purificación, condición que debe ser establecida al inicio de la
2130 separación. Ante cualquiera de los dos compromisos, nuestra
2131 metodología de aislamiento optimizada sería capaz de responder de
2132 manera satisfactoria.

- 2133 • Ambas metodologías, UF y SEC, pueden ser implementadas en un
2134 laboratorio de baja complejidad, ya que son de fácil manipulación y
2135 alta reproducibilidad, lo que facilita su adopción en entornos de
2136 investigación y análisis clínicos, promoviendo así una amplia
2137 accesibilidad a estas valiosas técnicas.
- 2138 • La electroporación fue un método efectivo para la carga de
2139 Doxorubicina en VEs aisladas desde sangre periférica, ya que
2140 minimiza la perturbación de componentes sensibles en la membrana.
2141 Más aún, la eficacia de la electroporación puede optimizarse
2142 ajustando las características del pulso eléctrico, mejorando así la

2143 carga del fármaco, y disminuyendo la agregación como uno de los
2144 efectos no deseados.

2145
2146

2147 **PRODUCTIVIDAD**

2148 1. Publicaciones científicas

2149

- 2150 • COMPARATIVE STUDY OF SIZE EXCLUSION
2151 CHROMATOGRAPHY FOR ISOLATION OF SMALL
2152 EXTRACELLULAR VESICLE FROM CELL-CONDITIONED
2153 MEDIA, PLASMA, URINE, AND SALIVA.

2154 Contreras H, Alarcón-Zapata P, Nova-Lamperti E, Ormazabal V, Varas-
2155 Godoy M, Salomon C, Zuniga FA.

2156 Paper publicado en Front. Nanotechnol., 05 April 2023, Sec. Biomedical

2157 Nanotechnology, Volume 5 - 2023;

2158

- 2159 • SQUARE WAVE VS. EXPONENTIAL DECAY PULSES: A
2160 DESIGN OF EXPERIMENT APPROACH TO IMPROVE
2161 DOXORUBICIN INCORPORATION INTO SMALL
2162 EXTRACELLULAR VESICLES VIA ELECTROPORATION

2163 Contreras H, Alarcón-Zapata P, Acevedo M, Ormazabal V, Valenzuela F,
2164 Tapia K, Toledo K, Aguayo C, Nova-Lamperti E, Zúñiga FA.

2165 Paper enviado para publicación a Journal of Drug Delivery Science and Technology
2166 (JDDST-D-23-02535)

2167

2168 2. Participación en otras publicaciones.

2169 • METABOLOMICS PROFILING AND CHEMORESISTANCE

2170 MECHANISMS IN OVARIAN CANCER CELLS:

2171 IMPLICATIONS FOR TARGETING GLUTATHIONE

2172 PATHWAY

2173 Pedro Alarcon-Zapata, Andy J. Perez, Karin Toledo-Oñate, Hector

2174 Contreras, Valeska Ormazabal, Estefania Nova-Lamperti, Claudio A.

2175 Aguayo, Carlos Salomon, Felipe A. Zuniga

2176 Paper enviado para publicación a Life Sciences (LFS-D-23-04325)

2177

2178 3. Participación en congresos

2179 • EXOSOMES ENGINEERING

2180 H Contreras, FA Zúñiga.

2181 Extracellular vesicles and exosomes symposium: focusing on pregnancy and cancer,

2182 Octubre 2018, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

2183 Modalidad oral.

2184

- 2185 • OPTIMIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN
2186 ESPECTROMETRÍA DE MASA PARA LA DETECCIÓN Y
2187 CUANTIFICACIÓN DE ASPARAGINA EN PLASMA.

2188 Contreras H, Zúñiga FA, Vergara C.

2189 XIII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental, y el XIV Encuentro
2190 de Química Analítica y Ambiental 2018. 12 -15 noviembre 2018, Hotel La Bahía Enjoy,
2191 La Serena, Chile.

2192 Modalidad Póster.

2193

- 2194 • OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN Y
2195 CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS PARA FINES
2196 DIAGNÓSTICO

2197 H. Contreras, P. Alarcón-Zapata, C. Vergara, F. Zúñiga.

2198 XXXIII Jornadas Chilenas de Química, Sociedad Chilena de Química. 7 – 10 enero
2199 2020, Puerto Varas, Chile.

2200 Modalidad Póster.

2201

2202 • OPTIMIZING EXTRACELLULAR VESICLES ISOLATION
2203 FOR CLINICAL DIAGNOSTIC APPLICATIONS.

2204 Contreras H, Alarcón-Zapata P, Nova-Lamperti E, Ormazabal V, Sharma S, Hooper J,
2205 Salomon C, Zúñiga FA.

2206 Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SCHCF) y Asociación Latinoamericana de
2207 Ciencias Fisiológicas (ALACF) 2020 Joint Meeting, November 2020, Chile.

2208 Modalidad oral-online.

2209

2210 • OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE VESÍCULAS
2211 EXTRACELULARES DESDE LÍQUIDOS BIOLÓGICOS PARA
2212 SU USO EN DIAGNOSTICO CLÍNICO.

2213 Contreras H, Alarcón-Zapata P, Nova-Lamperti E, Toledo K., Tapia K, Valenzuela F,
2214 Cordonier M, Acevedo M, Ormazabal V, Zúñiga F.

2215 20 Congreso Chileno de Química Clínica y Ciencias del Laboratorio. 18 y 19 de agosto
2216 2022. Hotel Intercontinental, Las Condes, Santiago, Chile.

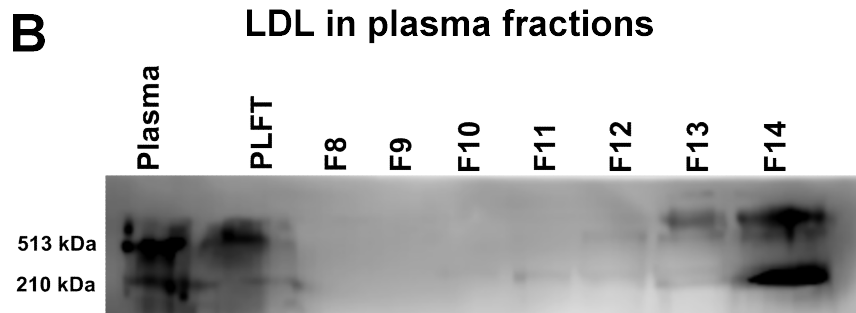
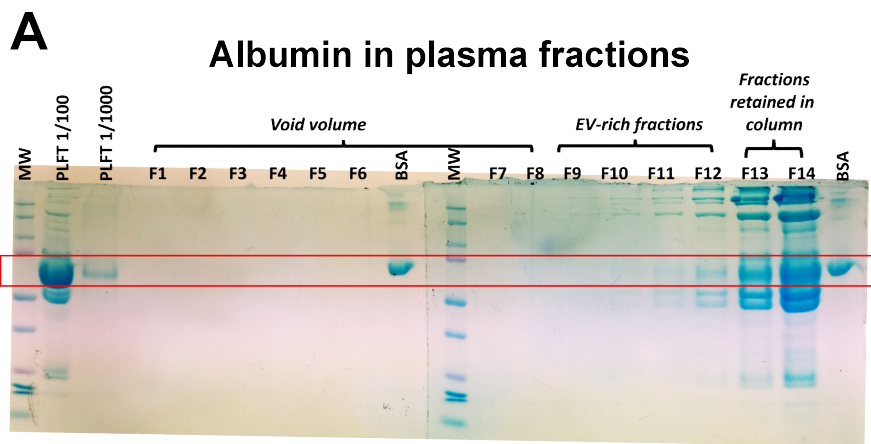
2217 Modalidad oral.

2218

2219 ANEXOS

2220 **4.2 Supplementary Figures**

2221 Comparative study of size exclusion chromatography for isolation of small
2222 extracellular vesicle from cell-conditioned media, plasma, urine, and saliva.



2223

2224 **Supplementary Figure 4.2.12:** Analysis of some major protein
2225 contaminants on EVs plasma fractions.

2226 A) Coomassie blue staining for the Albumin detection in the G200/40
2227 fractions. The red box indicates the migration zone for 67 kDa proteins. B)
2228 For the Western blot analysis, fifty microliters of the non-lysed collected
2229 fraction were loaded into 6% SDS-PAGE gel. The upper signal corresponds
2230 to ApoB-100 (513 kDa) and the lower signal to ApoB-48, 210 kD in the
2231 plasma sample. MW: molecular weight ladder; Plasma sample was diluted

2232 1:5 and used as positive control; PLFT: filtrated plasma sample (dilution
2233 1:100 and 1:1000 in A, and 1:2 in C); F1-F14, 200 μ l fractions collected
2234 from G200/40 column from plasma sample.

2235

2236

2237