

Resumen

En los últimos años, las microvesículas han sido de gran interés debido a sus características moleculares, las cuales les confieren la capacidad de actuar como mediadores de la comunicación intracelular y el intercambio de moléculas con células tanto adyacentes como distantes. Debido a esto se ha buscado implementar técnicas de análisis individualizados como la citometría de flujo para identificar, caracterizar y aislar a las microvesículas, pero su desarrollo ha sido complejo debido al tamaño (30 nm – 120 nm) de estas, el cual puede confundirse con el ruido electrónico detectado por estos equipos. Para su correcto análisis es necesario obtener muestras enriquecidas en microvesículas y con la menor cantidad de contaminantes. Tanto las células sanas como las células tumorales poseen la capacidad de liberar microvesículas, por lo cual es posible encontrarlas en los biofluidos, específicamente en plasma humano. Para poder realizar estudios de pacientes con posibles características metastásicas es necesario aislar las microvesículas plasmáticas provenientes de las células tumorales para su análisis. El estudio de microvesículas provenientes de plasma humano no es trivial ya que en este plasma encontramos diversas moléculas que dificultan el aislamiento de las microvesículas. Debido a la complejidad de la muestra y a la necesidad de la mayor pureza es necesario elegir un método de aislamiento previo que permita la reducción de posible contaminantes co-purificados con las microvesículas con las metodologías convencionales.

Objetivo

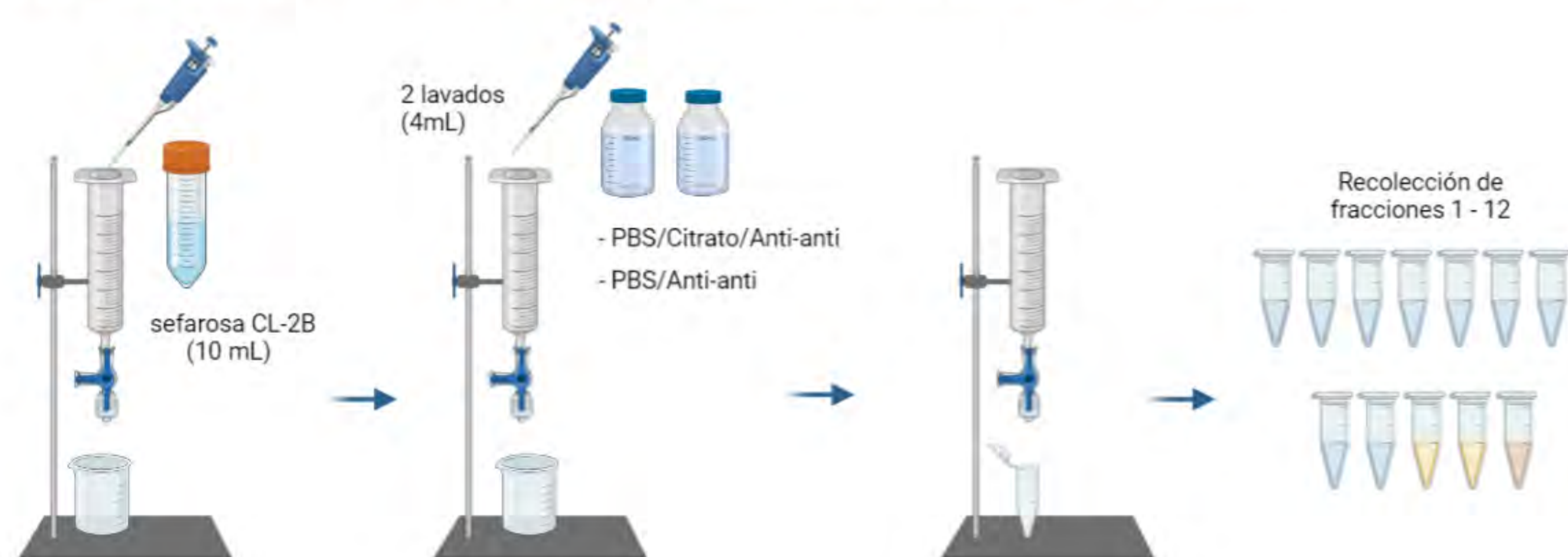
Estandarizar una metodología óptima para el aislamiento y purificación de microvesículas provenientes de plasma humano, priorizando el enriquecimiento de microvesículas, así como la menor contaminación por lipoproteínas y otros componentes presentes en el plasma, para obtener las mejores condiciones para el análisis por citometría de flujo.

Metodología

Procesamiento de la muestra



Cromatografía de exclusión molecular para aislamiento de microvesículas menores a 70 nm



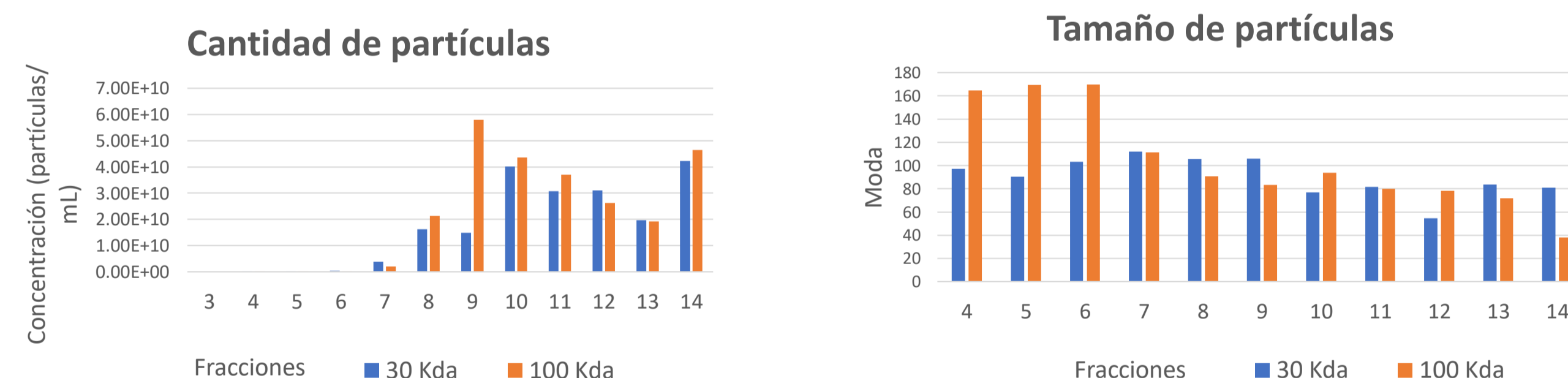
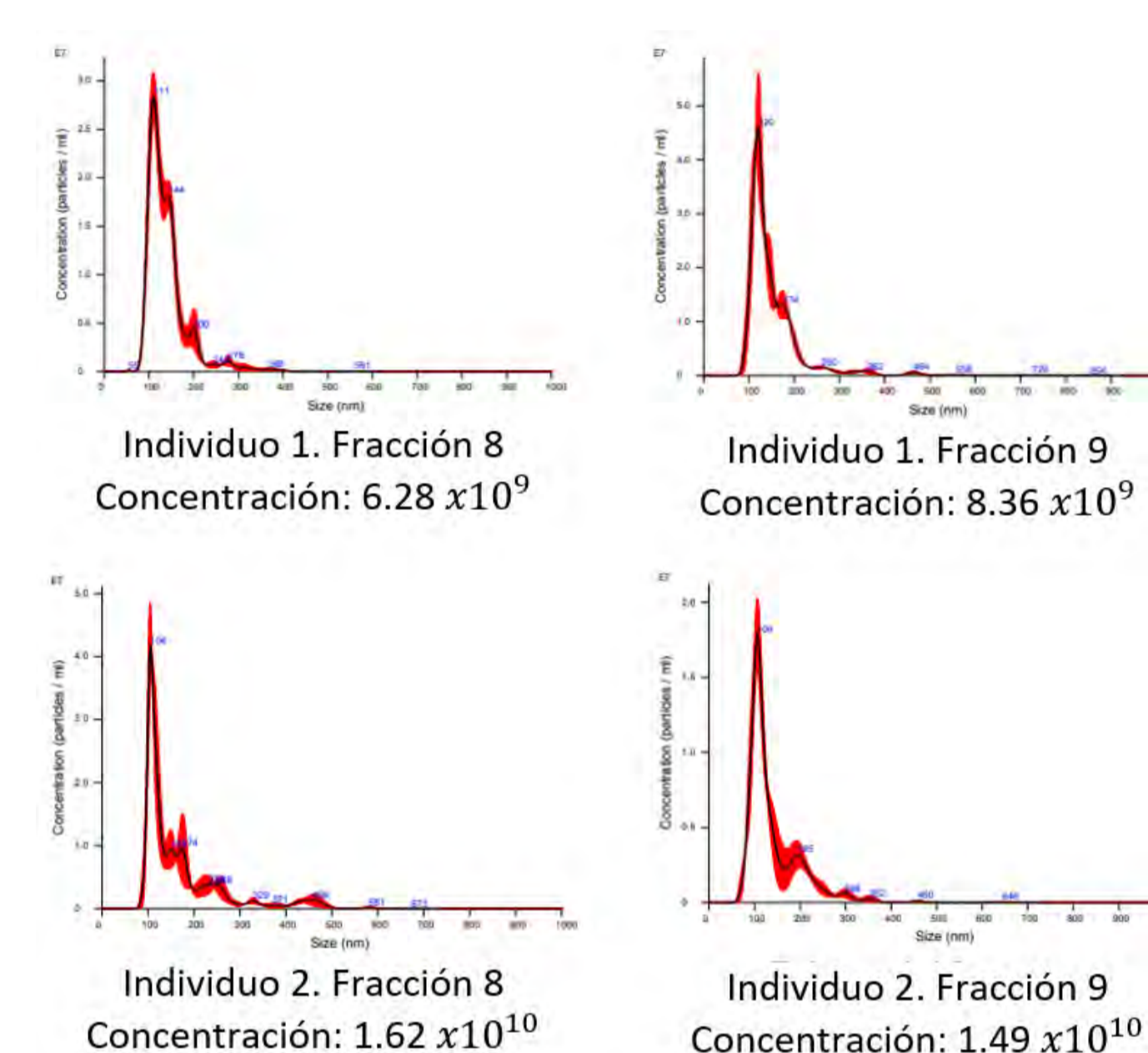
Análisis de microvesículas

- Análisis de Rastreo de Partículas (NTA)
- Western Blot
- Citometría de flujo
- Microscopía electrónica de barrido (TEM)

Resultados

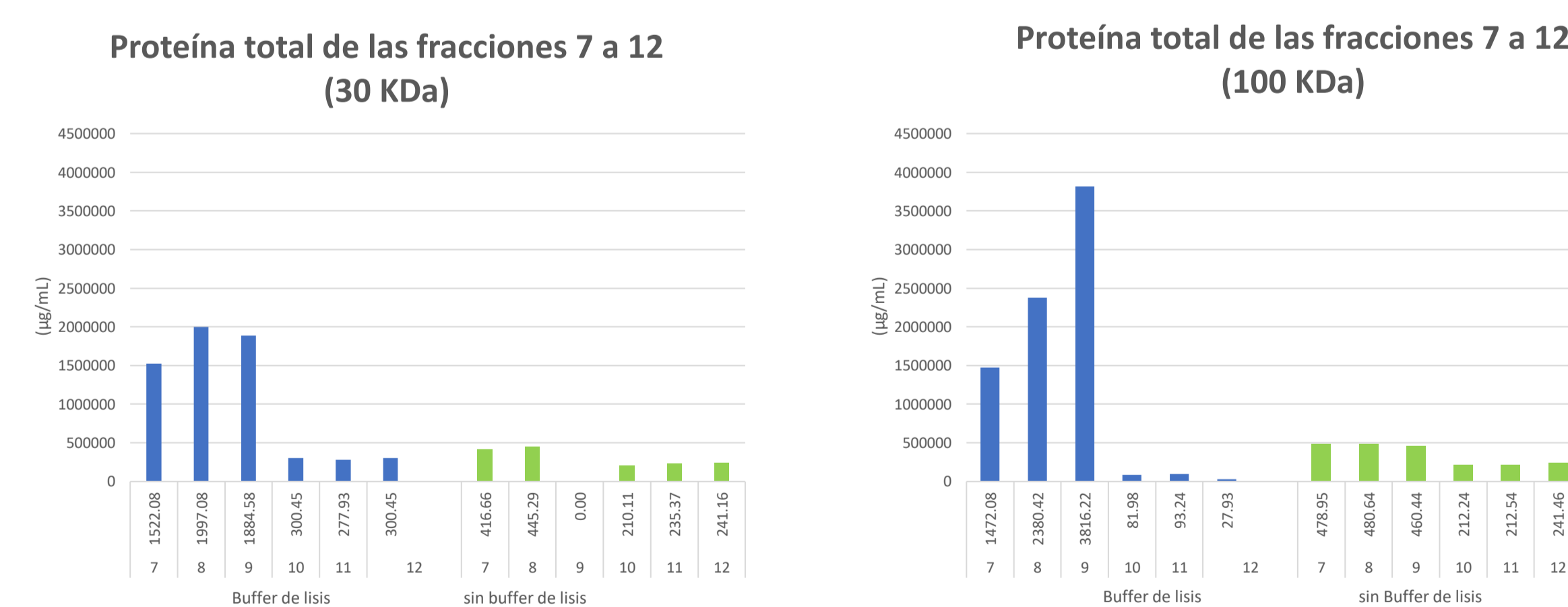
Análisis por NTA

Las microvesículas son visibles a partir de la fracción 7, pero se ven enriquecidas en las fracciones 8 y 9. En fracciones posteriores están presentes de igual forma, pero también encontramos partículas del tamaño de las lipoproteínas. El tamaño promedio de las partículas encontradas es menor a 120 nm usando el poro de 30 KDa a diferencia del poro de 100 KDa donde encontramos partículas de hasta 170 nm.



Cuantificación de proteína total

En microvesículas tratadas con Buffer de lisis se observa una mayor cantidad de proteínas a diferencia de las microvesículas que poseen su membrana lipídica intacta.



Discusión y conclusiones

En base a los experimentos realizados se puede determinar que las fracciones con mayor enriquecimiento de microvesículas son la 8, 9 y 10. La combinación de la ultrafiltración y la columna de exclusión molecular permite un aislamiento de microvesículas óptimo. Es necesario utilizar un poro menor a 100 KDa para lograr el mayor enriquecimiento de estas y una menor contaminación con moléculas co-aisladas como lipoproteínas.

Hay un aumento significativo en la cantidad de proteína encontrada posterior al uso de buffer de lisis, lo cual sugiere que la mayor cantidad proteica se encuentra dentro de las microvesículas.

Aún es necesario validar la presencia de lipoproteínas mediante otras técnicas específicas.