



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE**  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de Integración Curricular

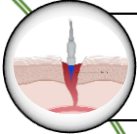

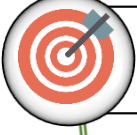

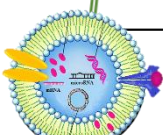


**“Evaluación del efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.), a nivel In vitro en células HaCaT.”**

**Autora:** Erazo Muñoz, Jatari Kashi  
**Directora:** Torres Arias Marbel, Ph.D.

Sangolquí, 04 de septiembre de 2023



# Índice de contenidos

-  Introducción
-  Justificación
-  Objetivos e hipótesis
-  Materiales y métodos
-  Resultados y discusión
-  Conclusiones
-  Recomendaciones

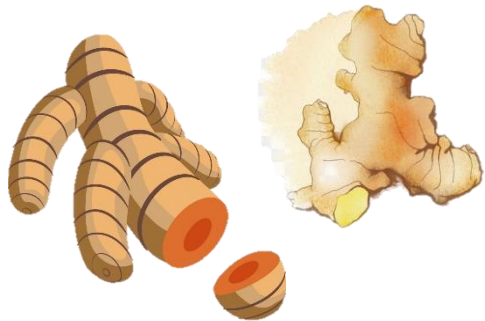
# Introducción



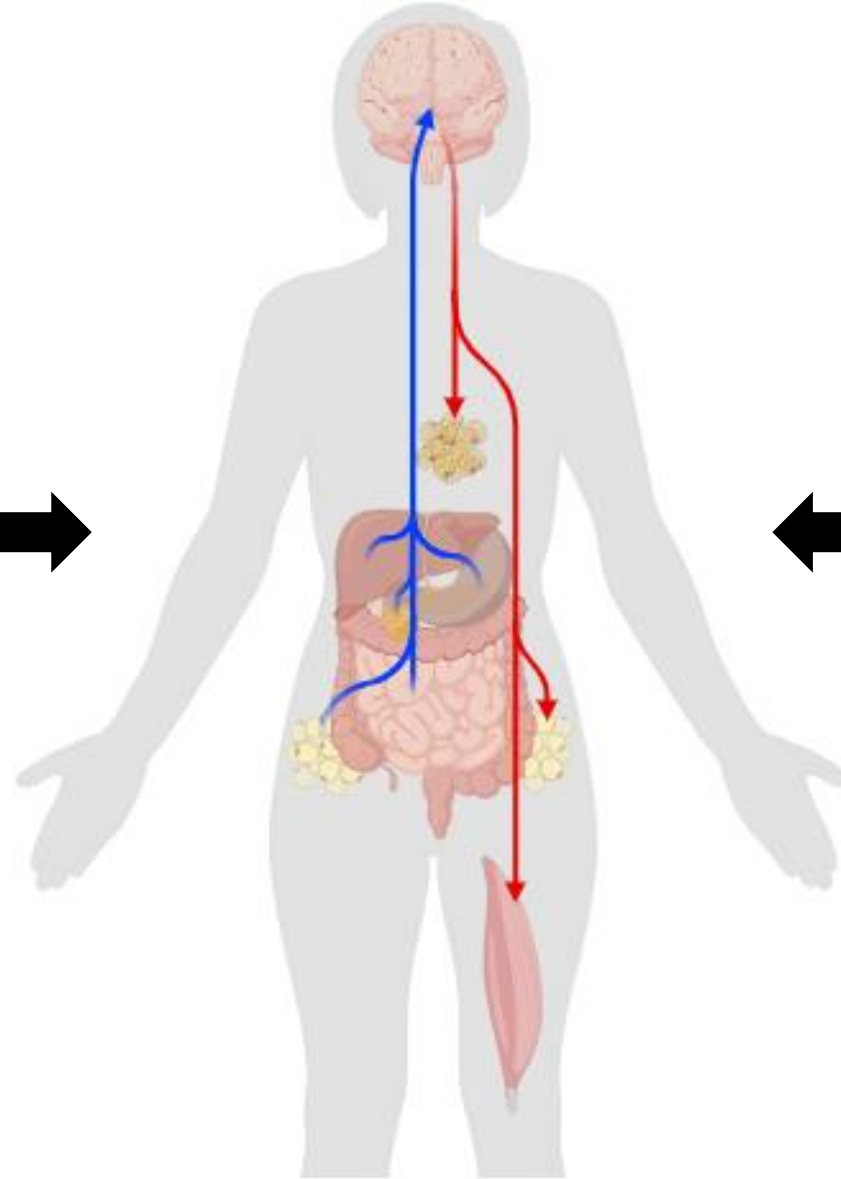
Tomate de árbol



Uvilla



Cúrcuma/Jengibre



Naranjilla



Mortiño



Capulí

(Martínez, 2022; Sánchez, 2022; Vera, 2022)



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

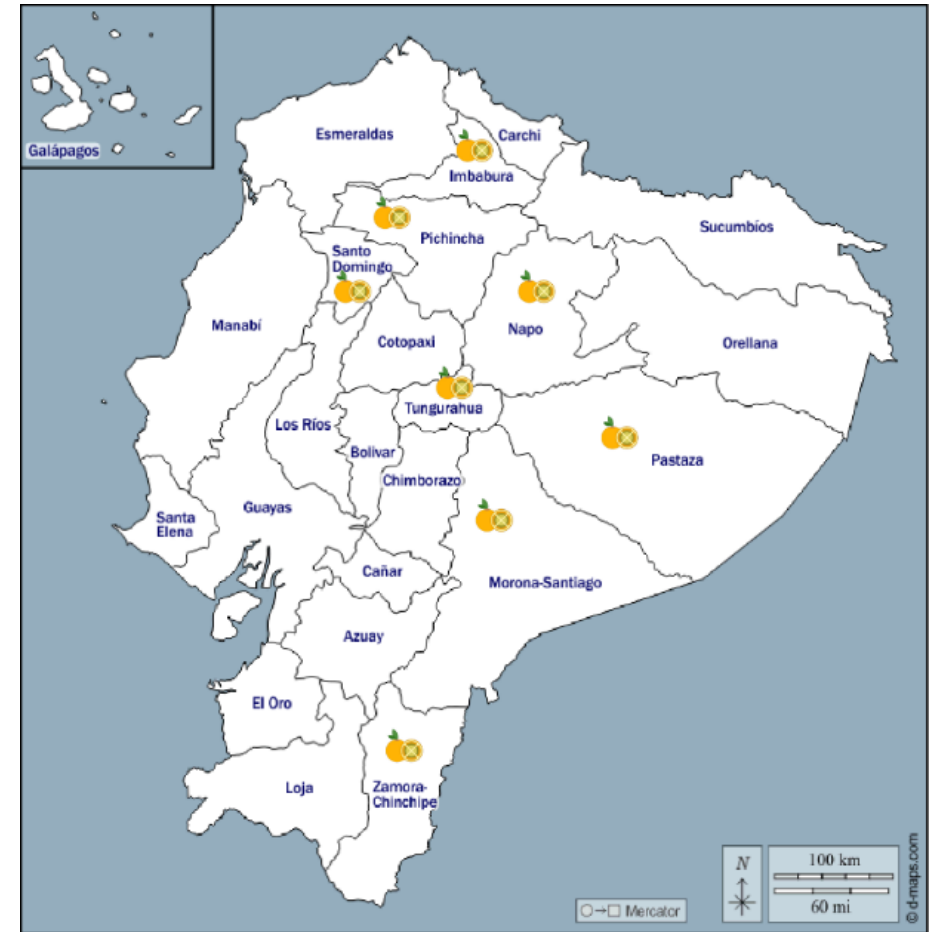
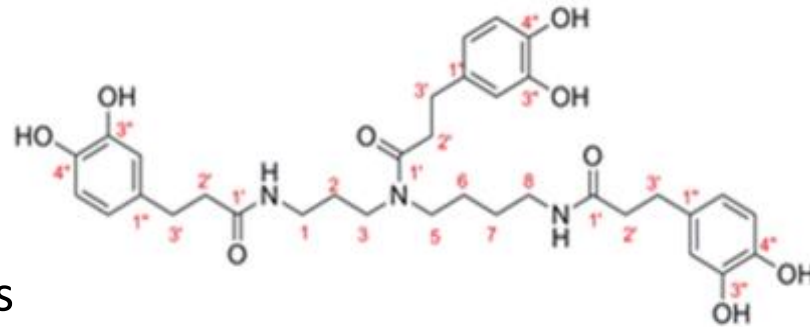
# Introducción

## *Solanum quitoense* Lamarck (naranjilla)



### Poliaminas

- Proliferación
- Expresión génica
- Señalización celular
- Diferenciación celular
- Modulación reacciones inflamatorias



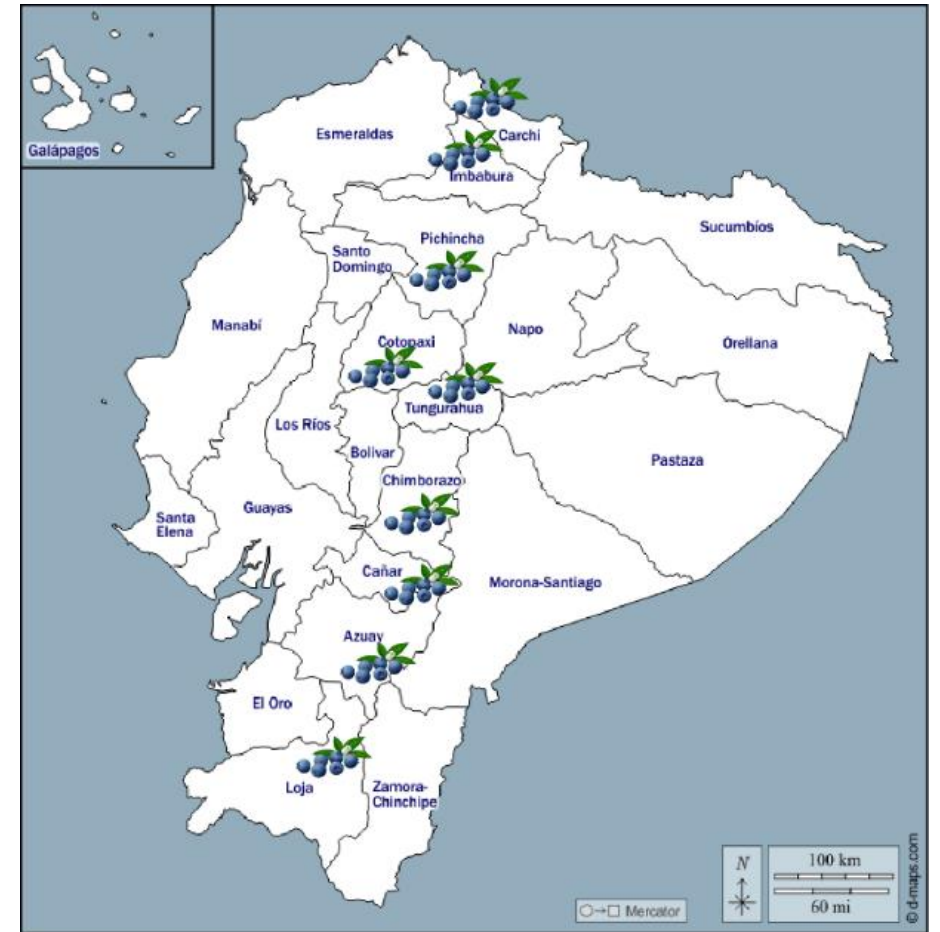
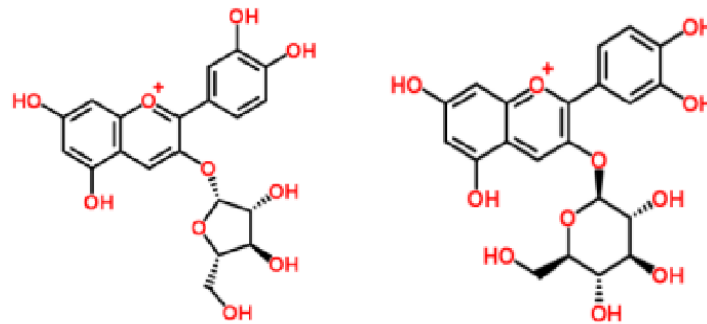
# Introducción

## *Vaccinium meridionale* Swartz (mortiño)



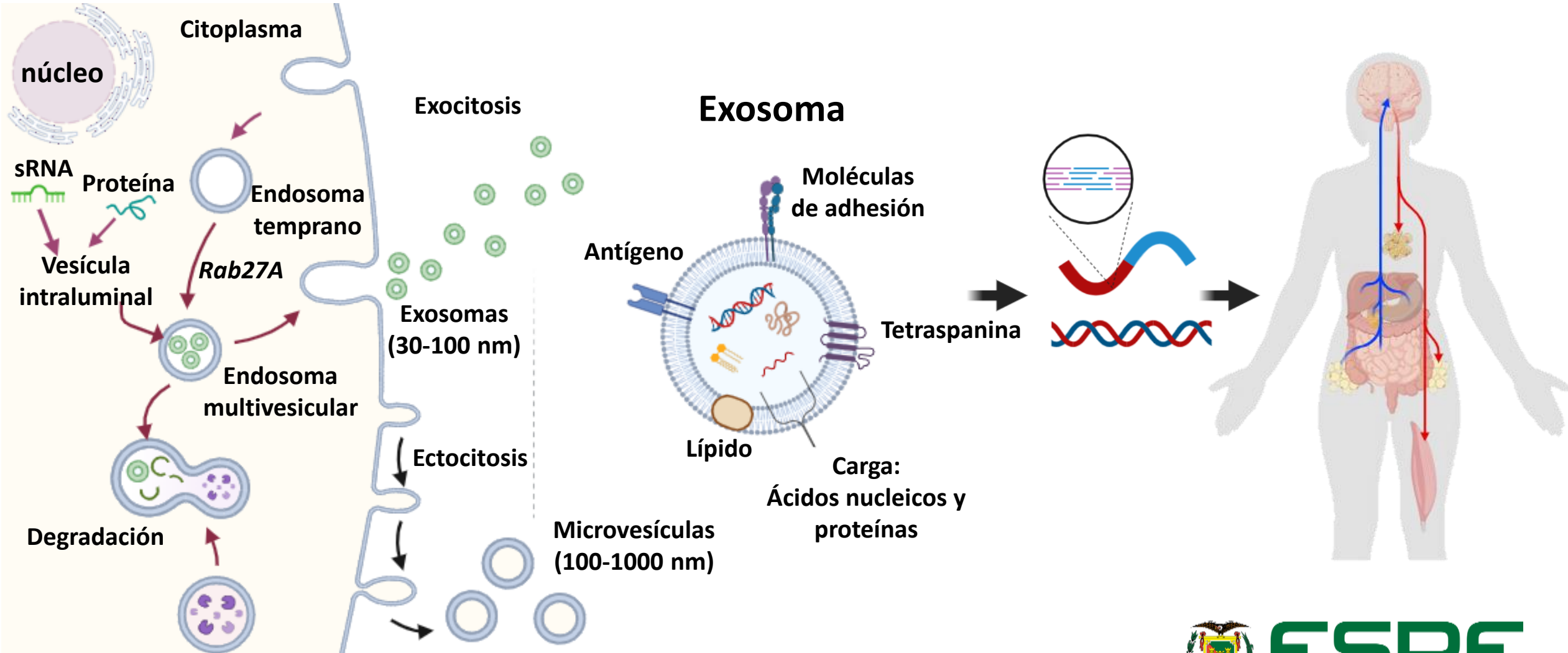
### Flavonoides y polifenoles

- Antioxidantes
- Eliminadores ROS
- Antiinflamatorios
- Antimicrobianos
- Antiproliferativos células cancerígenas



# Introducción

## Biogénesis vesículas extracelulares



(Dad et al., 2021; Martínez, 2022; Janas et al., 2015)



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# Introducción

## Biomarcadores de exosomas



Proteínas  
CD63, CD69

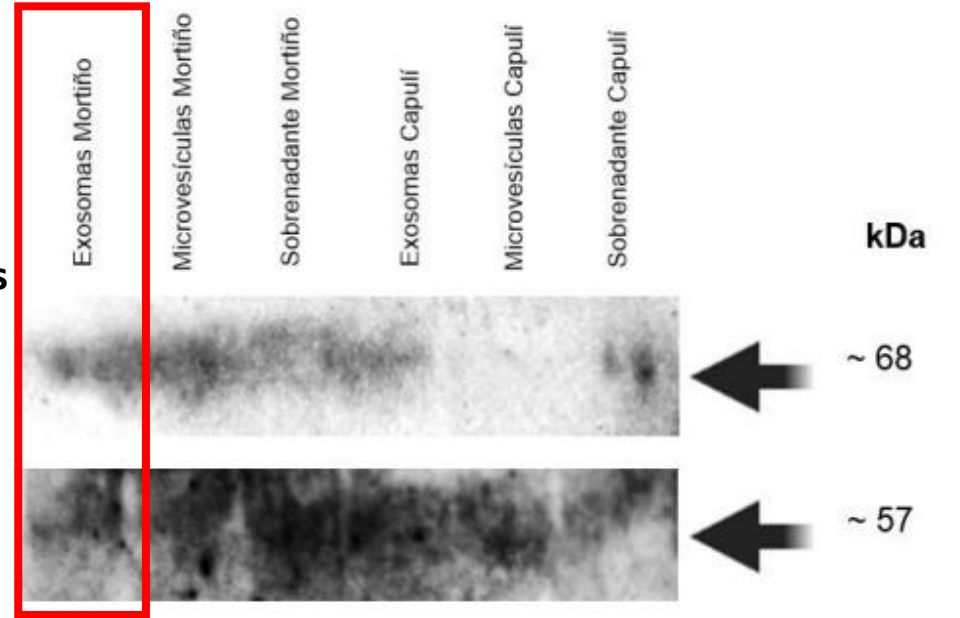


Proteínas CD63,  
CD81, ALIX

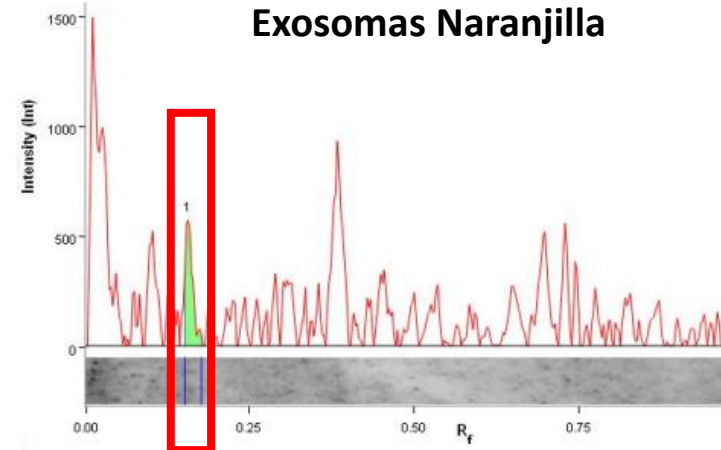
Tetraspaninas

anti - CD63  
(23-60 kDa)

anti - CD69  
(60 kDa)

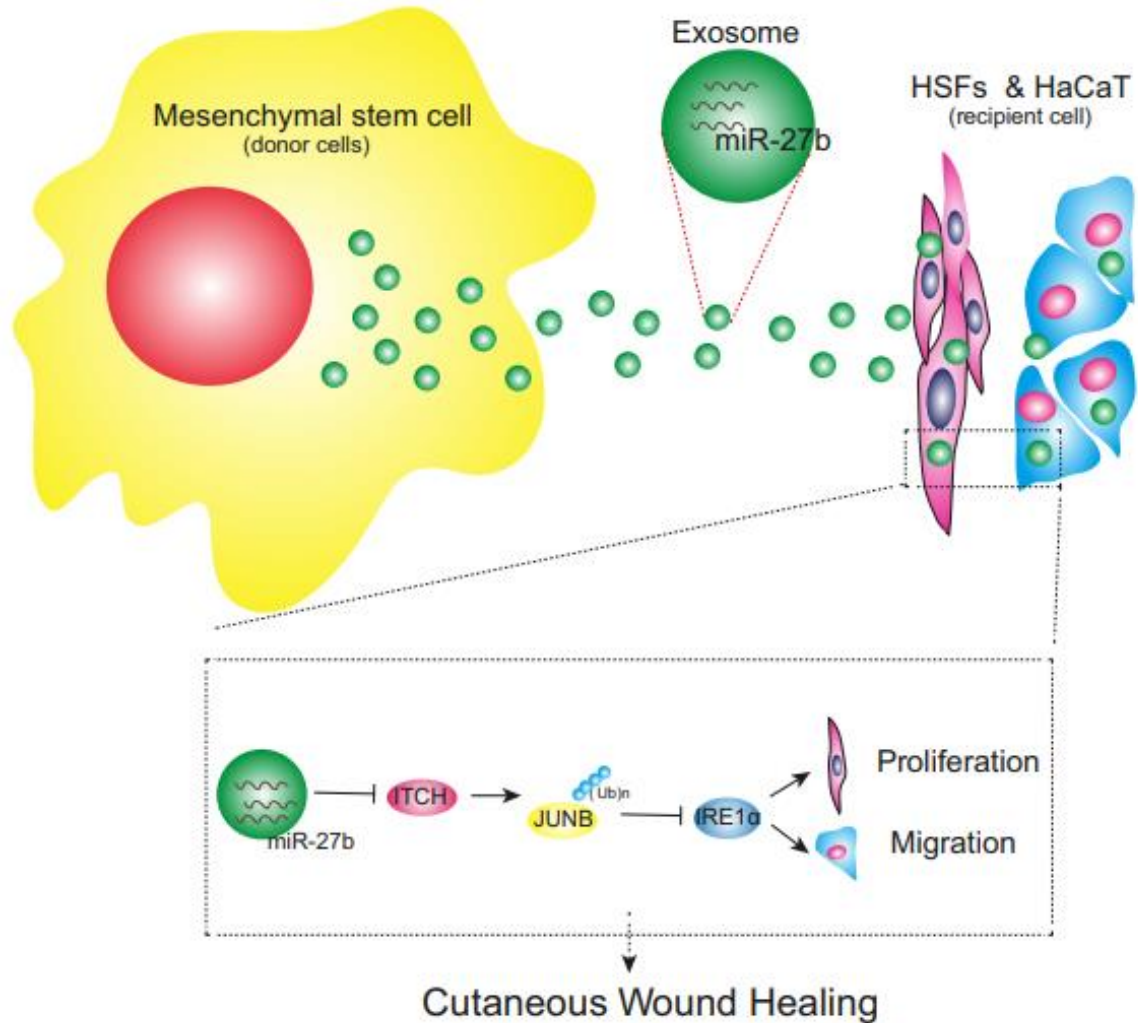


Proteína ALIX

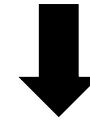


# Introducción

## Efecto angiogénico de los exosomas



Angiogénesis



Proliferación y migración de células endoteliales

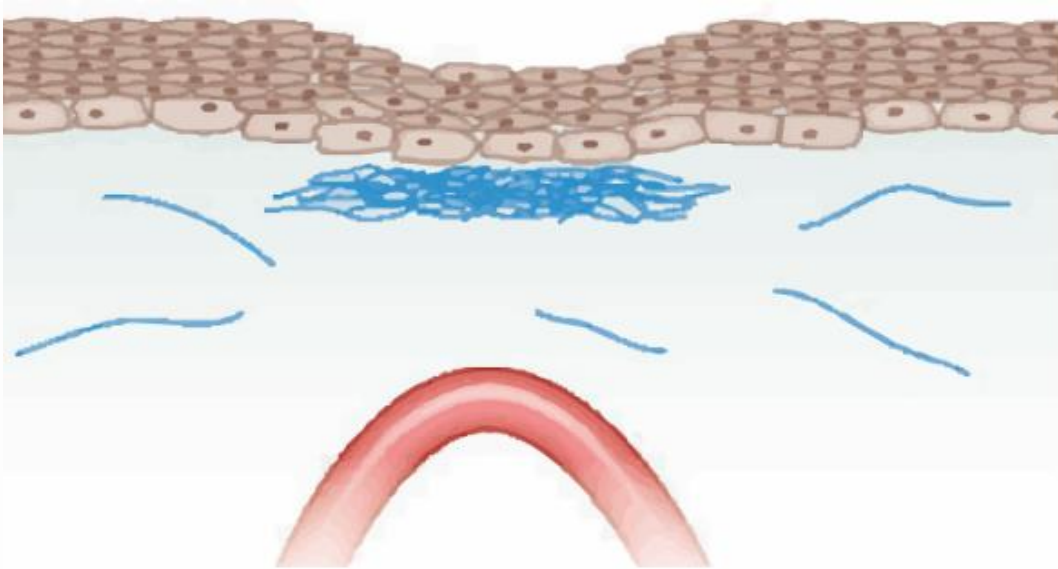


Factores VEGF y FGF

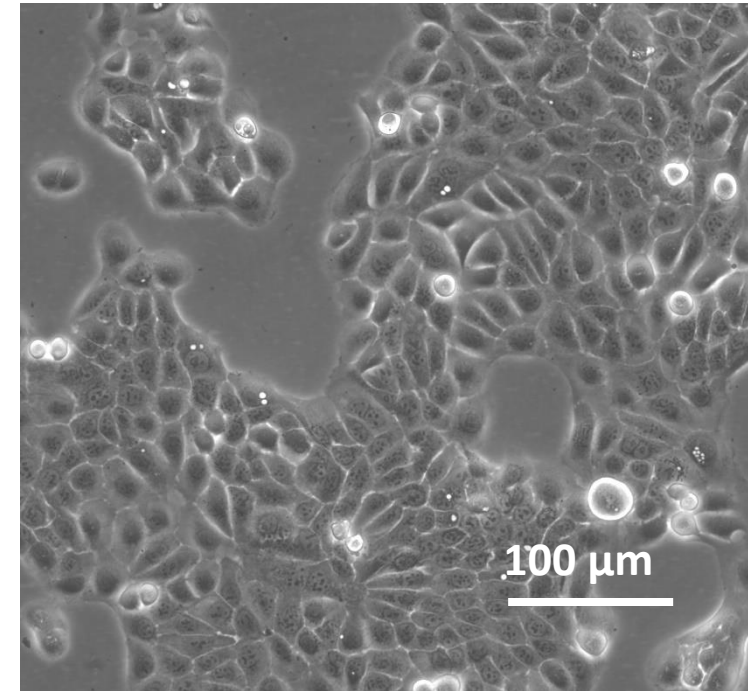


# Introducción

## Reparación de tejidos

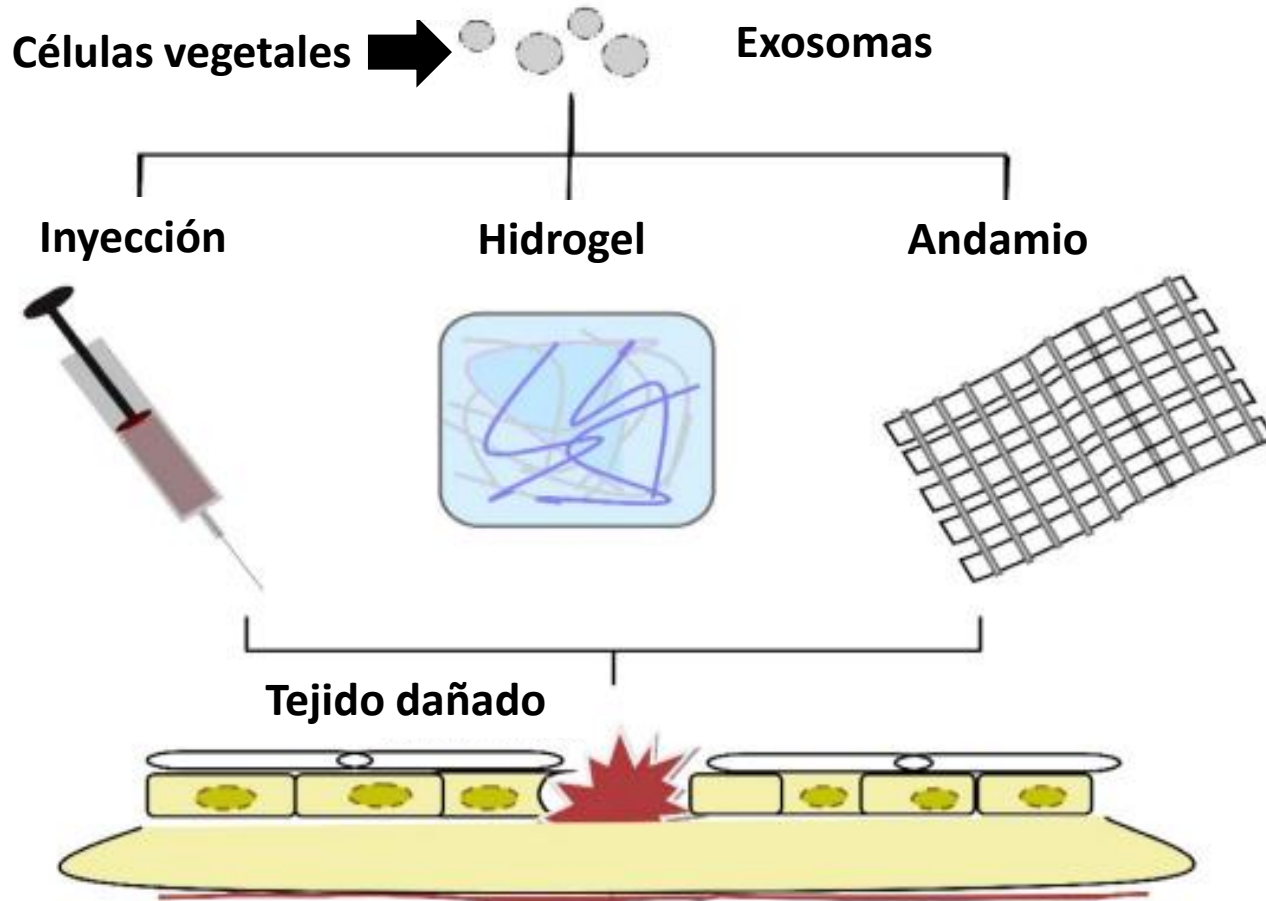


## Células HaCaT (queratinocitos epidérmicos humanos)

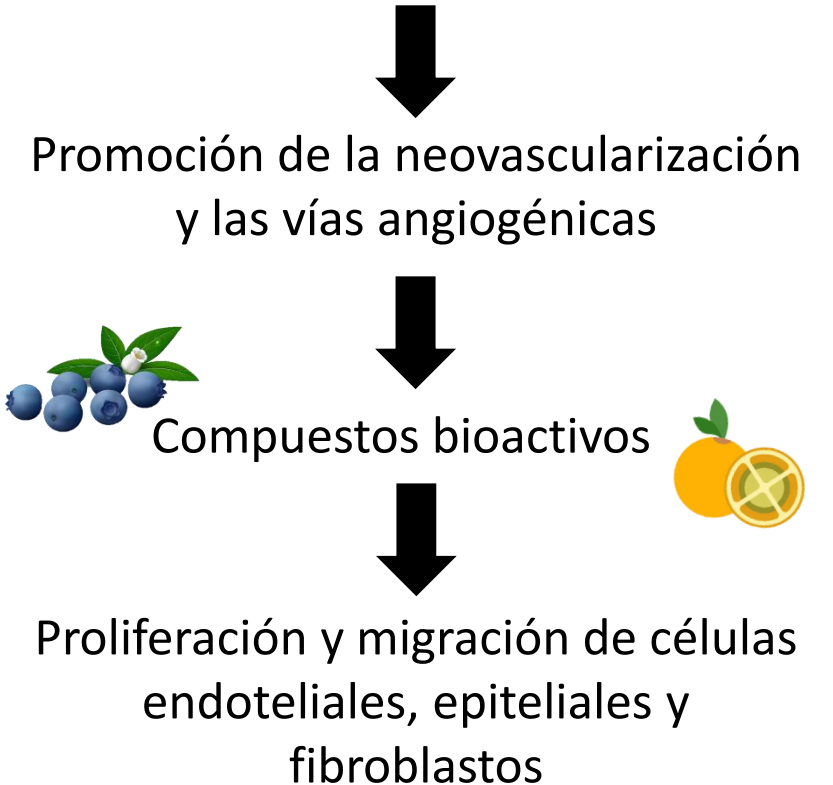


# Justificación

## Aplicación de exosomas



## Ingeniería de tejidos



# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar el efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas: naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae), a nivel *in vitro* en células HaCaT.

## Objetivos específicos

Obtener exosomas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) por medio de cromatografía por exclusión de tamaño para su cuantificación y observación



Determinar el efecto angiogénico a partir de la exposición de los exosomas de las frutas naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) en la línea celular HaCaT mediante ensayo de scratch, para comprobar si promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos en un entorno celular controlado.



Extraer RNAs de exosomas de las frutas naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) con fenol e isotiocianato de guanidina para su posterior análisis y cuantificación.



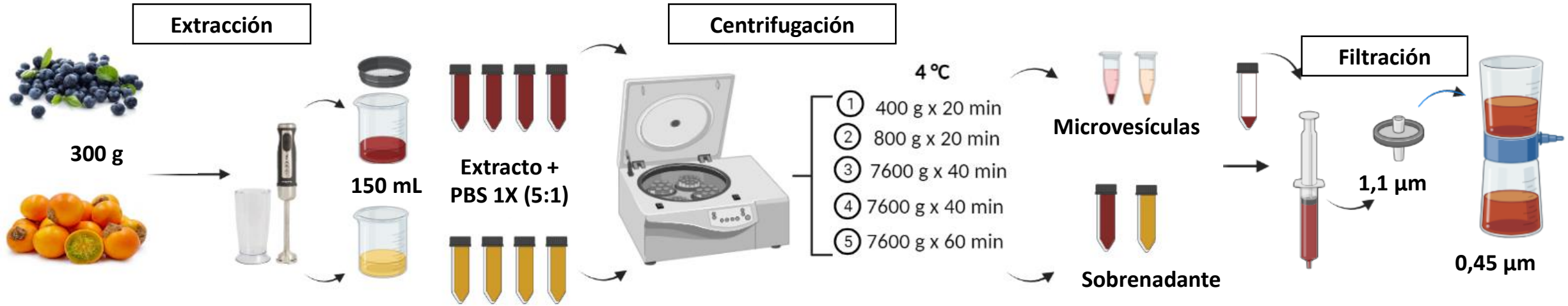
## Hipótesis

Los exosomas derivados de las frutas naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) tienen un mayor potencial terapéutico que los exosomas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) en procesos de cicatrización de heridas cutáneas a nivel *in vitro*.

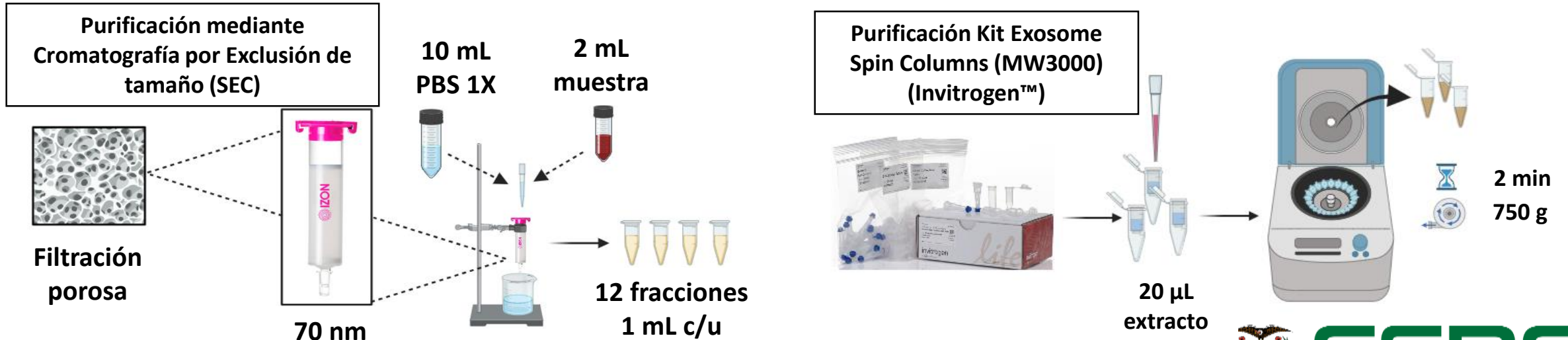


# Metodología

## Extracción de exosomas

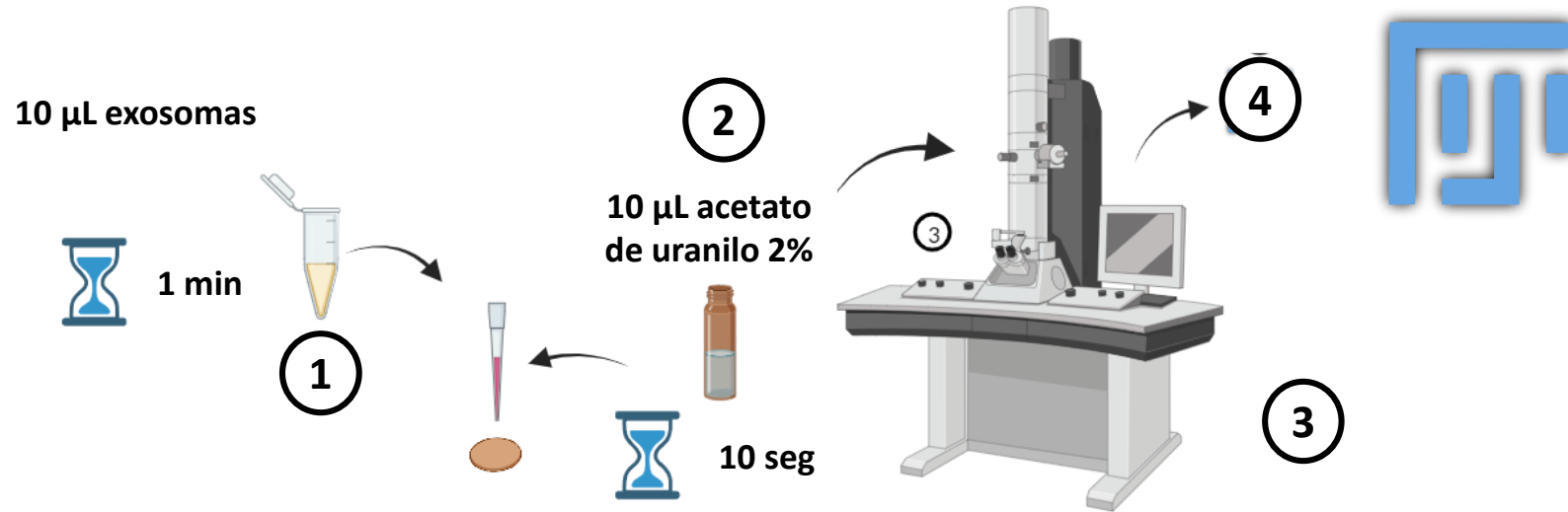


## Purificación

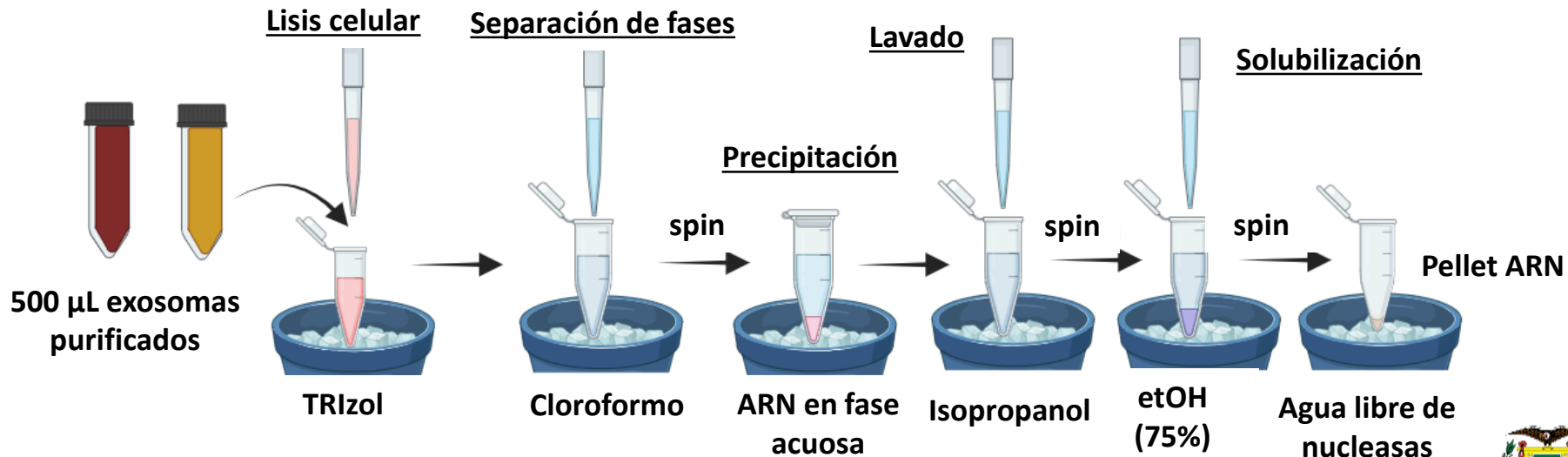


# Metodología

## Caracterización de exosomas mediante TEM

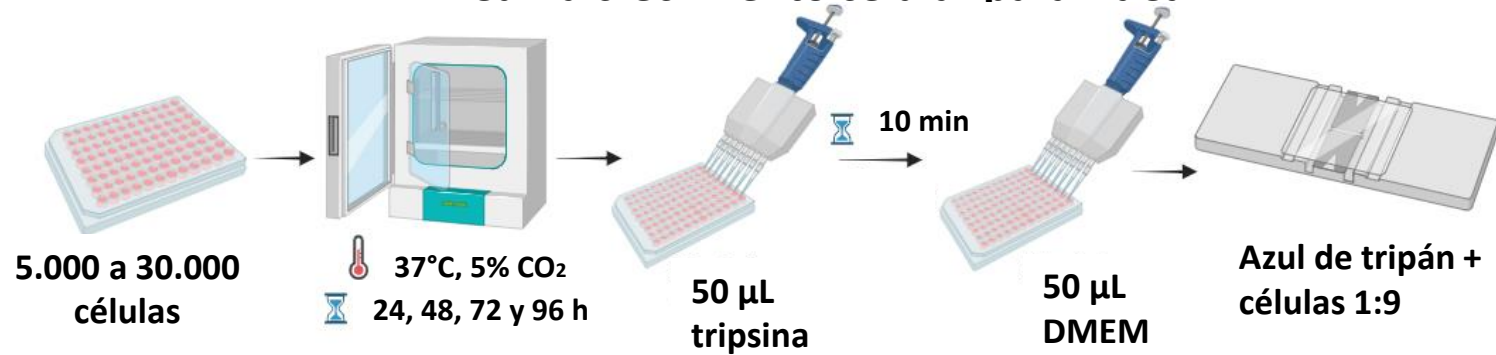


## Extracción RNA mediante TRizol

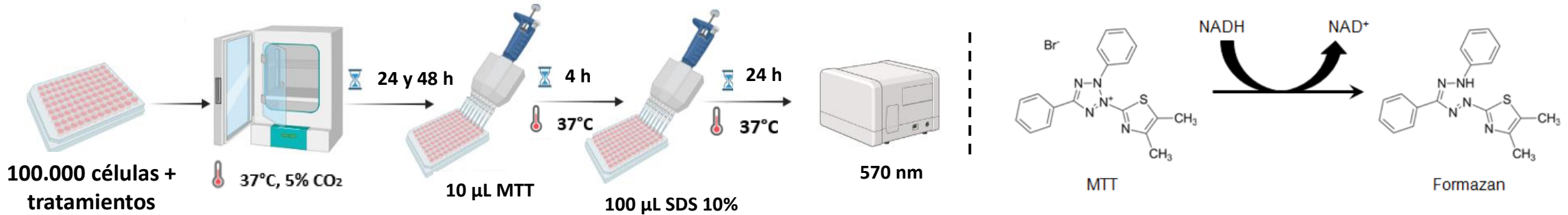


# Metodología

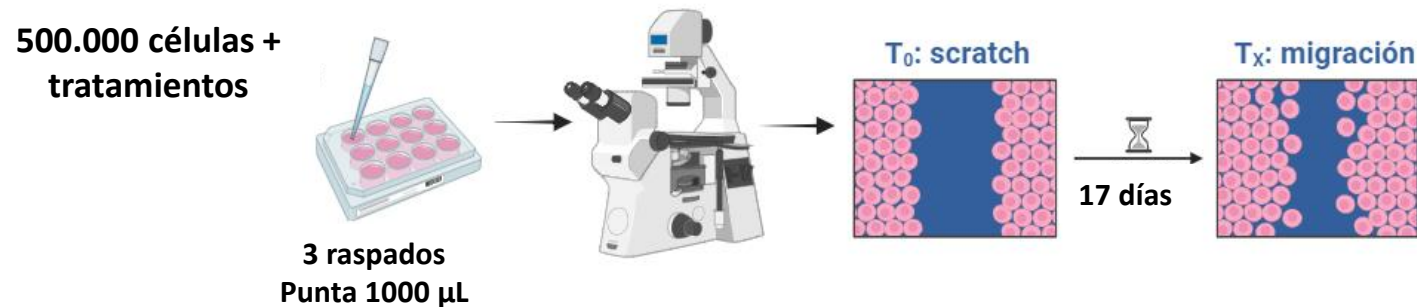
## Curva crecimiento celular para HaCaT



## Ensayo de MTT



## Ensayo de Scratch



# Resultados y discusión

## Purificación de exosomas

- Exosomas naranjilla
- Exosomas mortiño

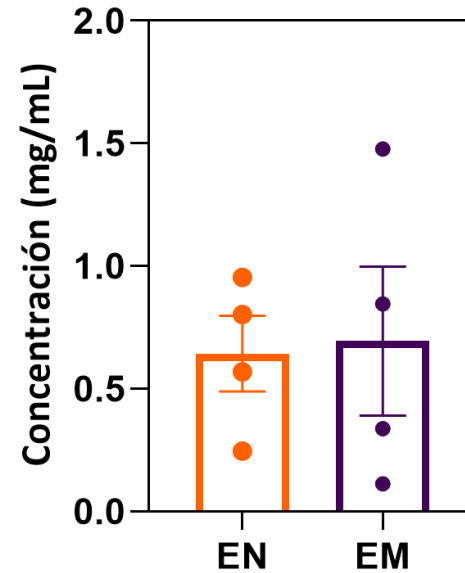
### Kit

- ✓ Eliminación sales
- ✓ Eliminación de contaminantes (<3000 MW)

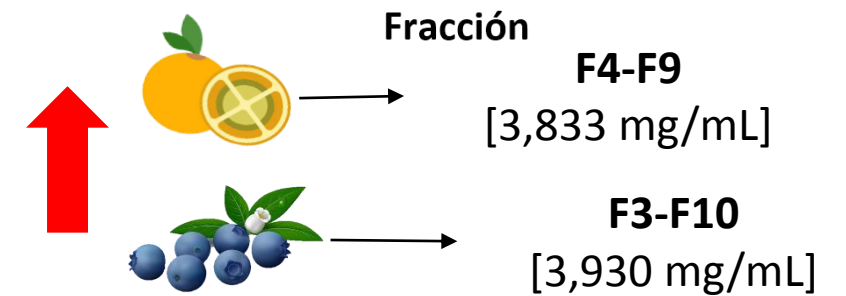
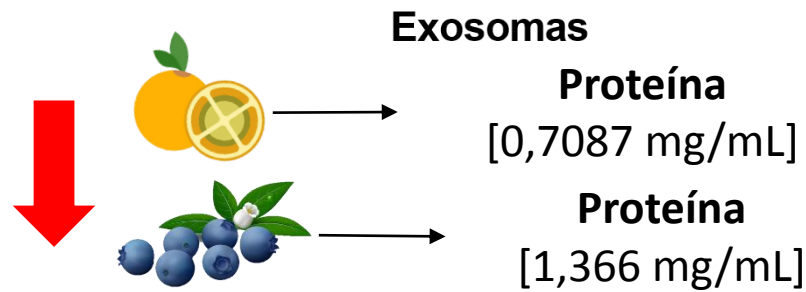
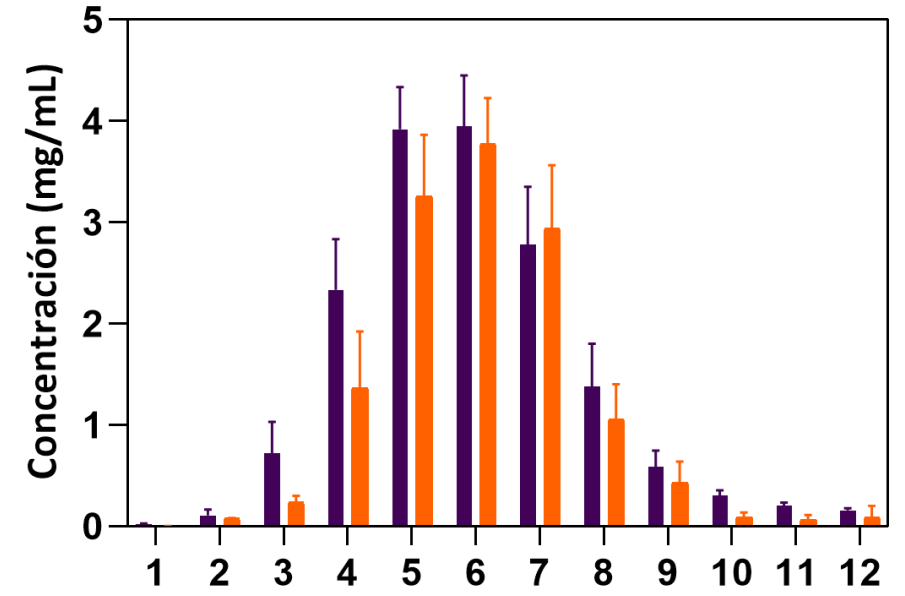
### SEC

- ✓ Depuración intensa
- ✓ Recuperación limitada

### Purificación por kit



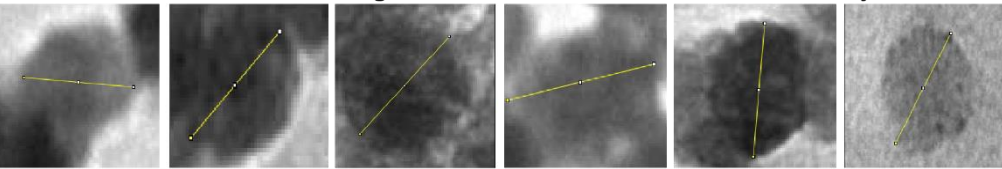
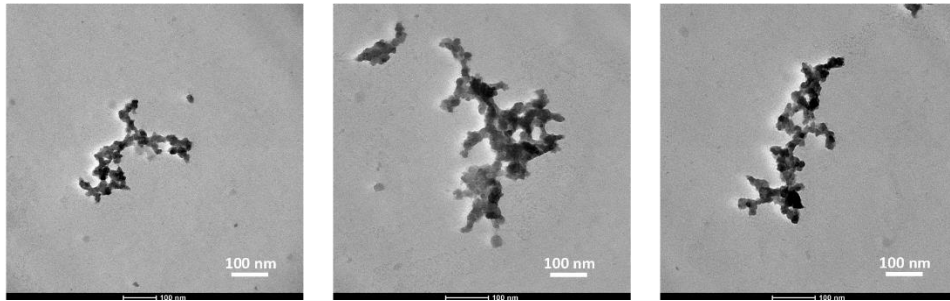
### Purificación SEC



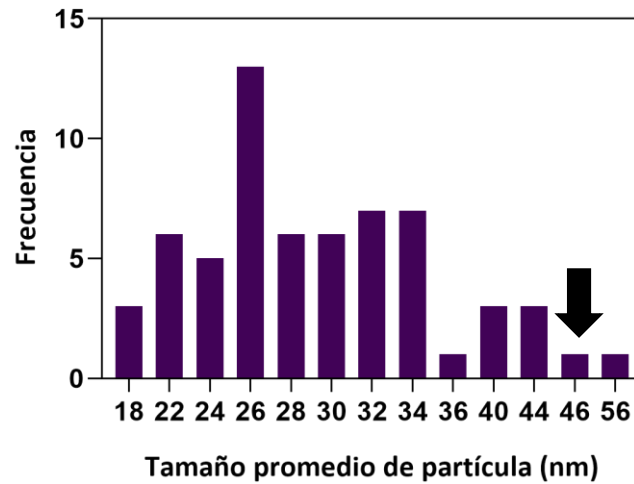
# Resultados y discusión

## Caracterización de exosomas mediante TEM

Exosomas morriño



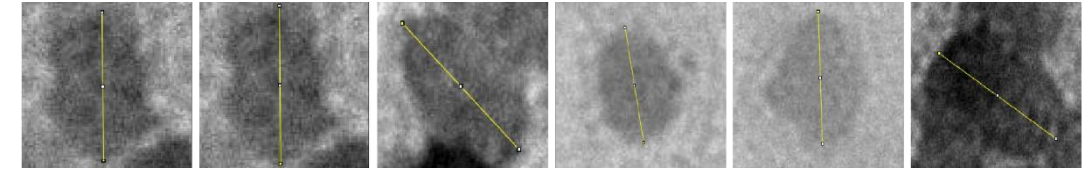
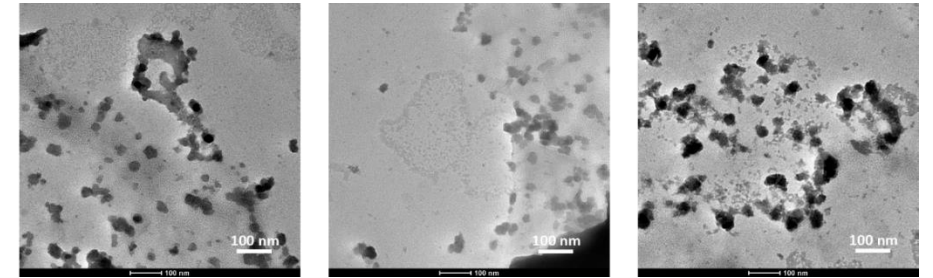
Histograma de tamaño de EM



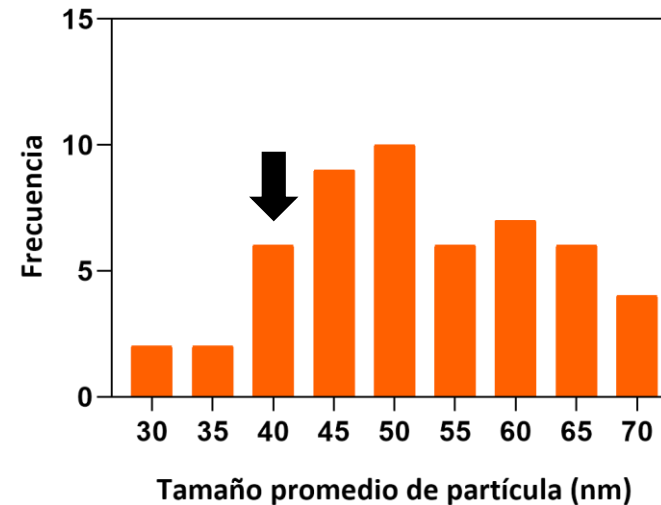
Longitud  
18-56 nm



Morfología  
semiesférica  
ovalada hueca



Histograma de tamaño de EN



Longitud  
30-70 nm



Exosomas naranjilla

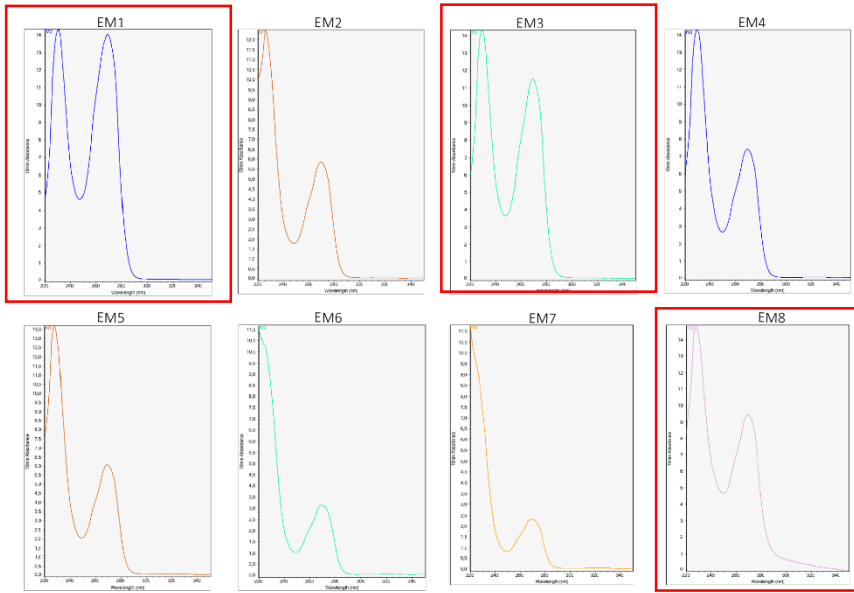


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



# Resultados y discusión

## RNA a partir de exosomas de mortiño



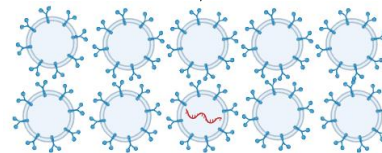
Cuantificación de RNAs

Sample ID	Nucleic Acid (ng/μL)	260/280	260/230
EM1	422	2,17	0,74
EM2	157,5	1,77	0,37
EM3	323,9	2,01	0,57
EM4	201,8	1,86	0,35
EM5	163,3	1,79	0,31
EM6	83,6	1,69	0,26
EM7	61,7	1,67	0,21
EM8	277,3	1,61	0,49

A230  
 ✓ Proteínas en estado plegado  
 ✓ Incorporación de sustancias y moléculas activas

miARNs, ARNs, ARNt, ARNm, ARNr y ARNs largos no codificantes

1 molécula sRNA/10 exosomas

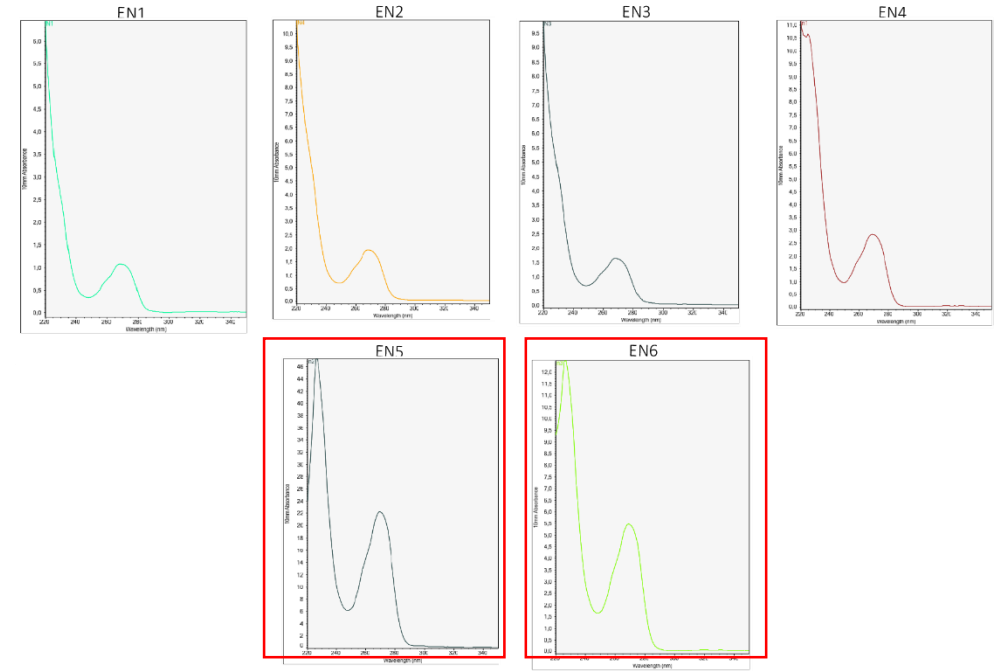


Enfoque qEV

sRNA 15 nt

ARN ribosomal escaso o nulo

## RNA a partir de exosomas de naranjilla



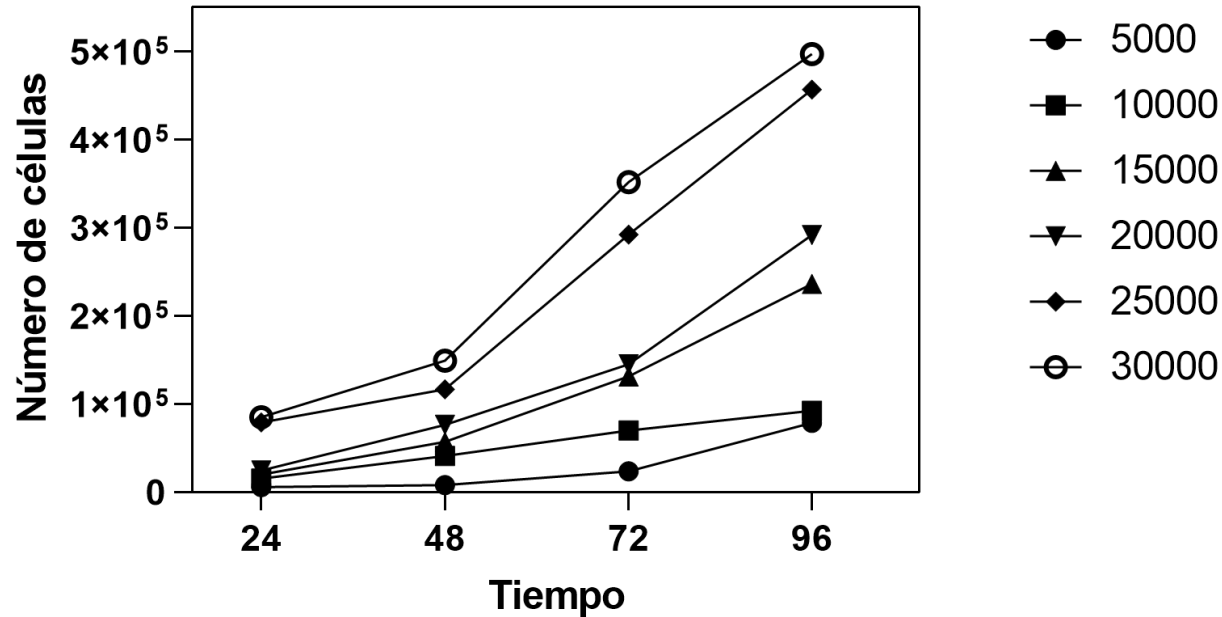
Cuantificación de RNAs

Sample ID	Nucleic Acid (ng/μL)	260/280	260/230
EN1	28,6	1,65	0,28
EN2	52,5	1,66	0,26
EN3	46,3	1,68	0,25
EN4	74,8	1,69	0,22
EN5	577,3	1,6	0,35
EN6	146	1,77	0,33

# Resultados y discusión

## Curva de crecimiento celular

### Crecimiento de células HaCaT



### Aumento en crecimiento celular vs Tiempo de cultivo

- ✓ Adaptación de las células al medio de cultivo
- ✓ Proliferación celular
- ✓ Elevada densidad celular
- ✗ Factores de estrés significativos

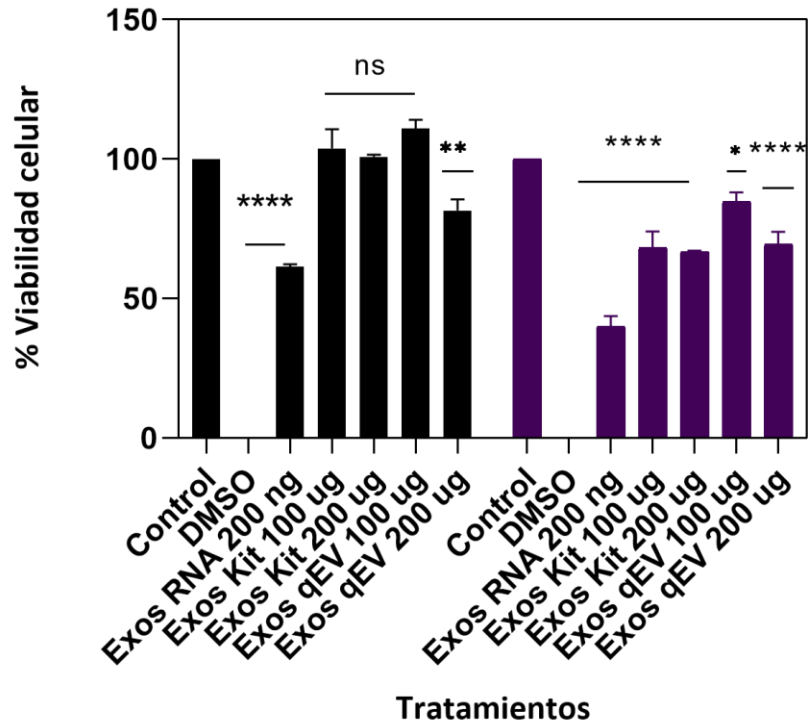
Modelo de crecimiento exponencial



Tiempo (h)	Ec. exponencial	R <sup>2</sup>
24	$y=52921e^{0,407X}$	0,9069
48	$y=20336e^{0,511X}$	0,933
72	$y=8785,5e^{0,5183X}$	0,9309
96	$y=4119,9e^{0,5255X}$	0,8831

# Resultados y discusión

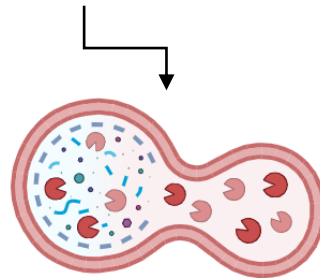
MTT EM



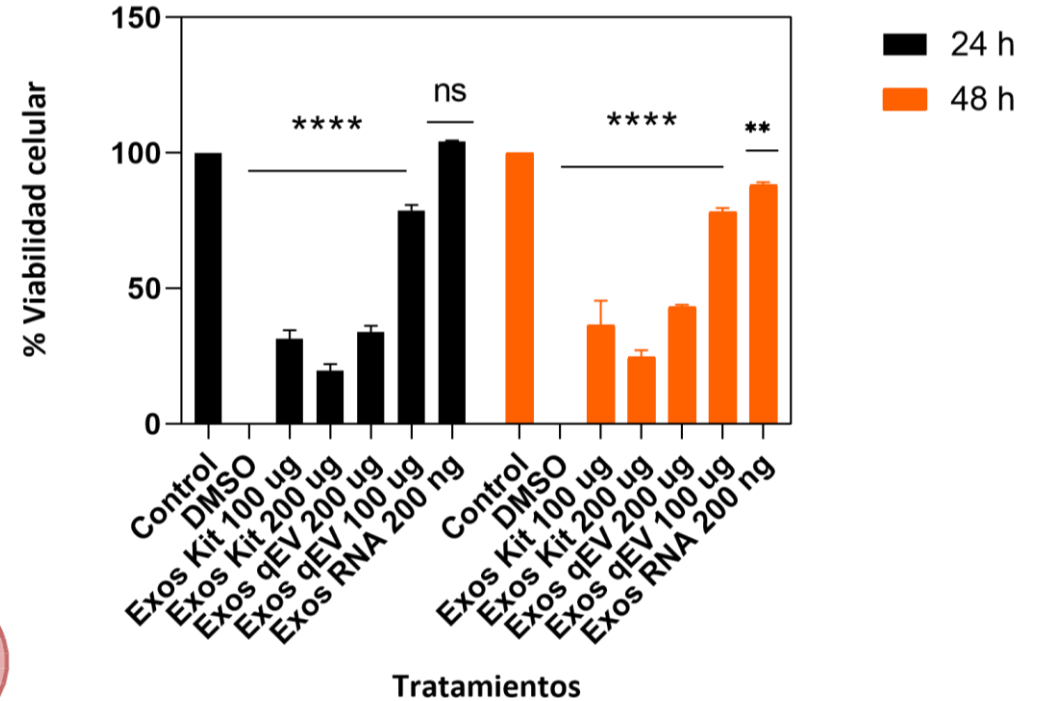
Citotoxicidad mediante MTT

24 h  
48 h

Procesos de  
autofagia



MTT EN



Disminución de la viabilidad en células dependiente de la concentración y el tiempo

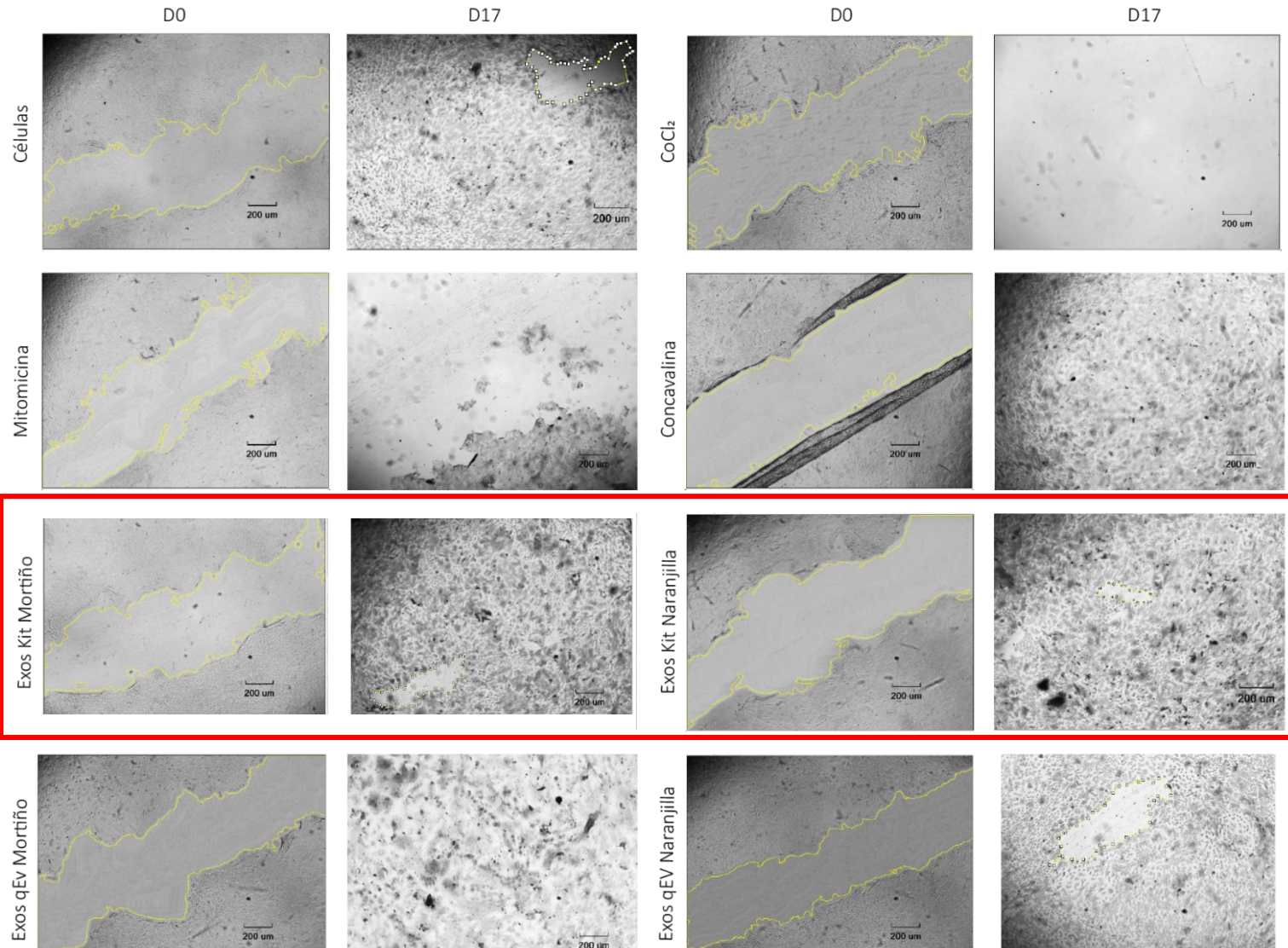
Disminución de la viabilidad en células dependiente de la concentración

Análisis estadístico: media ± SEM, ANOVA de dos vías.  
\*p=0,0224, \*\*p=0,0050, \*\*\*p=0,0001, \*\*\*\* p<0,0001, NS

(Baixauli et al., 2014; Guo & Lee, 2014; Martínez, 2022; Sánchez, 2022; Zhang et al., 2016)

# Resultados y discusión

Promedio área de raspado: 0.21 mm



Ensayo de Scratch



Activación de queratinocitos



EGFR y VEGF



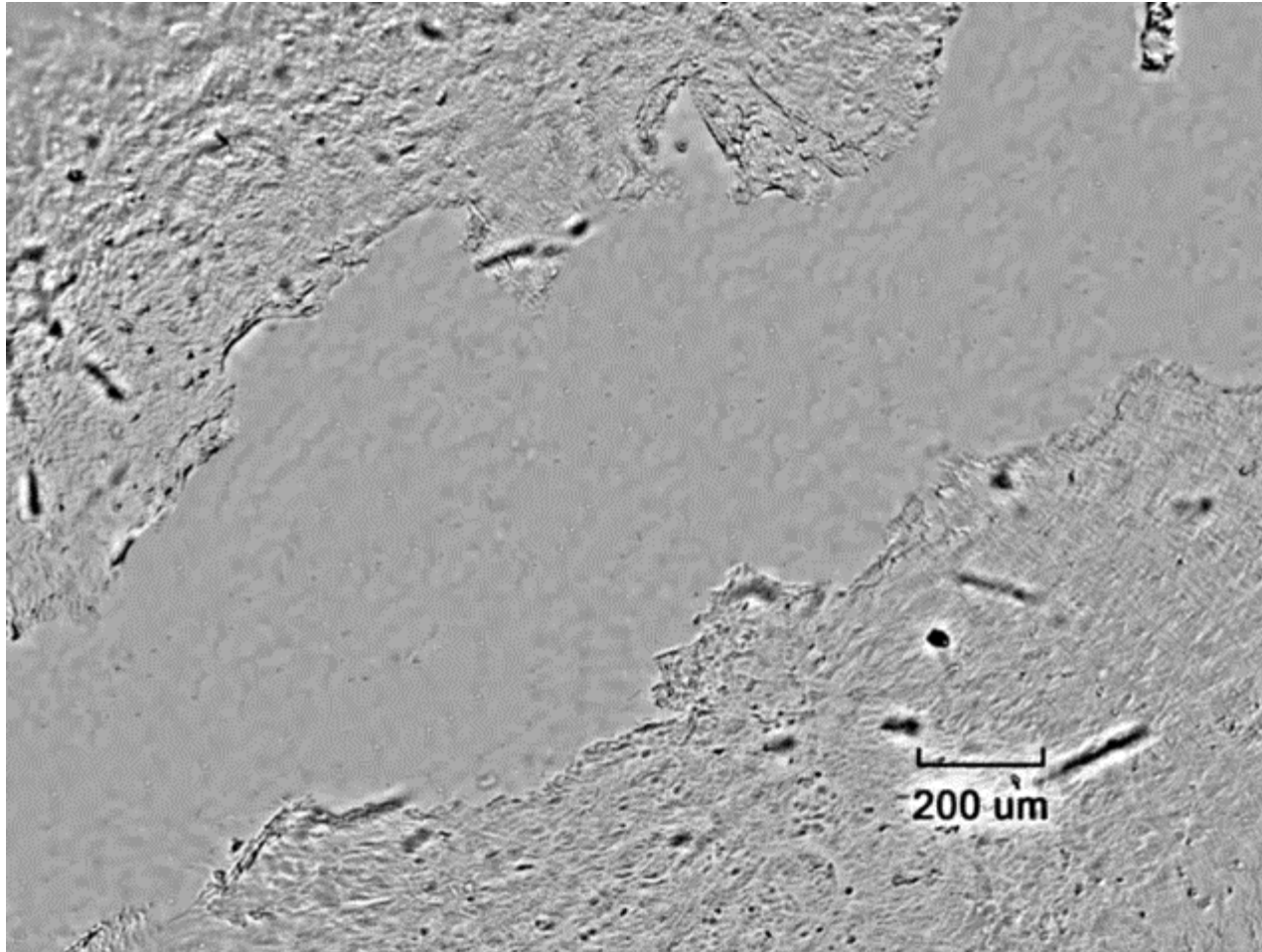
Producción metaloproteinasas de matriz



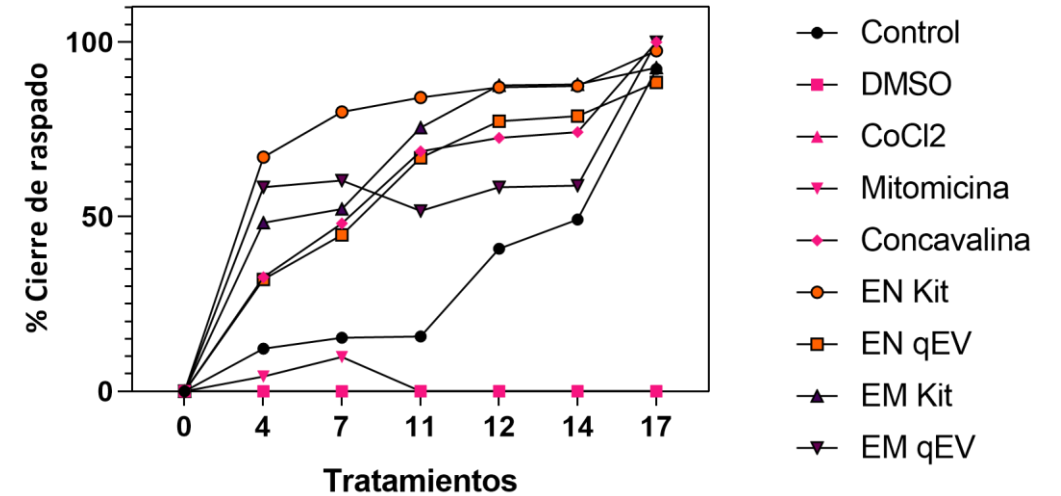
Activación de angiogénesis en células endoteliales

# Resultados y discusión

## Ensayo de Scratch



Scratch con EM y EN



Exos Kit Naranjilla

97,5%

Exos Kit Mortiño

92,7%



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

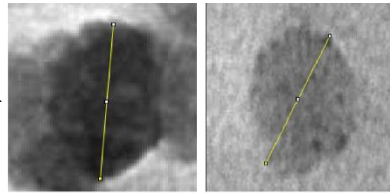
# Conclusiones

## Obtención de exosomas mediante SEC

Mortiño: 3,930 mg/mL.

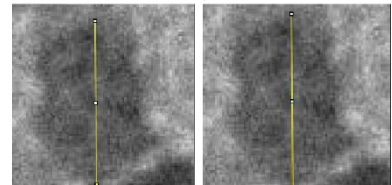
Naranja: 3,833 mg/mL.

Morfología semiesférica ovalada hueca



30-56 nm

F4-F9

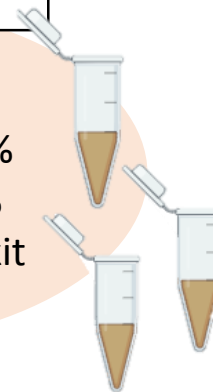


30-70 nm

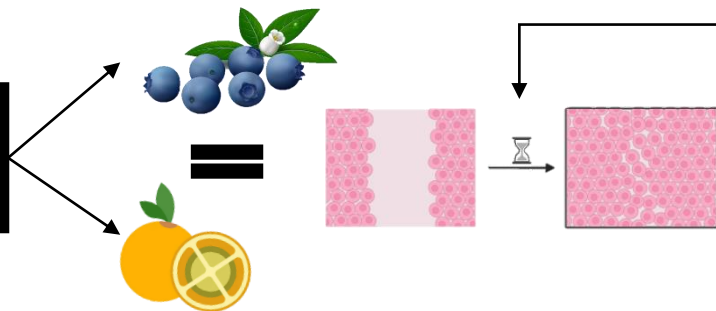
F3-F10

## Determinación del efecto angiogénico en HaCaT

Efecto proliferativo  
Exos naranja: 97,5%  
Exos mortiño: 92,7%  
Obtenidos mediante kit



Hipótesis

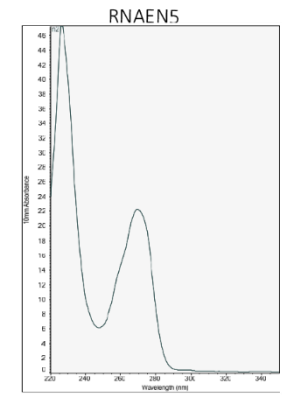
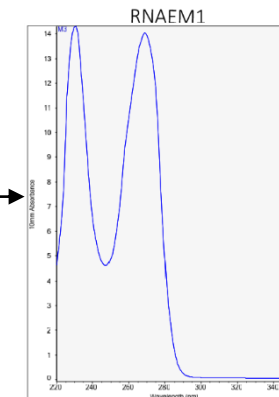


## Extracción de sRNA

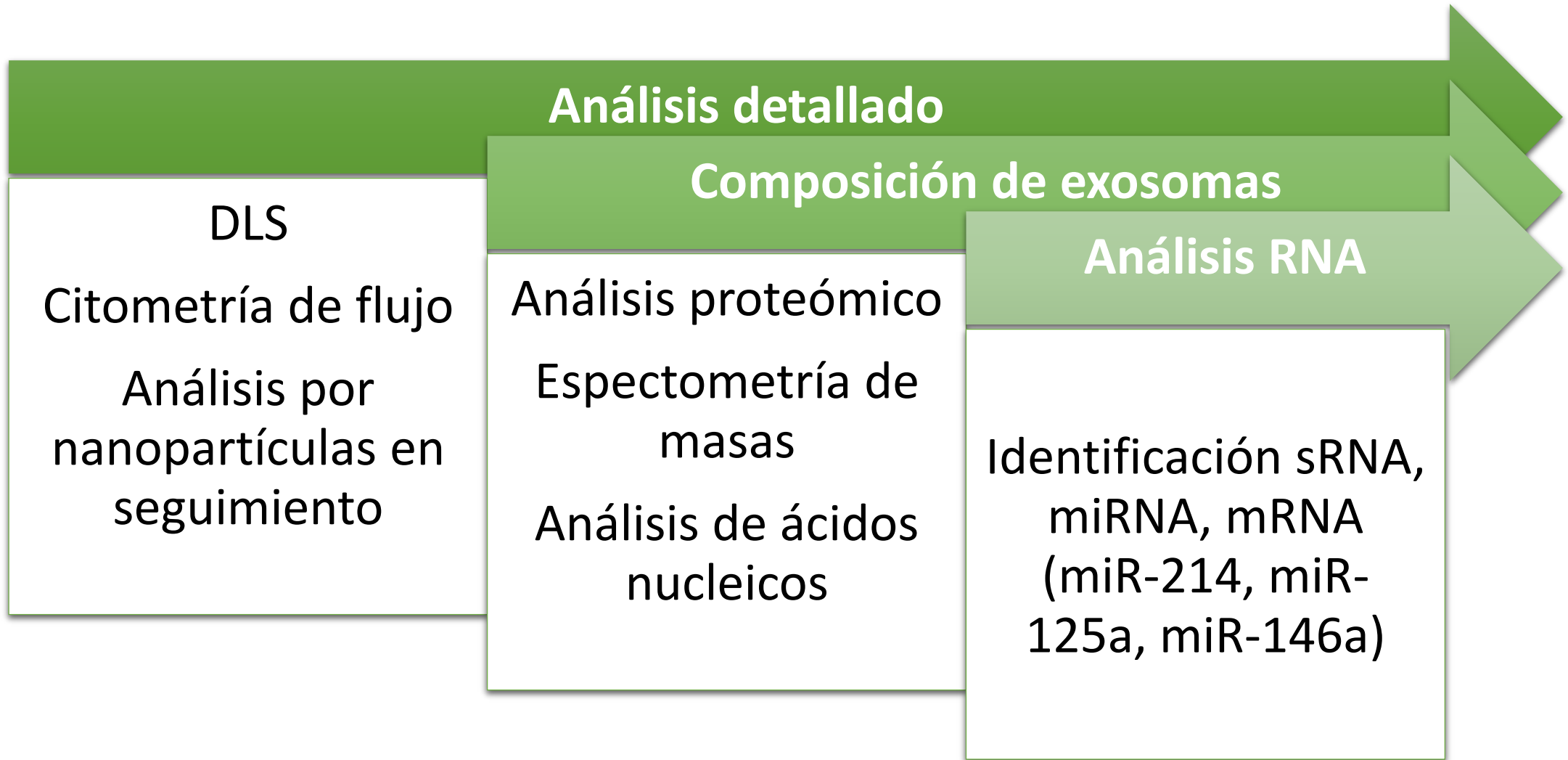
Pools de extracciones de sRNA

Exos mortiño: 211,3875 ng/uL.

Exos naranja: 154,25 ng/uL



# Recomendaciones



# Agradecimientos



**Marbel Torres Ph. D**  
**Alexis Debut Ph. D**  
**Ing. Fernanda Toscano**  
**Ing. Andrea Aluisa**

