



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE UNIDAD DE INTEGRACION CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Obtención de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae)

AUTORA: Sánchez Nicolalde María Gabriela

DIRECTORA: Torres Arias Marbel Ph.D.

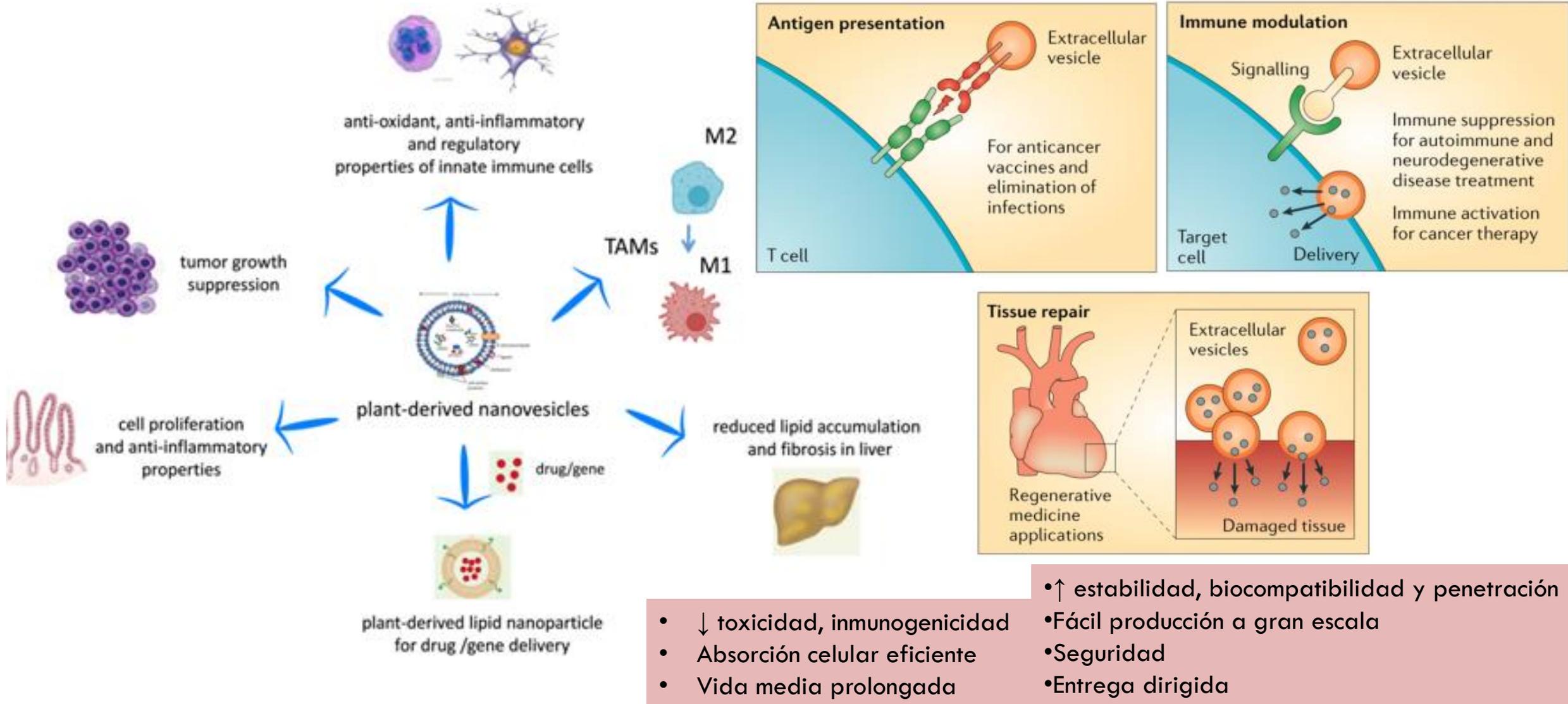
2 de septiembre de 2022



- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

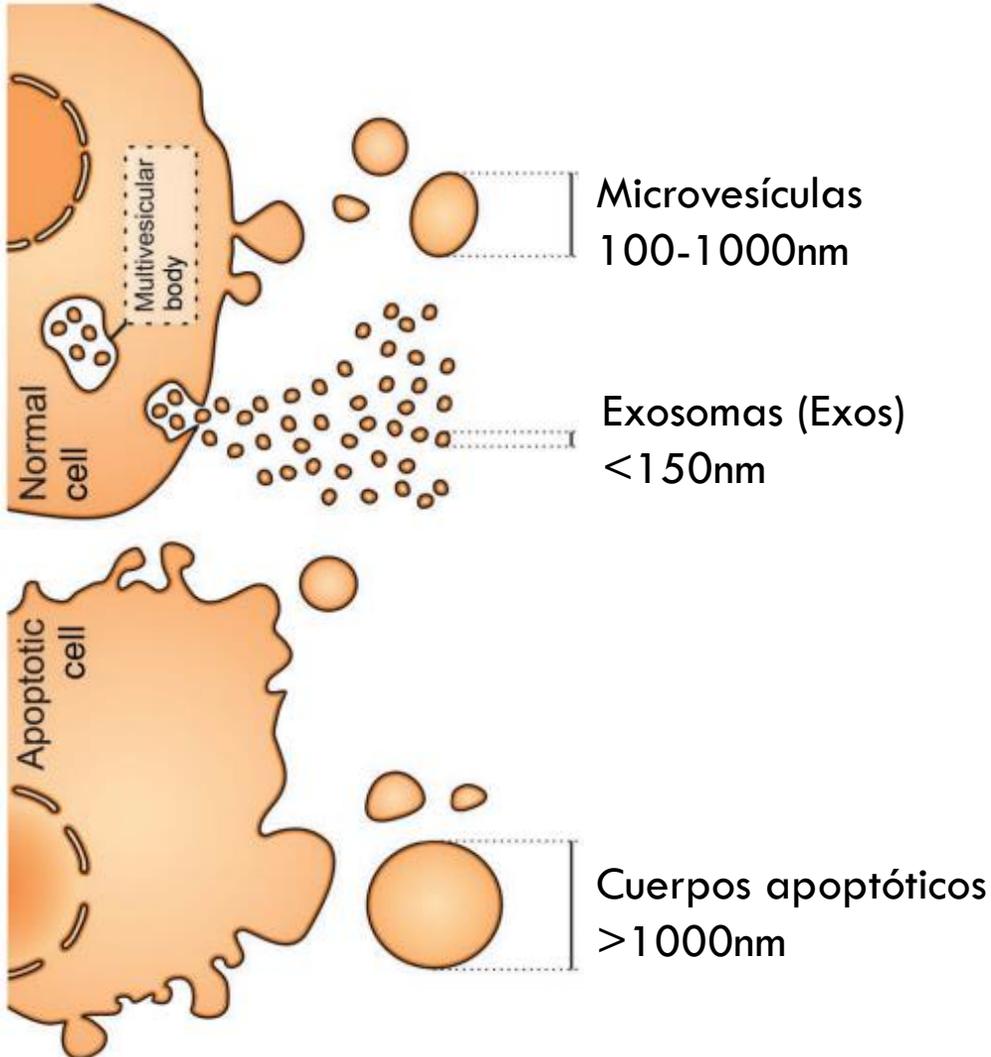


- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

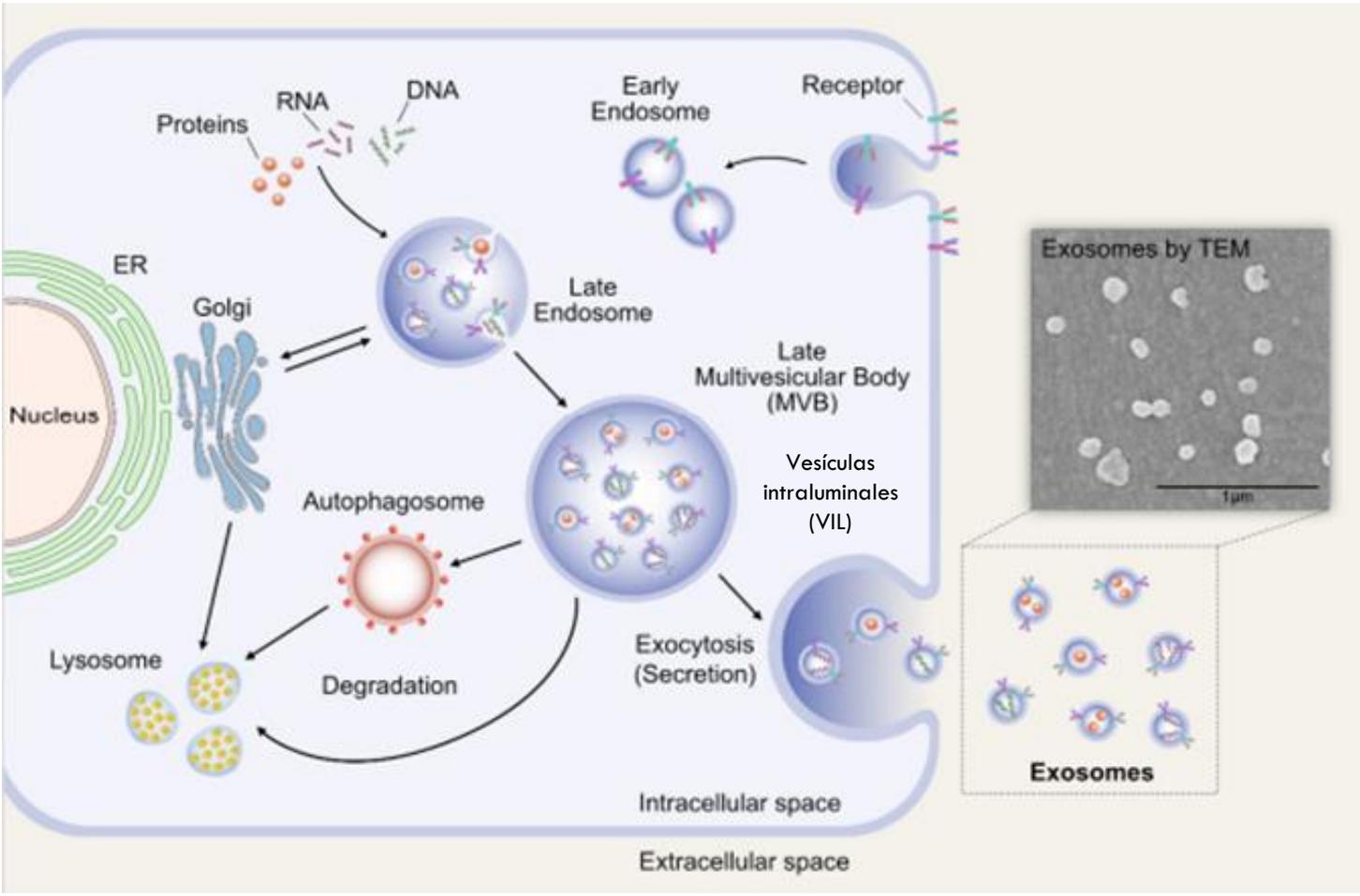


- ↓ toxicidad, inmunogenicidad
- Absorción celular eficiente
- Vida media prolongada
- ↑ estabilidad, biocompatibilidad y penetración
- Fácil producción a gran escala
- Seguridad
- Entrega dirigida

Tipos de EV



Biogénesis de exosomas



(Gioia et al., 2020) (Gurunathan et al., 2019)

Estructura membrana

*Glicerol

Esfingolípidos

- Ceramidas
- Esfingomiolina

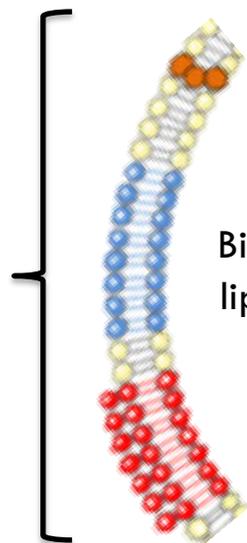
Colesterol

*Fosfolípidos

- Fosfatidilserina
- Ácido fosfatídico
- Fosfatidilcolinas

Glicolípidos

- Digalactosildiacylglicerol
- Monogalactosildiacylglicerol

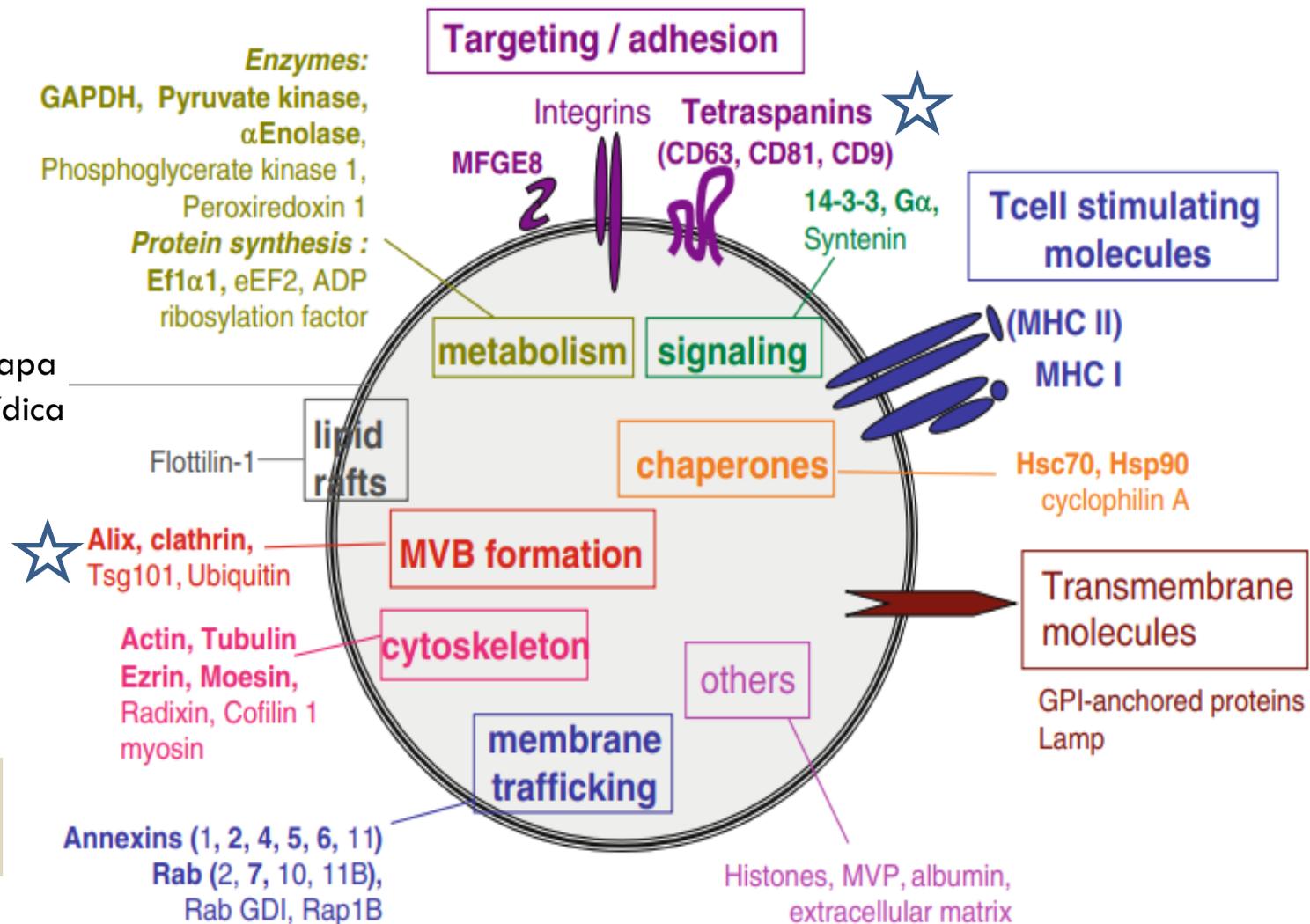


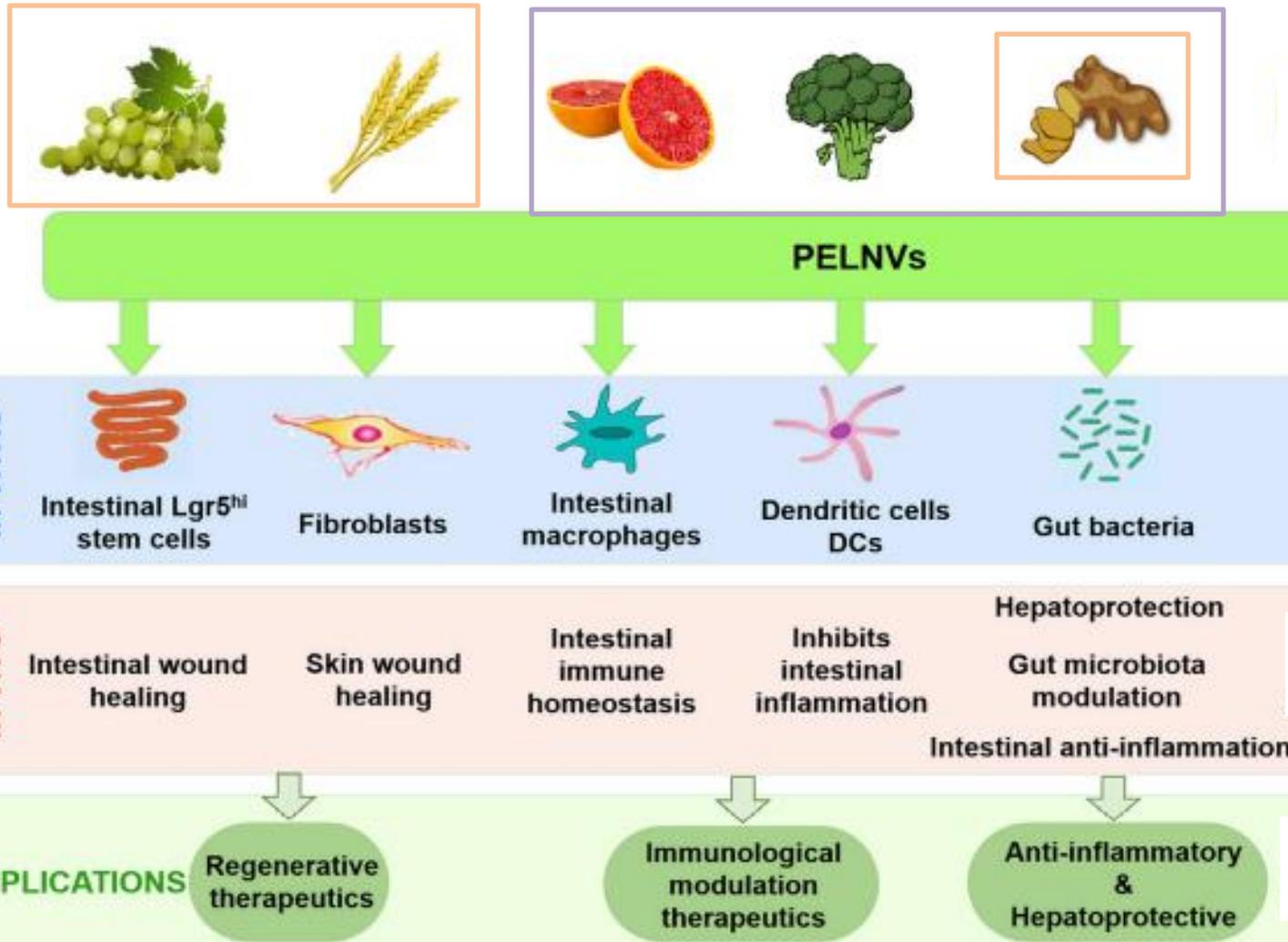
Bicapa lipídica



Patelinas 1-3, penetración 1, cadena pesada de clatrina y de choque térmico

Composición proteica





Ø citosinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β)
 ↑ anti-oxidante/anti-inflamatorio en M
 Ø NLRP3
 ↑ traslocación de Nrf2
 ↓ ROS

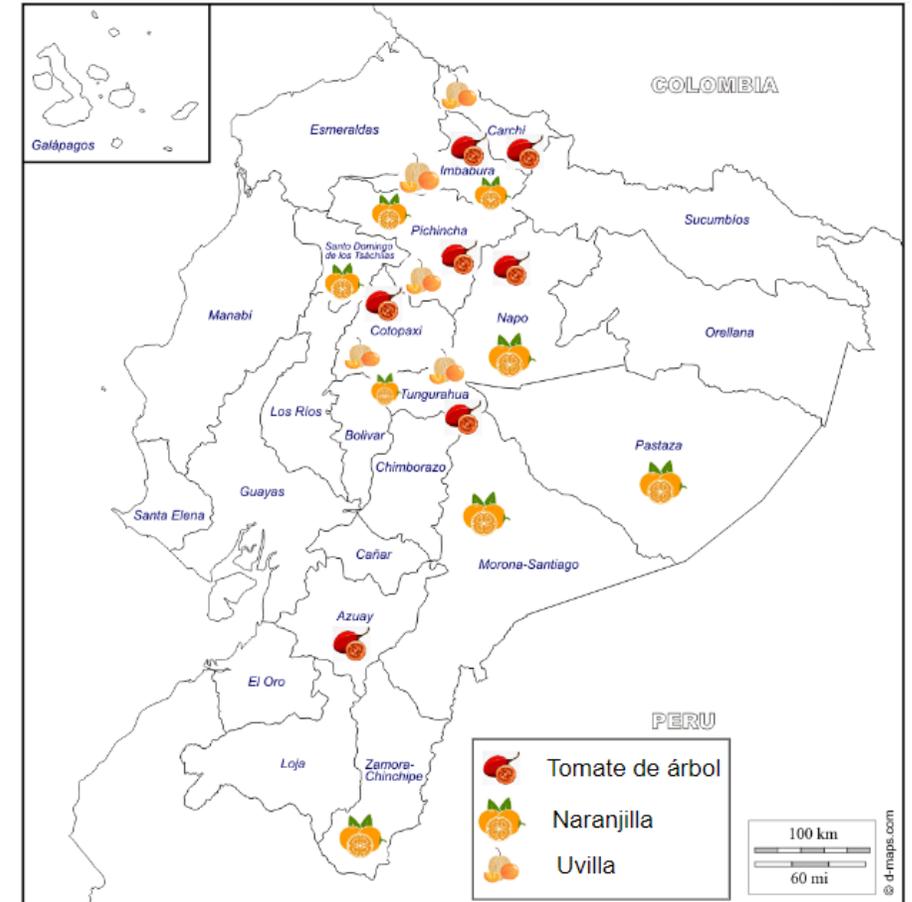
Proliferación de células madre
 Formación de organoides
 Inducen citosinas proinflamatorias (IL-10, IL-22)
 Cicatrización: ↑ ARNm de colágeno tipo I, vascularización
 Regeneración: migración y proliferación en fibroblastos

Tabla. Clasificación taxonómica

Nombre común	Tomate de árbol	Naranjilla	Uvilla
Reino	Plantae	Plantae	Plantae
División	Angiospermae	Angiospermae	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Simpetala	Dicotiledoneas
Orden	Solanales	Tubiflora	Tubiflora
Familia	Solanaceae	Solanaceae	Solanaceae
Genero	<i>Solanum</i>	<i>Solanum</i>	<i>Physalis</i>
Especie	<i>betaceum</i>	<i>quitoense</i>	<i>peruviana</i>
Nombre Científico	<i>Solanum betaceum</i> Cav.	<i>Solanum quitoense</i> Lamarck	<i>Physalis peruviana</i> L.



Zonas de producción de tomate de árbol, naranjilla y uvilla en Ecuador



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Antioxidante

Anti-inflamatorio

Antiproliferativo

(all-E)-luteína

Peruviosis D

Witaperuvina C

4β-hidroxiwithanólido E

Ácido 4-hidroxibenzoico

Rutina

Dihidrocafeoil espermidina

Ácido clorogénico

All-trans-β-caroteno

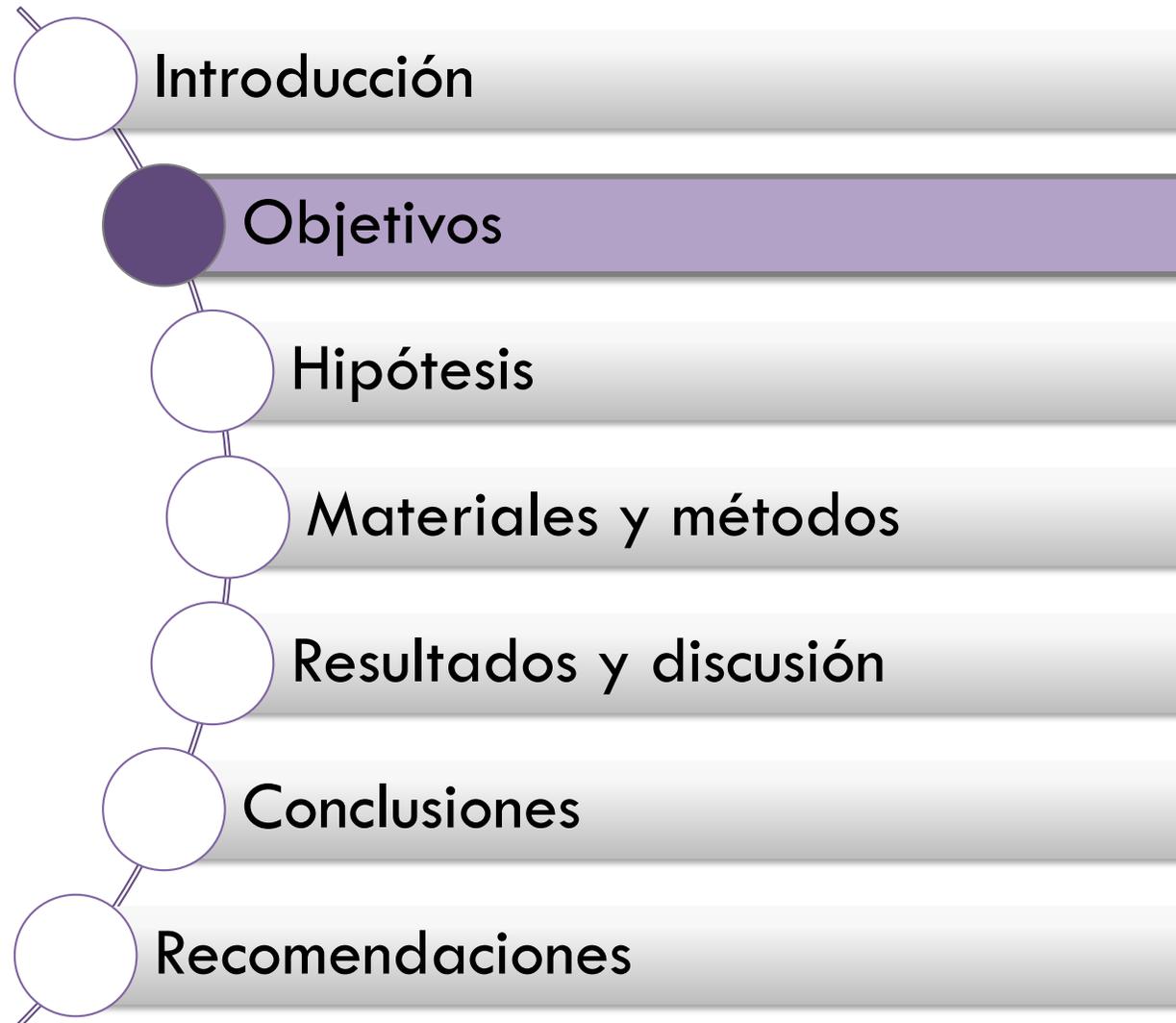
Delfinidina 3-rutinósic

3-O-ácido cafeoilquínico

- Tomate
- Naranja
- Uvilla

Captura de radicales libres
 ↓ ROS y RNS
 ↓ enzimas del estrés oxidativo

∅ NO, PGE2 y NF-kB
 Activación de Nrf2
 ↓ TNF-α, NLRP3, IL-1β, IL-6 e IL-10



- Introducción
- Objetivos**
- Hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

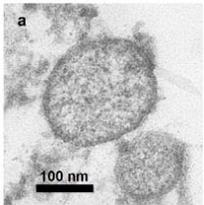


Objetivo General

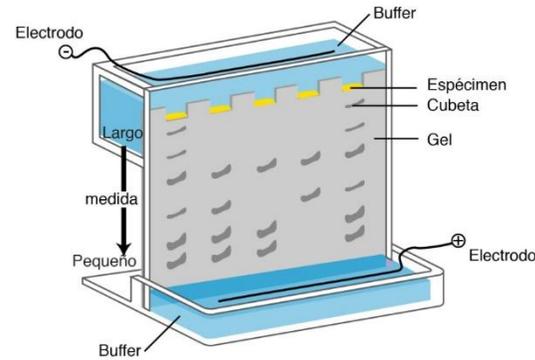
Obtener exosomas a partir de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae)

Objetivos Específicos

Caracterizar exosomas mediante de microscopía electrónica

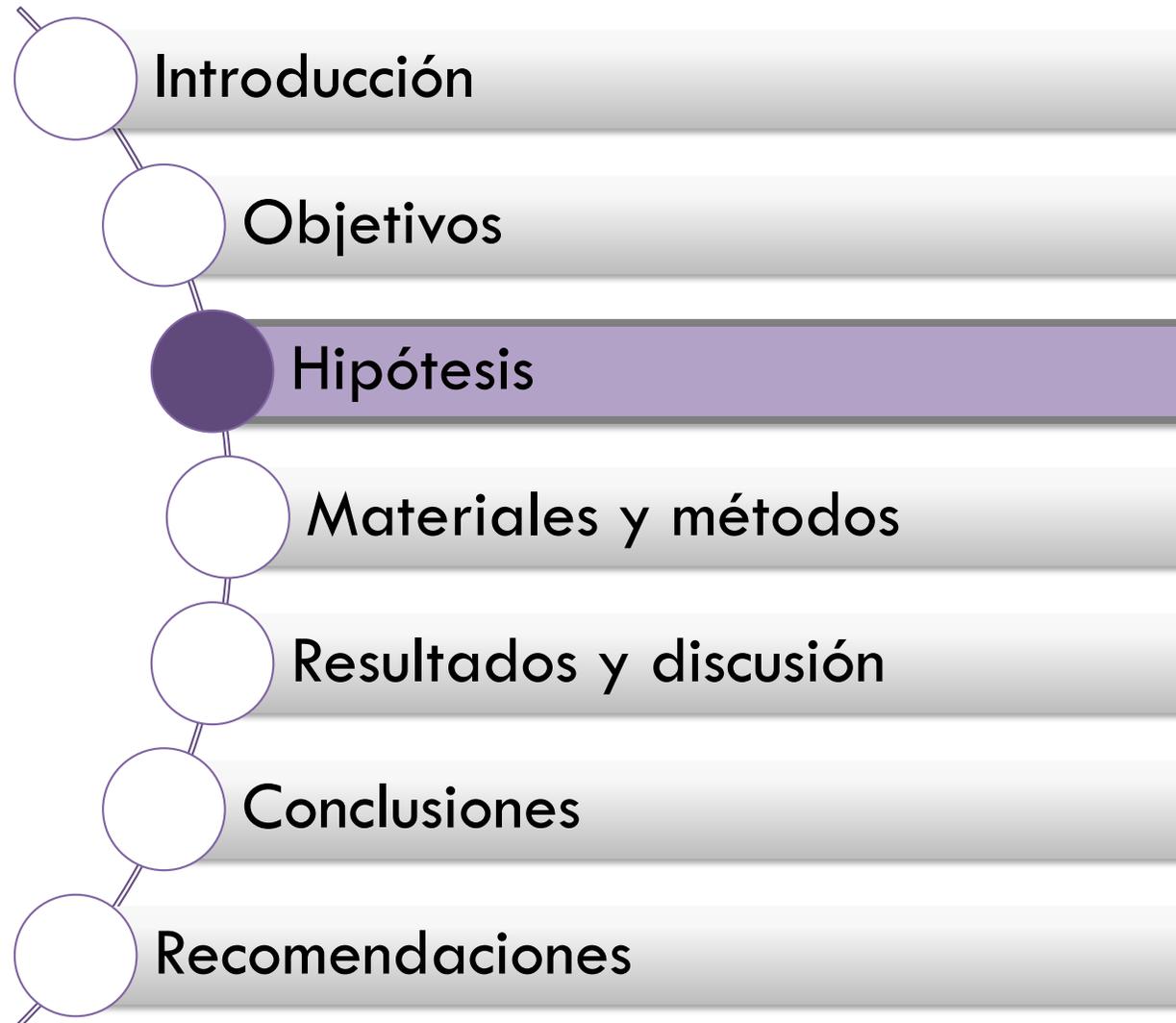


Analizar el perfil proteico de exosomas mediante electroforesis vertical

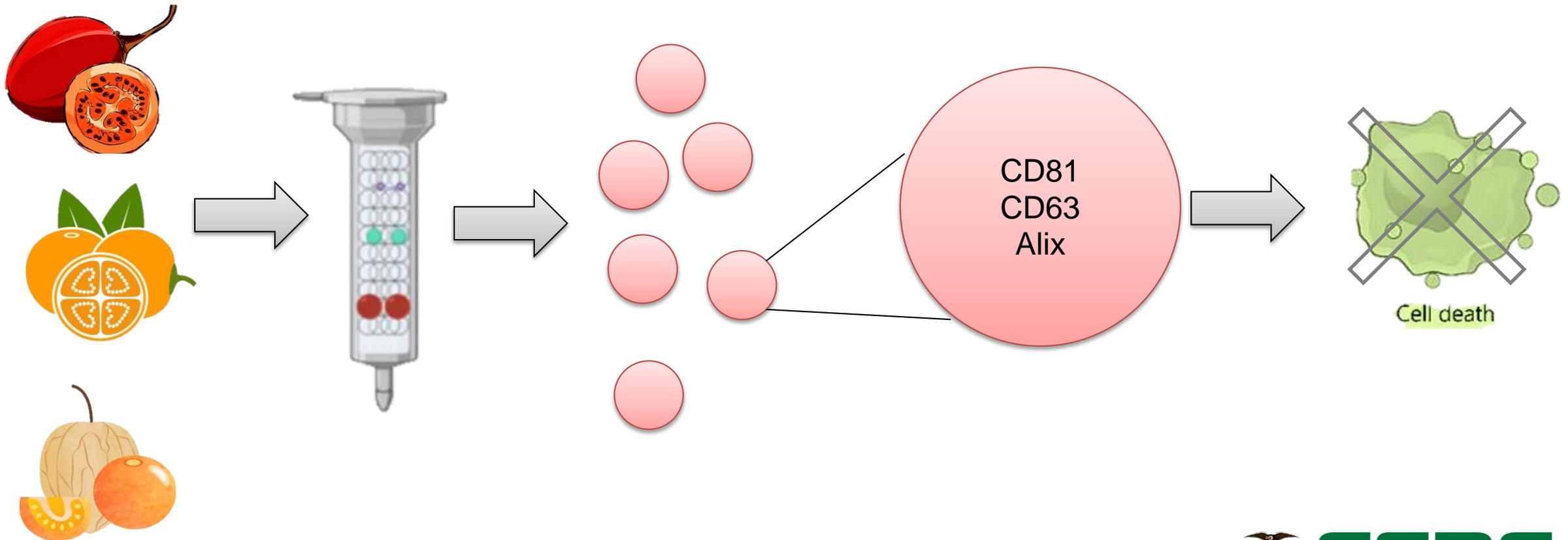


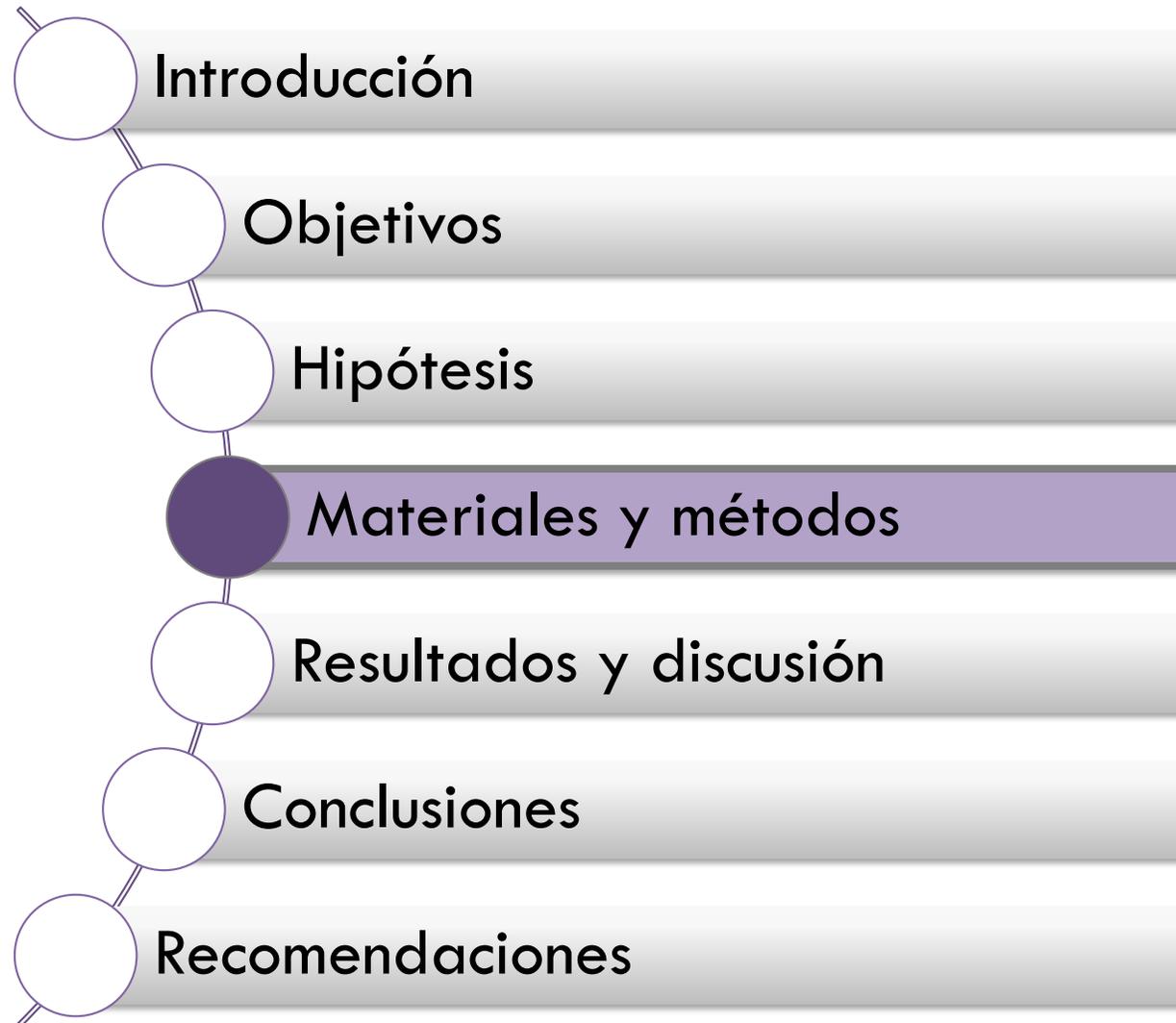
Determinar la citotoxicidad de exosomas mediante ensayo colorimétrico MTT



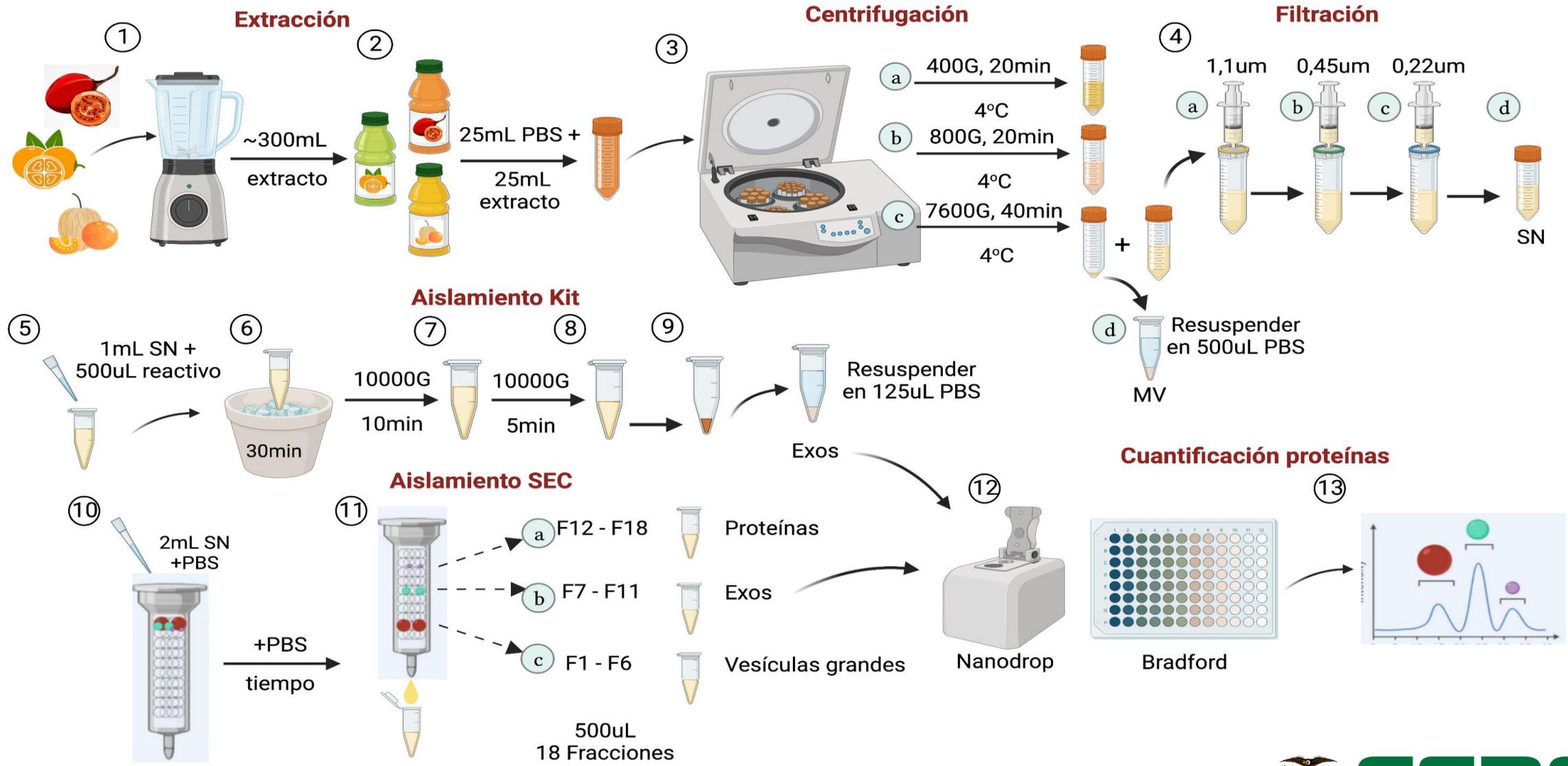


Los exosomas aislados a partir de extractos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae) mediante columna de exclusión de tamaño presentan en su composición las proteínas CD81, CD63 y Alix y no muestran citotoxicidad frente a líneas celulares humanas.

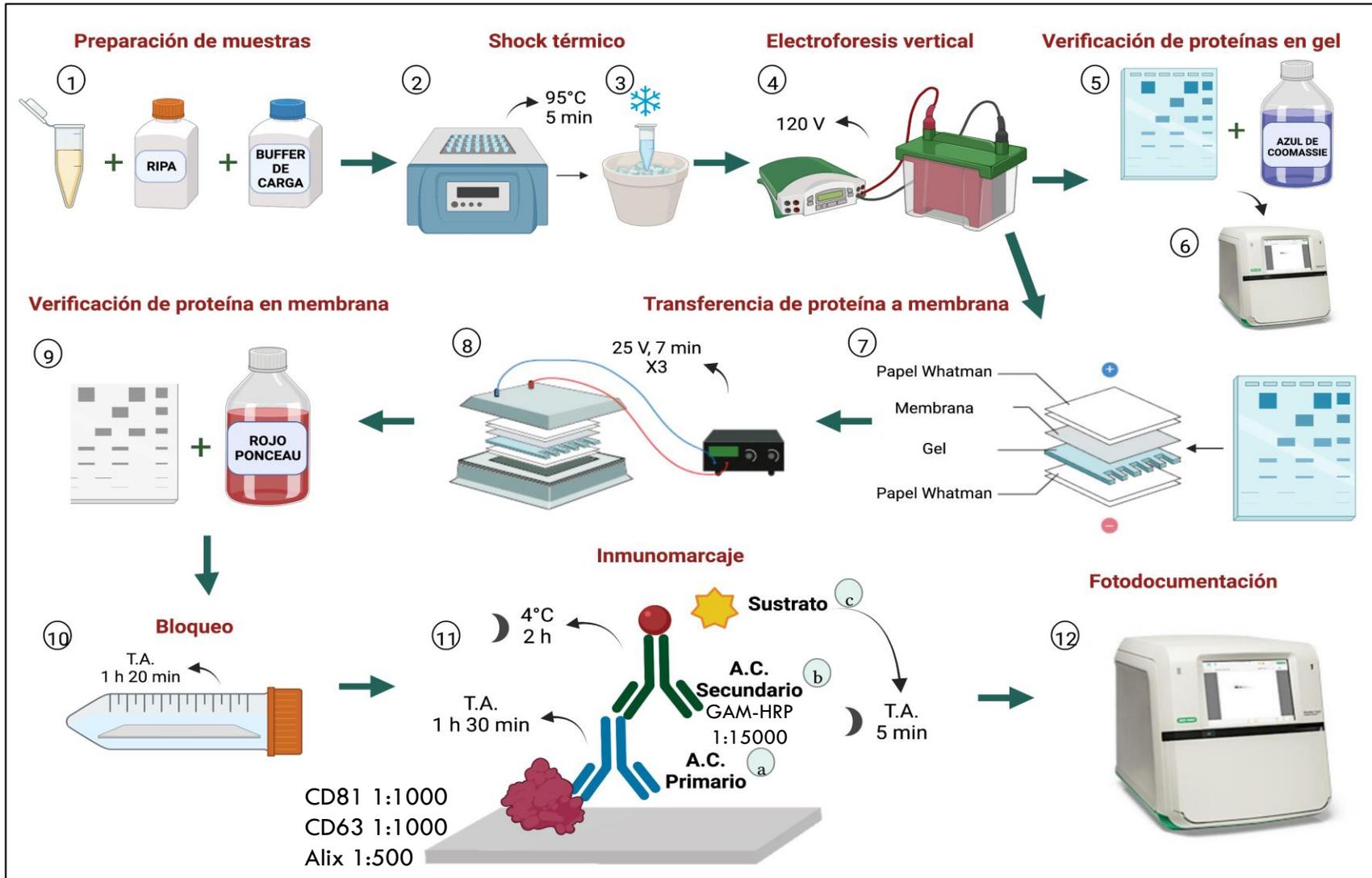




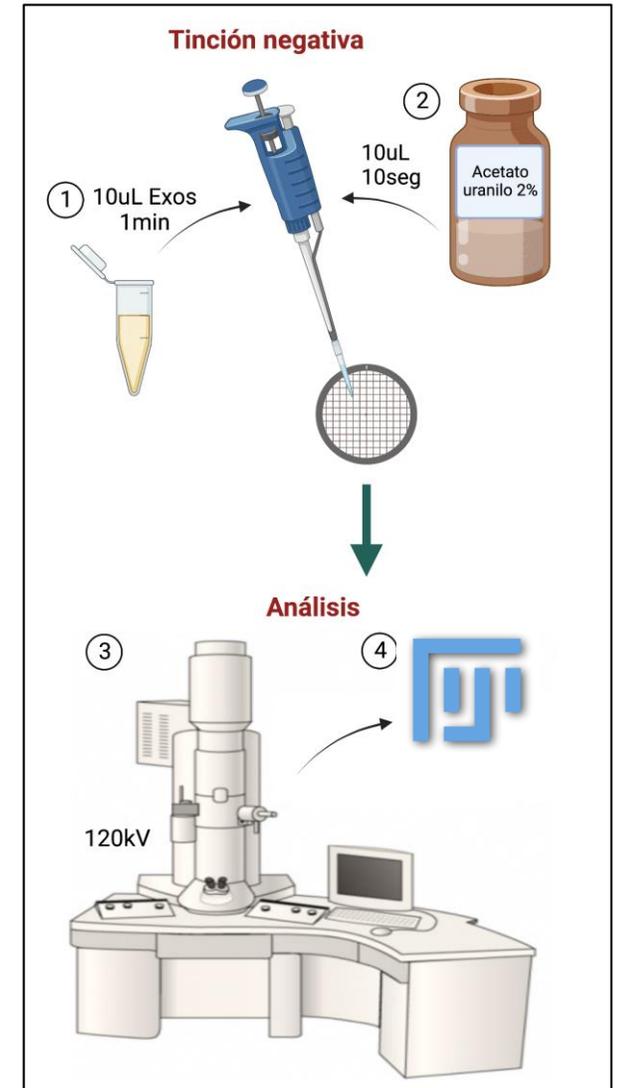
- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Materiales y métodos**
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones



Western Blot



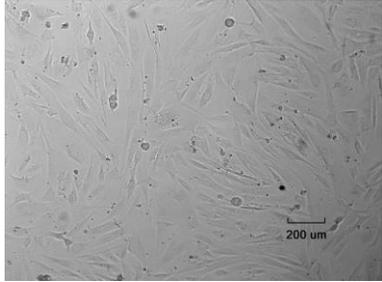
TEM



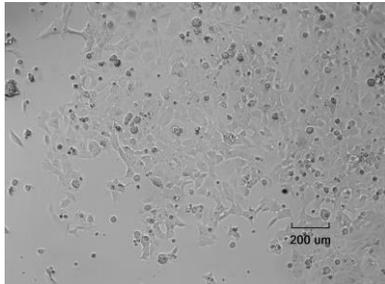
Determinación de la citotoxicidad

MATERIALES Y MÉTODOS

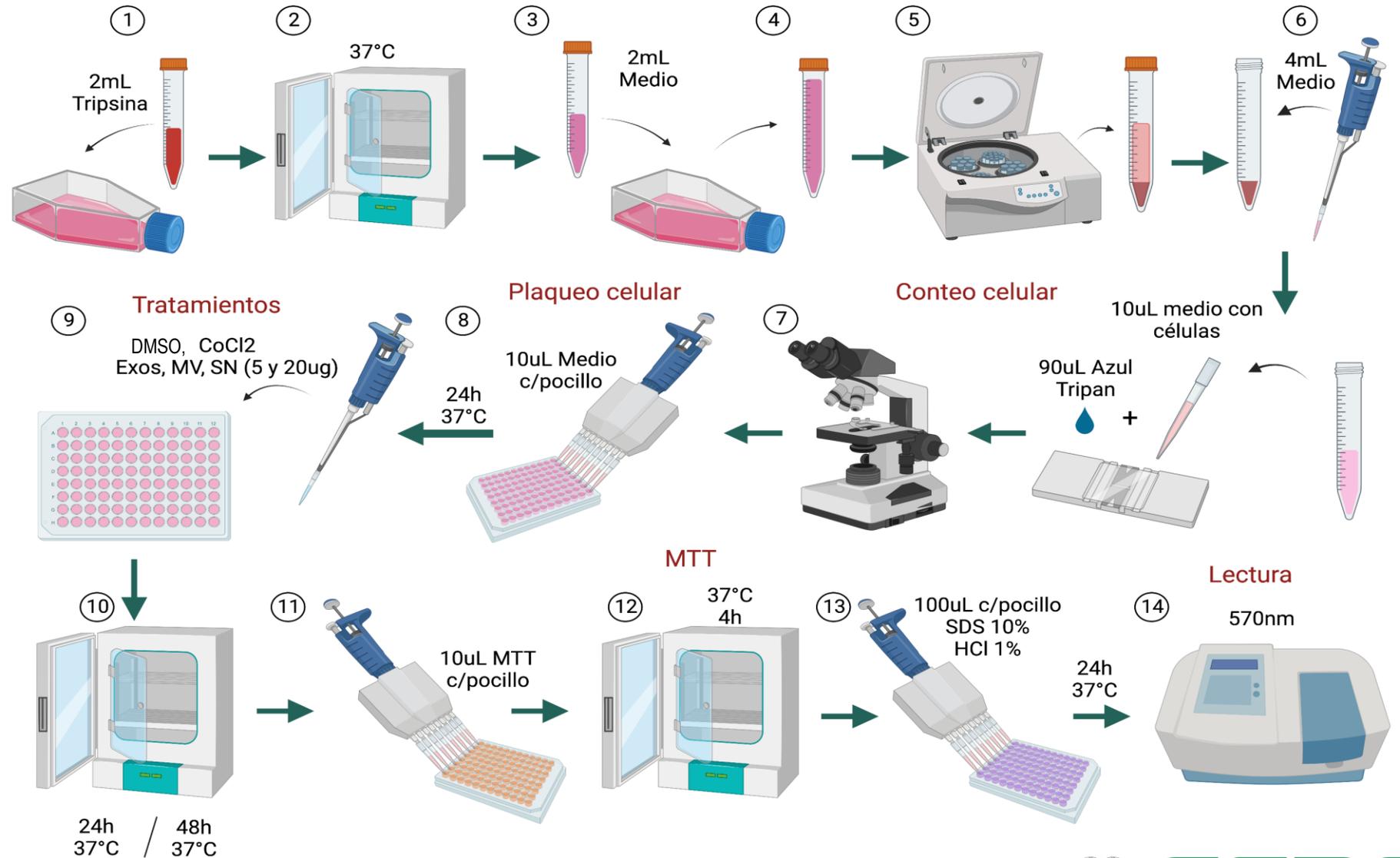
HFF

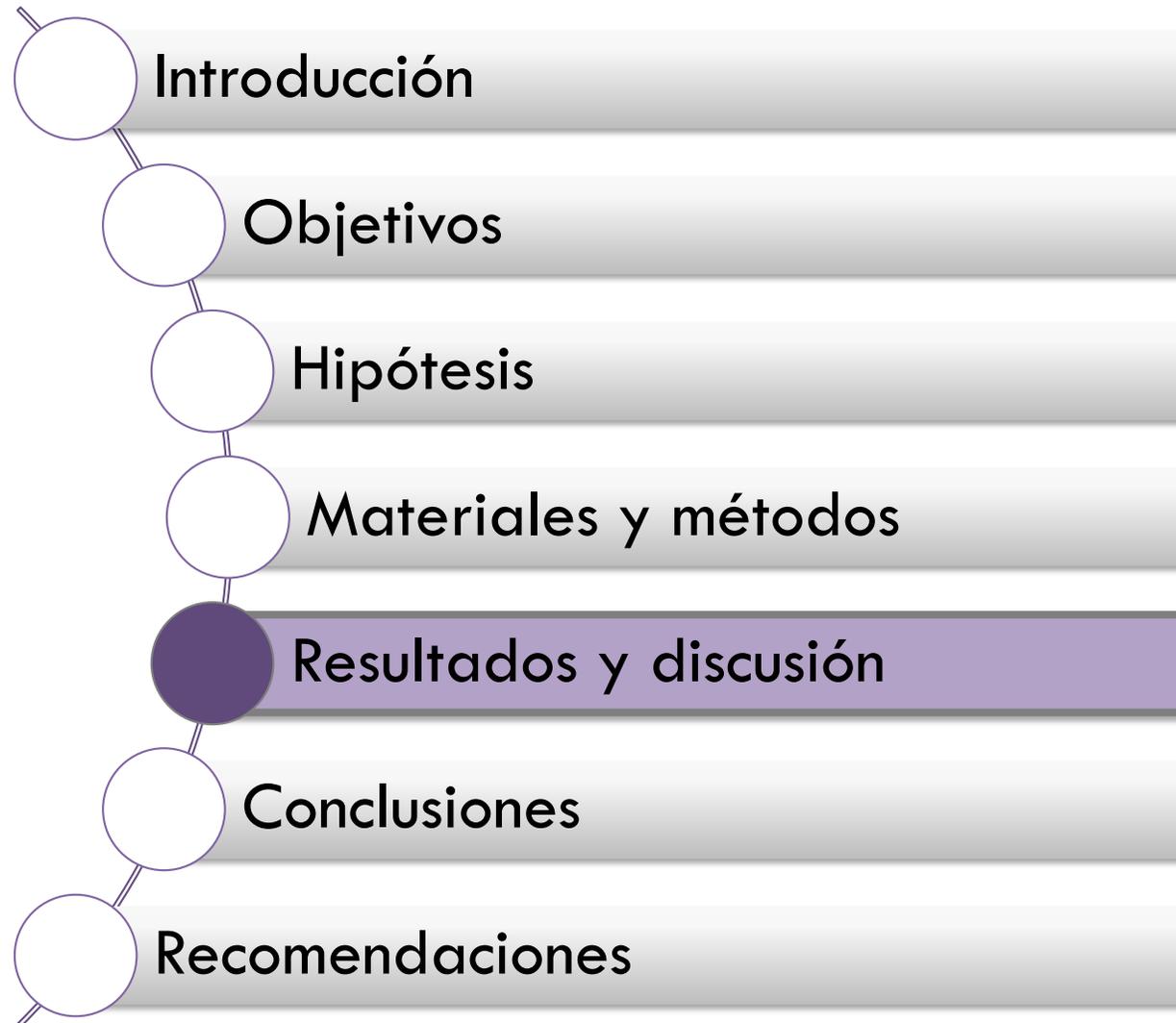


HeLa

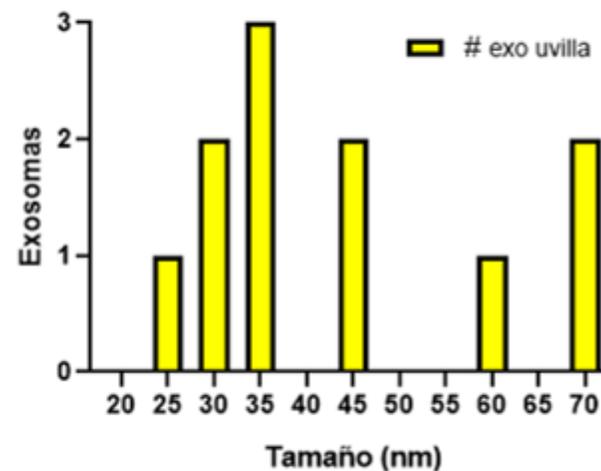
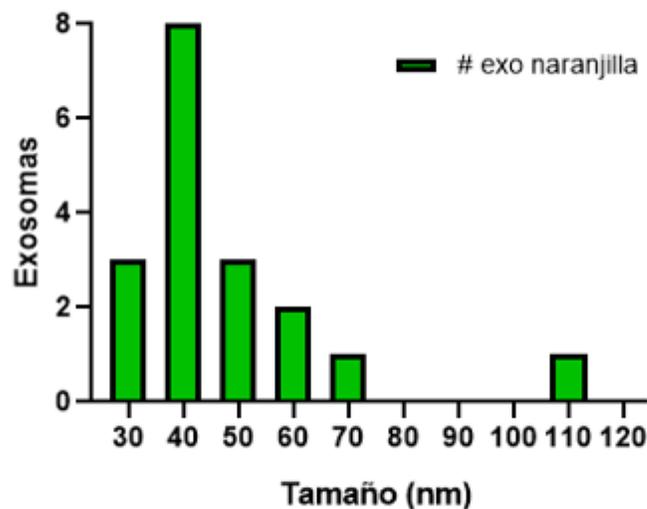
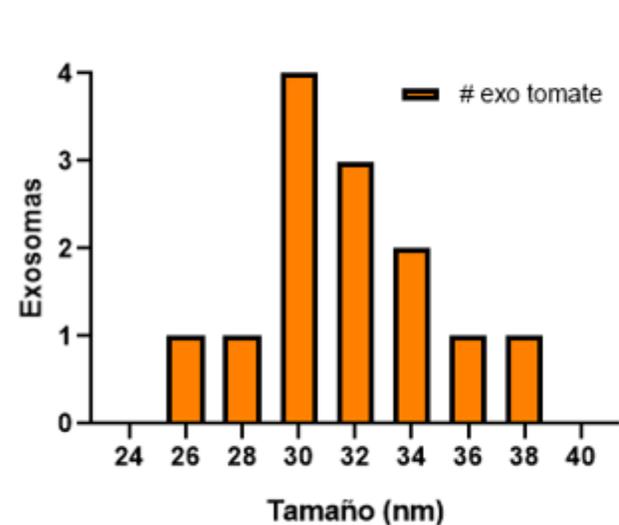


HEK

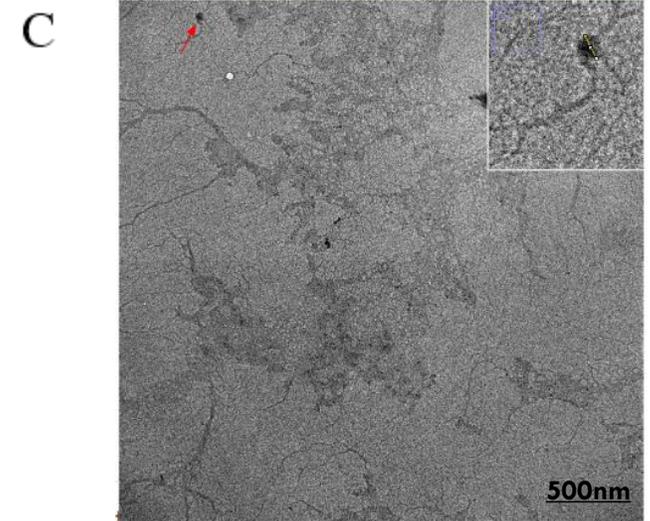
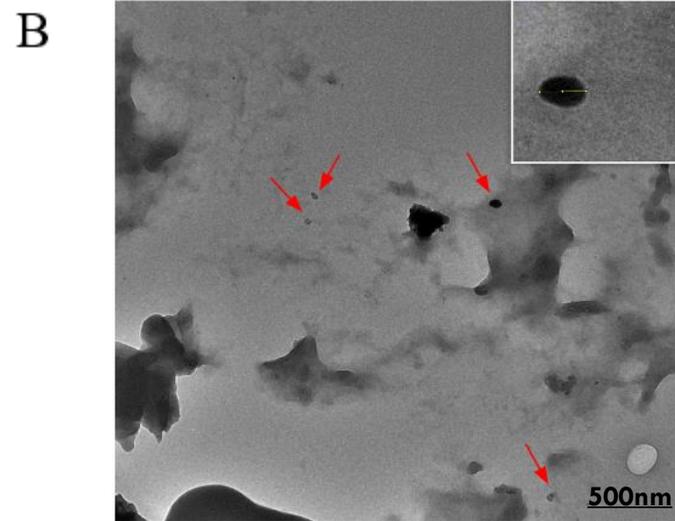
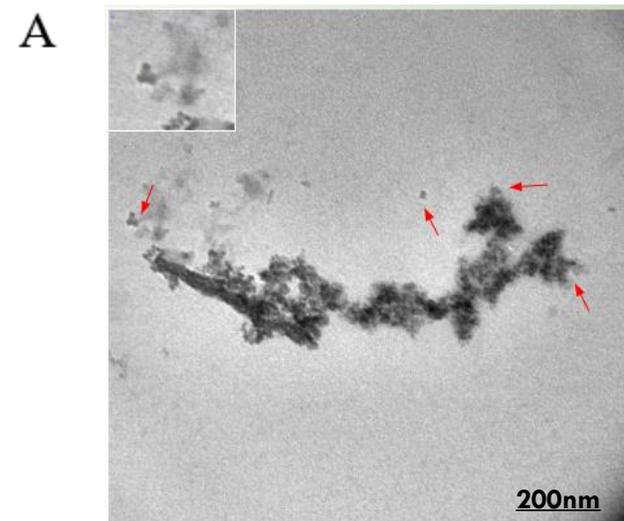




Histograma de Distribución de Frecuencia

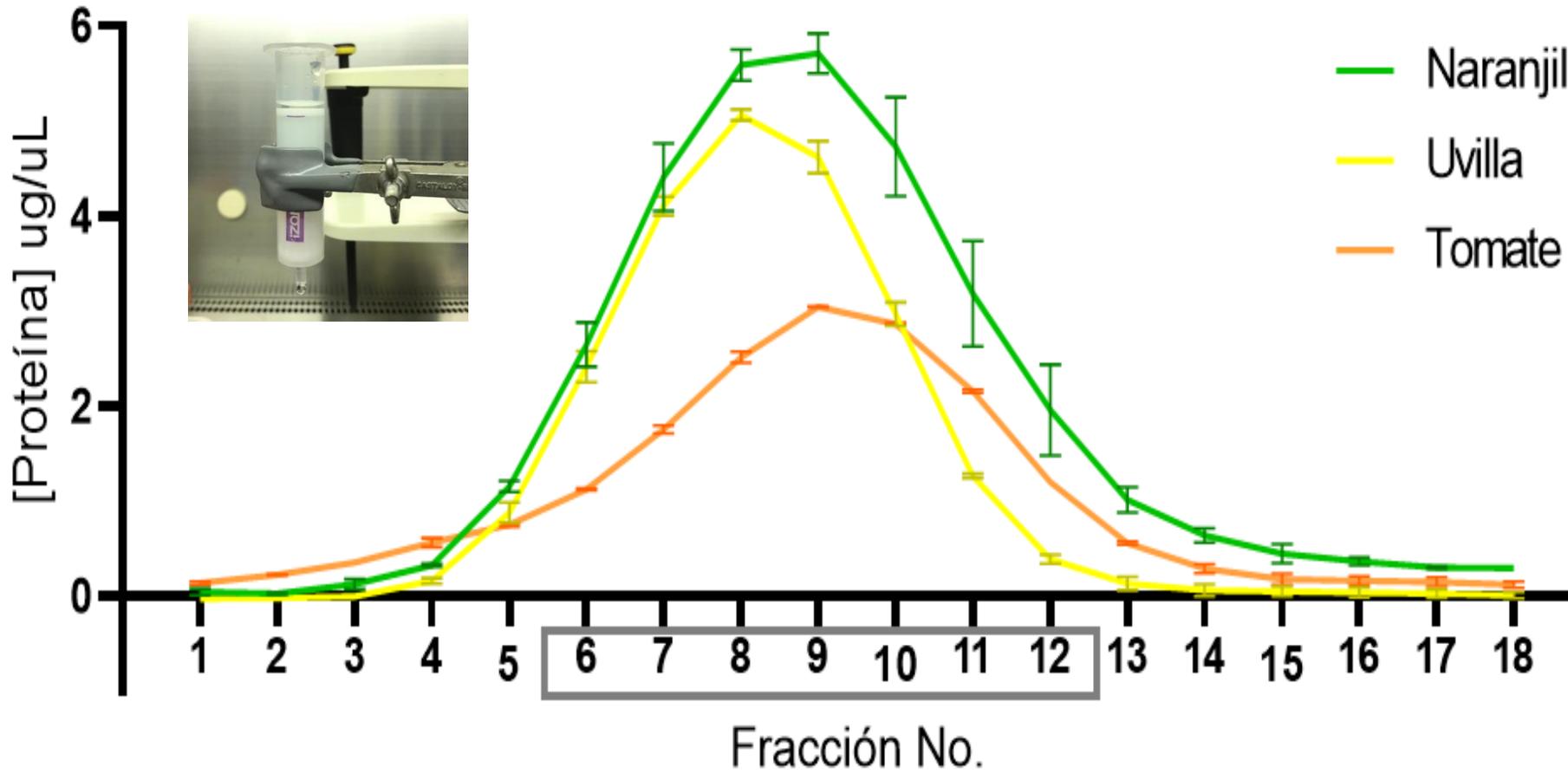


- Fuente celular
- Estado de las células
- Condición ambiental
- Técnicas de aislamiento



Σ exosomas
 18 naranjilla
 11 de uvilla
 13 tomate de árbol

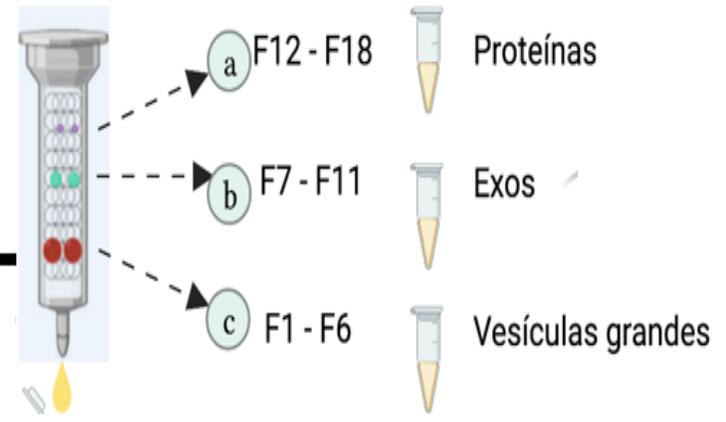
Cuantificación de proteínas. A280nm

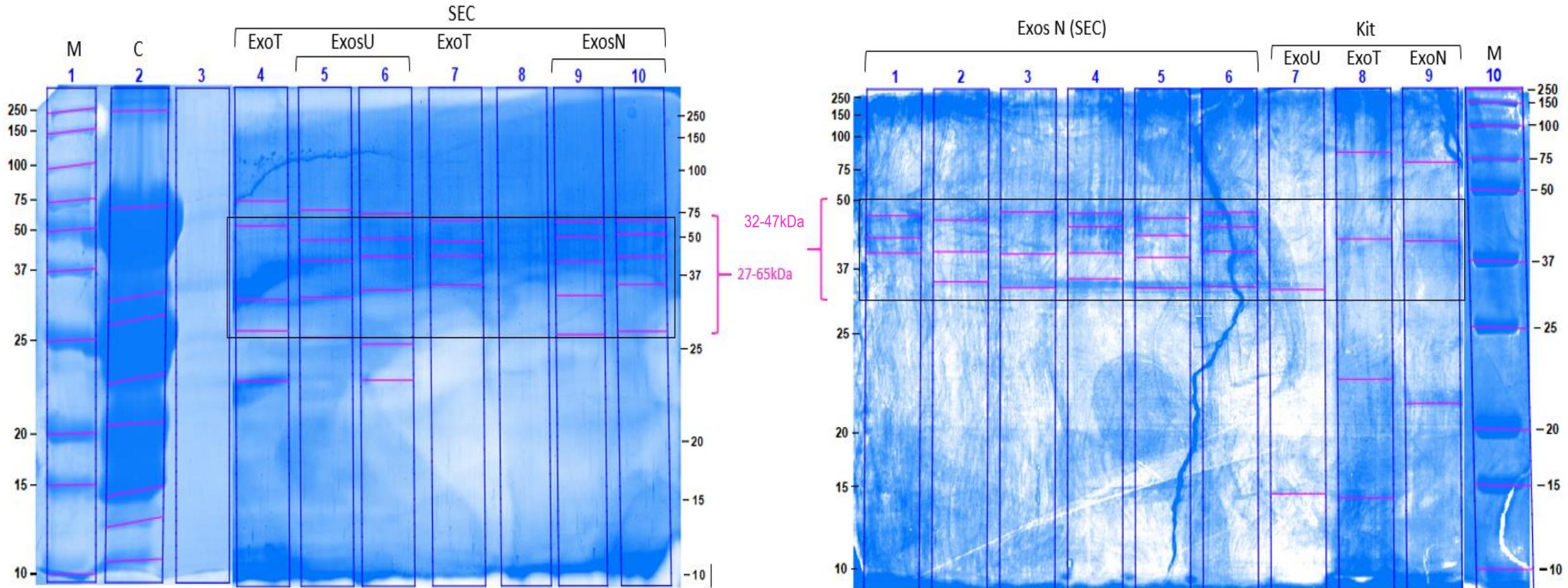


Naranja: F6 - F11
(2,416 – 5,922ug/uL)

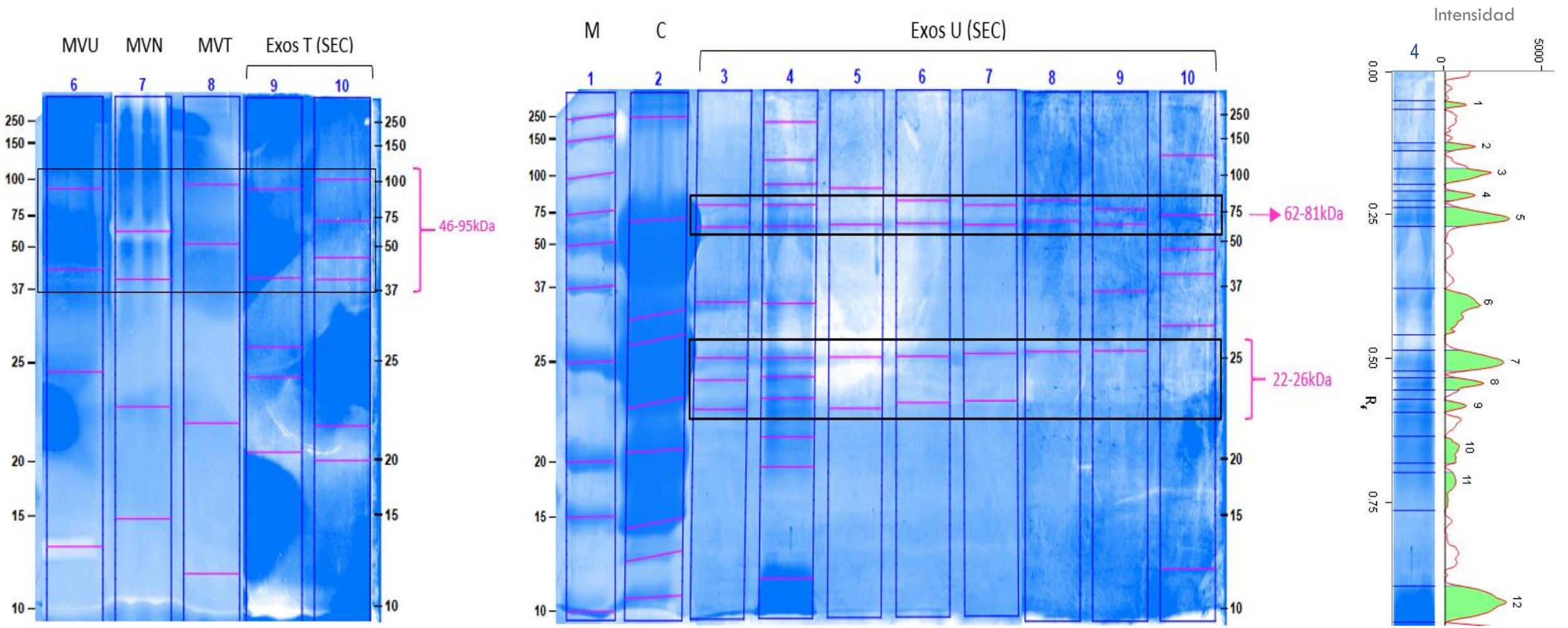
Tomate de árbol: F6 - F12
(1,109 – 3,051ug/uL)

Uvilla: F6 – F10
(2,250 - 5,123ug/uL)





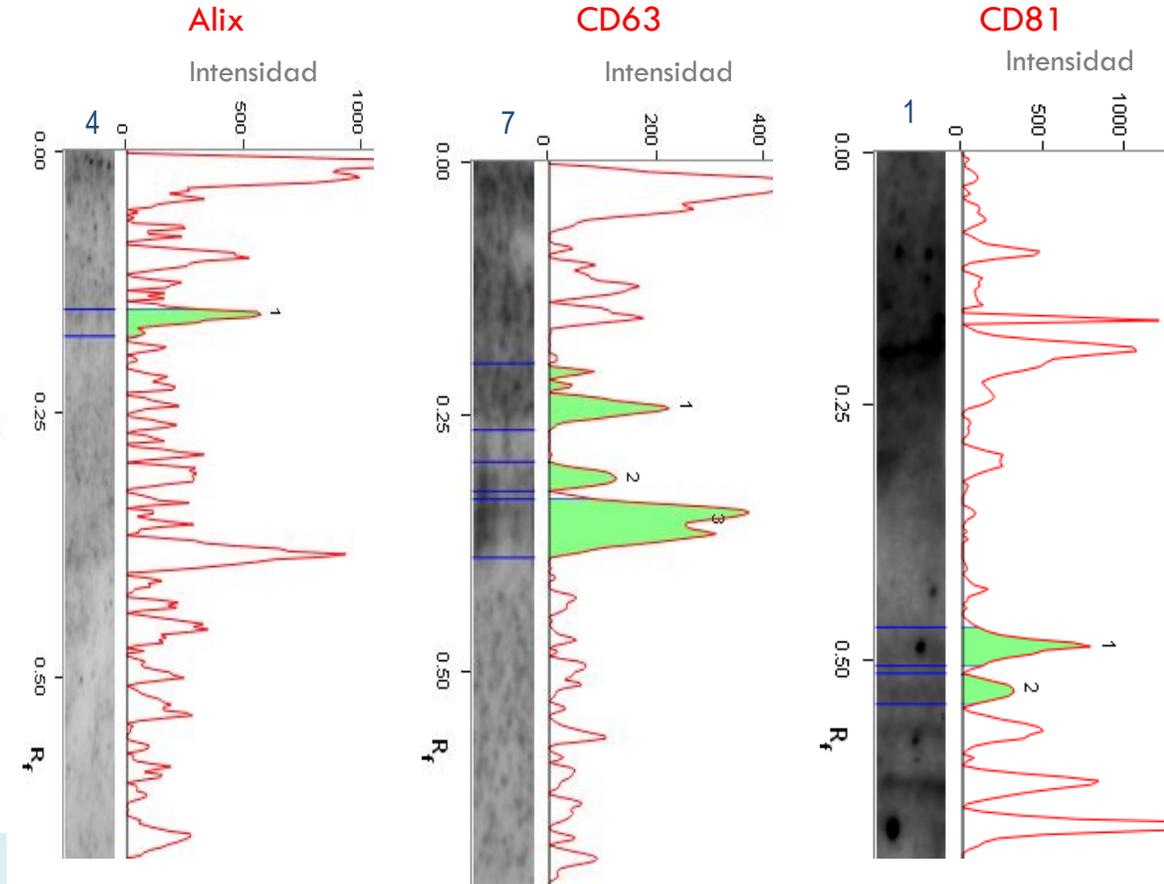
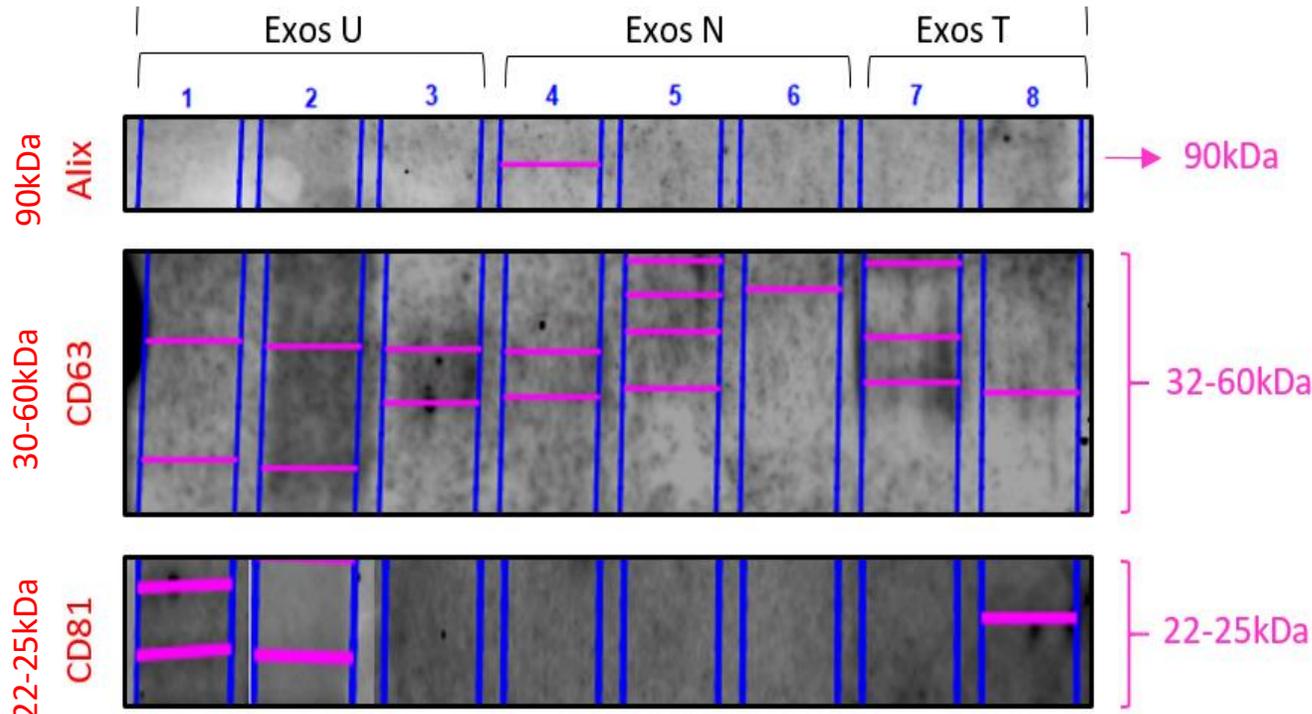
Perfil proteico de exomas aislados por SEC y kit en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturizantes/reductoras con tinción Coomassie Blue. MV: microvesículas, Exo: exomas, T: tomate de árbol, N: naranjilla, U: uvilla, M: marcador de peso molecular, C: control (IgY)



SDS de 4 Citrus ≈
MV ≠ NV

Proteínas del citosol (actina y enzimas proteolíticas)
Proteínas de membrana

Análisis de densitometría en
ImageLab (carril 4)

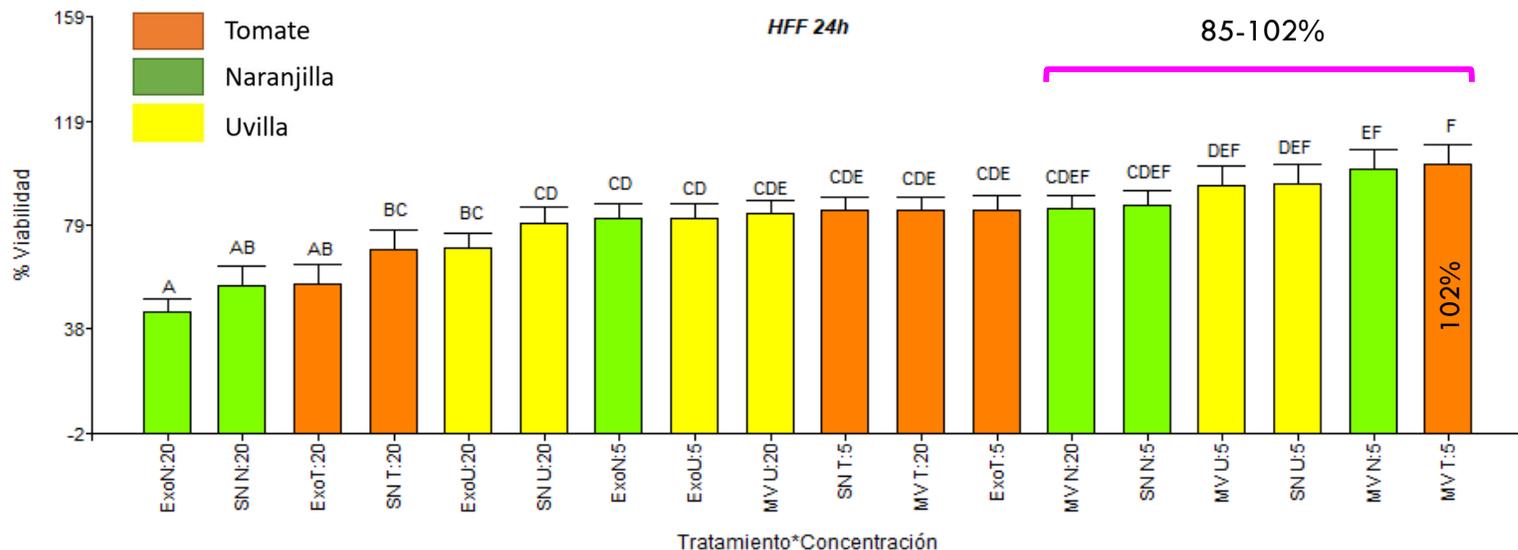


Análisis de densitometría en ImageLab

Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81) → maduración biosintética y tráfico de membranas

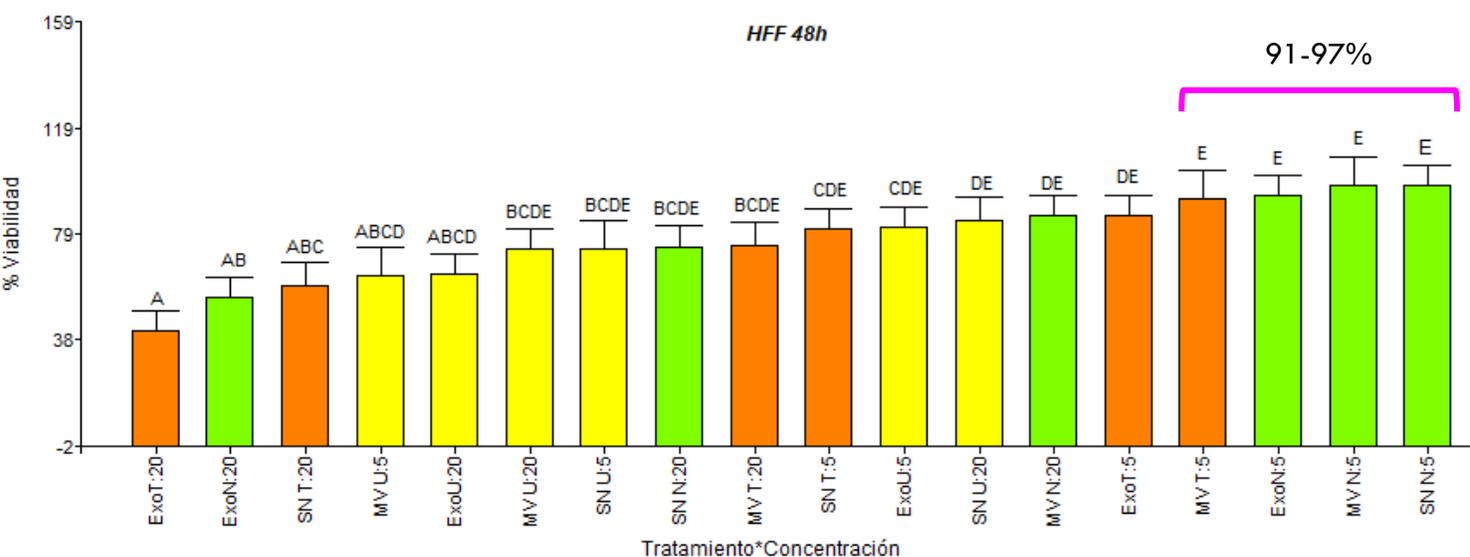
Alix, TSG101, HSC70 y HSP90 β → ESCRT
 Biogénesis independiente de ESCRT (dependiente de esfingomielinasa)

Exos mamíferos \approx Exos plantas



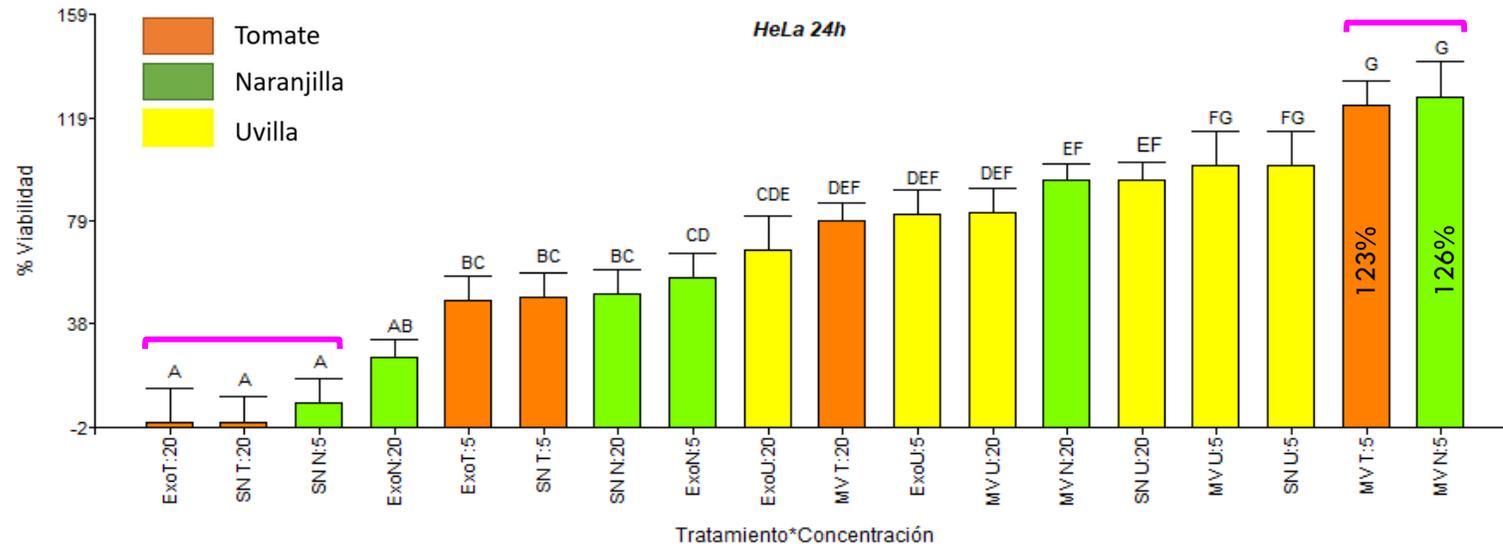
Tratamiento ANOVA
 Concentración [] 5 y 20ug p<0,10
 Tratamiento vs []

 NV (5,20ug) a 24,48,72h → antiproliferativa celulares cancerosas



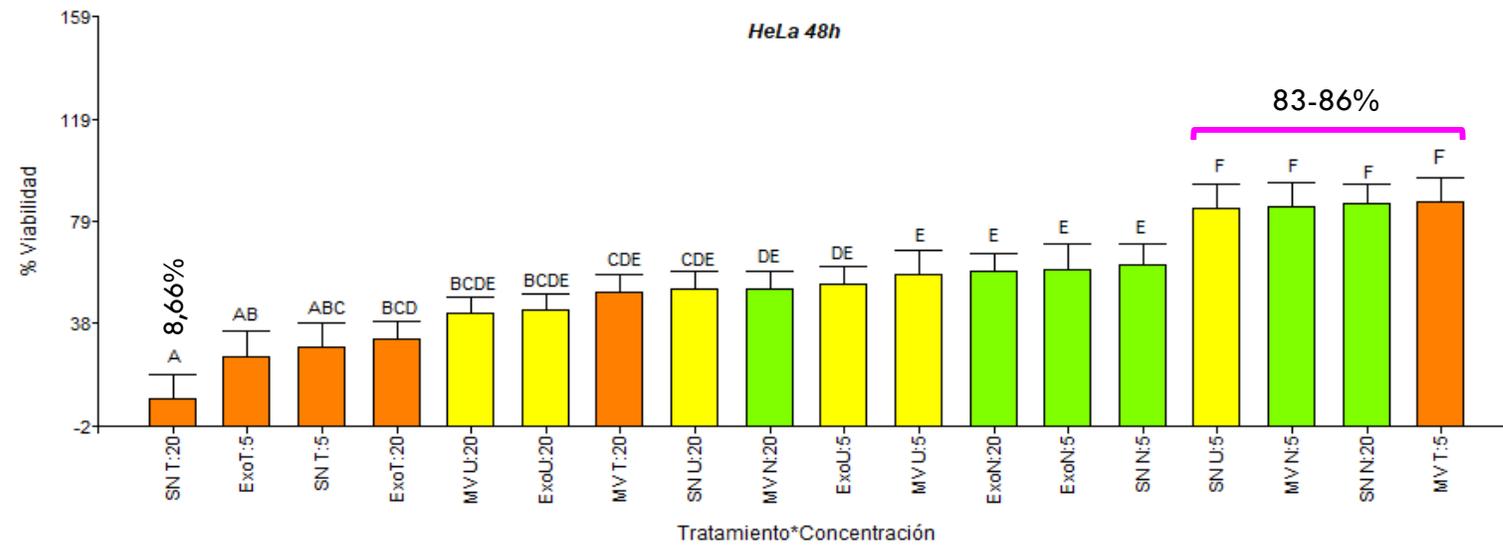
Ácido fosfatídico → absorción y proliferación

Los valores se presentan como medias ± SEM. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f, g) en una misma barra muestran diferencias significativas, según la comparación de Duncan (p< 0,10)



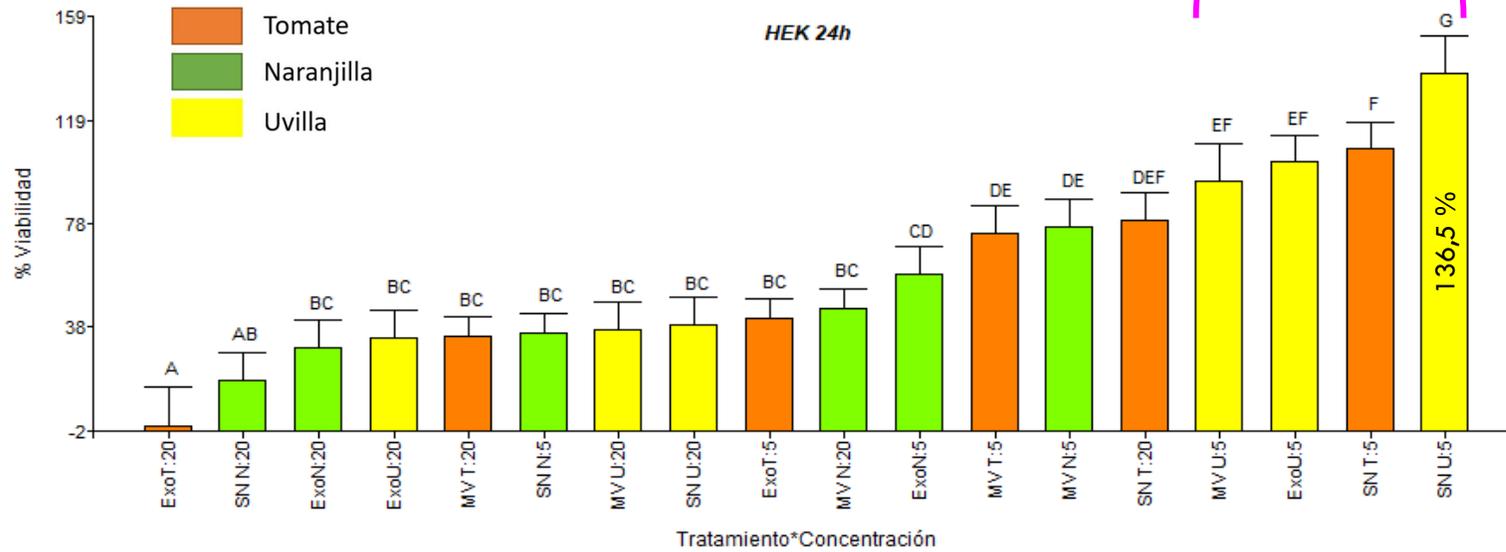
Antiproliferativa
 ↓citocinas proinflamatorias (IL-6)

Antioxidante: ác. rosmarínico, ác. ursólico, ác. gálico, catequina y galato de epicatequina



Antiproliferativa y antioxidante: fenoles, ác. ascórbico y carotenoides

Antiproliferativo: ác. clorogénico, rutina y antocianinas



Proliferativa: 4β-hidroxiwithanólido E, witaperuvina C y fisalactona
 Ø NO y NF-kB

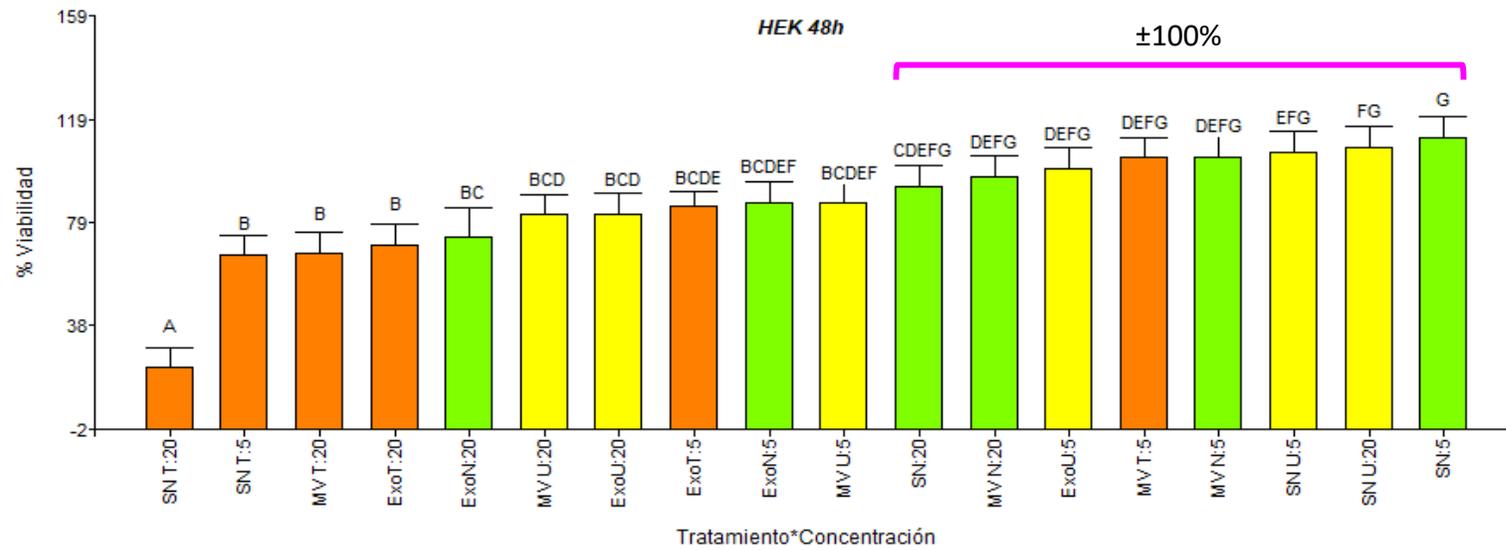
Proliferativa: espermidina

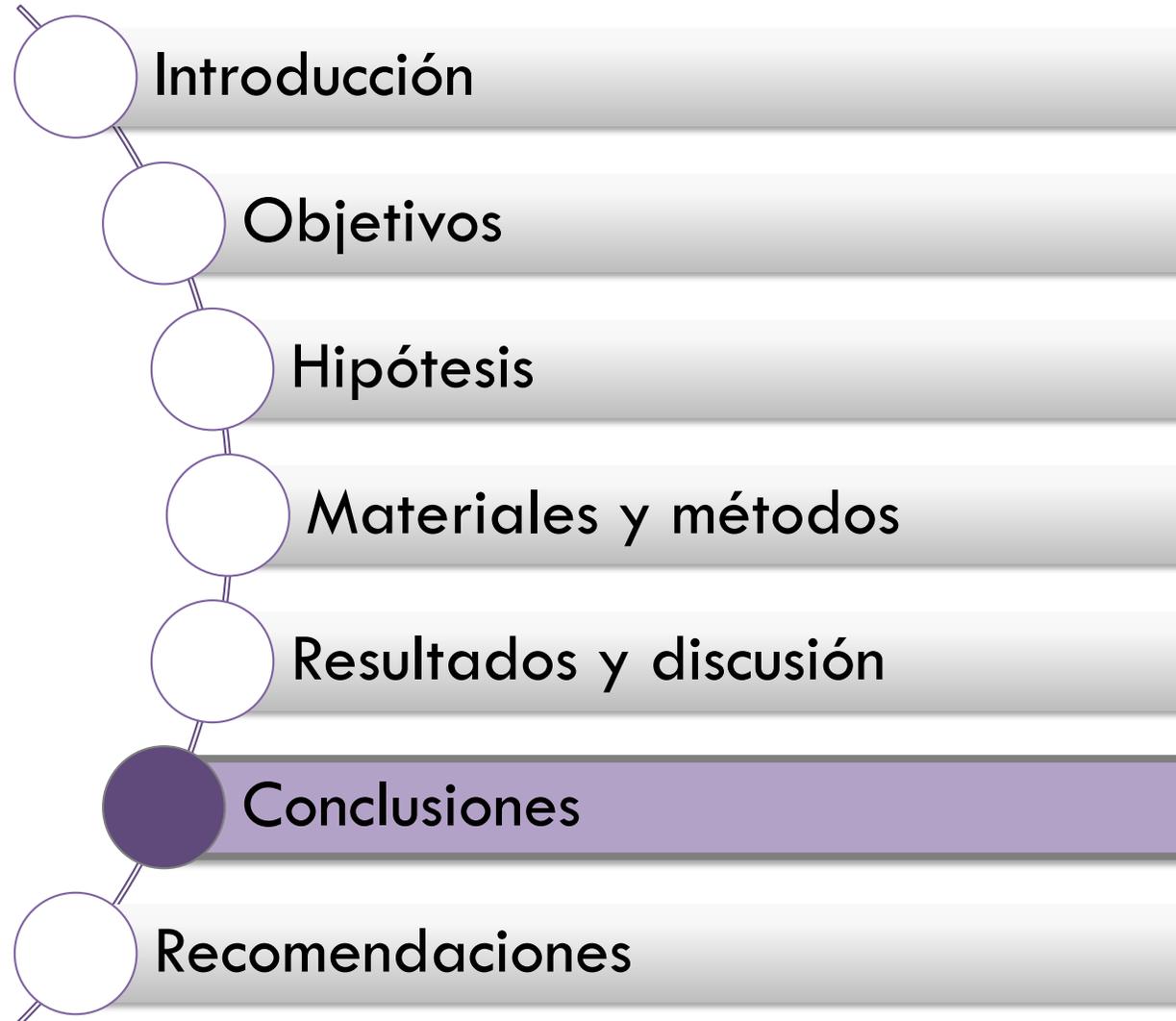
Sin toxicidad: β-caroteno
 Ø radicales libres

N ≠ T ≠ U (SN, MV, Exos) → Origen celular

Antioxidante: N > T > U

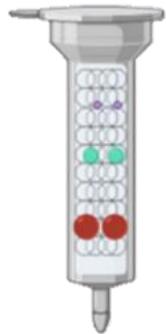
- Planta
 - Condiciones ambientales
 - Factores genéticos
 - Grado de madurez:
- Sobremaduros ↑ fenoles ↑ antioxidante





- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones**
- Recomendaciones

La técnica SEC permite aislar exosomas



F6 - F12



1-3ug/uL
25-35nm

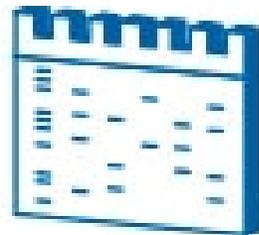


2-6ug/uL
32-110nm

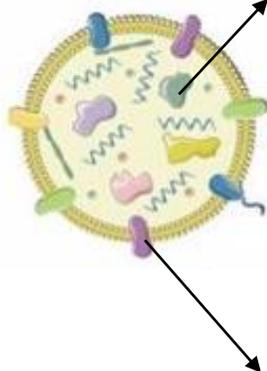


2-5ug/uL
30-69nm

La composición de los Exos obtenidos es similar



Perfil proteico similar



Alix (90kDa)



CD63 (32-60 kDa)
CD81 (22-25 kDa)



El nivel de citotoxicidad es independiente

SN



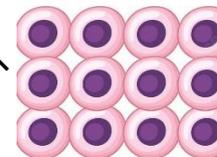
MV



Exos



5ug ↑



HeLa



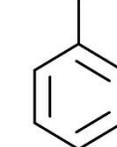
HEK



HFF

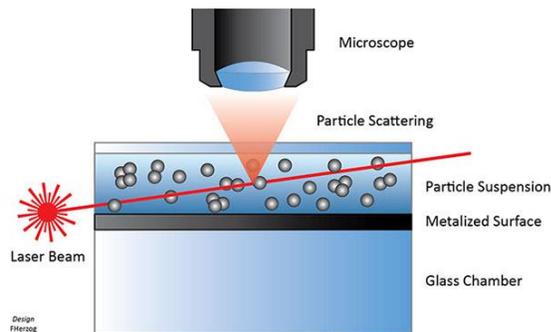
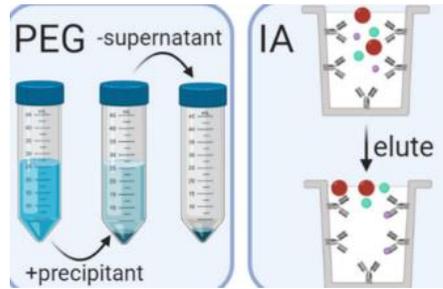
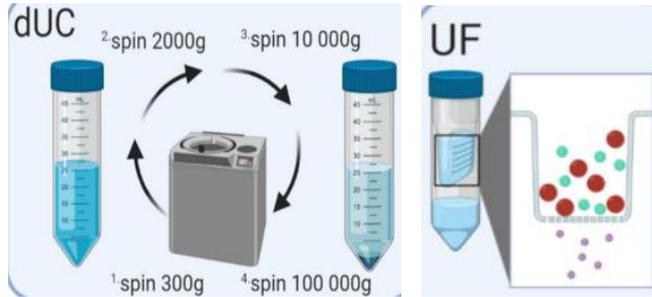


OH

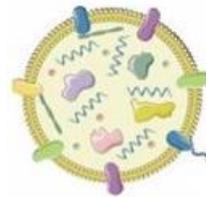


- Introducción
- Objetivos
- Hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

Otros métodos de aislamiento

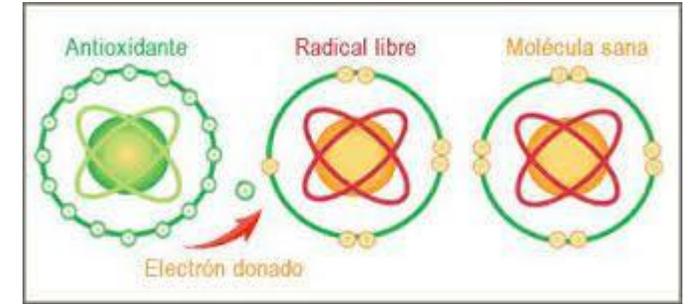


Ensayos del perfil proteómico y lipídico

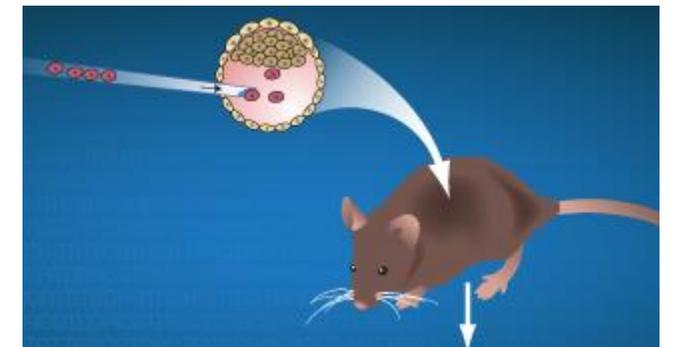
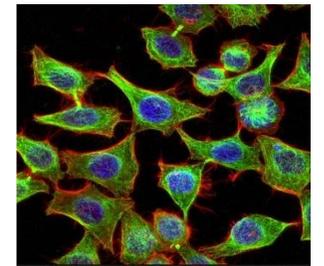


patelinas 1-3
penetración 1
cadena pesada de clatrina

Evaluar capacidad antioxidante



- ABTS
- FRAP
- DPPH
- ORAC





ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

DIOS
FAMILIA Y AMIGOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA