

Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE  
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura  
Carrera de Biotecnología



Trabajo de Unidad de Integración Curricular  
previo a la obtención del  
Título de Ingeniera en Biotecnología

“Obtención de exosomas a partir de *Prunus salicifolia* Kunth,  
Rosacea (capulí) y *Vaccinium meridionale* Sw.,  
Ericaceae (mortiño)”

**AUTORA:** Martínez Carrillo Alexandra Michelle  
**DIRECTORA:** Torres Arias, Marbel Ph.D.

Sangolquí  
Septiembre 2022



# CONTENIDOS

1

INTRODUCCIÓN  
Y  
JUSTIFICACIÓN

2

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

3

RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN

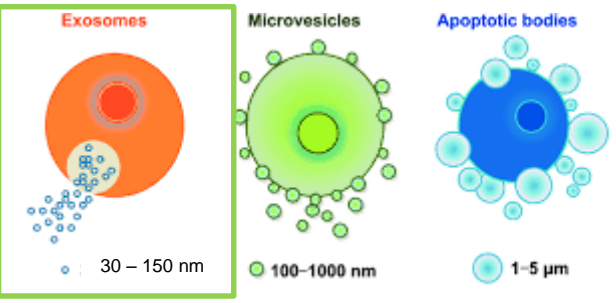
4

CONCLUSIONES  
Y  
RECOMENDACIONES



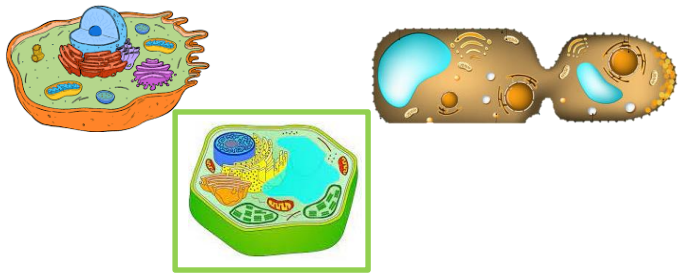
# ¿Exosomas?

## Vesículas Extracelulares

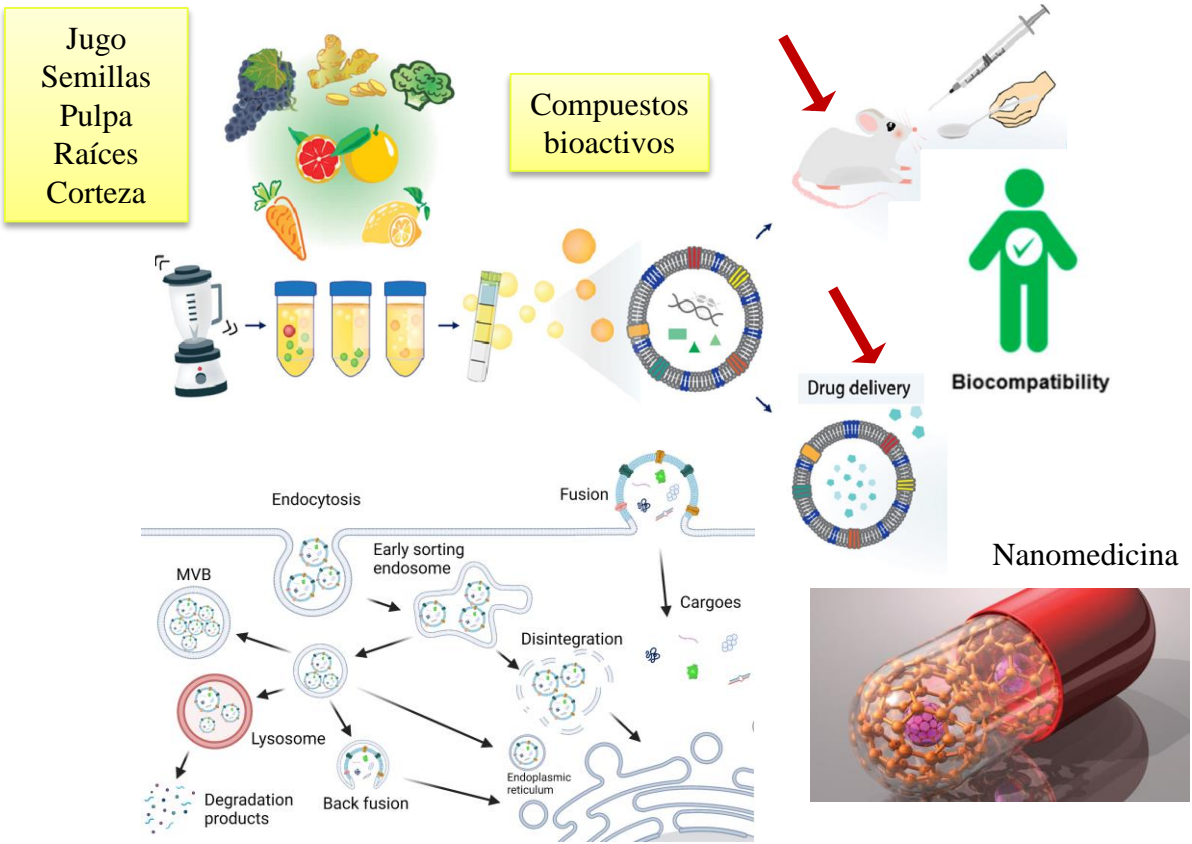


1983 → Vesículas endosomales

## Fuentes de Exosomas



## Exosomas Derivados de Especies Vegetales - Aplicaciones



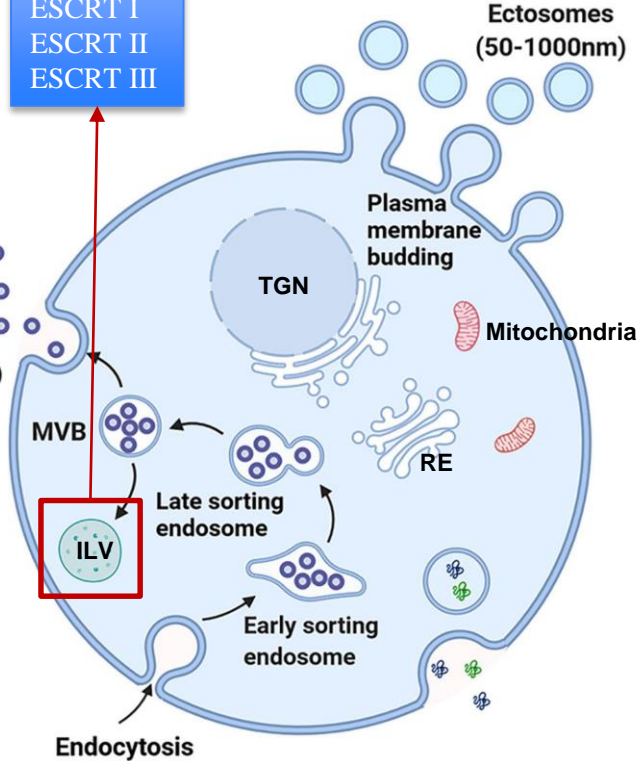
(Zhang *et al.*, 2019) (Sidhom *et al.*, 2020) (Kim *et al.*, 2022)

# ¿Exosomas?

1. Formación de vesículas endocíticas por invaginación de la membrana plasmática.
2. Formación de MVB con la membrana.
3. Liberación del contenido vesicular, exosoma

## Biogénesis de Exosomas

ESCRT 0  
ESCRT I  
ESCRT II  
ESCRT III

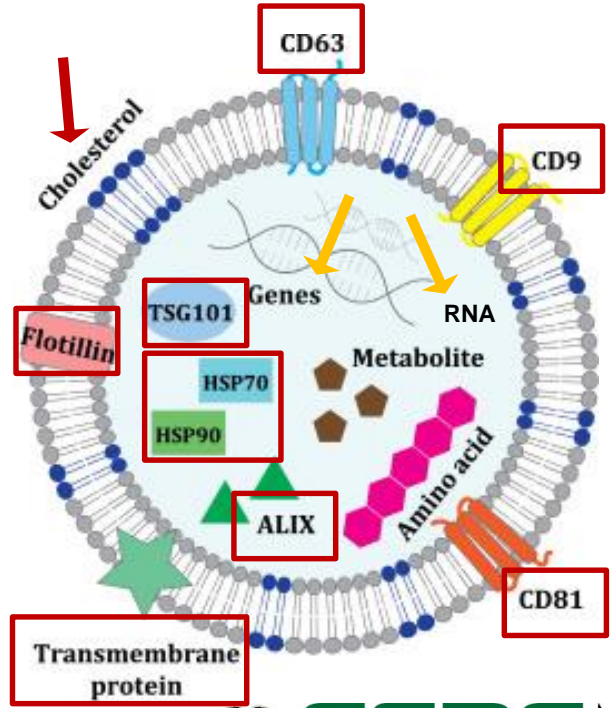


Exosomal cargos

Protein	RNA	DNA
Enzyme	mRNA	dsDNA
Signal transduce protein	miRNA	ssDNA
Cytoskeletal protein	Pre-miRNA	Viral DNA
Nuclear protein	lncRNA	mtDNA
RNA binding protein	circRNA	
Apoptotic protein		

## Composición de Exosomas

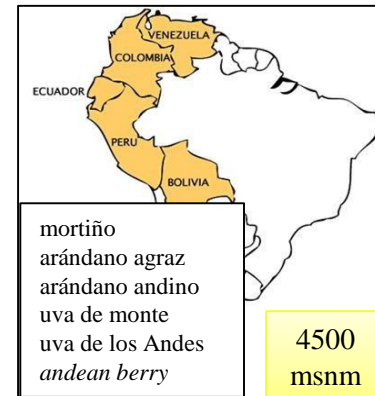
- Expresión de proteínas
- Lipídico
- Carga genómica y transcriptómica



(Guranathan et al., 2019) (Yang et al., 2021) (Perut et al., 2021)

## Prunus salicifolia Kunth

## Vaccinium meridionale Swartz



### TAXONOMÍA DEL CAPULÍ

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Prunus
Especie	<i>P. salicifolia</i> Kunth

### Actividad Antioxidante

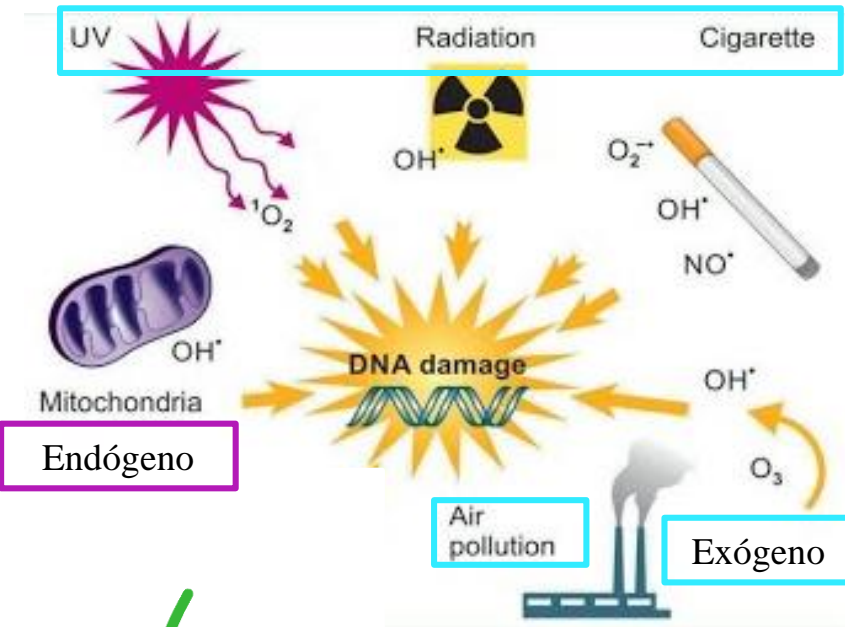
Componente Fitoquímico	Capulí	Mortiño
→ Polifenoles totales (mg GAE/100 g)	1732 ± 43.40	107.4 ± 6.7
Fenoles totales (mg GAE/g)	362,2	608.05 - 882
→ Antocianinas totales (mg/100 g)	10,71	1095.4 ± 19.2
Proantocianidinas (%)	3,247	4.6 ± 0.3
→ Flavonoides totales (mg EC/g)	16,56	6.5 ± 0.7

### TAXONOMÍA DEL MORTIÑO

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Vaccinium
Especie	<i>V. meridionale</i> Swartz

# Justificación

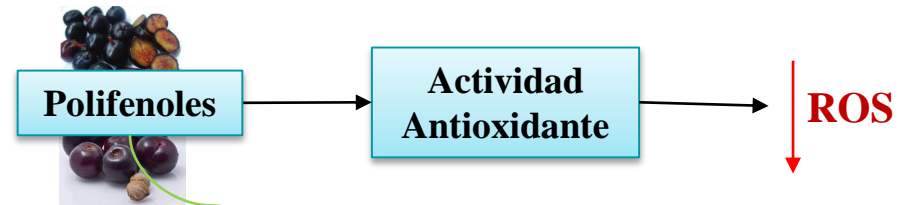
## Radicales Libres (ROS)



NORMALES → Equilibrado

ESTRÉS OXIDATIVO → Desequilibrado

↑ ROS



Modular

Procesos bioquímicos

implicados

- Carcinogénesis
- Cardiovasculares
- Neurodegenerativos

Aislar y caracterizar exosomas de capulí y mortiño; y evaluar el efecto biológico de estos exosomas sobre líneas celulares sanas y tumorales.

# OBJETIVO GENERAL

Obtener de exosomas a partir de *Prunus salicifolia* Kunth, Rosacea (capulí) y *Vaccinium meridionale* Sw., Ericaceae (mortiño).

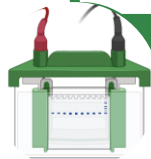
# HIPÓTESIS

*Prunus salicifolia* Kunth, Rosacea (capulí) y *Vaccinium meridionale* Sw., Ericaceae (mortiño) secretan exosomas con actividad antioxidante.

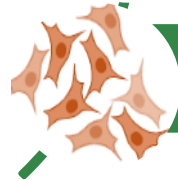
# OBJETIVOS ESPECÍFICOS



Caracterizar exosomas de dos frutos andinos mediante microscopía electrónica.



Analizar el perfil proteico de exosomas de dos frutos andinos mediante electroforesis vertical.



Determinar la citotoxicidad de exosomas de dos frutos andinos mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).



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



# CONTENIDOS

1

INTRODUCCIÓN  
Y  
JUTIFICACIÓN

2

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

3

RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN

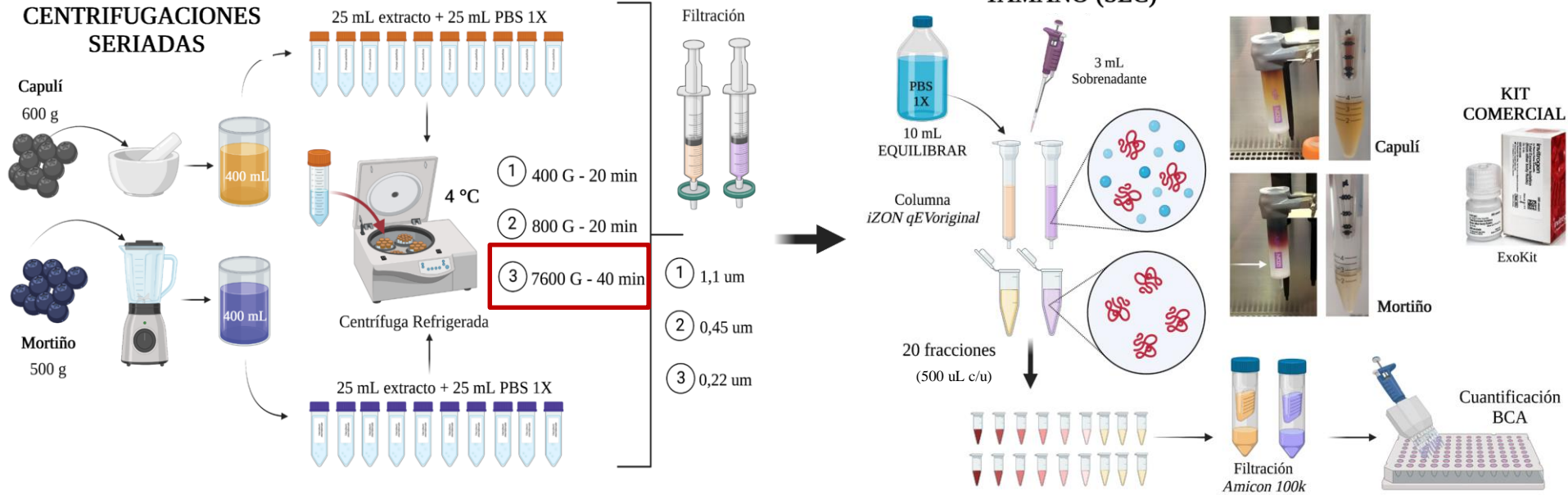
4

CONCLUSIONES  
Y  
RECOMENDACIONES





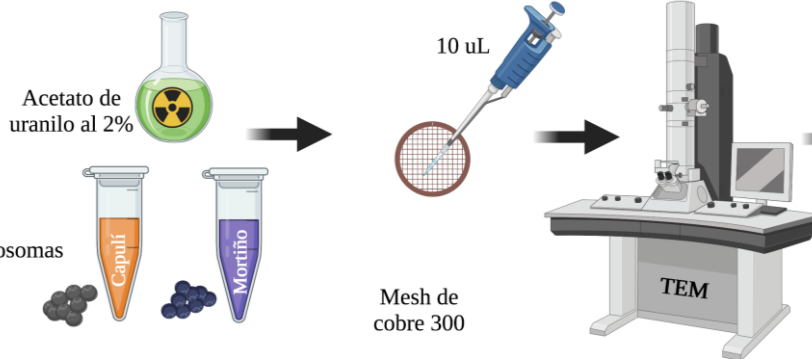
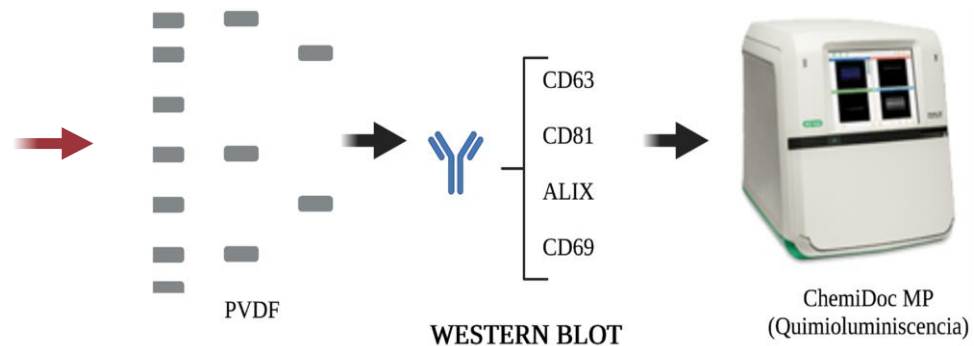
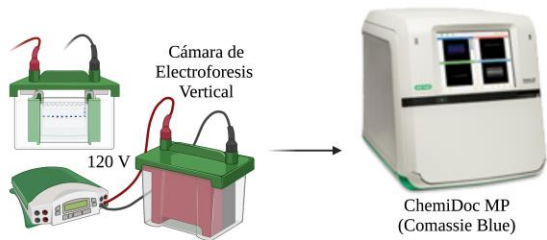
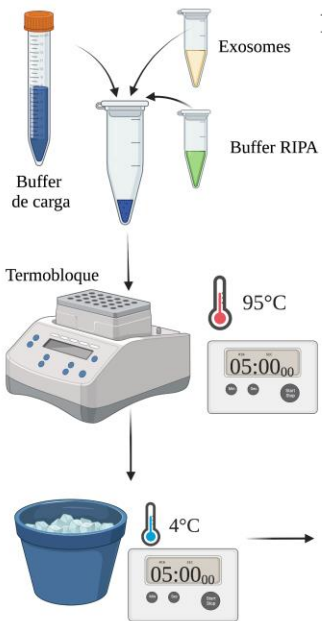
# Aislamiento de Exosomas de Capulí y Mortiño



# ELECTROFORESIS VERTICAL DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

# Caracterización de Exosomas de Capulí y Mortiño

Esquemas elaborados en BioRender



## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

2 protocolos



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



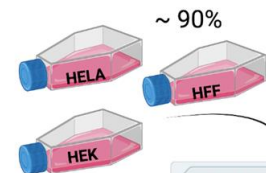
# Determinación de Citotoxicidad de Exosomas sobre Líneas Celulares

## PROLIFERACIÓN CELULAR



## ENSAYO MTT

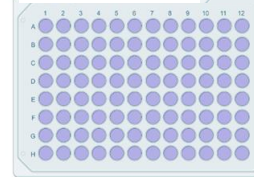
DÍA 1: Plaqueo



DÍA 2: Tratamientos

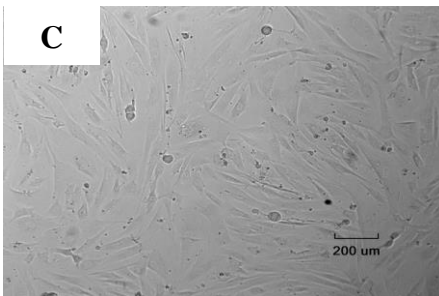
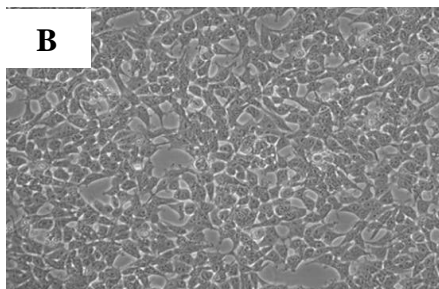
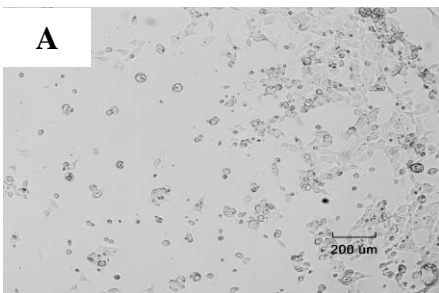


DÍA 3: MTT / SDS



37 °C  
5% CO<sub>2</sub>

Confluencia



Líneas celulares utilizadas en cultivo celular.  
A) HELA (LABIV), B) HEK-293 (ATCC),  
C) HFF (LABIV)

# CONTENIDOS

1



2



3



4

INTRODUCCIÓN

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN

CONCLUSIONES  
Y  
RECOMENDACIONES

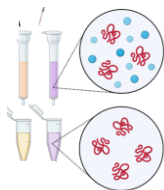


*Caracterización de exosomas de dos frutos andinos  
mediante microscopía electrónica de transmisión  
(TEM)*



# Aislamiento de Exosomas y Cuantificación Proteica por BCA

FRACCIONES: 6 - 11



1,068 mg/mL

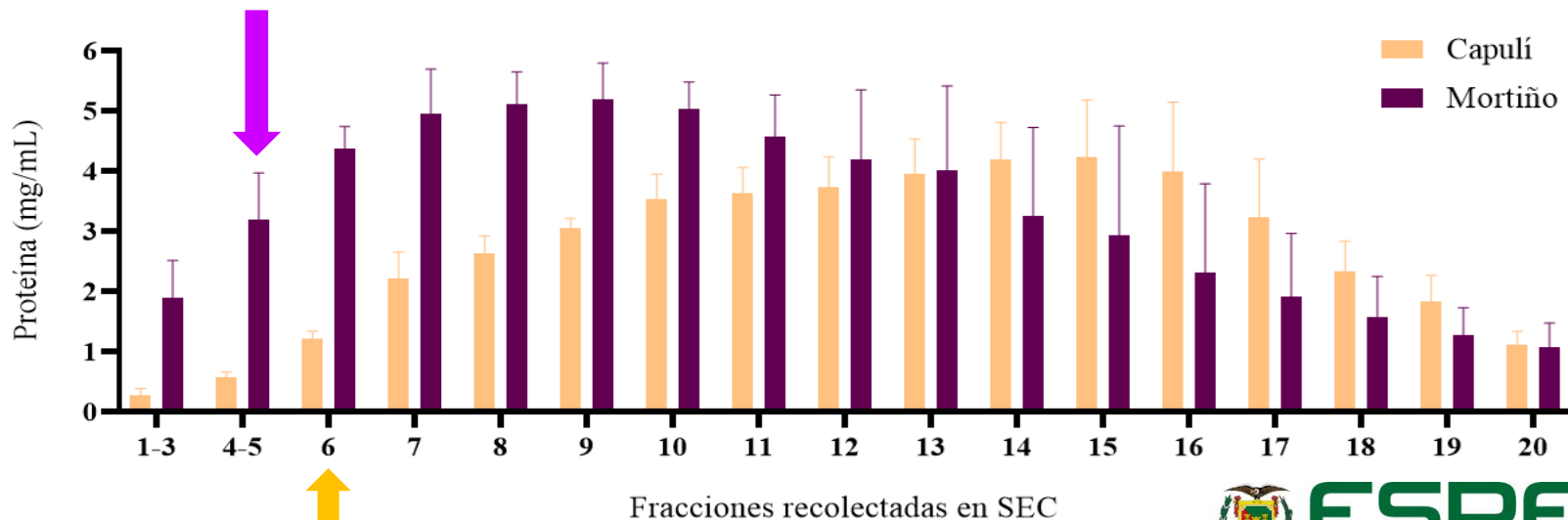
0,937 mg/mL



2,321 mg/mL

3,258 mg/mL

## Cuantificación de Proteínas de Capulí y Mortiño



(Valero *et al.*, 2016) (Hong *et al.*, 2016)

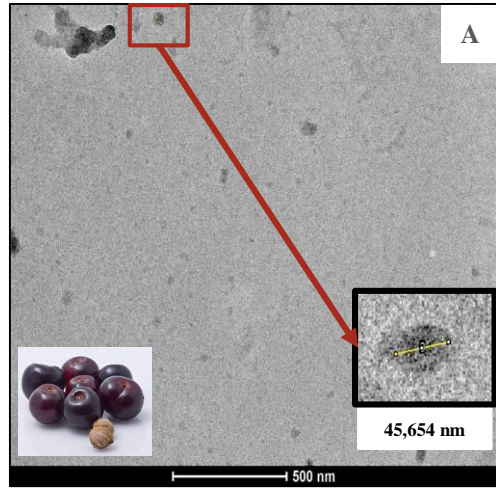
Esquemas elaborados en *GraphPad Prism*



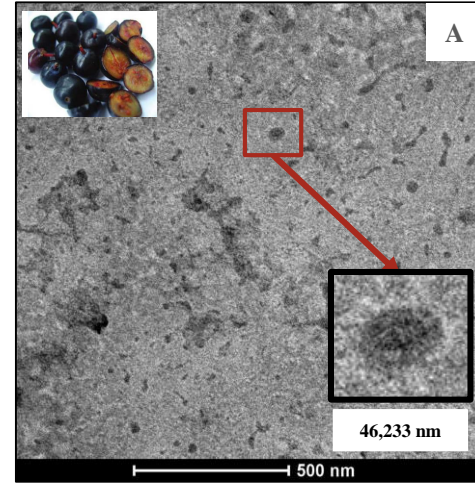
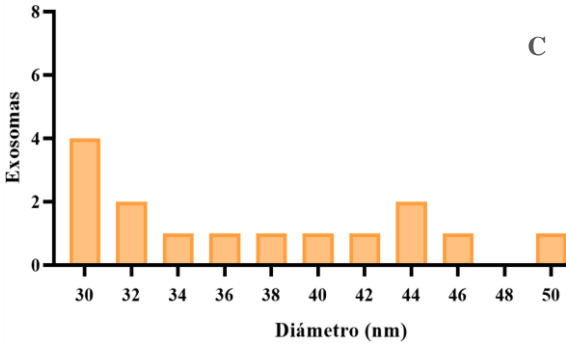
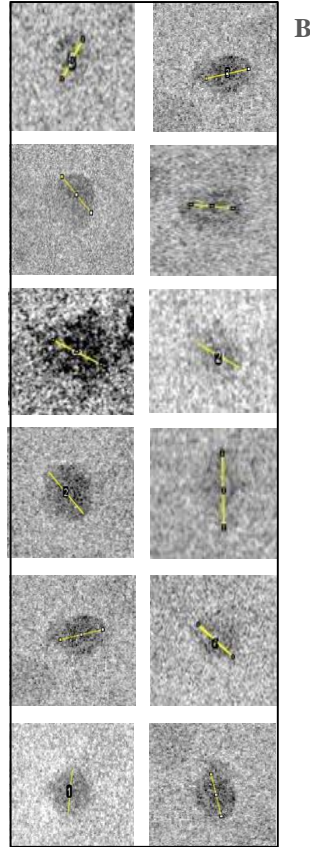
**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



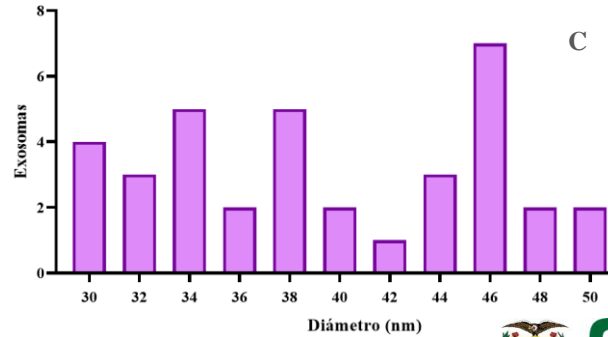
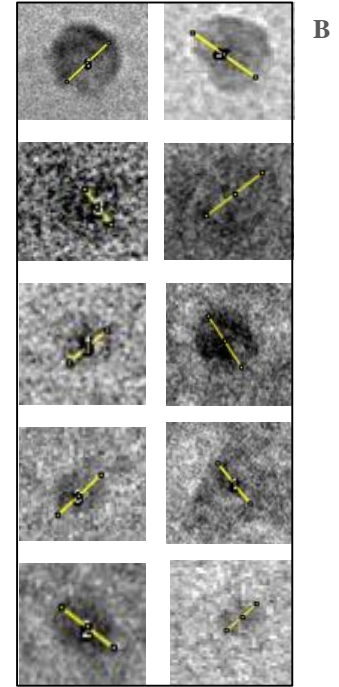
# Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)



Exosomas de Capulí



Exosomas de Mortiño



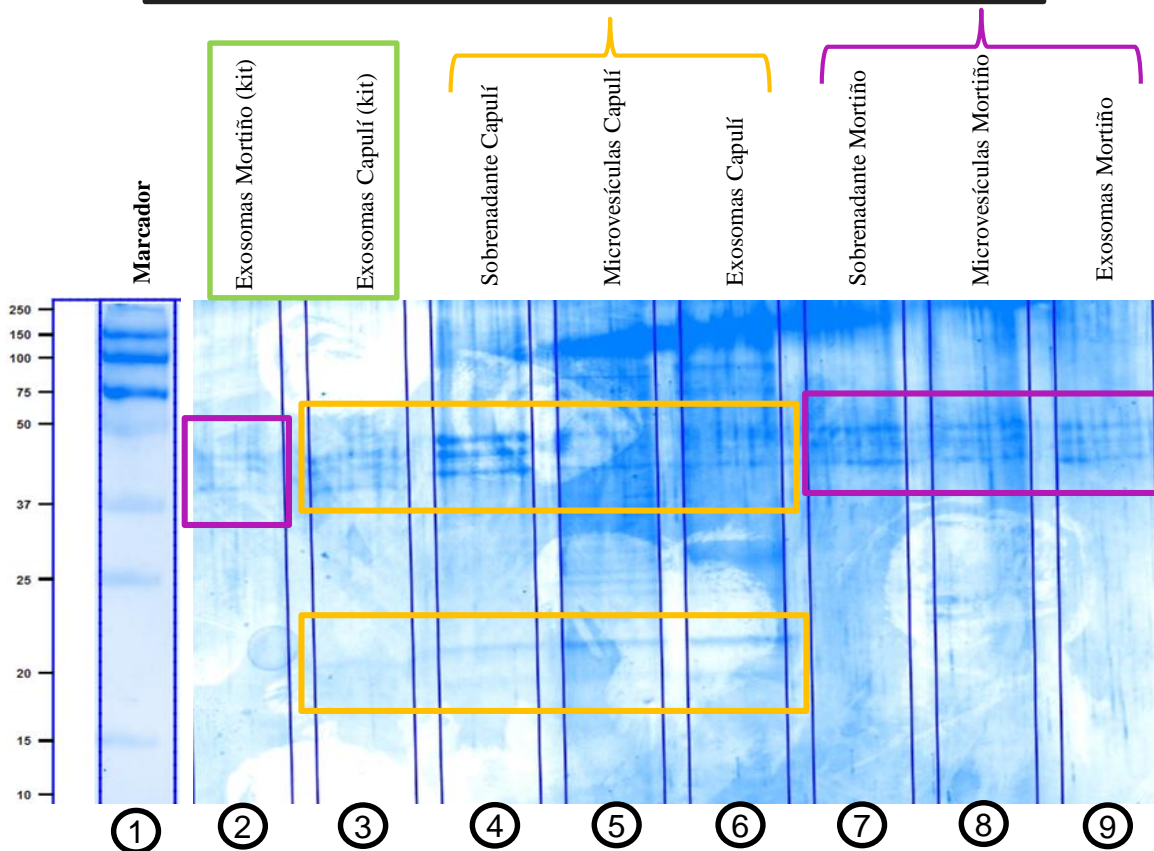
## *Análisis del perfil proteico de exosomas de dos frutos andinos mediante electroforesis vertical*



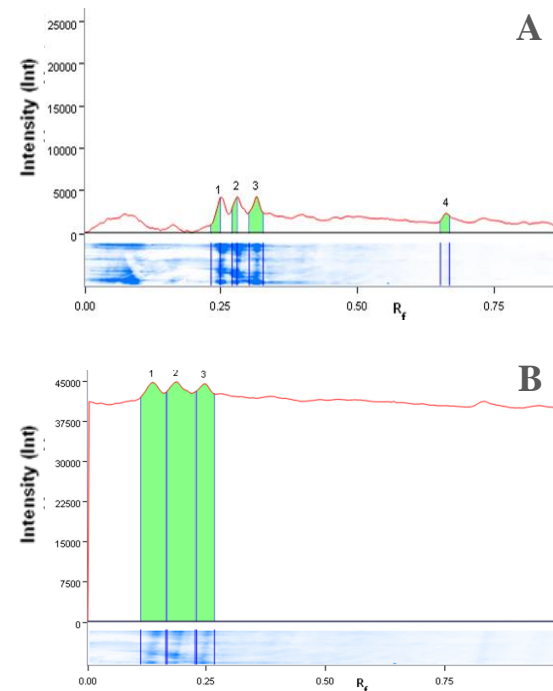


# Electroforesis Vertical de Proteínas de Capulí y Mortiño

Perfil Proteico de Capulí y Mortiño en Gel de Poliacrilamida al 10%



Densitometría del Perfil Proteico de Exosomas de Capulí y Mortiño



(Tang *et al.*, 2017) (Lamparski *et al.*, 2022) (Yang *et al.*, 2018)

Análisis realizados en ImageLab



# Immunodetección de Proteínas Exosomales mediante Western Blot

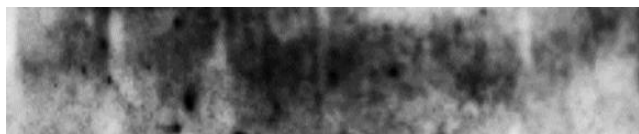
120 ug  
de proteína

Exosomas Mortiño  
Microvesículas Mortiño  
Sobrenadante Mortiño  
Exosomas Capulí  
Microvesículas Capulí  
Sobrenadante Capulí

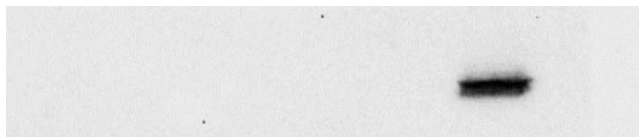
anti - CD63  
(23-60 kDa)



anti - CD69  
(60 kDa)



anti - CD81  
(22 kDa)

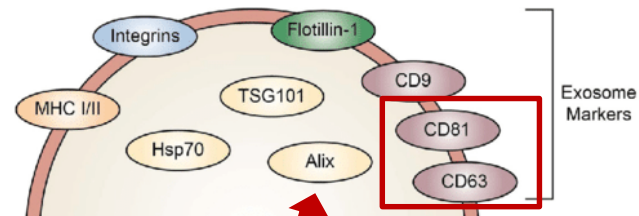


kDa

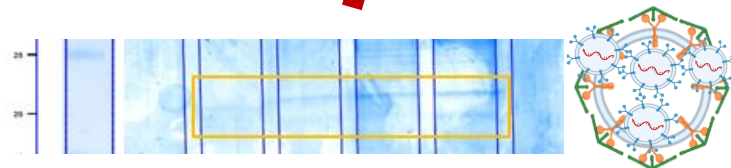
~ 63

~ 57

~ 23



Exosome Markers



Carga exosomal variable



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

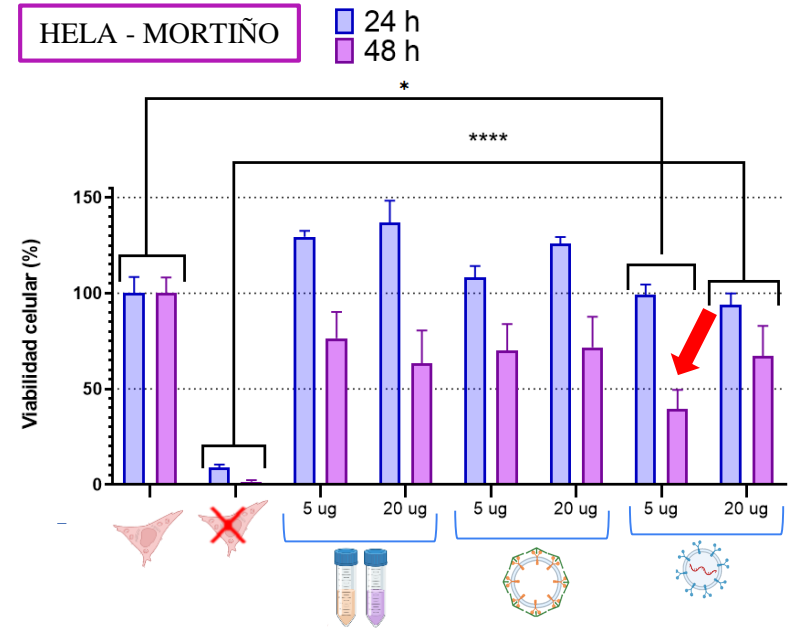
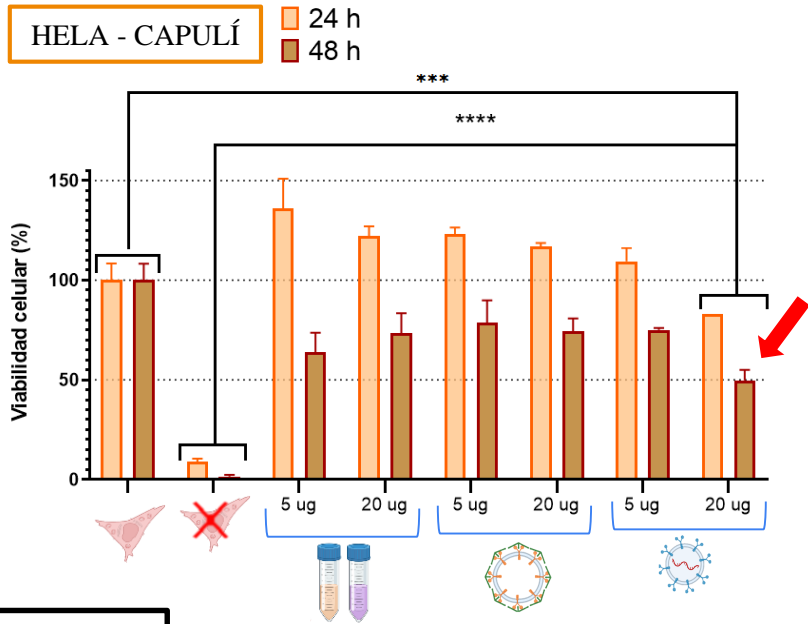


*Determinación de la citotoxicidad de exosomas de dos frutos andinos mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)*



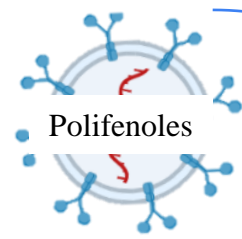
# Citotoxicidad de Exosomas sobre Líneas Tumorales

media ± SEM

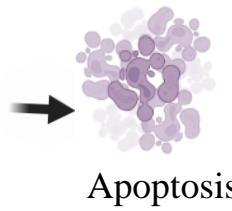


- Viabilidad
- Citotoxicidad
- Sobrenadante
- Microvesículas
- Exosomas

\*\*\*\* → p < 0.0001  
 \*\*\* → p = 0.0002  
 \* → p = 0.0246



Internalización celular



(Zamani *et al.*, 2019) (Soleti *et al.*, 2018) (Joshi *et al.*, 2020) (Yamaguchi *et al.*, 2006)

Esquemas elaborados en GraphPad Prism y BioRender

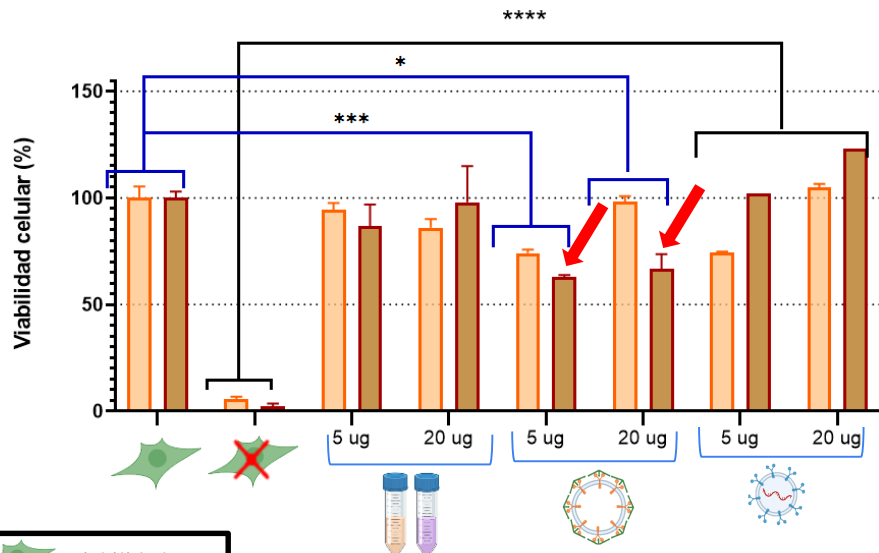
ESPE  
 UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
 INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

100 años

# Citotoxicidad de Exosomas sobre Líneas TumORALES

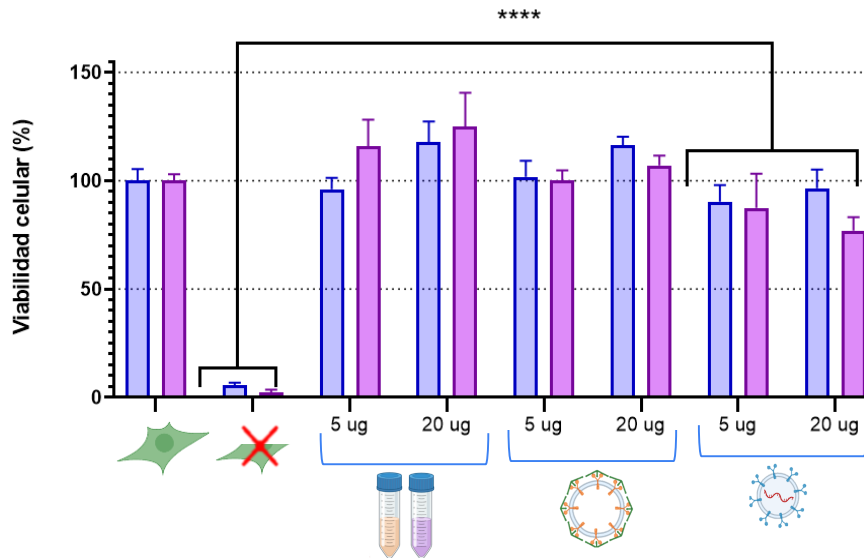
HEK - CAPULÍ






24 h  
48 h



HEK - MORTIÑO

24 h  
48 h



-  Viabilidad
-  Citotoxicidad
-  Sobrenadante
-  Microvesículas
-  Exosomas

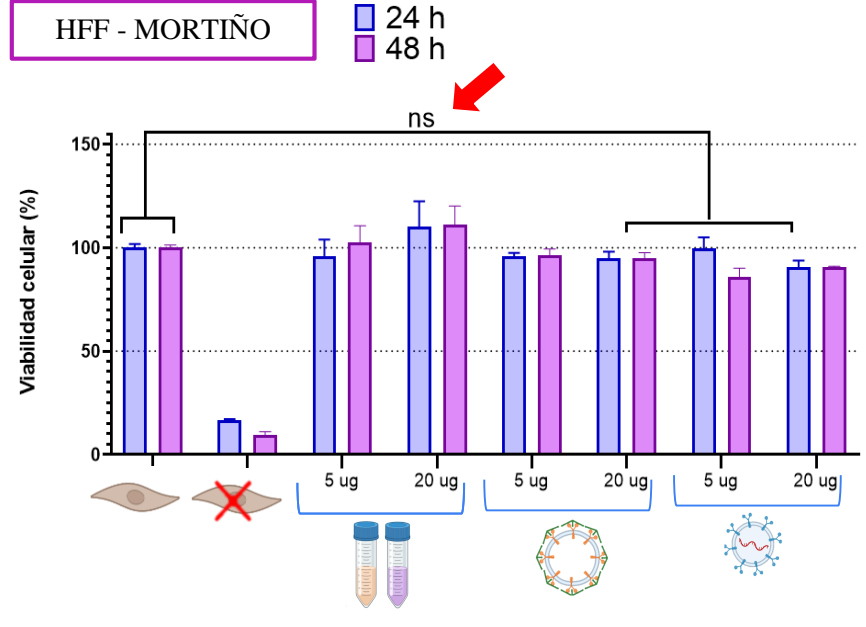
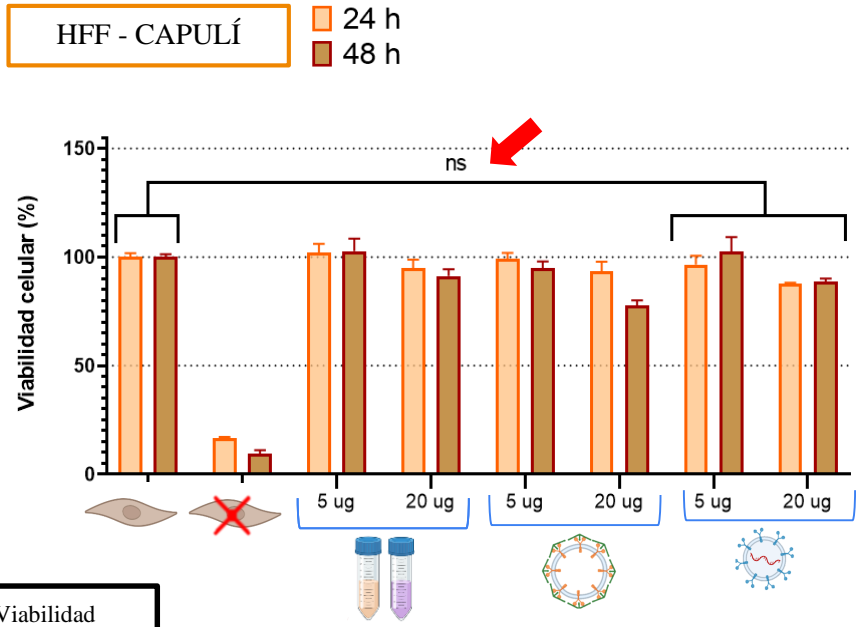
\*\*\*\* → p < 0.0001  
 \*\*\* → p = 0.001  
 \* → p = 0.020

**HEK:** Inmortalizada a partir de riñón embrionario humano mediante la transformación con adenovirus

(Shiloaj, 2021)

Esquemas elaborados en *GraphPad Prism* y *BioRender*

# Citotoxicidad de Exosomas sobre Línea No Tumoral



- Viabilidad
- Citotoxicidad
- Sobrenadante
- Microvesículas
- Exosomas

NO Citotóxicos

Capulí → Células sanas ~100% viabilidad

Mortiño liofilizado → 100% viabilidad (modelo animal)

(Noratto *et al.*, 2020) (Baenas *et al.*, 2020).

Esquemas elaborados en GraphPad Prism y BioRender

# CONTENIDOS

1

INTRODUCCIÓN

2

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

3

RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN

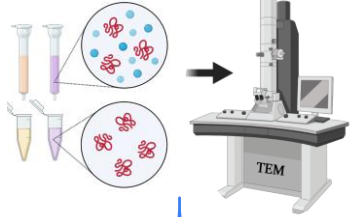
4

CONCLUSIONES  
Y  
RECOMENDACIONES



1

Exosomas

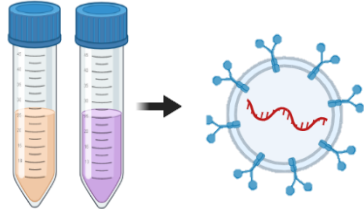


Morfología

Tamaño

# CONCLUSIONES

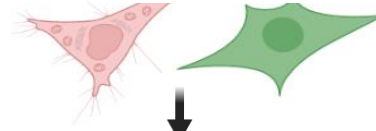
2



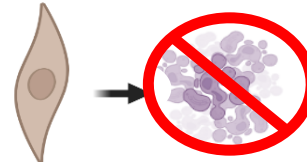
Conservación de proteínas

**HIPÓTESIS**

3



Citotoxicidad



Seguro

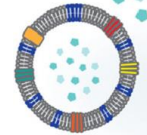
Terapéutico -  
Estrés oxidativo



Bases → Potencial de exosomas de frutos andinos

PRODUCCIÓN  
A  
GRAN ESCALA

Drug delivery

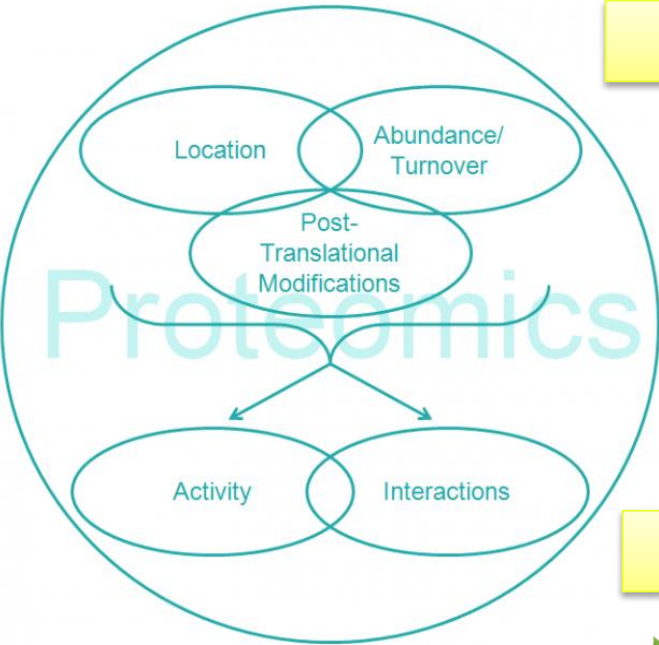


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA





# RECOMENDACIONES

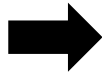
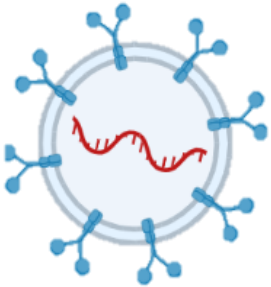
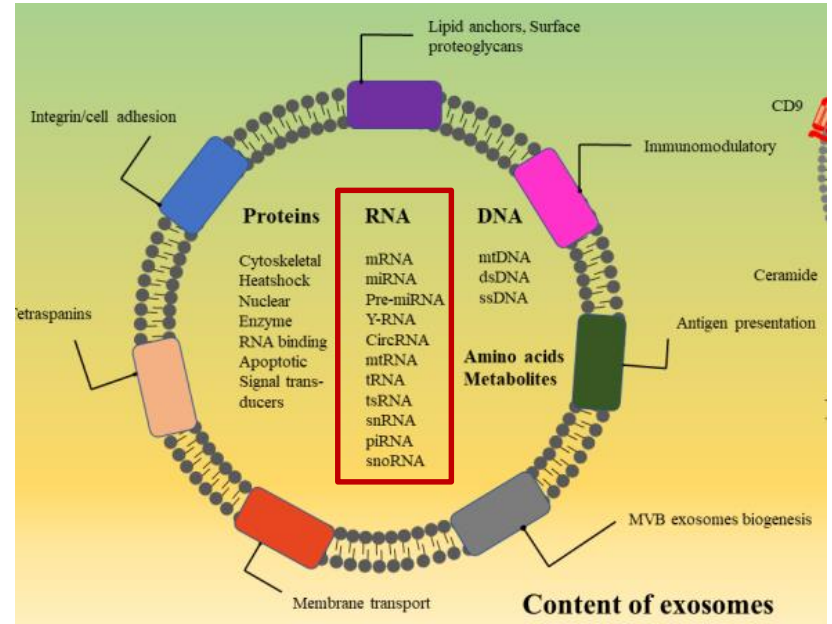


DLS

TEM HD

NTA

Citometría



Patelinas  
Sintaxinas  
HSP60,70,80,90

# AGRADECIMIENTOS



Carrera de Biotecnología  
UFA - ESPE



Torres Arias, Marbel Ph.D.



Debut Alexis Ph.D.



Familia & Amigos



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

