



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



**Trabajo de integración curricular previo a la obtención  
del Título de Ingeniero en Biotecnología**

“Obtención de exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae).”

Autor: Víctor Van Ronzelen

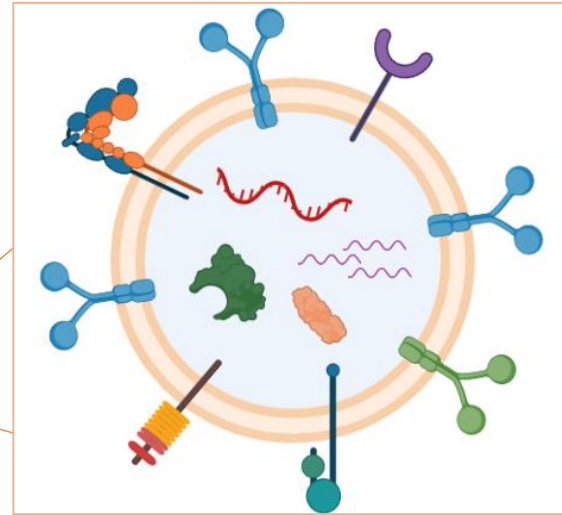
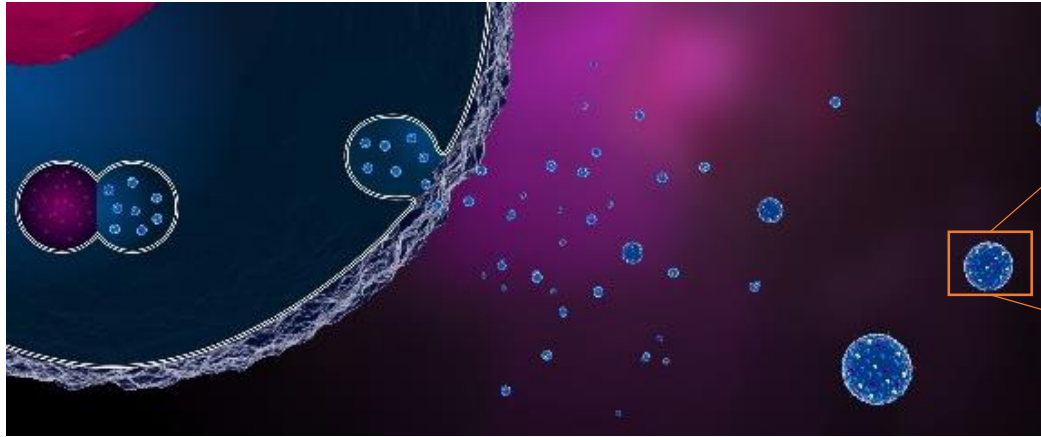
Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D.

Sangolquí, 2 de septiembre de 2022

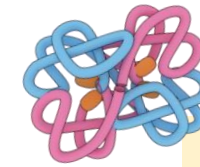


# INTRODUCCIÓN

¿Exosomas? → Vesículas extracelulares



Metabolitos



Annexinas

Integrinas

Tetraspaninas

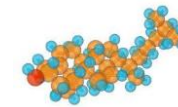
CD81  
CD69  
CD63

mRNA

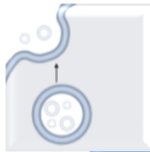
miRNA



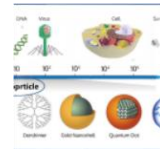
Lípidos



## Características generales



- Formados en cuerpos multivesiculares (MVB's)
- Secretados por exocitosis



- Escala nanométrica
- 30 – 100 nm



- Cargamento complejo
- Dependiente de célula secretora

# INTRODUCCIÓN

## Biogénesis exosomal

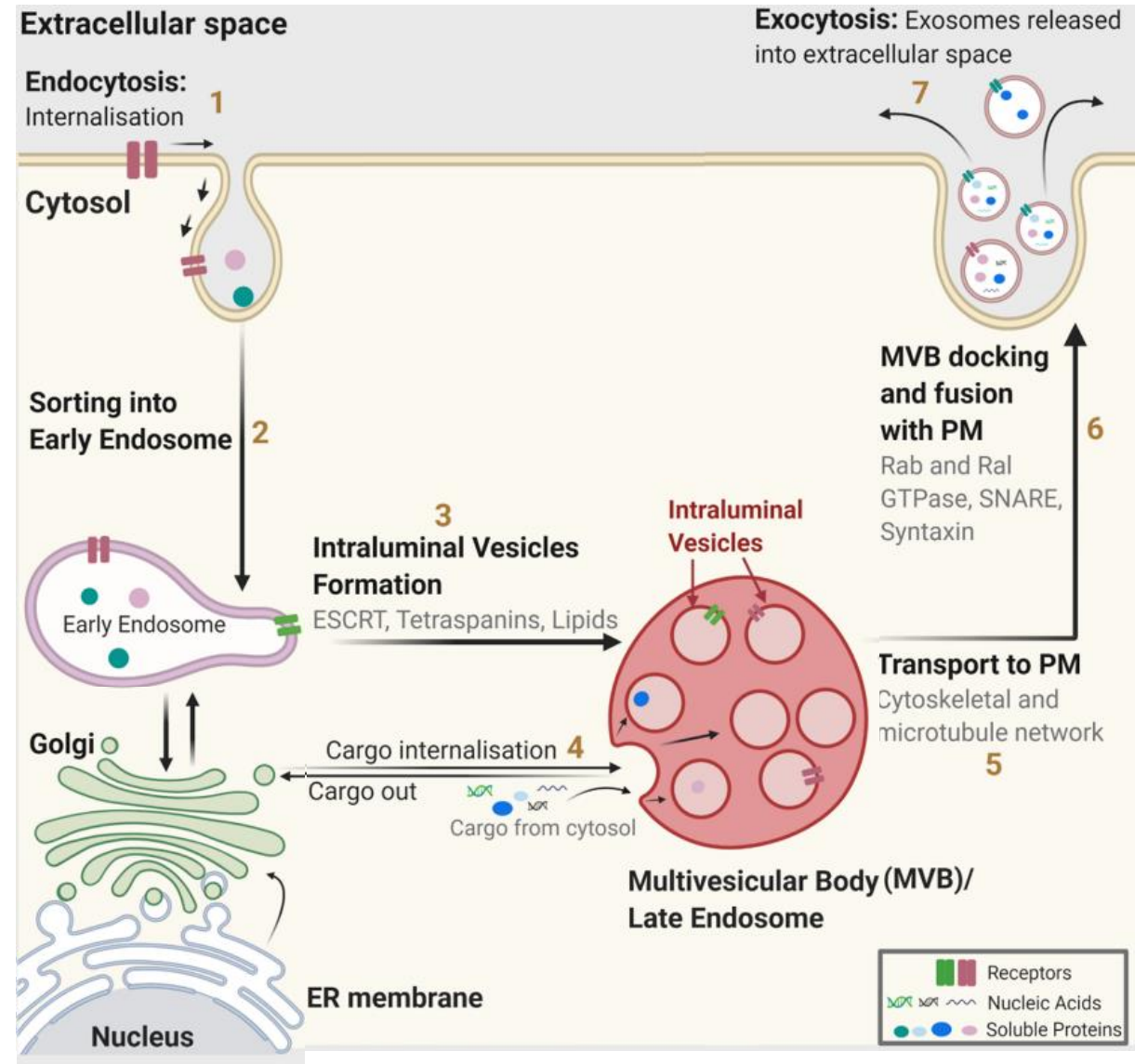
- Dependiente del complejo ESCRT

ESCRT-0  
ESCRT-I  
ESCRT-II  
ESCRT-III



- Independiente del complejo ESCRT

Sinteninas  
Tetraspaninas



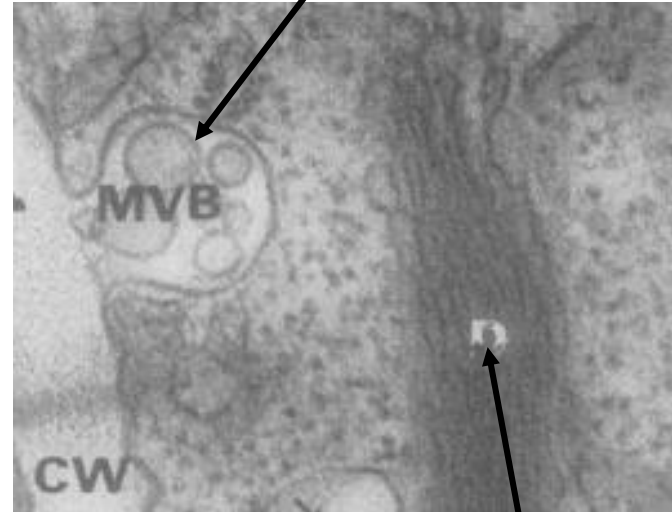


# INTRODUCCIÓN

## Exosomas de origen vegetal

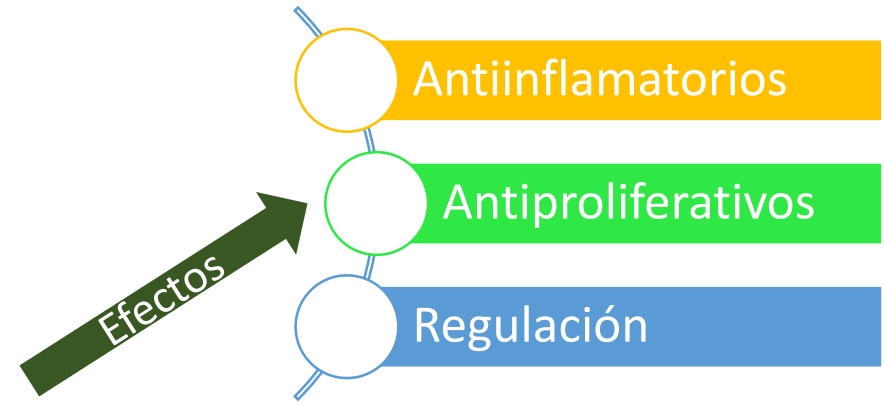


Vesículas intraluminales



Dictiosoma

Descripciones de exosomas en varios organismos vegetales



- Biocompatibilidad
- Rendimiento
- Disponibilidad

Ventajas

Alternativa a exosomas derivados de células mamíferas

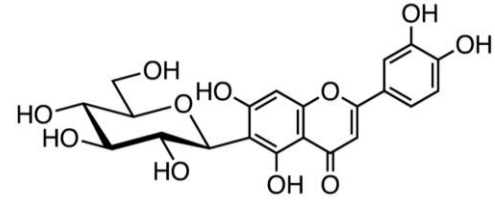
# INTRODUCCIÓN

Composición de maracuyá, taxo y lima

*Passiflora edulis*



Polifenoles  
Flavonoides  
Triterpenos

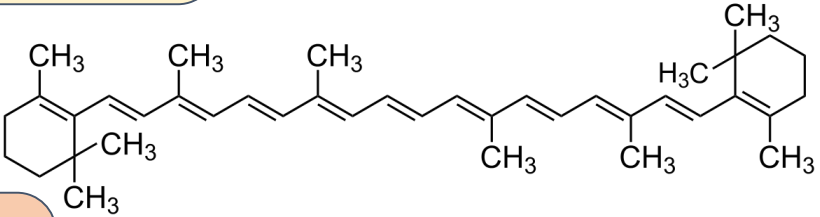


Isoorientina

*Passiflora tripartita*



Polifenoles  
Flavonoides  
Carotenoides

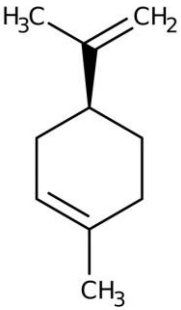


β-caroteno

*Citrus x aurantifolia*



Flavonoides  
Limonoides



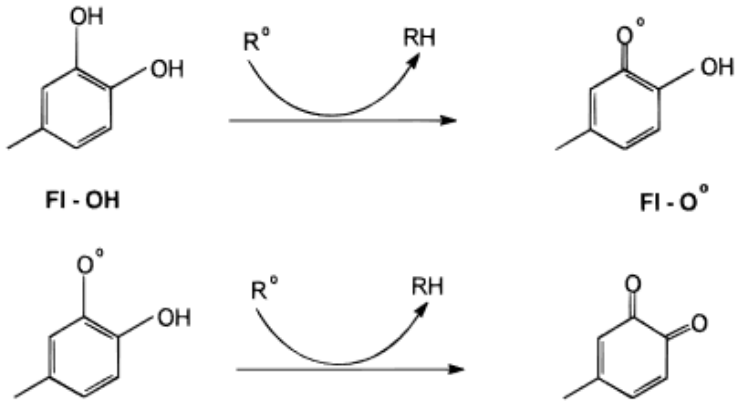
Limoneno



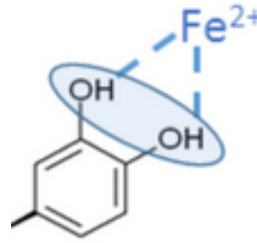
(Deng et al., 2010) (García-Ruiz et al., 2017) (Spadaro et al., 2012) (Xe et al., 2020)

# INTRODUCCIÓN

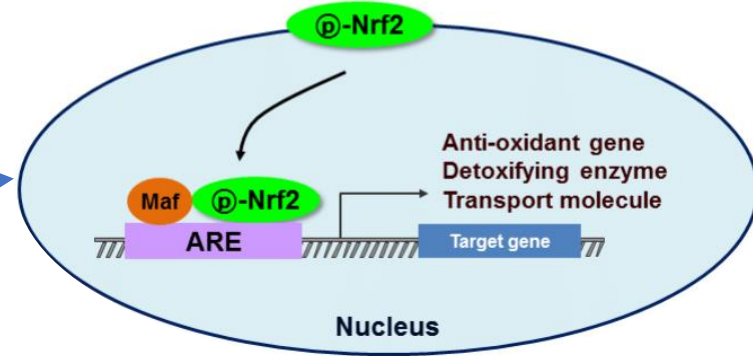
## Mecanismos antioxidantes



## Queladores de metales



## Activación de respuestas antioxidantes



## Secuestro de radicales libres



Inhibición de enzimas oxidantes

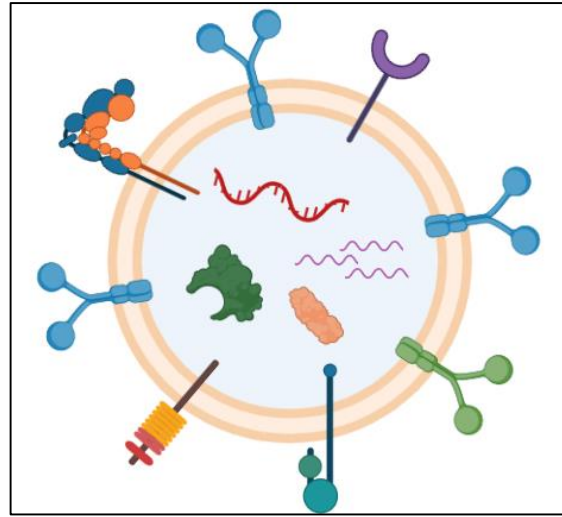
Supresión de vías de señalización relacionadas con estrés

NF-κB  
TNF-α

# Justificación



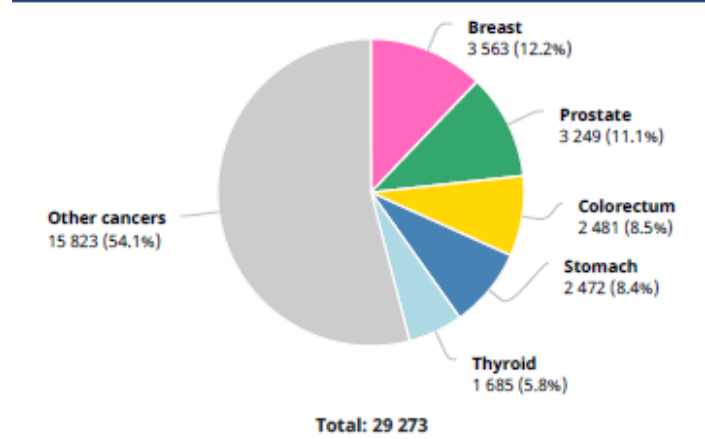
Condiciones favorables de producción



Oportunidad de investigación



Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Prevalencia de casos



Casos

# Hipótesis

Las frutas de maracuyá, taxo y lima secretan exosomas con efectos citotóxicos en líneas celulares cancerígenas.





# Objetivos

## Objetivo General

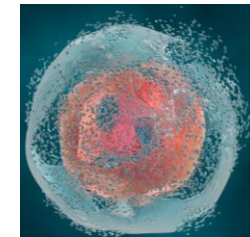
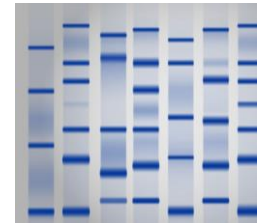
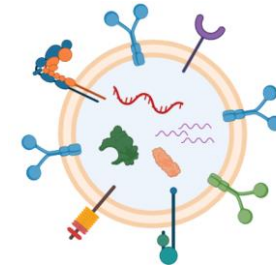
Obtener exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae).

## Objetivos Específicos

Caracterizar exosomas a partir de frutos de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae).

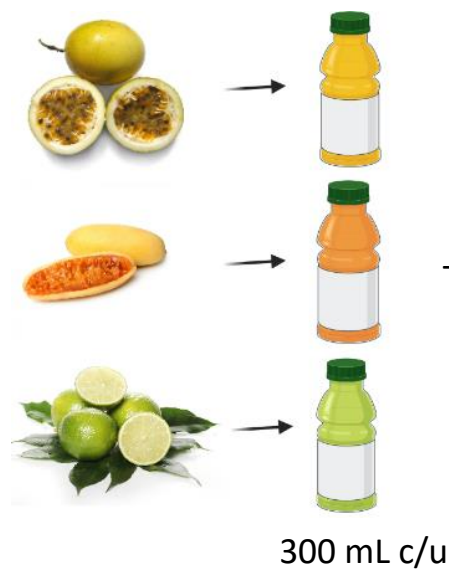
Analizar el perfil proteico de exosomas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae) mediante electroforesis vertical.

Determinar la citotoxicidad de exosomas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae) mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT).



## Obtención y purificación de exosomas

### 1 Obtención de pulpa

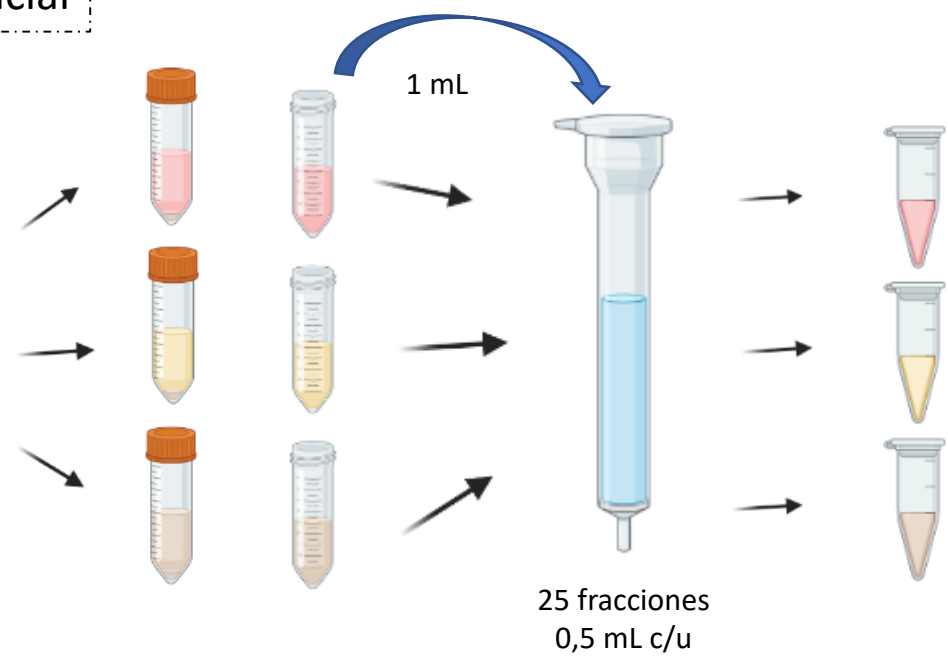


+ PBS 1X  
1:1

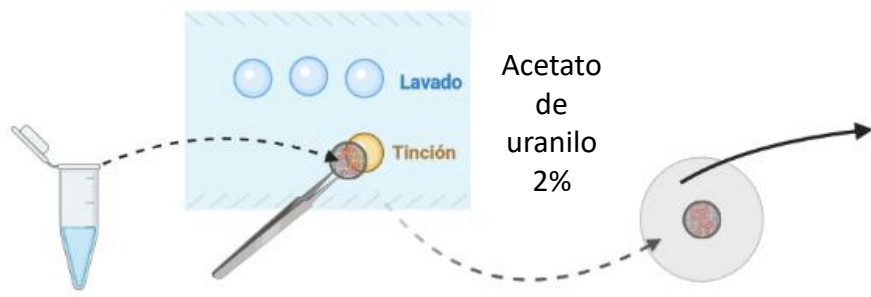
### 2 Centrifugación diferencial



### 3 Purificación por SEC



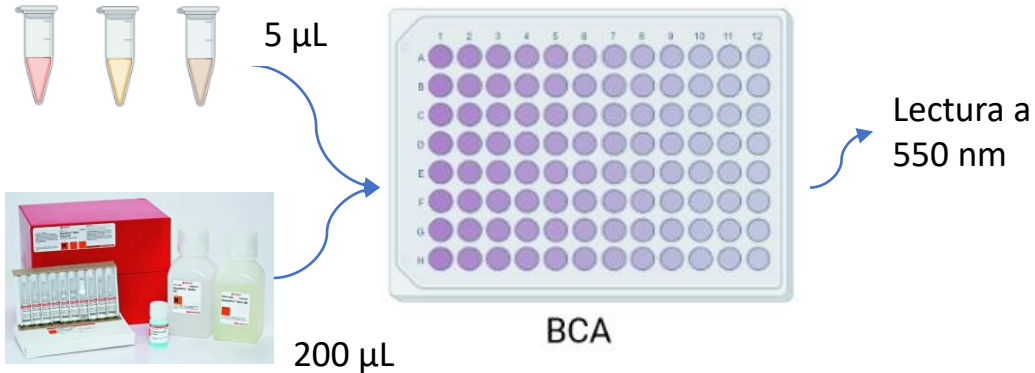
### 4 Visualización en TEM



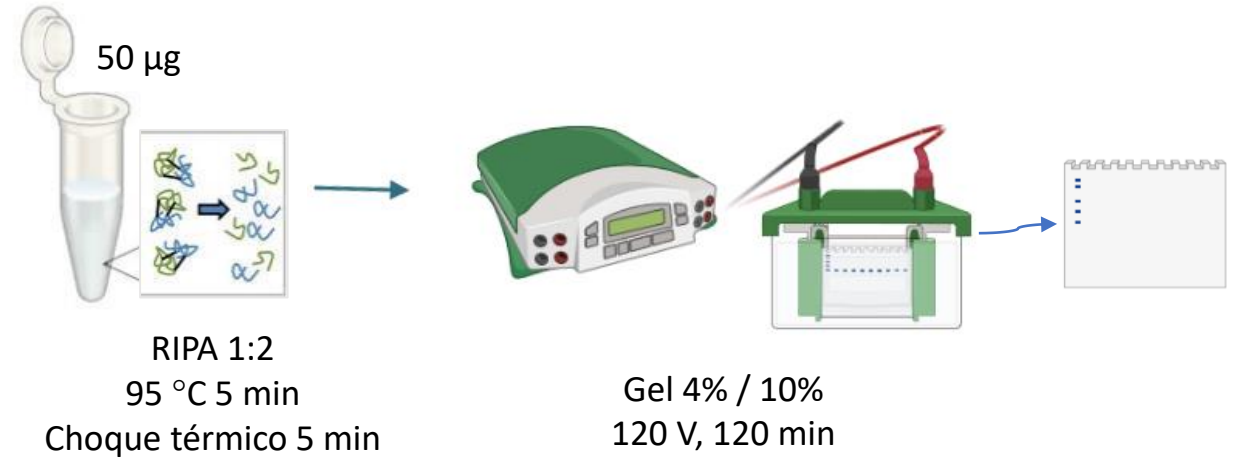
# Metodología

## Caracterización de exosomas

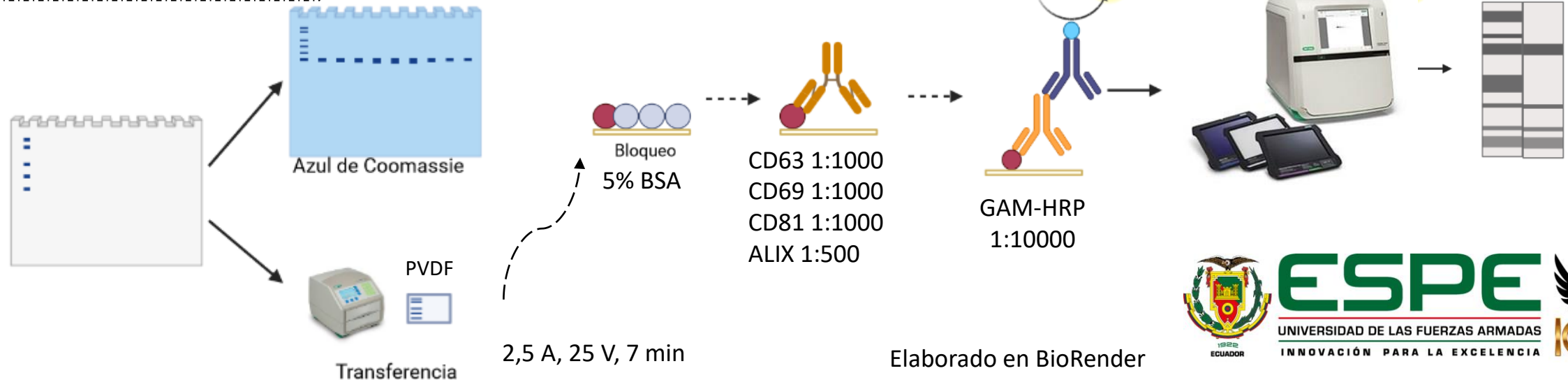
### 5 Cuantificación proteica



### 6 SDS-PAGE



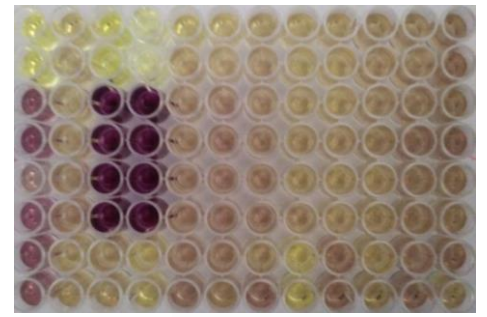
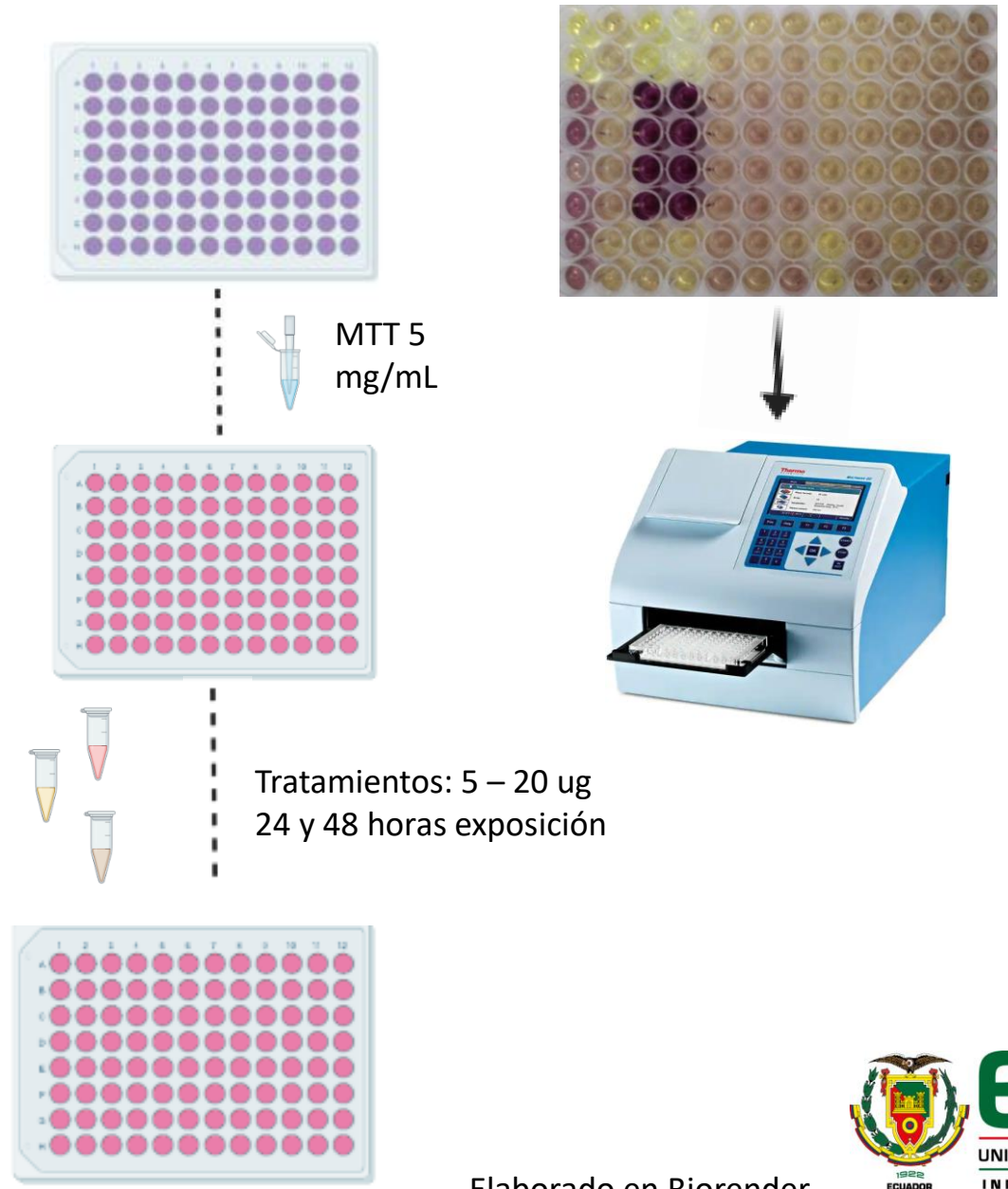
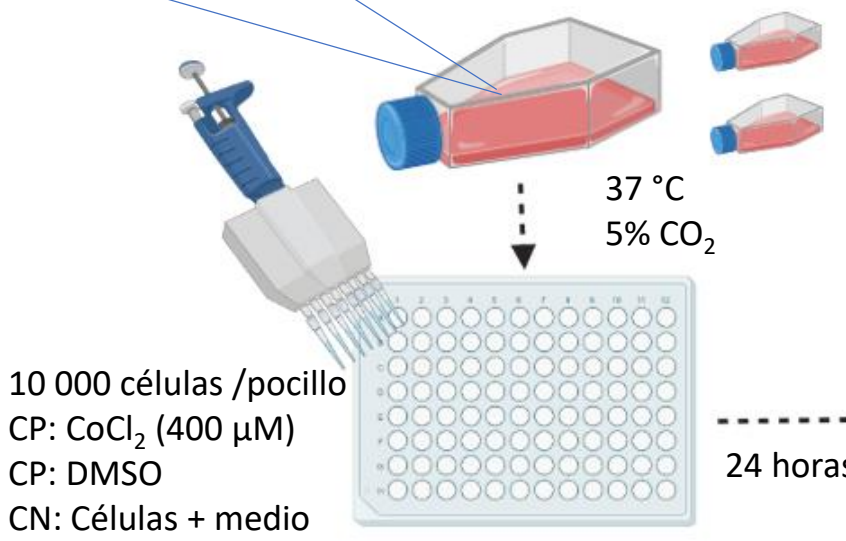
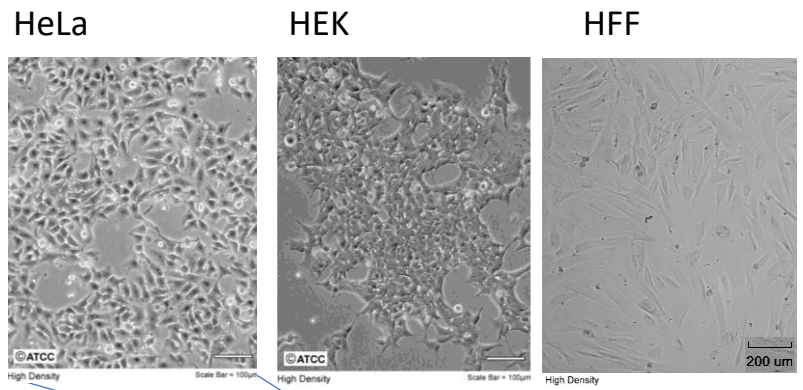
### 7 Análisis de perfil proteico



# Metodología

## Estudio de citotoxicidad

### 8 Ensayo MTT



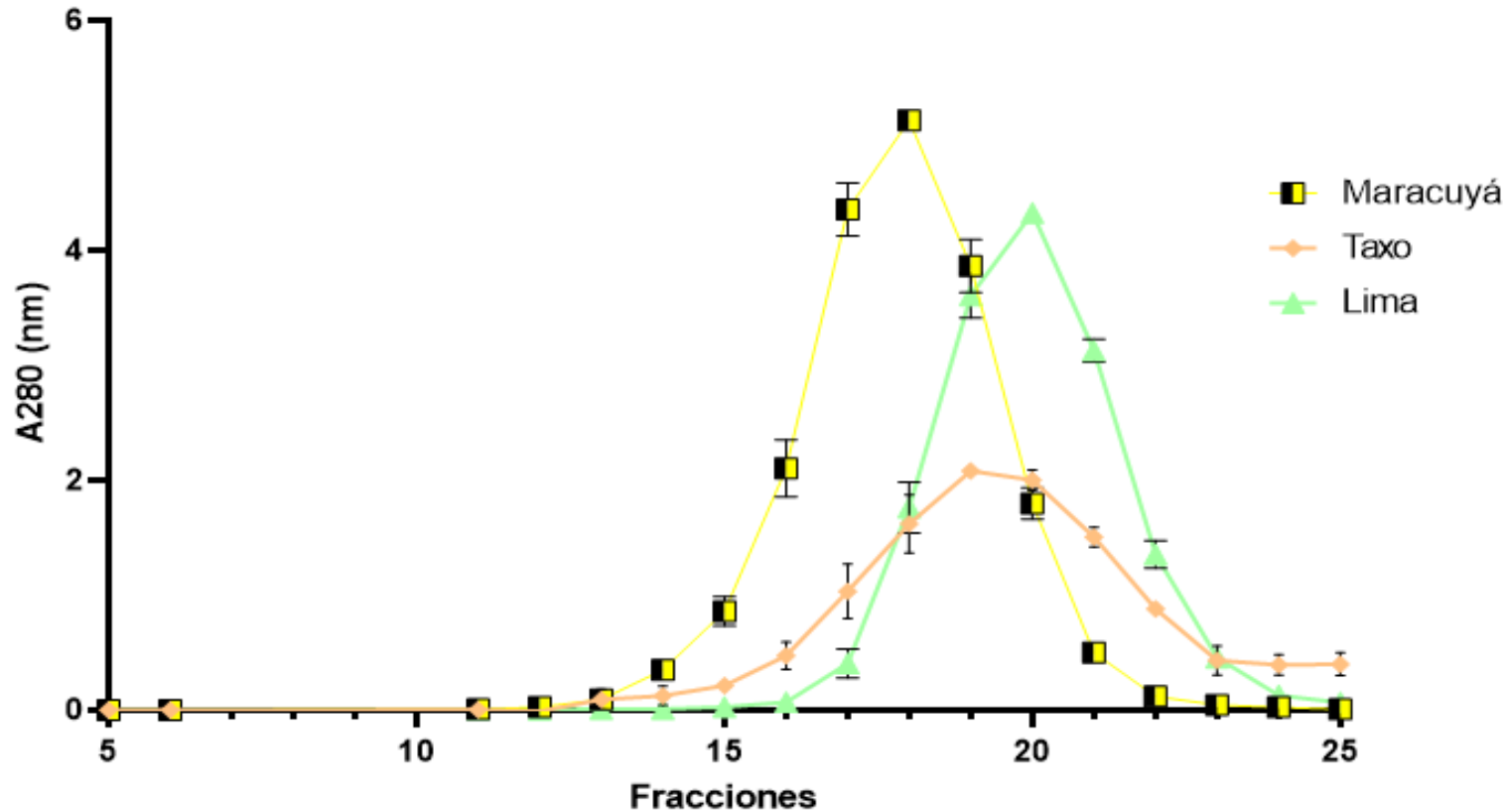
ANOVA de dos vías

Elaborado en Biorender

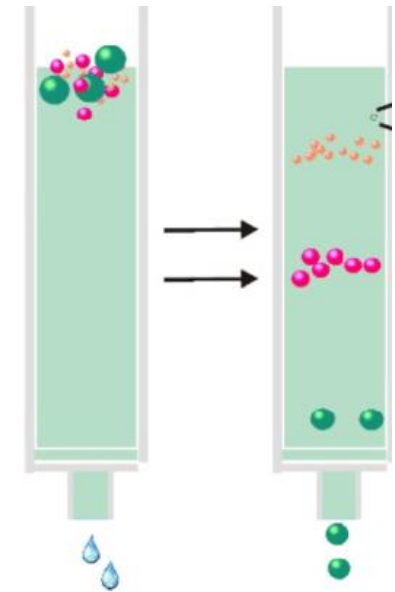


# Resultados y discusión

## Perfiles de elución proteica de las distintas muestras

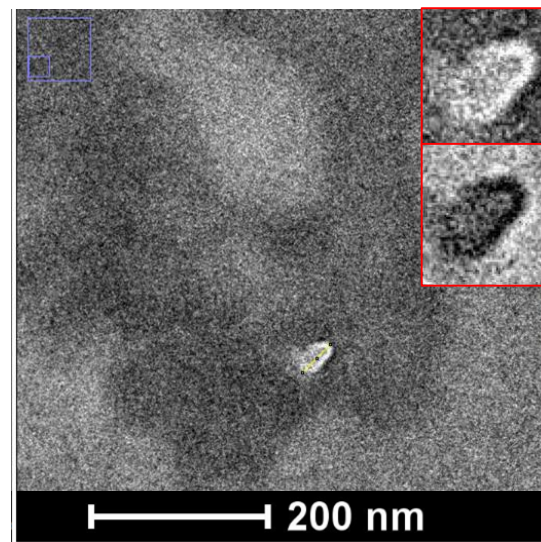


- Elución de proteínas en fracciones tardías
- Elución de vesículas de mayor tamaño en fracciones iniciales

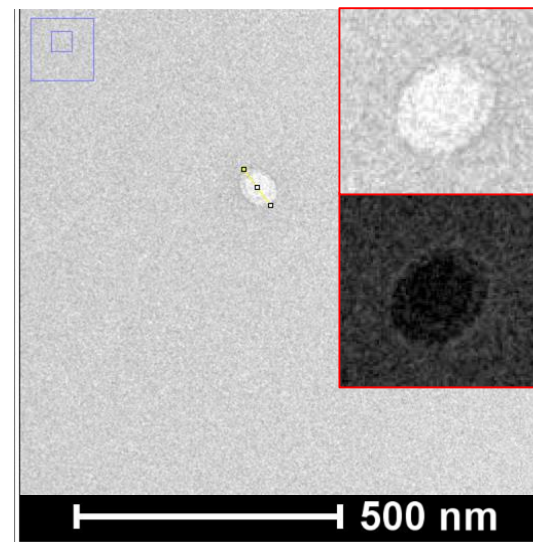


## Caracterización por TEM

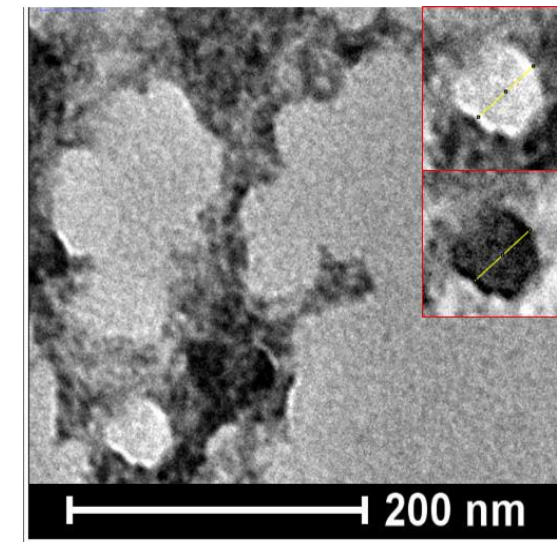
- Vesículas en forma de copa ahuecada o balón desinflado
- Tamaños de 30-85 nm



Maracuyá

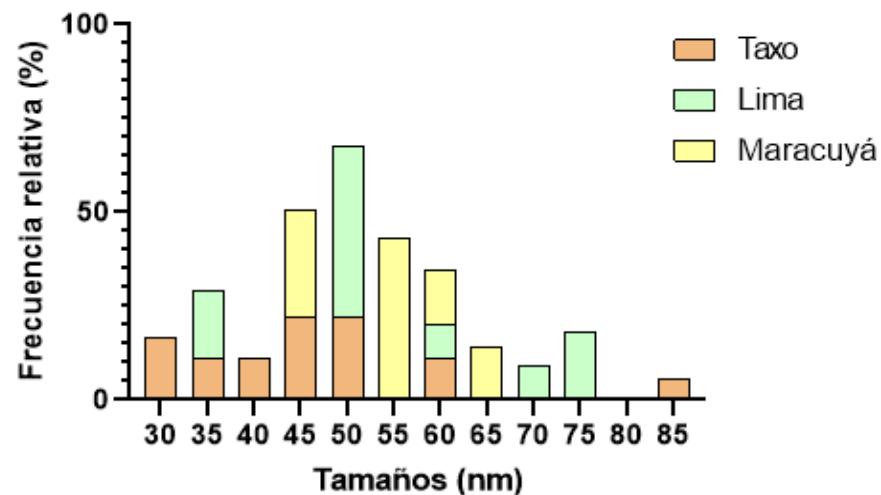


Taxo



Lima

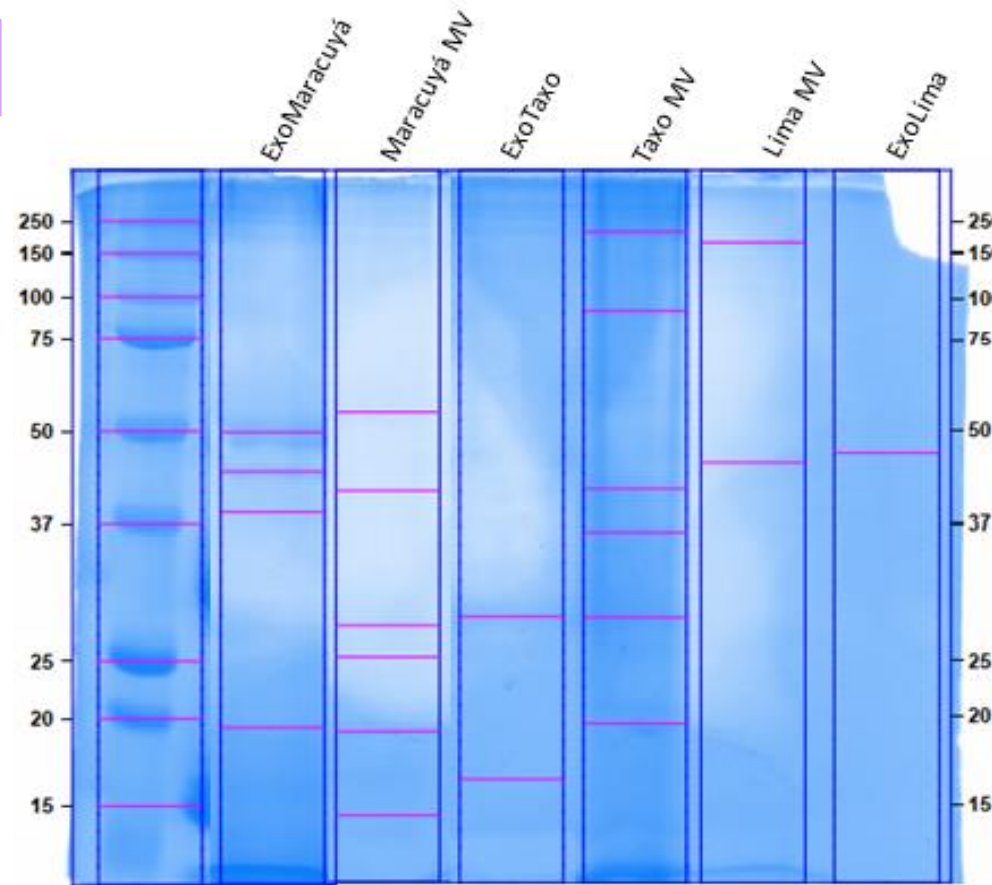
Histograma de frecuencia relativa



# Resultados y discusión

## Perfiles proteicos

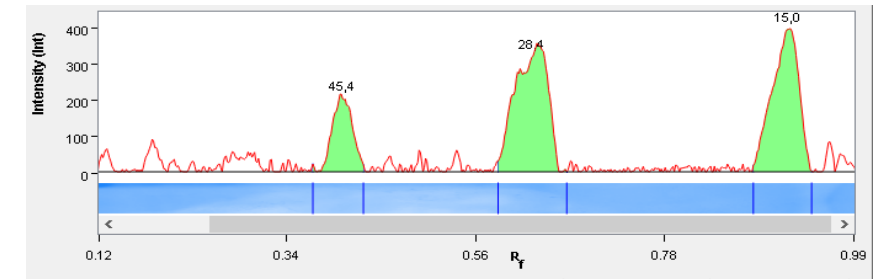
- Bandas de 15 a 250 kDa
- Bandas de tamaños similares entre exosomas y microvesículas



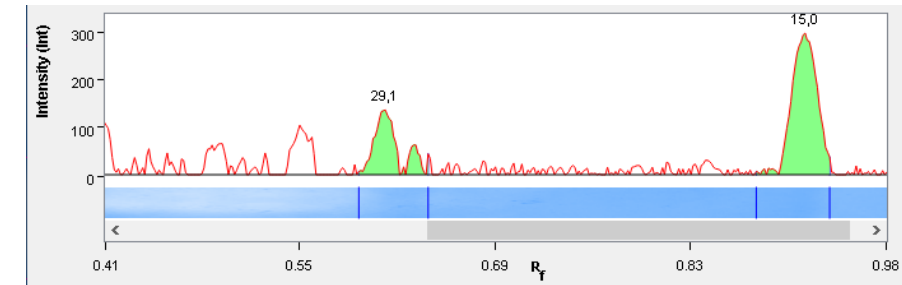
Electroforesis Vertical

## Densitometría

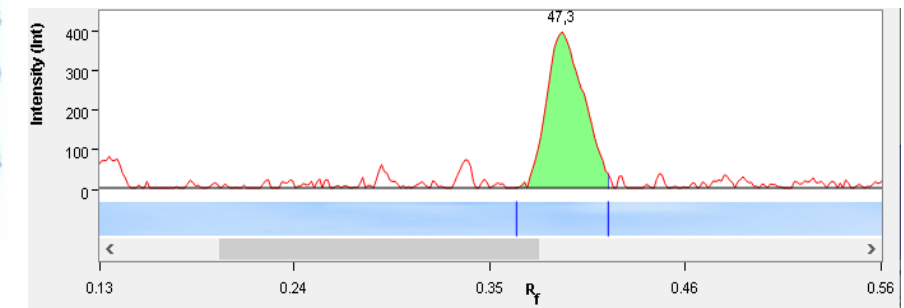
15



ExoMaracuyá



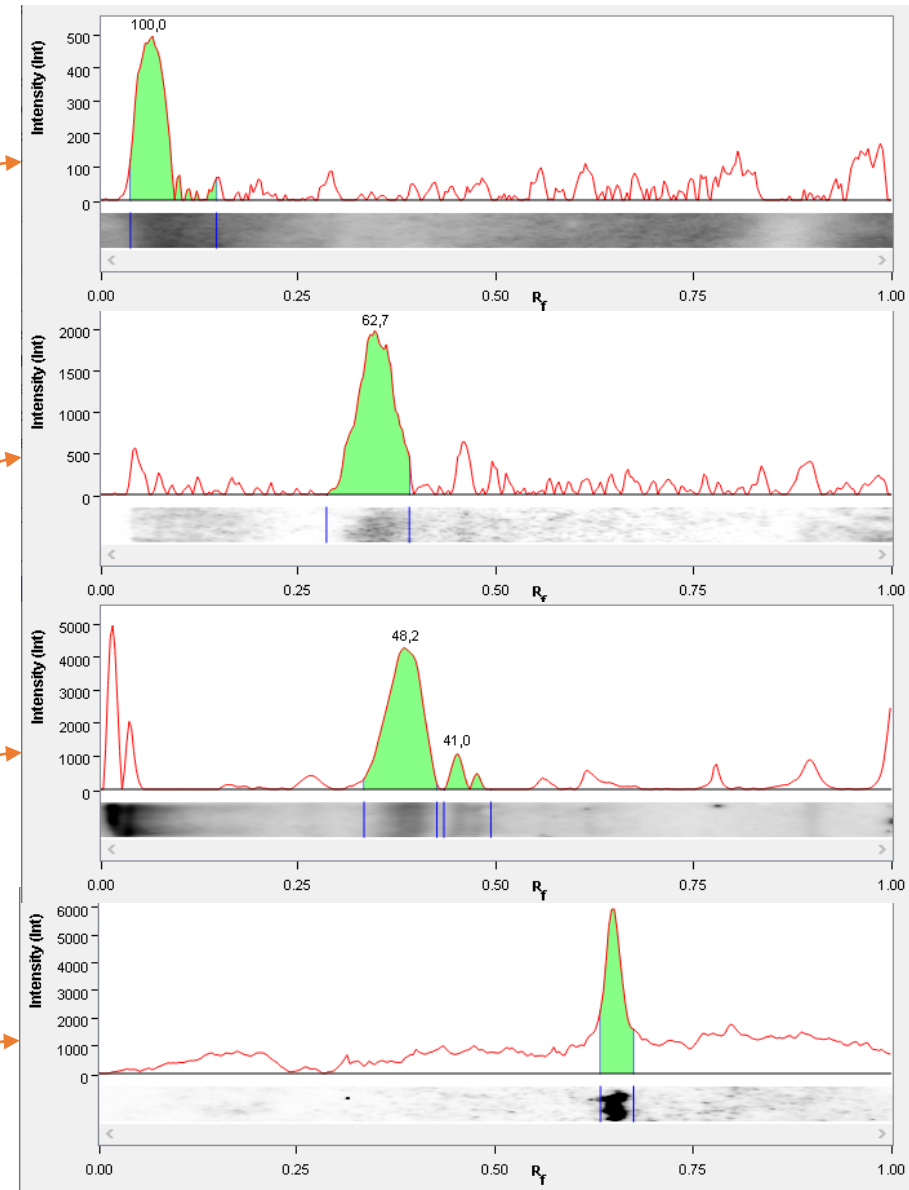
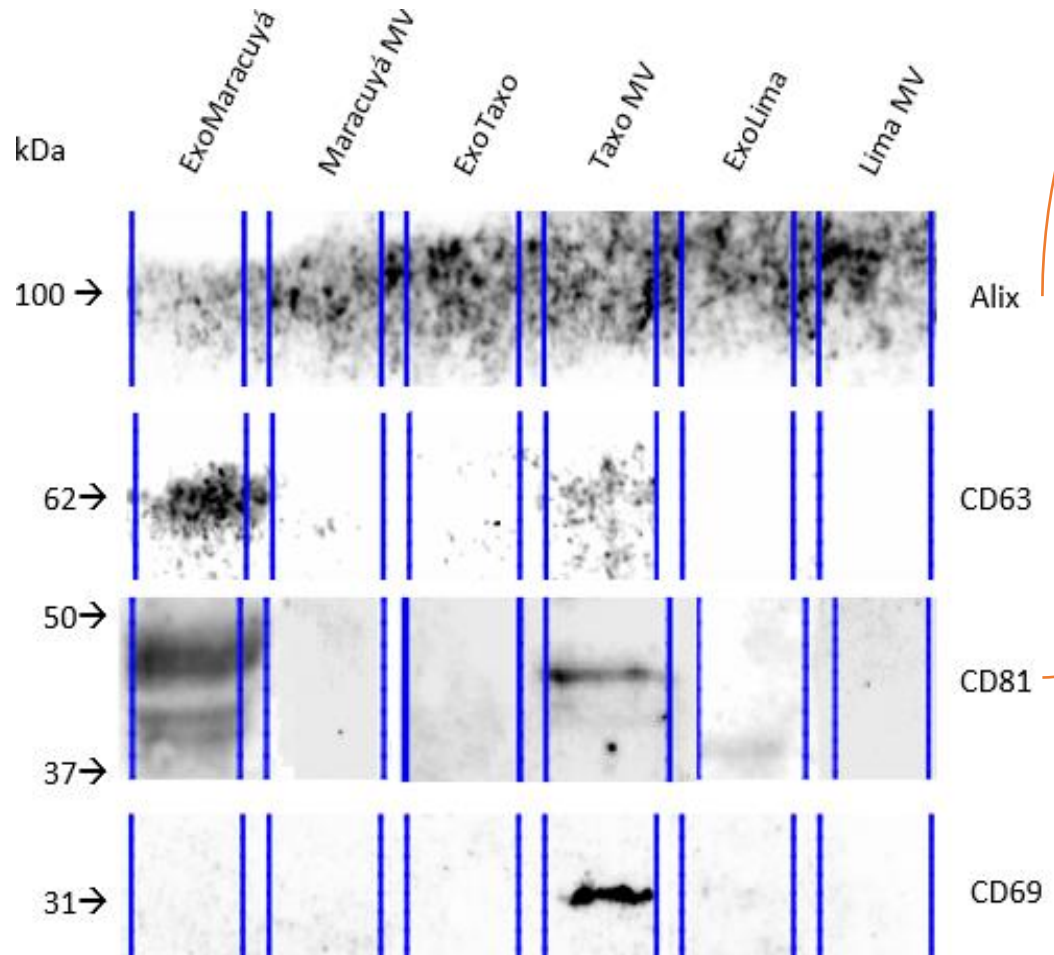
ExoTaxo



ExoLima

# Resultados y discusión

## Inmunomarcaje



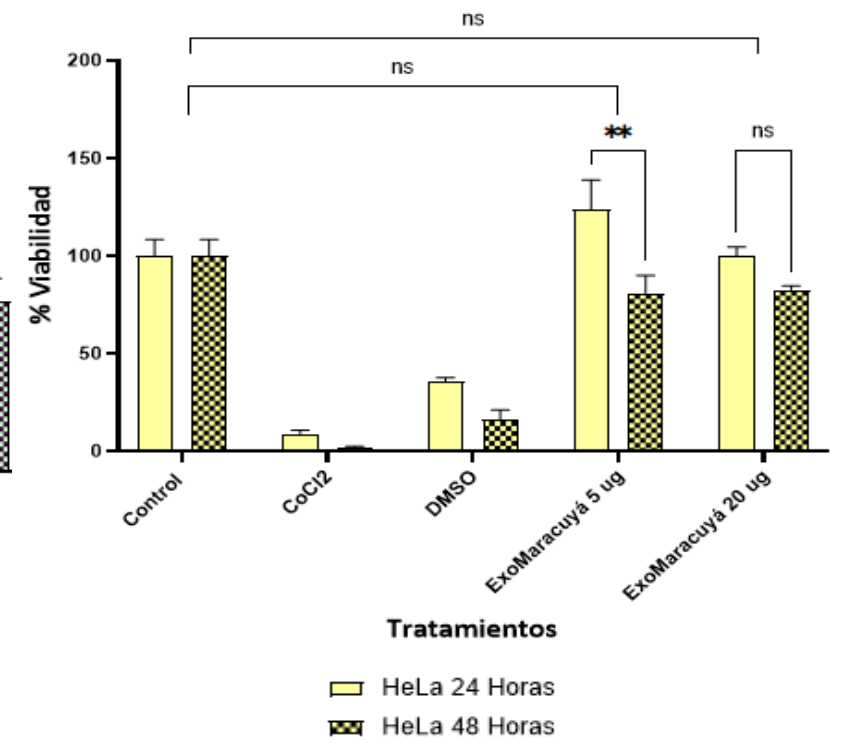
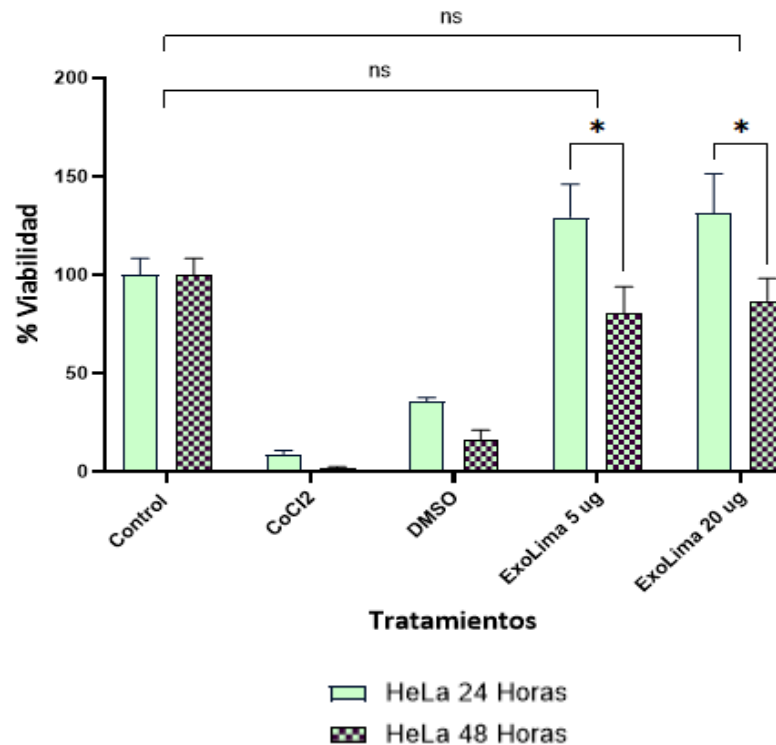
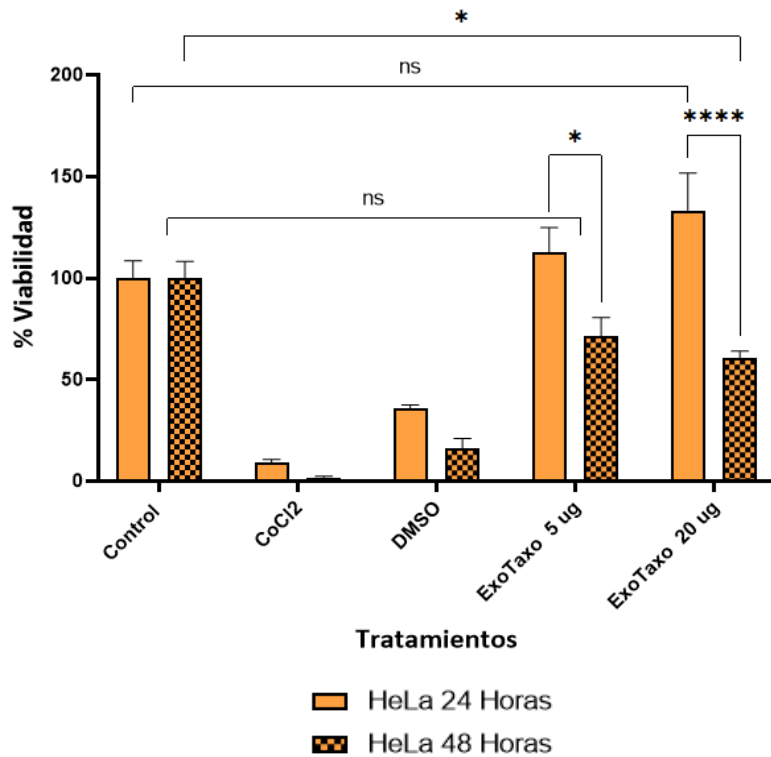
(Zhang et al., 2019) (Nemati et al., 2022) (Boucheix & Rubinstein, 2001)



## Ensayos de citotoxicidad

HeLa:

Reducción de la viabilidad con tratamiento a las 48 horas



\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001

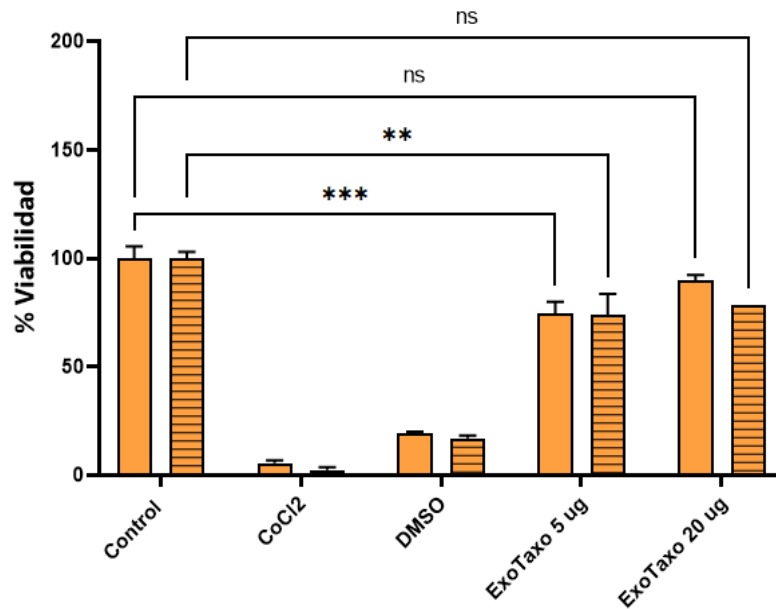
# Resultados y discusión

## Ensayos de citotoxicidad

HEK:

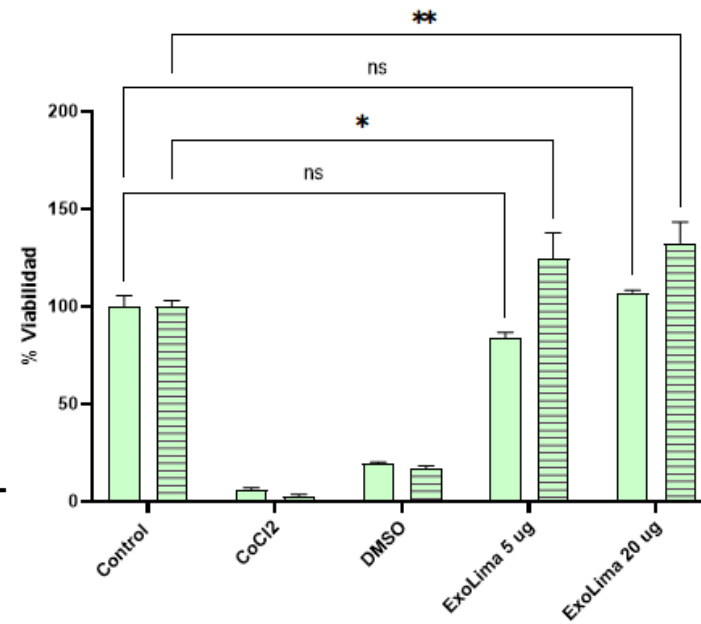
Reducción significativa con exosomas de maracuyá (5  $\mu$ g y 24 hrs) y taxo (5  $\mu$ g)

Efecto proliferativo en tratamientos con exosomas de lima a 48 hrs



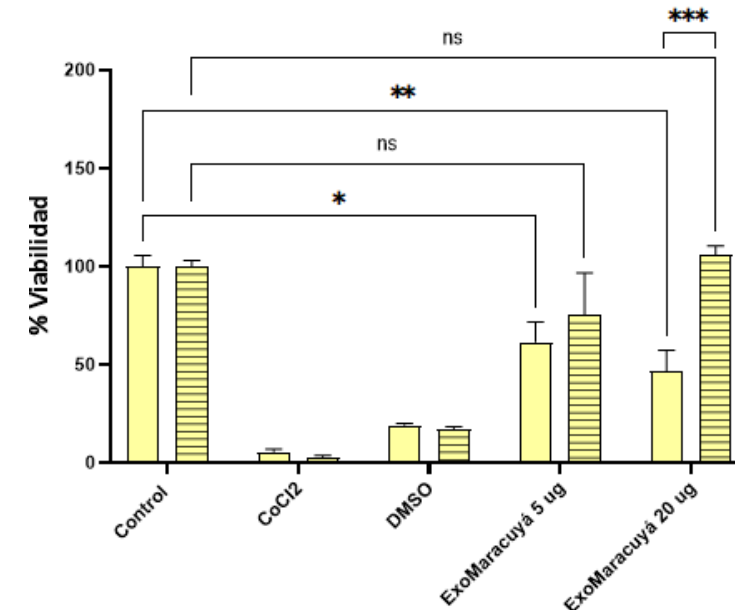
Tratamientos

HEK 24 Horas  
HEK 48 Horas



Tratamientos

HEK 24 Horas  
HEK 48 Horas



Tratamientos

HEK 24 Horas  
HEK 48 Horas

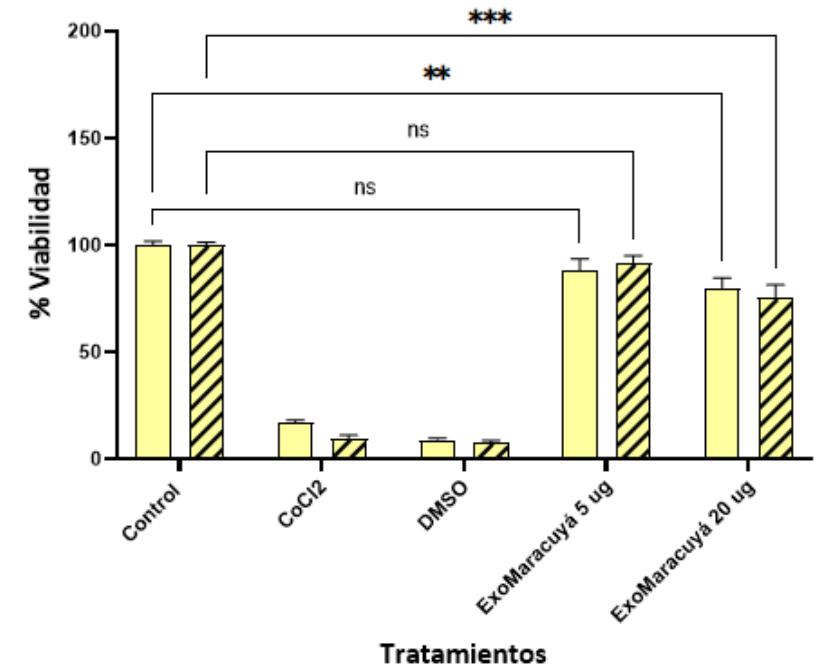
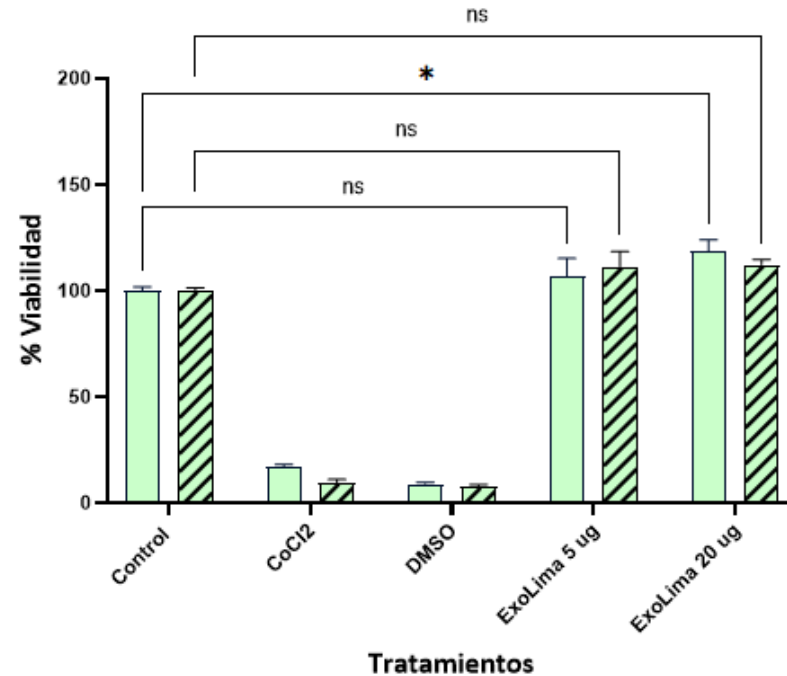
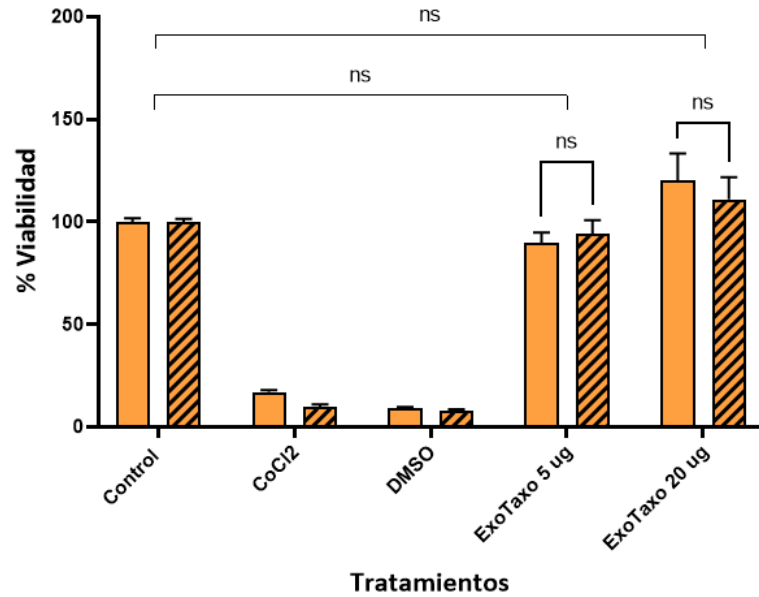
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

(Kaysan et al., 2011; Lin et al., 2014)

## Ensayos de citotoxicidad

HFF:

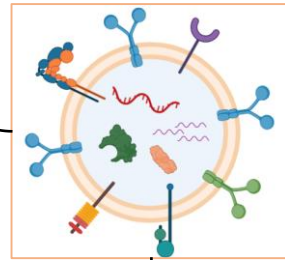
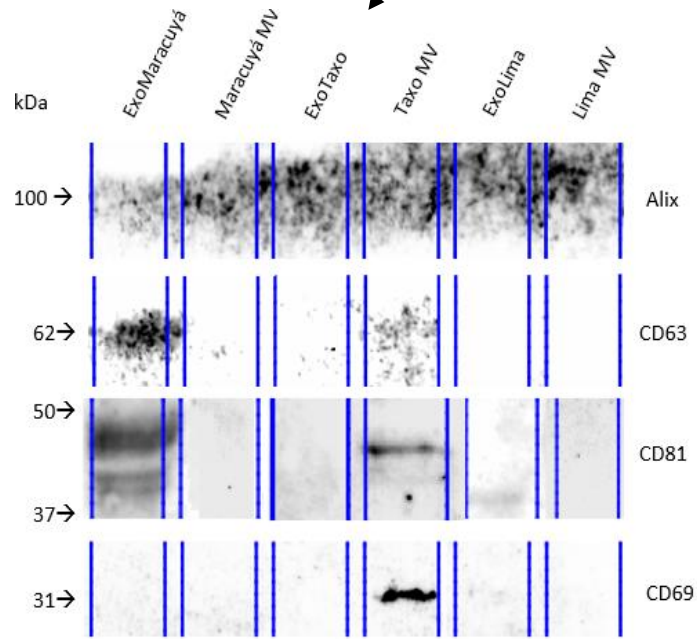
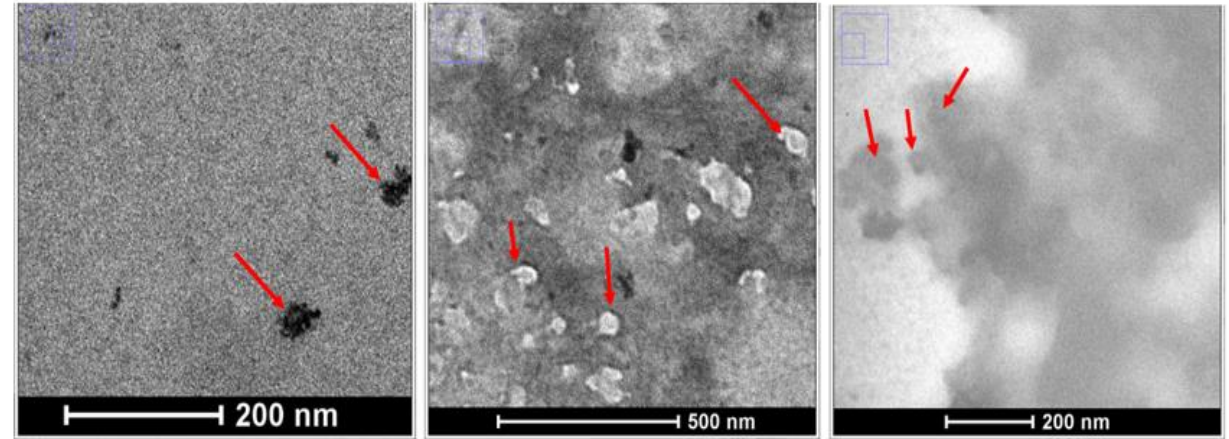
Reducción de la viabilidad únicamente con exosomas de maracuyá (20 µg)



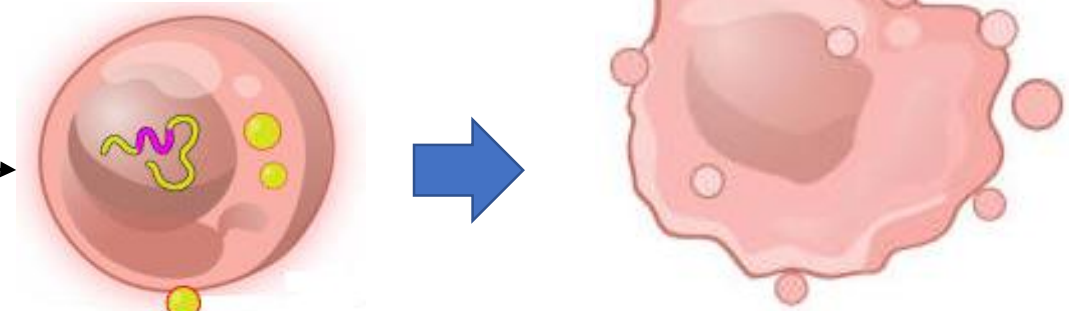
\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001

(Raimondo et al., 2015; Ishibashi & Ohtsuki, 2008)

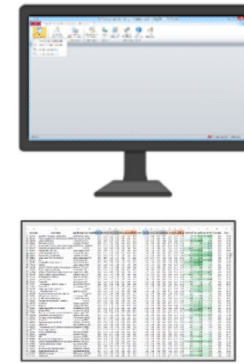
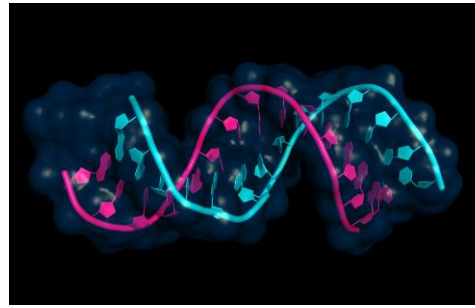
# Conclusiones



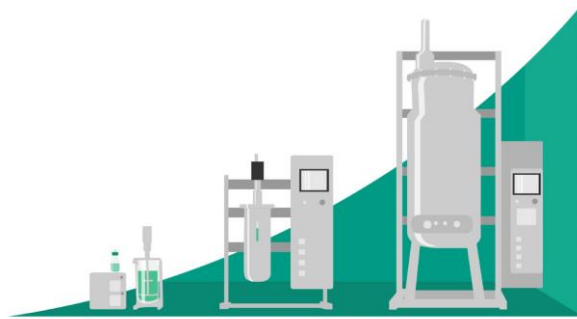
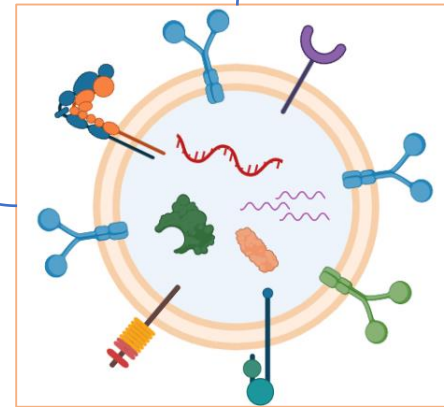
Efecto citotóxico



# Recomendaciones



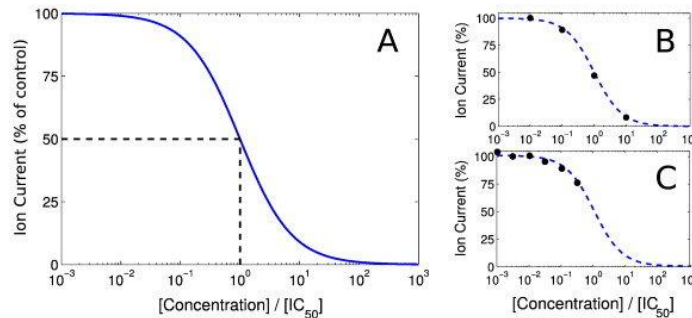
Proteómica + Transcriptómica



Escarar procesos de obtención



Síntesis de anticuerpos específicos para exosomas vegetales



- Comparar actividad antioxidante
- IC50

# Agradecimientos



**Marbel Torres, Ph.D.**  
**Alexis Debut, Ph.D.**



**Familia y Amigos!**