

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Caracterización de la población de vesículas extracelulares secretadas en cultivos de la línea celular RBL 2H3 en normoxia e hipoxia”

Tesis que presenta

Cristina de los Santos Recéndez

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directora de la Tesis: Dra Mónica Lamas Gregori

Ciudad de México

Septiembre 2018

Este proyecto se realizó en el laboratorio 13 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Sede Sur (Cinvestav-Sede Sur) bajo la dirección de la doctora Mónica Lamas Gregori. El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca de maestría 315624 y el proyecto CB-2013-01 219847.

A mi familia y amigos por su amor y apoyo incondicional.

**A mi poder superior por permitir que todos ellos hayan convergido en mi
vida.**

Agradecimientos

- Al Conacyt y al Cinvestav por el privilegio de haberme otorgado una beca y un lugar para la realización de mi Maestría.
- A la Dra Mónica Lamas Gregori por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.
- A las Dras Claudia Gonzales Espinosa y Marina Macías Silva por el apoyo, los consejos, las observaciones y sobre todo por el espacio en su laboratorio que ambas me brindaron.
- A mis padres, a mi familia y amigos por el apoyo que he tenido en todo momento y porque mucho de lo que soy hoy es gracias a ustedes.

Newton's Third Law:

For every action, there is an equal and opposite re-reaction.

Contenido

I.	Índice de tablas.....	i
II.	Índice de figuras	ii
III.	Lista de abreviaturas	iii
IV.	Resumen	v
V.	Abstract.....	vi
1.	Introducción.....	1
1.1	Comunicación intercelular y vesículas extracelulares: definición y clasificación	1
1.2	Vesículas extracelulares: biogénesis, liberación y recaptura	2
1.2.1	Vía dependiente del complejo de distribución endosomal requerido para el transporte (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT)	3
1.2.2	Vía independiente de ESCRT	4
1.3	Liberación de EV al medio extracelular y captación por las células blanco.	6
1.4	Vesículas extracelulares (EV): Estructura y composición	7
1.5	Función de las EV	8
1.6	Pautas para el estudio de EV establecidas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares.	10
1.7	Vesículas extracelulares en condiciones patológicas.....	13
1.8	Células cebadas, respuesta inmune e hipoxia.....	14
1.8.1	Hipoxia	16
1.8.2	Factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1- α).....	17
1.8	Línea celular RBL 2H3 como modelo para el estudio de EV.....	19
2.	Justificación	21
3.	Hipótesis	22
4.	Objetivo	23
4.2	Objetivos particulares	23
5.	Materiales y métodos	24
5.1	Línea celular.....	24
5.2	Cultivos celulares en normoxia e hipoxia.....	24
5.3	Ensayo de viabilidad celular.....	25
5.4	Protocolo de aislamiento de exosomas.....	26
5.4.1	Obtención de medio condicionado para la producción de microvesículas y exosomas	26
5.4.2	Remoción de células, células muertas y detritus celular	26

5.4.3	Lavado y recolección de la fracción de exosomas.....	26
5.5	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) whole-mounted de microvesículas.	27
5.6	Cuantificación óptica de vesículas.	27
5.7	Preparación de cubreobjetos para inmunofluorescencia.....	28
5.8	Inmunofluorescencia para detección de células en hipoxia utilizando pimonidazol. ...	28
5.9	Western Blot.....	29
5.10	Análisis de seguimiento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis NTA)	30
6.	Resultados	32
6.1	Homogeneidad en cultivos de RBL 2H3.....	32
6.2	La hipoxia no modifica la viabilidad celular a tiempos cortos	33
6.3	El cultivo de las células RBL 2H3 en un ambiente de 1% de tensión de oxígeno por 24 horas induce un estado hipóxico.	34
6.4	Las proteínas presentes en las EV aisladas de células RBL 2H3 tienen origen citosólico y endosomal	36
6.5	La condición de hipoxia no modifica la cantidad pero si la morfología de las EV secretadas por las células RBL 2H3	38
6.6	La morfología de las EV asiladas es predominantemente redonda	40
6.7	Las EV liberadas presentan un tamaño heterogéneo.	42
7.	Discusión.....	47
7.1	Aportaciones al área de estudio de las EV a partir de la secretadas por la línea celular RBL 2H3	47
7.2	Consideraciones técnicas para el estudio de las EV	48
7.3	Aportaciones a la caracterización de EV secretadas por la línea celular RBL 2H3	48
7.4	Efecto de la la hipoxia sobre la secreción de poblaciones de EV en la línea celular RBL 2H3.	50
7.5	El estudio de las EV secretadas por la línea celular RBL 2H3 en condiciones de normoxia e hipoxia: nuevas líneas de investigación.	53
7.5.1	Evaluación del cargamento	53
7.5.2	Evaluación de la función.....	53
8.	Resumen de resultados	55
9.	Conclusión.....	55
10.	Perspectivas.....	56
11.	Referencias.	57
Apéndice	64
Preparación de medios y soluciones	64	

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con FBS al 10%	64
DMEM con suero depletado de exosomas (medio condicionado para la producción de exosomas).....	64
Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) 1x.....	64
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x.....	65

I. Índice de tablas

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DE LAS EV.....	2
TABLA 2 CLASIFICACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ACUERDO A SU CONTENIDO Y MARCADORES. 8	8
TABLA 3 ANTICUERPO USADOS PARA LA CARACTEIZACIÓN DE LAS EV.	30

II. Índice de figuras

FIGURA 1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS POR LA VÍA DEPENDIENTE DE ESCRT.	4
FIGURA 2 FORMACIÓN DE EV A PARTIR DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	5
FIGURA 3. VÍAS QUE PARTICIPAN EN LA CAPTACIÓN DE LAS EV POR LAS CÉLULAS BLANCO.	6
FIGURA 4 REGULACIÓN DE HIF DEPENDIENTE DE OXÍGENO	18
FIGURA 5 CULTIVOS DE RBL 2H3.	32
FIGURA 6 GRÁFICAS REPRESENTATIVAS DEL PERFIL DE POBLACIÓN Y VIABILIDAD CORRESPONDIENTE A LAS CÉLULAS EN CONDICIÓN DE NORMOXIA. SE MIDió LA VIABILIDAD	33
FIGURA 7 GRÁFICAS REPRESENTATIVOS DEL PERFIL DE POBLACIÓN Y VIABILIDAD CORRESPONDIENTE A LAS CÉLULAS EN CONDICIÓN DE NORMOXIA.	34
FIGURA 8 ENSAYO DE INMUNOFUORESCENCIA DESPUÉS DE MAb1 (HYPOXYPROBE-1 KIT).	36
FIGURA 9 IMAGEN REPRESENTATIVA DE UN WESTERN BLOT DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS EN LAS EV AISLADAS DE CÉLULAS RBL 2H3.	38
FIGURA 10 EV AISLADAS EN CONDICIONES DE NORMOXIA.	39
FIGURA 11 IMÁGENES DE TEM CORRESPONDIENTE LAS EV AISLADAS EN CONDICIONES DE HIPOXIA.	40
FIGURA 12 GRAFICAS CORRESPONDIENTES AL PORCENTAJE POR CONTEO MANUAL DE LAS EV AISLADAS.	41
FIGURA 13 PORCENTAJE DE VESÍCULAS AISLADAS EN CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA.	42
FIGURA 14 IMAGEN REPRESENTATIVA DE LAS PARTÍCULAS DURANTE EL NTA.	43
FIGURA 15 GRÁFICA REPRESENTATIVA DE LA DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS ANALIZADAS DE UNA MUESTRA MEDIANTE NTA EN CONDICIONES DE NORMOXIA.	44
FIGURA 16 A GRÁFICA REPRESENTATIVA DE LA DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS ANALIZADAS DE UNA MUESTRA MEDIANTE NTA EN CONDICIONES DE HIPOXIA. B PROMEDIO DE LOS TAMAÑOS ANALIZADOS EN TÉRMINOS DE CONCENTRACIÓN DE NÚMEROS ABSOLUTOS.	45
FIGURA 17 CONCENTRACIÓN DE EV OBTENIDAS MEDIANTE NTA.	46

III. Lista de abreviaturas

AA: Ácido araquidónico
Akt: Proteína con actividad de cinasa de residuos de serina/treonina
Alix: Proteína interactiva ALG-2 X
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
ATM: Microscopía de fuerza atómica
ATP: Adenosín trifosfato.
ARF6: Factor 6 de ADP-ribosilación
CBP: Proteína de unión a CREB
CD9: Proteína (cúmulo de diferenciación) de la familia de las tetraspaninas 9
CD34+: Proteína situada en la superficie celular que participa en la adhesión celular
CD40: ligando
CD63: Proteína o cúmulo de diferenciación de la familia de las tetraspaninas 63
CD81: Proteína de la familia de las tetraspaninas 81
DC: Células dendríticas
DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium
ER: Retículo endoplásmico
ERK: cinasa regulada por señal extracelular
ESCRT: Complejos de distribución endosomal requeridos para el transporte
EV: Vesículas extracelulares
FACS: Citometría de flujo activada por fluorescencia
FBS: Suero fetal bovino
FcεRI: Receptor de alta afinidad para la IgE
Fyn: Proteína cinasa con actividad de residuos de tirosina de la familia Scr
GBM: Glioblastoma multiforme
GMPc Guanosín monofosfato cíclico
GRP94: Proteína 94 regulada por glucosa
GTP: Guanosín trifosfato
HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1
HRE: Elementos de respuesta a hipoxia
Hsp70: Proteína de choque térmico 70
Hsp90: Proteína de choque térmico 90
IgE: Inmunoglobulina E
ILV: Vesículas intraluminales
ITAM: Motivos de activación de tirosina encontrados en inmunorreceptores.
ISEV: International Society of Extracellular Vesicles
IP3: Inositol trifosfato

LBPA: Ácido lisobisfosfático

Lyn: Proteína con actividad cinasa de residuos de tirosina de la familias de Src.

MC: Células cebadas

MEM NEAA: Aminoácidos no esenciales MEM

MHC-I: Complejo principal de histocompatibilidad I

MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad II

MLCK: Cinasa de cadena ligera de miosina

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

miRNA: Micro-RNA no codificantes que regulan la expresión génica mediante la inhibición del RNA mensajero.

MVB: Cuerpos multivesiculares

NTA: análisis de rastreo de nanopartículas

p300: histona acetiltransferasa 300

PBS: Buffer fosfato salino

PG: Prostaglandinas

PGE₂: Prostaglandina E₂

PHD 1-3: Enzimas del dominio HIF-prolil hidroxilasas

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

PIP3: Fosfatidilinositol 3-fosfato

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D.

RPE: Epitelio pigmentario de la retina

RTPC: Células del túbulo renal proximal

Src: Familia de proteínas no receptoras con actividad de cinasas de tirosina

Syk: Proteína esplénica con actividad de cinasa de residuos de tirosina

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TSG101: Proteína del gen 101 de susceptibilidad tumoral, componente del complejo de distribución endosomal requerido para el transporte

Ub: Ubiquitina

VHL: Ligasa de Von Hippel-Lindau

Vps25: Proteínas vacuolares asociadas a la distribución de proteínas

WB: Western Blot

IV. Resumen

Las vesículas extracelulares (EV) son pequeñas vesículas de 40-150 nm compuestas por un bicapa lipídica liberadas al medio extracelular por varios tipos de células. Tienen un origen endosomal. Su membrana presenta lípidos ordenados en balsas lipídicas, proteínas y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II). Su cargamento incluye lípidos bioactivos, proteínas, enzimas y DNA, RNA y mRNA.

En esta tesis caracterizamos la población de EV liberadas por la línea celular de células cebadas (MC) RBL 2H3. Las MC tienen un papel importante en las enfermedades inflamatorias, respuesta a infecciones, progresión de tumores y condiciones relacionadas con isquemia que en común mantienen una exposición de las células a hipoxia. En varios tipos celulares, el estímulo de hipoxia, induce *per se* un aumento en la liberación de EV.

Los estudios se realizaron *in vitro* para el aislamiento de EV a partir del medio condicionado obtenido de cultivos celulares en condición de normoxia o hipoxia. Se observó cambio en las proteínas, péptidos y aminoácidos mediante inmunofluorescencia en las células en hipoxia. El estudio de las EV se realizó con las recomendaciones de la International Society of Extracellular Vesicles. Se siguió un protocolo de ultracentrifugaciones seriadas para su aislamiento. Mediante Western Blot se caracterizaron las proteínas Alix, Flotilina-2, Lyn y Actina que no presentaron diferencia en su expresión bajo condición de hipoxia, y GRP94. Con técnicas de microscopia electrónica se observó la morfología y tamaño de las EV aisladas; a partir de las imágenes obtenidas se realizó una cuantificación manual y clasificación de acuerdo a su morfología en la que se encontró que en las EV aisladas de hipoxia predomina una morfología redondeada. Finalmente se realizó una cuantificación y clasificación de partículas mediante un análisis de rastreo de nanopartículas.

Nuestros resultados sugieren que la hipoxia no es un estímulo suficiente *per se* para aumentar la producción de EV en esta línea celular pero si para un cambio en su morfología.

V. Abstract

Extracellular vesicles (EV) are small vesicles bilayered of 40-150 nm that are released into the extracellular medium by numerous cell types, contributing to intracellular communication. EV have an endosomal origin. The exosomal membrane contains lipid rafts, proteins and MHC-II molecules. Their cargo includes bioactive lipids, proteins, enzymes, DNA, RNA and mRNA.

In this thesis we characterized the population of EV released by the mast cell (MC) line RBL 2H3. MC have an important role in inflammatory diseases, immune response, progression of tumors and conditions related to ischemia that normally involve exposure of the cell to hypoxia. In various cell types, hypoxia induces an increase in the release of EV *per se*.

For *in vitro* studies we isolated EV from conditioned media obtained from cell cultures under normoxia and hypoxia. Macromolecular changes were observed by immunofluorescence in the cells in hypoxia. For the study of EV we followed the recommendations of the International Society of Extracellular Vesicles. A serial ultracentrifugation protocol was used for EV isolation. We then used Western Blot for protein characterization, the proteins Alix, Flotillin-2, Lyn and Actin did not show differences in their expression upon hypoxia. GRP94 was found only in cell lysate. With electron microscopy we observed the size and morphology of the isolated EV. From the obtained images, optical quantification and sorting according their morphology was performed. We found that a rounded morphology predominates in EV isolated from hypoxia cultured cells. Finally a quantification and sorting of particles was carried out by nanoparticle tracking analysis.

Our data suggest that hypoxia caused by 24 h of exposure to 1% O₂ is not enough to increase the number of released EV in this cell line, but it may condition a change in its morphology.

1. Introducción

1.1 Comunicación intercelular y vesículas extracelulares: definición y clasificación

La comunicación intercelular es absolutamente esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis en los organismos celulares. Puede llevarse a cabo de manera localizada o a distancia. (Ha et al., 2016). Las células eucariotas se comunican con otras mediante interacción directa (**señalización juxtacrina**) y/o mediante la secreción de factores solubles como hormonas, factores de crecimiento y citocinas al sistema circulatorio. Estos factores pueden actuar en la misma célula (**señalización autocrina**), sobre células vecinas (**señalización paracrina**) o en células más distantes (**señalización endocrina**) la comunicación directa de célula a célula es mediada por la estimulación de las proteínas en la membrana plasmática denominadas receptores o por complejos de unión como las uniones estrechas o las uniones gap (Yáñez-Mó et al., 2015) que permiten el intercambio de iones (K^+ , Ca^{2+}), segundos mensajeros (AMPC, GMPc, IP3) y metabolitos como glucosa (Faruk Aykan 2012).

Otro caso de comunicación intercelular a distancia que se ha descrito en años recientes se lleva a cabo mediante estructuras membranales nanométricas compuestas por una bicapa lipídica llamadas **vesículas extracelulares** (EV, por sus siglas en inglés *extracellular vesicles*) que sirven como acarreadoras de diferentes cargamentos como lípidos, proteínas y moléculas receptoras o efectoras para sus células blanco (Ha et al., 2016).

El descubrimiento de dichas vesículas así como el primer uso de la palabra *exosoma* fue en 1970 por Rose Johnstone y sus colegas, mientras trabajaron con la maduración de los reticulocitos (Ha et al., 2016). En la actualidad se ha descrito su liberación por muchos tipos celulares como células hematopoyéticas, células T citotóxicas, plaquetas, células cebadas, neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann, células epiteliales, etc. La secreción de EV sucede tanto *in vivo* como en cultivo (Raposo et. al., 2013) y, además, se ha descrito su presencia en una

variedad de fluidos corporales como suero, líquido cefalorraquídeo, leche materna y orina entre otros .

Las EV de los eucariotas pueden subdividirse de acuerdo a su origen intracelular o biogénesis, cargamento y tamaño en diferentes tipos (Tabla1):

Características	Exosomas	Microvesículas	Ectosomas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	50-100 nm	100-1000 nm	50-200 nm	50-500 nm
Apariencia en TEM	<i>Cup shape</i>	Forma irregular y electrodensos	Estructuras redondeadas bilaminar	Heterogénea
Sedimentación	100,000 g	10,000 g	160,000-200,000 g	1,200 g, 10,000 g, 100,000 g
Composición lipídica	Enriquecidas en colesterol; esfingomielina y ceramidas. Contienen balsas lipídicas; fosfatidilserina expuesta	Fosfatidilserina expuesta	Enriquecidos en colesterol y diacilglicerol; fosfatidilserina expuesta	ND
Cargamento	mRNA, miRNA, RNA no codificantes; proteínas de choque térmico, de fusión y transporte membranal.	mRNA, miRNA, RNAs no codificantes, proteínas citoplásmicas y de membrana, incluyendo receptores.	Proteínas citoplásmicas y de membrana	Fracciones nucleares, orgánulos celulares
Principales marcadores proteicos	Tetraspaninas (CD63, CD9), Alix y TSG101	Integrinas, selectinas y ligando CD40	CR1 y enzimas proteolíticas, no CD63	Histonas
Origen intracelular	Compartimientos internos (endosomas)	Membrana plasmática	Membrana plasmática	ND

Tabla 1 Características de las EV. Tomado y modificado de ZIELLO et. al. 2007

1.2 Vesículas extracelulares: biogénesis, liberación y recaptura

Por lo general, las vesículas circulantes se componen de ambos, exosomas y microvesículas. Su función biológica depende de múltiples factores que incluyen, entre otros, origen celular o tisular de las vesículas, mecanismos de secreción y captación o de unión a las células blanco, composición lipídica y cargamento.

La formación de los exosomas consiste en tres diferentes etapas: 1) la formación de vesículas endocíticas desde la membrana plasmática o desde organelos el citosol de la célula

a, 2) la invaginación de la membrana vesicular endosomal que resulta en la formación de cuerpos multivesiculares (multivesicular bodies, MVBs) dentro de su lumen llamadas vesículas intraluminales (ILVs) y 3) la fusión de los MVBs con la membrana plasmática que, libera así su contenido vesicular hacia el espacio extracelular (Ha et al., 2016).

La formación de MVB ocurre durante la acumulación de ILV dentro del lumen del endosoma tardío. (Ha et al., 2016). De manera general, la biogénesis de las vesículas puede dividirse en dos vías:

1.2.1 Vía dependiente del complejo de distribución endosomal requerido para el transporte (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT)

En esta vía participa la maquinaria ESCRT, compuesta por cuatro complejos de proteínas ESCRT (0, I, II y III), a su vez compuestos por otras subunidades (Figura 1). Estas son reclutadas de forma secuencial del citoplasma a la membrana del endosoma temprano para distribuir el cargamento ubiquitinado y formar subdominios recubiertos que forman los ILVs (Vingtdeux et al., 2012).

ESCRT-0 identifica a las proteínas transmembrana marcadas con ubiquitina en invaginaciones en la membrana endosomal. (Jiang et al., 2017).

La membrana de los endosomas tempranos es marcada por abundante **fosfatidilinositol 3-fosfato** (PIP3). La presencia de **PIP3**, de los cargamentos ubiquitinados y la topología curvada de la membrana del endosoma inducen al reclutamiento de **ESCRT-I** y **ESCRT-II** (Akers et al., 2013).

ESCRT-III es reclutada al sitio de ESCRT-I y II a través de Alix, que se une simultáneamente al componente Tsg101 del complejo ESCRT-I y CHMP2, componente de ESCRT-III (Akers et al., 2013).

Esta vía requiere de proteínas accesorias como Tsg101 y Alix (Zaborowski, et. al., 2015)

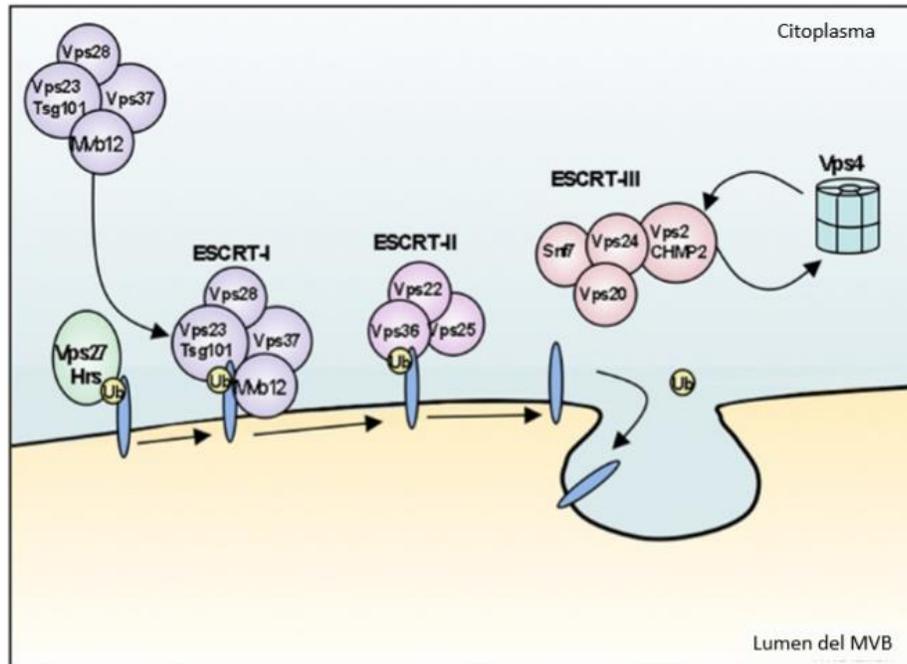


Figura 1 Representación esquemática de la biogénesis de los exosomas por la vía dependiente de ESCRT.

En la figura se representa el reclutamiento secuencial de los cuatro complejos a la membrana del endosoma: **ESCRT-0** (compuesto por el complejo Vps27/Hrs) es reclutado a los endosomas uniéndose a PI3P y al cargamento ubiquitinado (Ub). Luego recluta **ESCRT-I** (compuesto por Tsg101/Vps23-Vps28-Vps37) a la membrana, donde interactúa con el cargamento ubiquitinado a través de su subunidad Vps23. Después **ESCRT-I** recluta al complejo **ESCRT-II** (compuesto por Vps22/Vps25/Vps36) y ambos inician la invaginación de la membrana endosomal limitante; a su vez **ESCRT-II** inicia la oligomerización del complejo **ESCRT-III** (compuesto por Vps20/CHMP2-Vps2/Vps24/Snf7). **ESCRT-III** concentra el cargamento, recluta enzimas desubiquitinantes que aseguran la disociación de la ubiquitina de las moléculas del cargamento antes de su secuestro en MVB y recluta factores como Vps4 AAA-ATPasa, implicados en el desensamblaje de los complejos ESCRT, lo que resulta en su disociación de la membrana. Tomada y editada de Vingtdoux et al., (2012).

1.2.2 Vía independiente de ESCRT

En esta vía participan enzimas como la esfingomielinasa, que hidroliza la esfingomielina en ceramida y fosfolipasa D (PLD) que a su vez hidroliza la fosfatidilcolina para generar colina y ácido fosfatídico, y este induce una curvatura negativa de la membrana hacia MVB. (Jiang et al., 2017). Ambas enzimas regulan la secreción de exosomas. (Rashed et al., 2017).

En contraste las microvesículas se consideran una clase más heterogénea de vesículas y se forman por vía directa mediante el desprendimiento de la membrana celular. La curvatura de la membrana hacia el exterior es facilitada por los cambios en la composición de las proteínas y los lípidos presentes en microdominios, en conjunto con enzimas dependientes de calcio como la flipasa y la flopasa que translocan la fosfatidilserina a la superficie exterior de la membrana plasmática (Jiang et al., 2017) (Figura 2). Después de su maduración, los MVB pueden formar lisosomas e ir hacia degradación lisosomal o con fusionarse con la membrana plasmática celular para liberar su contenido hacia el espacio extracelular. (Rashed et al., 2017).

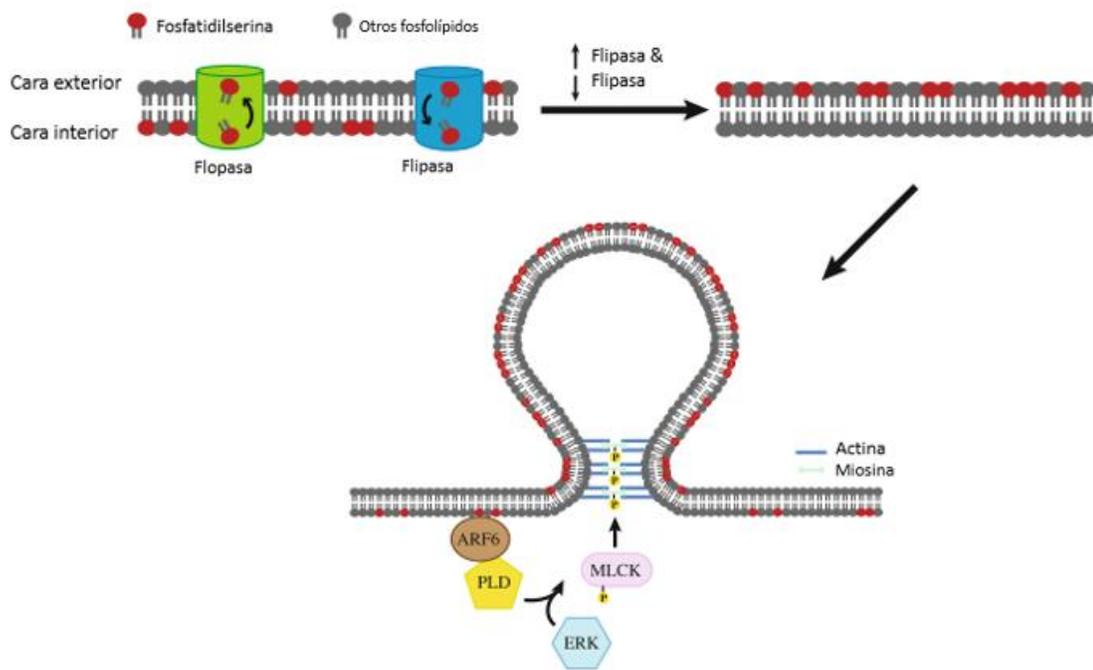


Figura 2 Formación de EV a partir de la membrana plasmática. Para permitir el desarrollo de las microvesículas, el factor 6 de ADP-ribosilación (ARF6) inicia una cascada de señalización que comienza con la activación de la PLD, que recluta la cinasa ERK en la membrana plasmática. ERK fosforila y activa a MLCK) La fosforilación y activación de la cadena ligera de miosina por MLCK desencadena la liberación de microvesículas. Tomada y editada de Akers et al. (2013).

1.3 Liberación de EV al medio extracelular y captación por las células blanco.

Con respecto a su **liberación al medio extracelular**, se ha propuesto un mecanismo general que es dependiente de calcio y del pH (Rashed et al., 2017). Sin embargo, existen muchas otras proteínas implicadas y el mecanismo preciso depende del tipo celular.

En cuanto a los **mecanismos de captación** por la célula receptora los más conocidos son la fusión membranal, la fagocitosis, la macropinocitosis y la endocitosis mediada por clatrina, caveolina o balsas lipídicas (Mulcahy et al., 2014) liberando proteínas de la superficie exosómica a la célula receptora. Además pueden unirse por interacciones receptor-ligando, como en la presentación de antígeno (Valadi et al., 2007).

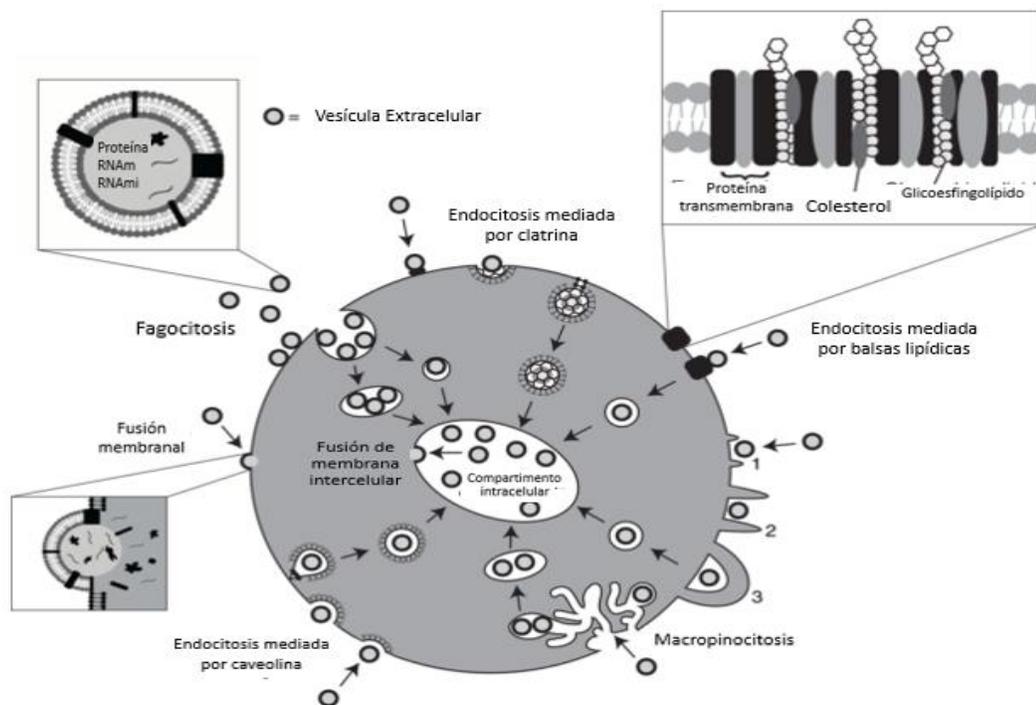


Figura 3. Vías que participan en la captación de las EV por las células blanco.

EVs se internalizan por fagocitosis, endocitosis mediada por caveolina o clatrina. De manera alternativa las EV intraluminales se fusionan con la membrana limitante endosomal seguido de la endocitosis para permitir que el contenido de las EV realice una respuesta fenotípica. Tomada y editada de Mulcahy et al. (2014)

1.4 Vesículas extracelulares (EV): Estructura y composición

Las membranas de las EV consisten en una bicapa lipídica similar a la de la membrana plasmática celular. Los exosomas están enriquecidos en esfingomielina, gangliósidos y lípidos insaturados (lo que implica una mayor rigidez de la bicapa lipídica exosómica) ordenados en balsas lipídicas; su proporción de fosfatidilcolina y diacilglicerol está disminuida con respecto a las membranas de sus células de origen (Laulagnier et al., 2004). Los mismos autores sugieren que la rigidez de la membrana puede ser dependiente del pH, ya que al tratar las EV liberadas por células RBL 2H3 con solución ácida se volvieron menos rígidos, igualando la rigidez de la membrana plasmática celular, que permaneció inalterada en pH ácido.

La dependencia del pH también puede relacionarse con el origen de los exosomas, ya que el pH de lo MVB es menor que en el citoplasma. La mayor acidez hace que la fluidez de las membranas de las EV sea parecida a la de la membrana plasmática, facilitando la fusión (Laulagnier et al., 2004).

Además se encuentran lípidos como las prostaglandinas (PG), los leucotrienos, y las enzimas que participan en el metabolismo de los lípidos, como la fosfolipasa C (PLC), por lo que los exosomas funcionan como transportadores de lípidos bioactivos hacia la célula receptora (Rashed et al., 2017). También contienen ácidos nucleicos y proteínas de las células de origen.

Se han descrito una serie de moléculas que son características o específicas de diferentes poblaciones de EV (Tabla 1). Estas moléculas se pueden utilizar para la identificación de poblaciones de vesículas (El Andaloussi et al., 2013)

<p>Cuerpos apoptóticos</p> <ul style="list-style-type: none"> •Contenido: Fracciones nucleares, organelos celulares. •Marcadores: Grandes cantidades de fosfatidilserina.
<p>Microvesículas</p> <ul style="list-style-type: none"> •Contenido: mRNA, miRNA, RNAs no codificantes, proteínas citoplásmicas y de membrana, incluyendo receptores. •Marcadores: Integrinas, selectinas, ligando CD40.
<p>Exosomas</p> <ul style="list-style-type: none"> •Proteínas: de choque térmico (Hsp70, Hsp90), de fusión y transporte de membrana (GTPasa, anexinas, flotilina), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82 Trombospondina, ALIX TSG101), moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (MHC-I, MHC-II) •Lípidos: esfingomielina, fosfatidilcolina, fosftidiletanolamina, fosfatidilserina, GM3. •Ácidos nucleicos: mRNA miRNA, RNA no codificantes.

Tabla 2 Clasificación de las vesículas extracelulares de acuerdo a su contenido y marcadores. Tomado y modificado de El Andaloussi et. al., (2103)

Cuando se analiza la composición proteica de los exosomas, el rango de proteínas es limitado, ya que las proteínas exosomales que se han identificado son las que se encuentran en el citosol, en la membrana de los compartimentos endosomales o en la membrana plasmática de las células de origen, con una cantidad muy limitada de proteínas de origen nuclear, mitocondrial, de retículo endoplásmico (ER) o del aparato de Golgi (Théry, 2011).

1.5 Función de las EV

La primera función descrita de los exosomas fue la eliminación de proteínas de membrana. Este es el caso de los receptores de transferrina que son expulsados de los reticulocitos durante el proceso de maduración en los eritrocitos. Se consideró por lo tanto que podrían ser una alternativa a la degradación lisosomal (Théry, 2011). Algunas otras funciones estudiadas hasta el momento son:

- Estimulación de la respuesta inmune: ejemplificado por su papel en la

maduración de las células

- T y en la presentación de antígeno (Qin & Xu, 2014); o en la estimulación de las respuestas inmunes antitumorales por células T *in vivo* por los exosomas derivados de células dendríticas (DC) murinas (Zitvogel et al., 1998).
- Estimulación de la progresión de tumores mediante su habilidad para llevar a cabo procesos tales como inducción de la proliferación celular y la estimulación del crecimiento tumoral, al promover la angiogénesis mediante la remodelación de la matriz extracelular regulada por la secreción de proteasas de la matriz. De esta forma se induce metástasis y se permite la evasión de la respuesta inmune mediante la modulación de la actividad de las células T (El Andaloussi et al., 2013).
- Sin embargo también se ha reportado que los exosomas derivados de células tumorales portan antígenos de los tumores secretores que pueden actuar en la presentación de antígenos tumorales por las DC, por lo que el resultado de estos efectos contradictorios *in vivo* aún no está bien establecido (Théry, 2011).
- Uno de los roles fisiológicos de exosomas de células no inmunes es el reportado de los derivados de los queratinocitos, que modulan la síntesis de melanina al incrementar la expresión y actividad de las proteínas que modulan la pigmentación de la piel dentro de los melanosomas (Cicero et al., 2015).
- Participación en los procesos de mantenimiento, desarrollo y diferenciación de células troncales. Estudios recientes demostraron la importancia de los exosomas en la regeneración de tejido después del daño. Así, por ejemplo, los exosomas derivados de las células troncales hepáticas promueven la regeneración de los hepatocitos (Rashed et al., 2017). De hecho, se sabe que las células troncales expresan un amplio número de factores de transcripción que contribuyen a su fenotipo indiferenciado y secretan varias moléculas de señalización relevantes para su interacción con el nicho celular donde residen y con otras células (Klingeborn et al., 2017)

- Los exosomas y otras EV funcionan como vehículos de estos factores tróficos mediante el secuestro de moléculas de señalización en su superficie o al transferir factores de transcripción y micro RNAs (miRNA) a otras células residentes (Klingeborn et al., 2017). La transferencia de mi RNA mediante EV los protege de la degradación y garantiza su estabilidad. Existe una clase de miRNA distribuidos de manera preferente en exosomas como el miR-320 y el miRNA-150 (J. Zhang et al., 2015).

Una característica relevante de las EV es que el mismo tipo celular puede secretar diferentes subgrupos de vesículas dependiendo de los factores ambientales (p. ej. tensión de oxígeno), topografía celular (respecto a la superficie basal o apical celular) o del estímulo de activación (p. ej. apoptosis o autofagia) (Yáñez-Mó et al., 2015)

1.6 Pautas para el estudio de EV establecidas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares.

Al ser un tema de estudio reciente y debido a la falta de heterogeneidad en los estudios iniciales de EV, en 2011 se crea la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV por sus siglas en inglés) cuyo equipo de trabajo propone una serie de criterios, que representan la caracterización mínima que los investigadores deben reportar de las EV, además de sugerir controles adecuados que deben incluirse en los estudios funcionales y de caracterización (Lötvall et al., 2014).

La ISEV recomienda la utilización de al menos dos tecnologías diferentes para su caracterización individual. Entre ellas se encuentran:

- La microscopía electrónica de transmisión (TEM) o la microscopía de fuerza atómica (AFM) cuyas imágenes deben mostrar un *campo abierto* que abarque múltiples vesículas.
- . Enfoques analíticos que pueden incluir Western Blot (WB), citometría de flujo activada por fluorescencia (*Fluorescence-activated cell sorting, FACS*) o análisis proteómico global usando técnicas de espectrometría de masas.

(Lötvall et al., 2014), así como el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

- Evaluación *semicuantitativa* de al menos 3 diferentes proteínas en una
- preparación de EV. Las proteínas obtenidas y caracterizadas deberían estar presentes en las vesículas de interés, especialmente las proteínas transmembrana y citosólicas con capacidad de unión a membrana. Además, también debería ser determinado el nivel de proteínas que se espera que no estén enriquecidas en EV de origen endosomal.

En esta investigación se utilizaron como marcadores para caracterización las siguientes proteínas:

- **Proteína interactiva ALG-2 X (*ALG-2 interacting protein X, ALIX*)**

También conocida como AIP1, es una proteína citoplásmica que se caracterizó primero por su interacción con ALG-2, proteína de unión a calcio necesaria para la muerte celular (Trioulier et al., 2004). Actualmente se le han asignado roles en la deformación y fisión de la membrana de los endosomas de la membrana plasmática celular. Regula la endocitosis de fase fluida y la internalización de los cargamentos que entran en las células a través de endocitosis independiente de clatrina (Mercier et al., 2016).

También está involucrada en la biogénesis de los exosomas (Colombo et al., 2013) ya que interactúa con las unidades ESCRTI y ESCRTIII como puente de unión para la formación del complejo durante la maduración endosomal y biogénesis de los exosomas (Odorizzi, 2006).

- **Proteína 94 regulada por glucosa (*Glucose-regulated protein 94, GRP94*)**

También conocida como gp96 o endoplasmina, es una proteína miembro de la familia de las proteínas de choque térmico 90 (Hsp90) que reside en el ER, donde actúa como una de las principales proteínas de unión a Calcio para su almacenamiento y a otros péptidos. Su actividad más importante es como chaperona molecular que dirige el plegamiento y/o el ensamblaje de proteínas

secretadas y de membrana; así mismo protege a las células del estrés oxidativo (Marzec et al., 2012). Al ser una proteína confinada a otro compartimento intracelular se utiliza en esta investigación como marcador de exclusión de las EV para distinguirlas de las de otro origen diferente al endosomal.

- **Lyn**

Proteína cinasa de la familia de Src, que participa en la señalización tras la activación del receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI), al actuar como un regulador negativo de las respuestas mediadas por IgE a través de la vía FcεRI-ITAM (Xiao et al., 2005). También se ha aislado en exosomas secretados por eritrocitos y células eritroleucémicas (De Gassart et al., 2003). Los mismos autores investigaron los dominios de balsas lipídicas en exosomas en estos tipos celulares y encontraron a Lyn como uno de los componentes; además describen que Lyn asociada a exosomas presenta un peso molecular menor que Lyn detectado en los dominios de membrana aislados de células.

- **Flotilina-2 o Reggie-2**

Las flotilinas (Flotilina 1 y 2) son proteínas que se asocian con microdominios de membrana específicos de manera constitutiva. Se localizan de manera predominante en la membrana plasmática y en estructuras endosómicas como endosomas tardíos y exosomas. Originalmente se les asociaba con la formación de caveolas sin embargo por hallazgos posteriores ahora se sabe que participan en formación de microdominios específicos no-caveolares. Ambas se expresan de manera ubicua, son funcionalmente distintas y dependientes una de la otra. Están implicadas en procesos celulares como migración y adhesión celular, señalización por receptores de proteínas cinasas y en el tráfico de membrana (Meister et. al., 2014).

1.7 Vesículas extracelulares en condiciones patológicas

Las poblaciones de vesículas extracelulares que secretan las células responden al microambiente al que están expuestas (Katsman et al., 2012) pudiendo variar su composición y número en respuesta a condiciones patológicas. Esto es particularmente relevante en el caso del cáncer ya que se ha demostrado que los exosomas liberados localmente de células tumorales pueden modificar el nicho celular del tumor, promoviendo la angiogénesis y la proliferación de estas células. (Tickner et al., 2014).

Por otro lado, cuando las células se someten a estrés, por ejemplo, presentan un incremento en la liberación de EVs incluyendo exosomas. En el caso particular de las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) los exosomas liberados bajo estrés exhiben cambios en la señalización de fosfoproteínas. Además están cubiertos con componentes del complemento incluyendo el complejo terminal de ataque a la membrana C5b-9 implicado en vías de inflamación (Klingeborn et al., 2017), ligado a estrés oxidativo y con un papel importante en la patogénesis de la degeneración macular asociada con la edad (Biasutto et al., 2013)

En un estudio realizado por Kucharzewska et. al (2013) se documentó que los exosomas derivados de células de glioblastoma multiforme (GBM) cultivadas en condiciones de hipoxia (disminución de la cantidad de oxígeno disponible) son potentes inductores de la angiogénesis *ex vivo* e *in vitro* a través de la modulación fenotípica de las células endoteliales a su alrededor (Kucharzewska et al., 2013).

Muy recientemente Zhang et al., (2017) demuestran que la hipoxia estimula la producción y secreción de exosomas en células del túbulo renal proximal (RTPC) *in vitro* y que los exosomas derivados de las células hipóxicas ofrecen un efecto citoprotector a las RTPC en un modelo de daño celular por depleción de ATP. En este modelo HIF-1 (factor inducible por hipoxia 1) es el que media la producción de exosomas durante la hipoxia y contribuye al efecto citoprotector de estos.

1.8 Células cebadas, respuesta inmune e hipoxia

Las MC tienen un papel importante en las enfermedades inflamatorias, así como en la respuesta a infecciones, progresión de tumores y condiciones relacionadas con isquemia. Las MC se encuentran distribuidas en todos los tejidos vascularizados del cuerpo y de manera abundante en los tejidos expuestos al medio ambiente como los pulmones, el intestino y la piel, por lo que son unas de las primeras células expuestas a alérgenos, contaminantes y patógenos (Gulliksson et al., 2010).

Las MC son células secretoras que expresan al FcεRI en su superficie. Su activación se lleva a cabo con el entrecruzamiento de la IgE unida al receptor por el antígeno, entonces los receptores se agrupan e inician una vía de señalización que implica la fosforilación de los ITAM y la activación de cinasas como Fyn, Lyn y Syk, que conlleva a la translocación de gránulos preformados hacia la membrana plasmática y su liberación mediante exocitosis. Los gránulos secretores contienen moléculas como proteínas lisosomales, histamina, heparina y β-hexosaminidasa (Vukman, et. al., 2017). Los autores mencionan también otros tipos de secreción de las MC que incluyen la liberación de mediadores solubles al medio extracelular, la secreción picemal y mediante vesículas.

Durante la inflamación o la respuesta inmune a una infección, las células inmunes se infiltran de manera local consumiendo oxígeno. Al ser éste un componente del microambiente requerido para la actividad celular, se ha intentado responder la pregunta de si las MC, que son moduladores clave de la reacción de defensa del huésped, responden de manera diferente bajo condiciones de hipoxia en los tejidos infectados (Möllerherm et al., 2017). La hipoxia es una característica prominente de los tejidos con inflamación, como tumores, infartos miocárdicos, placas ateroscleróticas, pulmones de pacientes asmáticos, curación de heridas, y sitios de infección bacterianas; estas condiciones además están asociadas con un incremento en el número de células cebadas (Gulliksson et al., 2010).

La secreción de exosomas por células cebadas derivadas de la médula ósea (BMMC por sus siglas en inglés), células cebadas peritoneales y las líneas celulares MC P815 y MC/9 fue descrita por primera vez en 2001 por Skokos y colaboradores quienes comprobaron que las MC utilizaban exosomas como mensajeros para la inmunoregulación de la actividad de linfocitos B y T (Skokos et al., 2001).

Se ha reportado que los exosomas derivados de las MC pueden inducir respuestas específicas antígeno-anticuerpo en ratones *in vivo*, participar en la maduración de células dendríticas (por regulación positiva de MHC-II, CD40, CD80 y CD86) e inducir la proliferación y secreción de citocinas de células B *in vitro* (Vukman et al., 2017). La membrana de los exosomas liberados por las MC se encuentra enriquecida en esfingomiélin y, contiene de manera característica moléculas del MHC-II en su superficie así como FcεRI intacto. Contienen además, TNFα, protrombina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. (Carroll-Portillo. et al., 2012).

Durante el metabolismo celular en condiciones aeróbicas continuamente se generan especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que a dosis altas en condiciones experimentales puede conducir a muerte celular, sin embargo a dosis bajas puede inducir a mayor tolerancia a un nivel más alto de estrés oxidativo en las células. Esta protección está regulada a nivel transcripcional (Eldh et al., 2010).

A comparación de los exosomas producidos por las células cultivadas en condiciones normales, los exosomas liberados por MC expuestas a estrés oxidativo tienen la capacidad de comunicar señales de protección a las células progenitoras receptoras CD34+ y a otras MC que fueron expuestas a estrés oxidativo de manera posterior, resultando en reducción de la muerte celular (Eldh et al., 2010). Se ha podido demostrar que, en este proceso, es fundamental la transferencia de mRNA y miRNA funcional (*exosomal shuttle RNA*) que se sugiere como un mecanismo importante de comunicación intercelular. Potencialmente puede iniciar la traducción proteica en la célula diana utilizando el mRNA sintetizado originalmente en las MC, utilizando este mecanismo para transmitir señales ambientales locales a ubicaciones periféricas (Carroll-Portillo et al., 2012).

Valadi y colaboradores (2007) identificaron los miRNA let-7, miR-1, miR-15, miR-16, miR-181 and miR-375 en exosomas derivados de la línea celular de células cebadas MC/9. Dos de los más estudiados son lin-4 y let-7 implicados en el desarrollo temprano y tardío respectivamente. Además sugieren que los miRNA exosómicos miR-1, miR-17, miR-18, miR-181 and miR-375 pueden tener papeles en la angiogénesis, hematopoyesis, exocitosis y tumorigénesis.

La comunicación mediante mRNA y miRNA contenido en exosomas puede ocurrir en el microambiente pero potencialmente también podría ocurrir a distancia (Valadi et al., 2007).

Sin embargo, a diferencia de lo reportado por Eldh en 2010, en la mayoría de los experimentos en cultivo, las células se cultivan bajo condiciones de normoxia, ignorando el hecho de que las células inmunes normalmente actúan bajo hipoxia en tejidos con inflamación (0.1–3% O²) (Möllerherm et al., 2017) por lo que el efecto de la hipoxia en las funciones de los mastocitos está poco estudiado.

1.8.1 Hipoxia

La hipoxia es una condición que surge cuando la demanda celular de oxígeno excede al suministro. Es una característica común del microambiente del nicho inmunológico importante tanto en la inmunidad como en la inflamación (Taylor & Colgan, 2017). En los tejidos, como resultado de la reducción en los niveles de oxígeno, el metabolismo tisular cambia hacia un consumo menor de oxígeno y a la vez induce a la eritropoyesis y angiogénesis para restaurar el suministro limitado de oxígeno (Gulliksson et al., 2010).

La hipoxia es una característica común en numerosos nichos inmunológicos fisiológicos, particularmente en los sitios donde la proliferación celular y por ende la demanda metabólica de oxígeno es alta (Taylor et al., 2017).

Se conoce que la hipoxia estimula la producción y secreción de exosomas en células tubulares renales; y que los exosomas de las células hipóxicas protegen contra la lesión celular tubular renal. La producción de exosomas durante la hipoxia

esta mediada por HIF1- α , que además contribuye al efecto citoprotector (W. Zhang et al., 2017)

1.8.2 Factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1- α)

El sistema HIF es un regulador clave en una amplia gama de respuestas celulares a la hipoxia que actúa en todas las células de mamíferos. Los cambios en la expresión génica y las vías mediadas directa o indirectamente por este factor de transcripción influyen en la adaptación metabólica, angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular, la supervivencia y apoptosis (Weidemann et al., 2008). Comprende a un complejo proteico heterodimérico formado por una subunidad constitutiva HIF β nuclear, y una subunidad HIF α (principalmente HIF-1 α y HIF-2 β) citoplásmica dependiente de oxígeno (Sormendi et al., 2016).

HIF-1 α se expresa ubicuamente y HIF-2 α tiene una expresión más limitada principalmente en células endoteliales y células productoras de eritropoyetina en el riñón. Respecto al sistema inmune, HIF-1 α se expresa en prácticamente todas las poblaciones celulares tanto de la inmunidad innata como adaptativa; HIF-2 α por su parte se estabiliza en células como monocitos y macrófagos (Sormendi et al., 2016)

En condiciones de normoxia u oxigenación normal (21% de O₂), HIF-1 α se hidroxila en residuos de prolina por las enzimas dependientes de oxígeno del dominio HIF-prolil hidroxilasas (PHD1-3), asociándose con la ligasa E3 de von Hippel-Lindau (VHL) para degradación proteosomal. En condiciones de hipoxia, la hidroxilación de prolina en HIF-1 α se encuentra bloqueada, lo que lleva a su acumulación, a su dimerización con HIF-1 β y su translocación al núcleo para la transcripción génica adaptativa (W. Zhang et al., 2017) de múltiples genes conocidos como elementos específicos de respuesta a hipoxia (HRE) involucrados en el metabolismo celular como la producción de citocinas y factores de crecimiento, eritropoyesis e inflamación (Fig.4) (Gulliksson et al., 2010; Sormendi et al., 2016).

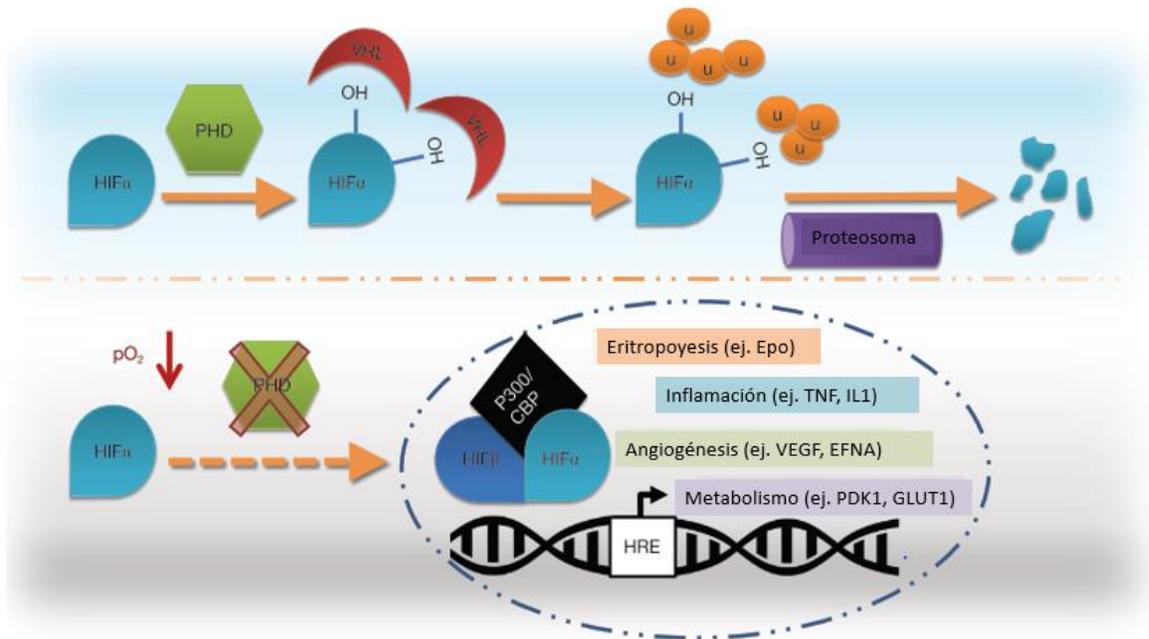


Figura 4 Regulación de HIF dependiente de oxígeno

Durante la normoxia (panel superior) los PHD hidroxilan dos residuos de prolina en HIF α y permitiendo la unión de la proteína VHL y de su ubiquitín ligasa E3, propiciando la unión de ubiquitina a esta subunidad y su posterior degradación proteosómica. En periodos de privación de oxígeno las PHD se encuentran inactivadas e HIF α puede translocarse al núcleo unirse a la subunidad HIF β . El dímero se une a P300/CBP activando a HRE lo que desencadena la transcripción de genes implicados en procesos de adaptación a hipoxia. Tomado y modificado de Sormendi et al., (2016).

Otros mecanismo de autorregulación de HIF además de la regulación a la alza de las PHD, son los microRNA, que controlan los niveles de expresión de este factor de transcripción (Taylor et al., 2017). La baja tensión de O₂ regula negativamente a nivel global la biogénesis de miRNA, sin embargo algunos miRNA maduros seleccionados son inducidos por la hipoxia en múltiples tipos celulares. Por ejemplo, el miR-210 se ha identificado como un objetivo directo de HIF y es inducido consistentemente por células en hipoxia. La expresión elevada de este miRNA en hipoxia regula una reducción en la actividad de la cadena transportadora de electrones, por lo que HIF mediante HIF1 tiene un efecto de supresión en la

respiración mitocondrial, lo que a la vez disminuye el consumo de oxígeno y ayuda a restablecer la oxigenación tisular (Ivan et al., 2017).

1.8 Línea celular RBL 2H3 como modelo para el estudio de EV.

Existen varias líneas celulares utilizadas para el estudio de las MC *in vitro*. RBL-2H3 es una línea celular de leucemia basófila, aislada y clonada en 1976 en el Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Investigación Dental, de células basófilas de rata Wistar que se mantuvieron como tumores (Blank et. al., 2004). Estas células fueron clonadas mediante el método de dilución limitante a partir de las células RBL-HR+ en el intento de reducir la heterogeneidad celular, aislándose así la línea celular RBL2H3 (Passante et al., 2009)

Presentan una ventaja incuestionable al ser células fácilmente cultivables, por lo que se pueden obtener un gran número de células homogéneas de manera fácil. Como las MC y los basófilos, responden con desgranulación tras la estimulación del FcεRI por IgE, con la liberación de una gama de mediadores preformados y recién sintetizados, similar a la reacción de las MC durante la respuesta inmune alérgica. (Passante et. al., 2009).

Hasta el momento, se conoce que las células RBL secretan EV que contienen enzimas implicadas en el metabolismo lipídico como las fosfolipasas D y A₂, cuya actividad inicia con la adición de GTP. También contienen escramblasa de fosfolípidos, proteína de unión a ácidos grasos y lípidos bioactivos como ácido araquidónico (AA) y la prostaglandina E₂ (PGE₂), que transmiten a través de EV a células vecinas contribuyendo a la reactividad de otras células como las células T (Subra et al., 2010),

En cuanto a la composición de su membrana, los exosomas de las MC corresponden a un nuevo tipo de membrana lipídica con altos niveles de esfingomielinina y glicerofosfolípidos disaturados, sin enriquecimiento en colesterol o ácido lisobisfosfatídico (LBPA) en comparación con las de las células totales (Laulagnier et al., 2004). En un estudio posterior los autores clasificaron a los exosomas liberados por las RBL 2H3 en dos subpoblaciones principales: una

enriquecida en lípidos relacionados con el aparato Golgi y en tetraspaninas y la otra enriquecida en lípidos de gránulos y en proteínas MHC II (Laulagnier et al., 2005) sin embargo los estudios disponibles no profundizan en la caracterización de las EV liberadas por este tipo celular.

2. Justificación

Las células cebadas son células multifuncionales implicadas en respuestas inmunitarias a través de su papel secretorio y en particular durante procesos inflamatorios donde predomina un estado de hipoxia. En los últimos años se ha otorgado un papel relevante a las EVs en la respuesta inmune. Se ha descrito la secreción de EVs en células cebadas pero no se ha estudiado este proceso en condiciones de hipoxia. Por lo que en esta investigación se pretende la obtención de EVs en la línea celular RBL 2H3 y su caracterización en condiciones de normoxia e hipoxia.

3. Hipótesis

La línea celular RBL 2H3 puede secretar vesículas extracelulares de forma constitutiva. La hipoxia es un estímulo para el aumento en la secreción de las mismas.

4. Objetivo

Obtención y purificación de los diferentes tipos de vesículas extracelulares de estas secretadas por la línea celular RBL-2H3 bajo condiciones de normoxia e hipoxia analizando su morfología, cantidad y composición.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Establecimiento de las condiciones de cultivo de la línea celular RBL 2H3 en normoxia e hipoxia.
- 2) Obtención y aislamiento de vesículas extracelulares secretadas al medio por células RBL 2H3 mediante ultracentrifugaciones seriadas.
- 3) Análisis de las vesículas extracelulares mediante técnicas de inmunocitoquímica y Western Blot.
- 4) Evaluación morfológica mediante técnicas de microscopía electrónica.
- 5) Cuantificación de las vesículas extracelulares por análisis de rastreo de nanopartículas.

5. Materiales y métodos

5.1 Línea celular

Se usaron células de la línea celular RBL 2H3 obtenidas de la *American Type Culture Collectio (ATCC CRL-2256)*.

Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C con control de CO₂ del 5% hasta que alcanzaron una confluencia de 70-80% (aproximadamente 3 días posteriores a que se sembraron). Se utilizaron células de pasaje 3 a 13 en un Flask T175 (aproximadamente 1.2x10⁷ células/Flask). Se utilizó medio de crecimiento Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Gibco) así como antibiótico y antimicótico al 1% (Gibco), Pen-Strep al 1.2% (Gibco) suplementado con Piruvato de Sodio 1mM (Gibco) y aminoácidos no esenciales MEM 1x (MEM NEAA, Gibco). Para la producción de vesículas extracelulares se utilizó medio condicionado para la producción de exosomas con la preparación antes descrita con excepción del FBS, en su lugar se utilizó FBS depletado de exosomas (Gibco) al 10%.

5.2 Cultivos celulares en normoxia e hipoxia.

Una vez que los cultivos alcanzaron 80-90% de confluencia en el Flask T175 se retiró el DMEM con FBS al 10% y se lavó con 10 mL de PBS estéril en dos ocasiones. Se retiró el PBS y se colocó medio condicionado para la producción de exosomas y se colocaron en incubadora Binder CB 150 para las células en condiciones de normoxia con O₂ al 21% (CO₂ 5% y 37° C) y en cámara de desplazamiento de gas Memmert 108 por 24 h para la condición de hipoxia. En esta cámara, adicional al control de la concentración de CO₂, se introduce N₂ para lograr el desplazamiento de aire, haciendo posible el control de la concentración de oxígeno, que en este caso se fijó a 1%.

5.3 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular en ambas condiciones se evaluó mediante un ensayo MUSE® Count & Viability Kit (MCH100102). Este kit permite el análisis cuantitativo de las células viables y no viables al teñirlas de manera diferencial de acuerdo a la permeabilidad de las mismas para la unión al DNA de uno de los colorantes contenido en el reactivo.

Uno de los colorantes tiñe las células que han perdido la integridad de su membrana permitiendo que el colorante tiña el núcleo de las células no viables y células muertas (las células viables no se tiñen), parámetro que se muestra como “Viabilidad”. El otro colorante tiñe DNA, es permeable a la membrana y marca células con núcleo (pero no a células con un núcleo de detritus ni a células no nucleadas) parámetro que se muestra como “Células nucleadas”. Los datos generados mediante el software son:

- Conteo de células viables (células/mL)
- Total de células contadas (células/mL)
- % de viabilidad de la muestra

Siguiendo el protocolo indicado, se retiró el medio para la producción de exosomas y se lavó en dos ocasiones con buffer fosfato salino (PBS) estéril, se colocaron 7 mL de Tripsina al 0.05% durante 5 min a 37°C. Se inactivó la enzima con 7 mL de medio de crecimiento y el sobrenadante se colocó en tubos Falcon de 15 mL que se centrifugaron 3 min a 1200 rpm. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 10 mL de medio de crecimiento.

De acuerdo al instructivo del fabricante se realizó una dilución con un factor de dilución 40: se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL 20 µL de la suspensión celular y 780 µL de reactivo contenido en el Kit, se incubó por 5 min a RT, se homogenizó la muestra y se colocó en citómetro Muse (Los conteos para cada muestra se hicieron por triplicado). Los resultados fueron analizados por el software del analizador celular Muse incluido en el equipo.

5.4 Protocolo de aislamiento de exosomas

(modificado de Théry et al., 2006 y Laulagnier et al., 2005.)

Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio 225 N del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.4.1 Obtención de medio condicionado para la producción de microvesículas y exosomas

Al término de 24 h de incubación de las células en condiciones de normoxia o hipoxia, se recolectó el medio condicionado para la producción de exosomas de ambos grupos con una pipeta Pasteur estéril y se colocó en tubos Falcon de 50 mL a 4°C.

5.4.2 Remoción de células, células muertas y detritus celular

Las células restantes y detritus fueron eliminados mediante ultracentrifugaciones seriadas a 4°C a 300 x *g* por 10 min en rotor s4180, después se transfirió el sobrenadante a tubos Falcon de 50 mL recuperándolo hasta aproximadamente 1-2 cm por encima del pellet celular y se centrifugaron a 2000 x *g* durante 20 min en mismo rotor; se recuperó el sobrenadante nuevamente hasta dejar 1-2 cm por encima del fondo del tubo y se trasladaron a tubos de polipropileno abiertos de 50 mL que se centrifugaron a 4°C 10,000 x *g* 30 min en rotor JA-25.50.

5.4.3 Lavado y recolección de la fracción de exosomas

Las microvesículas fueron aisladas después al transferir el sobrenadante (dejando unos 2 cm por encima del fondo del tubo) a tubos de policarbonato para ultracentrífuga a 110,000 x *g* a 4°C durante 70 min en rotor SW40Ti; se desechó el sobrenadante hasta un cm por encima del fondo del tubo, se resuspendió el pellet (no visible a este momento) se rellenó con PBS 1x y se centrifugaron nuevamente en el mismo rotor y con los mismos

parámetros. Finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet final en 40-50 μL de RIPA 1x o en 20-50 μL de PBS 1x dependiendo de su utilización posterior y se congelaron a -70°C .

5.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) whole-mounted de microvesículas.

La preparación de estas muestras se llevó a cabo en el Departamento de Microscopía electrónica del Cinvestav Sede Zacatenco.

Para la preparación de la muestra para TEM se descongeló el vial del pellet de exosomas resuspendido en PBS 1X, manteniéndolo siempre a 4°C . Con micropipeta se depositaron 10 μL de muestra en una rejilla cubierta con Formvar-carbon durante 5 min y se retiró con papel filtro.

Posteriormente se colocaron 10 μL de acetato de uranilo al 2% y se retiró inmediatamente con papel filtro, luego 10 μL de acetato de uranilo por 30 segundos y se retiró con papel filtro y finalmente 10 μL de acetato de uranilo por 2 min y se retiró nuevamente con papel filtro. Se dejó secar la superficie de la rejilla y se montó para observación en microscopio electrónico Jeol, modelo JEM 1400 a un voltaje de 80kV. Se tomaron aproximadamente de 3 a 6 imágenes de cada muestra para evaluar la población de exosomas aumento de 20, 50 y 150 kV

5.6 Cuantificación óptica de vesículas.

Para la cuantificación manual de EV se tomaron 2 imágenes correspondientes a cada condición de las obtenidas por MET. Se midió el diámetro de cada vesícula y de las que presentaban una morfología alargada se tomó el diámetro mayor. Se descartó a las vesículas que se encontraban en los bordes de las imágenes por no poder observarse su morfología completa y posteriormente los diámetros obtenidos se clasificaron en rangos.

5.7 Preparación de cubreobjetos para inmunofluorescencia.

La técnica de inmunocitoquímica se llevó a cabo en cubreobjetos que se prepararon en la campana de flujo laminar: en una placa de 24 pocillos se colocaron 12 cubreobjetos redondos de 22 mm de grosor, limpios y secos. Previamente, cada cubreobjeto se cubrió con alcohol al 70% y se expuso a luz UV durante 4 h. Las células de un Flask T25 con confluencia del 80% se lavaron en dos ocasiones con PBS 1x estéril y se colocaron 3 mL de tripsina al 0.05% durante 5 min, se golpeó ligeramente el Flask para despegar la mayor cantidad de células posible y posteriormente se inactivó a la tripsina con 3 mL de medio de crecimiento DMEM con FBS 10%. Se colocó el sobrenadante en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó por 3 min a 1200 rpm. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 5mL de medio de crecimiento. Se sembraron 30 μ L a una densidad de aproximadamente 10,000 células por cubreobjeto. Se colocó la caja por 20 min en incubadora a 37° para que las células se sedimentaran y posteriormente se colocaron en 500 μ L de medio de crecimiento en cada pozo y se dejaron en incubadora a 37°C por 24 h para su utilización.

5.8 Inmunofluorescencia para detección de células en hipoxia utilizando pimonidazol.

El kit HypoxyprobeTM-1 para detectar las células en hipoxia, utiliza clorhidrato de pimonidazol, un 2-nitroimidazol, el cual es activado por reducción en las células hipóxicas. El intermedio activado forma enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilo en proteínas, péptidos y aminoácidos. El anticuerpo MAb1 se une a estos enlaces permitiendo su detección por medio de inmunofluorescencia.

Del stock de clorhidrato de pimonidazol se realizó una dilución 1:10 y se diluyó en agua MilliQ estéril, se retiró el medio de crecimiento de las células colocadas previamente en hipoxia por 22 h y se colocaron 200 μ L de medio de crecimiento

nuevo y 1 μL de la dilución de pimonidazol por dos horas para cumplir 24 h en condición de hipoxia.

Se retiró el medio de crecimiento de los pozos con los cubreobjetos y se lavaron en una ocasión con PBS 1x, se fijaron con 500 μL de PFA al % a RT por 20 min, se lavaron en una ocasión con PBS 1x por 3 min y se colocaron 200 μL cloruro de amonio (NH_4Cl) 50mM por 15 min a RT y se lavó con PBS-T al 0.01% por 3 min.

El bloqueo se realizó con una solución de PBS 1X, albumina de suero bovino (BSA) 3%, suero normal de burro (SND) 5% y Tween 20 al 0.1% durante 2 h a RT. Se incubó con FITC-MAb del kit (1:200) en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche protegido de la luz.

Al día siguiente se realizaron 6 lavados de 2 min cada uno con PBS-T, se tiñó con DAPI 1:500 diluido en PBS 1X por 5 min y se lavó nuevamente en tres ocasiones con PBS-T 0.1%. Se retiraron los cubreobjetos de la caja y se montaron con 2 μL de DABCO en portaobjetos con el lado de las células en contacto con la superficie del portaobjetos y se selló con esmalte transparente y se almacenó a 4°C en la oscuridad. Las imágenes se observaron en el microscopio de epifluorescencia marca Zeiss Axiovert 40 CFL, acoplado a una cámara Carl Zeiss AxioCam MRm. Las imágenes se procesaron con el software AxioVision Rel.4.8.

5.9 Western Blot

Del pellet de microvesículas obtenido de cada condición resuspendido en buffer RIPA se tomaron 170 μg de proteína (aproximadamente 15 μL del pellet) y 170 μg de proteína (15 μL) de lisado celular como control (así como del pellet obtenido de los medios de crecimiento utilizados durante los experimentos) que se mezclaron cada uno con 15 μL de Laemmli 2x (Sigma), se calentaron a 90° C en baño María por 3 min y se homogenizaron en vortex por 30 segundos en tres ocasiones. Estos fueron cargados en un gel de acrilamida al 10%. La electroforesis se realizó durante 1 hora a 50 mA. Posteriormente las proteínas del gel se transfirieron a una

membrana de PVDF durante 2 h con 40 min a 25 V. Se bloqueó la unión inespecífica en las membranas con una solución de leche descremada al 5% en buffer Tris salino con Tween-20 al 0.1% (TBS-T) por dos horas a RT. Transcurrido este tiempo se incubó a las membranas con anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en agitación con las siguientes concentraciones:

Anticuerpo primario	Concentración
ALIX (ab 117600)	1:1000
GRP94 (ab2791)	1:1000
Flotilina-2 (B-6): sc-28320	1:1000
Lyn (44): sc-15	1:1000
Actina (sc-81178)	1:1000

Tabla 3 Anticuerpo usados para la caracterización de las EV.

Al día siguiente se hicieron 2 lavados de 10 min cada uno con TBS-T a las membranas en agitación y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) 1:10,000 para ALIX y Actina y anti-rata HRP 1:10,000 para GRP94 por 1 hora a RT en agitación. Finalmente se lavaron en 2 ocasiones de 10 min cada una con TBS-T en agitación. La detección de proteínas se realizó con kit de quimioluminiscencia (Millipore) y película fotográfica. Las películas fotográficas fueron capturadas con el software Gel Capture Mini Bis y cuantificadas con el software Gel Quant Express

5.10 Análisis de seguimiento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis NTA)

La realización de este experimento se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo de la UNAM.

El NTA utiliza las propiedades de dispersión de la luz y del movimiento browniano para obtener mediciones de concentración y distribución del tamaño

de las partículas en muestras en suspensión líquida. Esto se realizó en el equipo NanoSight NS300 equipado con un láser de 532 nanómetros. Para mediciones óptimas se realizó una dilución 1:800 con PBS de cada muestra (de un pellet resuspendido en 50 μ L de PBS 1x) y se cargaron 400 μ L en la cámara del láser. Para cada muestra, se obtuvieron tres vídeos de 40 segundos y fueron analizados con nivel de cámara 10 y un umbral de detección de 8. Los videos fueron analizados con el software NS 300 versión v3.00.

6. Resultados

6.1 Homogeneidad en cultivos de RBL 2H3.

Una de las pautas primordiales de la ISEV es la de reportar la confluencia y viabilidad de los cultivos utilizados para el aislamiento de EV. En este proyecto obtuvimos los cultivos de células RBL 2H3 en Flask T175 cm² (aproximadamente 1.3×10^7 células a 80% de confluencia) utilizando 30 mL de medio de crecimiento DMEM con FBS 10% suplementado con aminoácidos y piruvato (Gibco) para su crecimiento. Esta línea celular se adhiere a la placa y su morfología característica es alargada, similar a los fibroblastos. Una vez que las células alcanzan una confluencia aproximada de 80% o mayor, adquieren una forma redondeada (Figura 5b). Cuando los cultivos alcanzaron esta confluencia realizamos el cambio de medio de crecimiento por el medio condicionado para la producción de exosomas y la colocación de cada grupo en condición de normoxia o hipoxia y la recolección del mismo al cabo de 24 h. Cabe resaltar que ni el uso de medio condicionado ni la condición de hipoxia modificaron la adherencia o morfología de las células en cultivo.

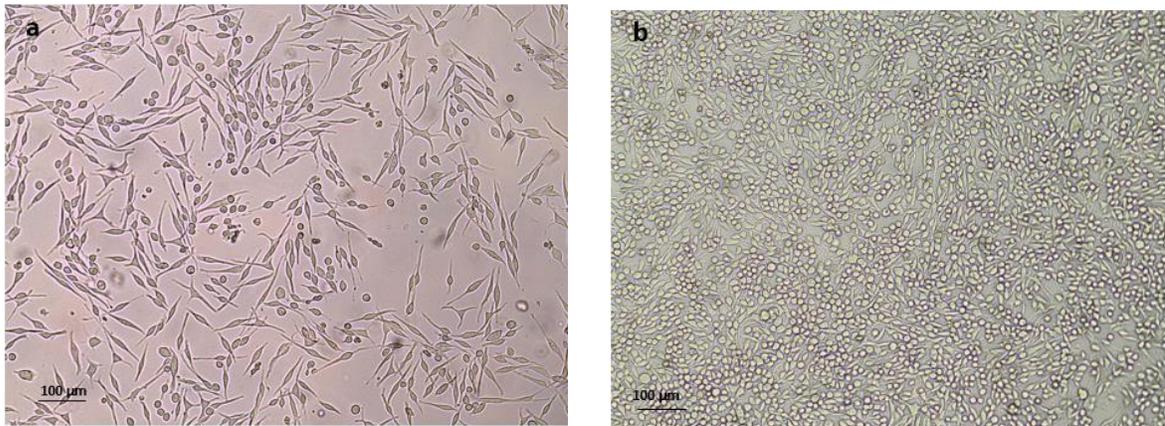


Figura 5 Cultivos de RBL 2H3.

Se sembraron 4×10^6 células RBL 2H3 en un Flask T175 y se dejaron en incubación por 72 h. En los paneles se muestra una imagen representativa de 2 cultivos realizados durante el proyecto. Se observa en el panel **a** su morfología alargada característica a las 24 h posterior al sembrado. En el panel **b** se pudo observar el cambio de morfología celular alargada hacia una redondeada a

mayor confluencia (aproximadamente 70%) a las 72 h. Objetivo 10x. Barra de calibración 100 μ m.

6.2 La hipoxia no modifica la viabilidad celular a tiempos cortos

Para conocer la viabilidad de las células utilizadas durante el proyecto, se realizó un ensayo de viabilidad utilizando un factor de dilución 40 (para los Flask T175 utilizados en cada condición experimental) con Kit Muse Cell and Viability kit que tiene la capacidad de discriminar entre las células viables nucleadas y que conservan la integridad de su membrana y restos o detritus celulares y aquellas que han perdido dicha integridad.

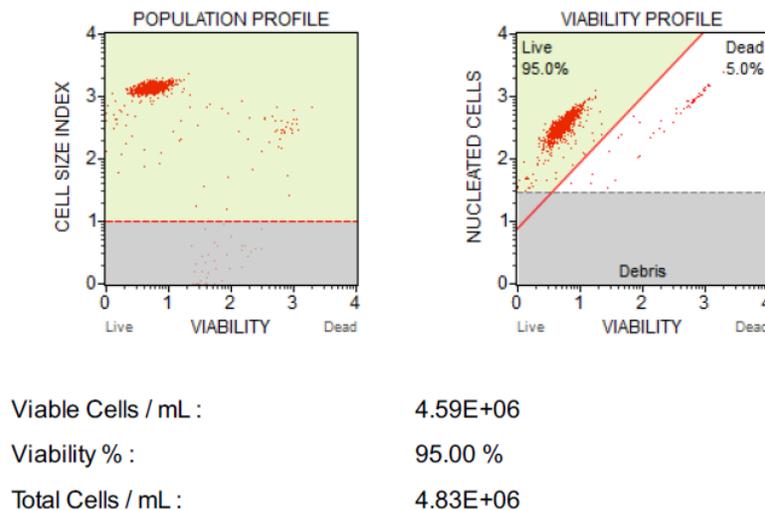
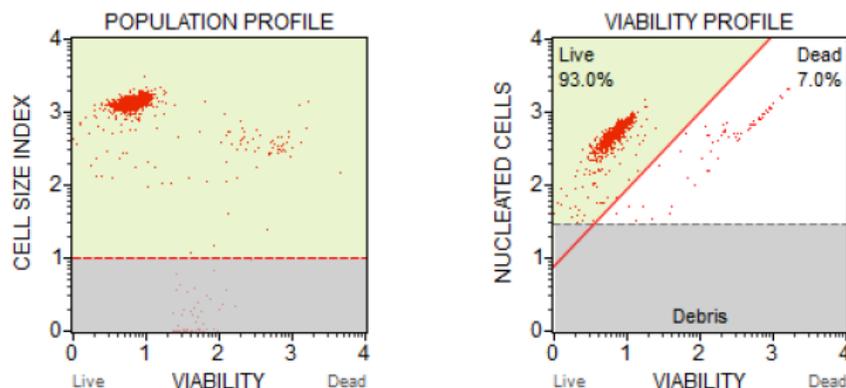


Figura 6 Gráficas representativas del perfil de población y viabilidad correspondiente a las células en condición de normoxia.

En la figura 6 se muestra el perfil de la población y la viabilidad de los cultivos en condición de normoxia en las que esta se mantuvo siempre por encima del 90%.

Las células en condiciones de hipoxia (figura 7) no modifican de manera significativa su viabilidad celular.



Viable Cells / mL :	3.54E+06
Viability % :	93.00 %
Total Cells / mL :	3.81E+06

Figura 7 Gráficas representativas del perfil de población y viabilidad correspondiente a las células en condición de normoxia.

Esto corresponde con lo reportado en la literatura por Gulliksson que observa que las células cebadas (derivadas de sangre del cordón umbilical) cultivadas en condición de hipoxia (1% O₂) mantienen una elevada viabilidad hasta por tres días.

Con este experimento cumplimos una de las primeras pautas de la ISEV para el aislamiento de vesículas extracelulares.

6.3 El cultivo de las células RBL 2H3 en un ambiente de 1% de tensión de oxígeno por 24 horas induce un estado hipóxico.

Para garantizar que los cultivos celulares colocados en la cámara de desplazamiento de gas reflejaran un estado de hipoxia realizamos una tinción

por inmunofluorescencia en cubreobjetos (aproximadamente 1×10^4 célulasn cada cubreobjeto), colocando una concentración 200 uM de pimonidazol en cada grupo. En la figura 8 podemos observar en los paneles superiores las células que se colocaron en la incubadora de desplazamiento de gas por 24 h a un tensión de oxígeno del 1% y en los inferiores las células en normoxia (con tensión de oxígeno 21%).

En las columnas de la izquierda se observa la tinción de núcleos con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), la células se encuentran confluentes y adheridas a la superficie. En la columna del medio se puede observar la marca fluorescente en el citoplasma correspondiente a las células en condiciones de hipoxia y en la tercera columna a la derecha se observa la colocación de ambas marcas.

El incremento en la inmunorreactividad en el citoplasma de las células cultivadas en condiciones de hipoxia es notorio, ya que el ensayo detecta por inmunofluorescencia (FITC conjugado con anti-pimonidazol) al pimonidazol, un 2-nitroimidazol activado de manera reductiva específicamente en células hipóxicas, que forma aductos estables con grupos tiol en proteínas, aminoácidos y péptidos. Este experimento confirma que las células se encuentran en un estado hipóxico.

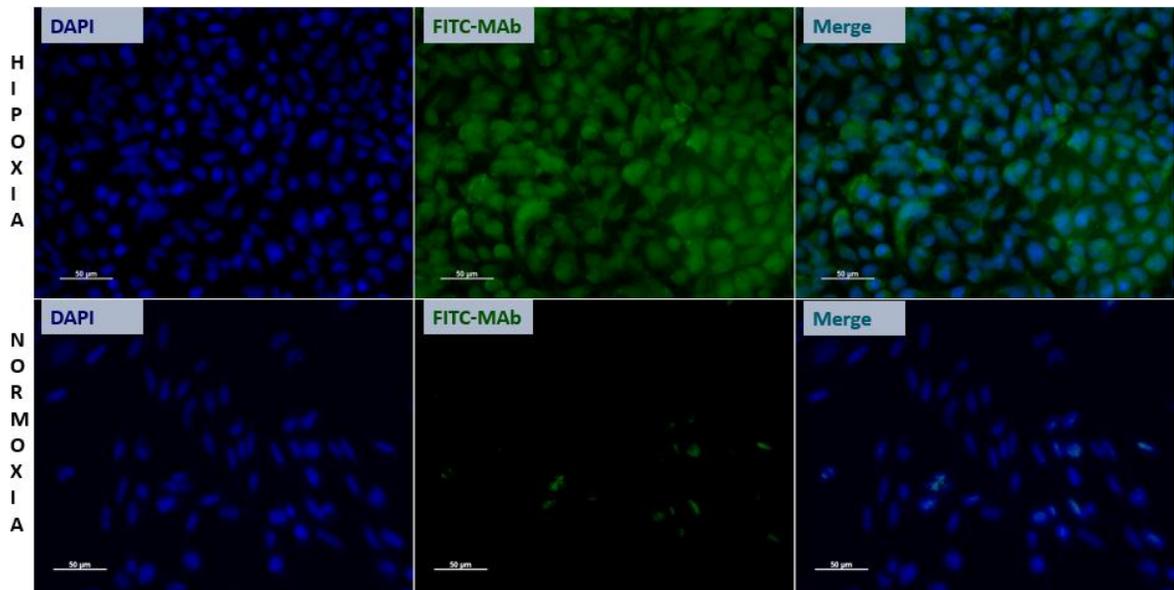


Figura 8 Ensayo de inmunofluorescencia después de MAb1 (Hypoxyprobe-1 Kit).

En los paneles superiores correspondientes a las células cultivadas en condiciones experimentales de hipoxia (O_2 1%) se observan: a la izquierda, los núcleos celulares; en el medio la detección de los aductos formados entre los grupos tiol de las macromoléculas y el pimonidazol y a la derecha la colocalización de los mismo. En los paneles inferiores se observa a las células en condición de normoxia (O_2 21%) con una detección mucho menor de dichos aductos y por ende menor colocalización. Se sembraron 1×10^4 células en cada cubreobjeto. Azul: DAPI. Verde: FITC-MAb. Objetivo 10x. Barra de calibración 50 μ m.

6.4 Las proteínas presentes en las EV aisladas de células RBL 2H3 tienen origen citosólico y endosomal

Con el fin de seguir las pautas de la ISEV para la caracterización de las EV aisladas decidimos realizar la búsqueda de la expresión de proteínas de manera cualitativa.

Se comprobó la presencia de las siguientes proteínas: ALIX, ampliamente utilizado como marcador característico de EV por su participación en la formación de endosomas, Lyn, (perteneciente a la familia Scr) como proteína presente en vesículas y citoplásmica, Flotilina-2, como proteína de andamiaje en endosomas y asociada a balsas lipídicas, Actina, como proteína citoplásmica ubicua relacionada con el citoesqueleto y, finalmente GRP94, como proteína de

exclusión para confirmar el origen endosomal de las EV. La carga de los carriles para el inmunoblot se realizó de la siguiente manera:

- 170 ug de proteína del pellet obtenido de la ultracentrifugación del medio condicionado de las células en condición de normoxia (O₂ al 21%).
- 170 ug de proteína del pellet obtenido de la ultracentrifugación del medio condicionado de las células en condición de hipoxia por 24 h (O₂ al 1%).
- 170 ug de proteínas de lisado celular.
- 170 ug de proteínas del pellet obtenido de la ultracentrifugación del medio condicionado sin tratamiento.

Cada uno se mezcló con 15 ul de Laemmli 2x cargando un total de aproximadamente 30 ul de cada muestra en cada carril.

La figura 9 muestra el resultado. Observamos que la expresión de Alix se encuentra enriquecida en el carril correspondiente a las EV en condición de normoxia e hipoxia en comparación con el lisado celular y que su expresión no se distingue en el carril correspondiente al pellet obtenido de la ultracentrifugación del medio condicionado para la obtención de EV. Este patrón se repite con la Flotilina-2, la expresión en el lisado celular también es mucho menor en comparación con los exosomas. Lyn, por el contrario presenta una expresión como una línea más gruesa en el lisado celular y como dos líneas en los exosomas por su característica policlonal, la expresión es mayor en el lisado celular respecto a los de las EV y GRP 94 solamente se encuentra presente en el lisado celular lo cual descarta un origen diferente al endosomal de las EV aisladas. Ninguna de estas proteínas se encuentra presente en el pellet obtenido de medio de crecimiento.

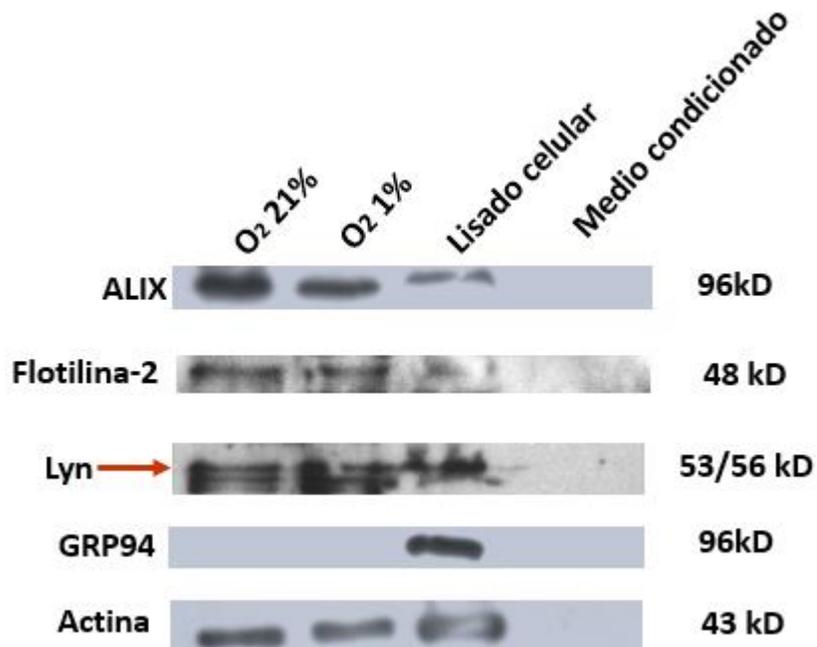


Figura 9 Imagen representativa de un Western Blot de las proteínas expresadas en las EV aisladas de células RBL 2H3.

Mediante ultracentrifugación se obtuvieron los pellet de EV de medio condicionado de células RBL 2H3 tanto en normoxia (O₂ al 21%), en hipoxia (O₂ al 1%), y de medio condicionado sin tratamiento (cuarto carril), de cada uno se cargaron 170 ug de proteína. En el tercer carril se cargó 170 ug correspondiente a lisado celular. Por medio de SDS-PAGE se separaron las proteínas de las EV obtenidas y del lisado celular.

6.5 La condición de hipoxia no modifica la cantidad pero si la morfología de las EV secretadas por las células RBL 2H3

Realizamos el aislamiento de EV por medio de un protocolo de ultracentrifugaciones seriadas. Para evaluar si existían diferencias decidimos evaluar la morfología de las EV aisladas mediante una técnica cualitativa como la TEM. Para ello tomaron 10 µL del pellet de EV obtenido de las ultracentrifugaciones seriadas del medio condicionado de normoxia y de hipoxia, (previamente resuspendidos en PBS), se colocaron en rejillas cubiertas con Formvar Carbon (polivinilo formal estabilizado con una película de carbón evaporado) y se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2%.

Se obtuvieron las siguientes imágenes que se muestran en la Figura 10: las vesículas aisladas de ambas condiciones presentan una morfología heterogénea, predominante es de tipo *cup-shaped* (forma de copa) que se ha descrita en la literatura como característica de las EV y otras vesículas con una estructura más alargada. En la figura 10a se muestra una vista de un campo abierto de las EV aisladas en condiciones de normoxia y en la figura 10b un el acercamiento del campo delimitado en rojo.

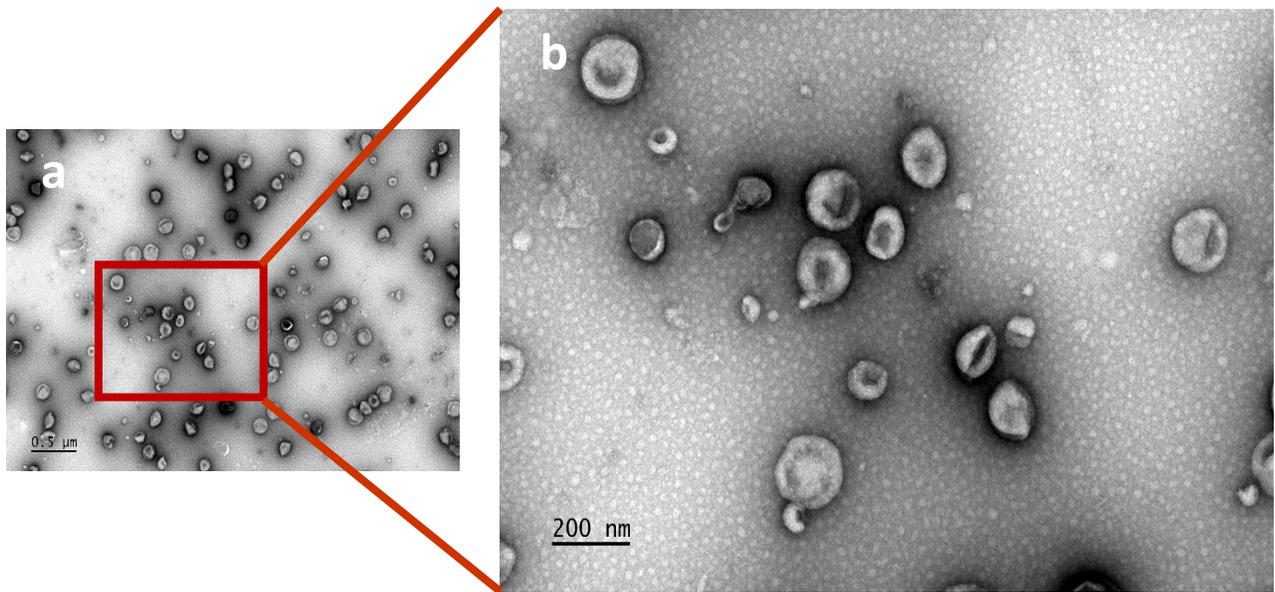


Figura 10 EV aisladas en condiciones de normoxia.

Se muestra una imagen representativa de TEM de las EV obtenidas en condiciones de normoxia. **a.** Imagen de campo abierto en la que se puede observar la presencia de múltiples EV con un tamaño y morfología heterogénea. 20 kV. Barra de calibración 0.5 μm. **b.** Acercamiento de recuadro rojo en **a**, se observa morfología *cup-shaped* característica. 50 Kv. Barra de calibración 200 nm.

La figura 11a corresponde a la imagen de campo abierto correspondiente a las vesículas aisladas en condiciones de hipoxia. En 10b un acercamiento al recuadro rojo. De igual manera presentan una morfología heterogénea así como la forma en

tipo de copa característica. No se observa unos cambios drásticos en la morfología o cantidad de las EV aisladas en normoxia e hipoxia.

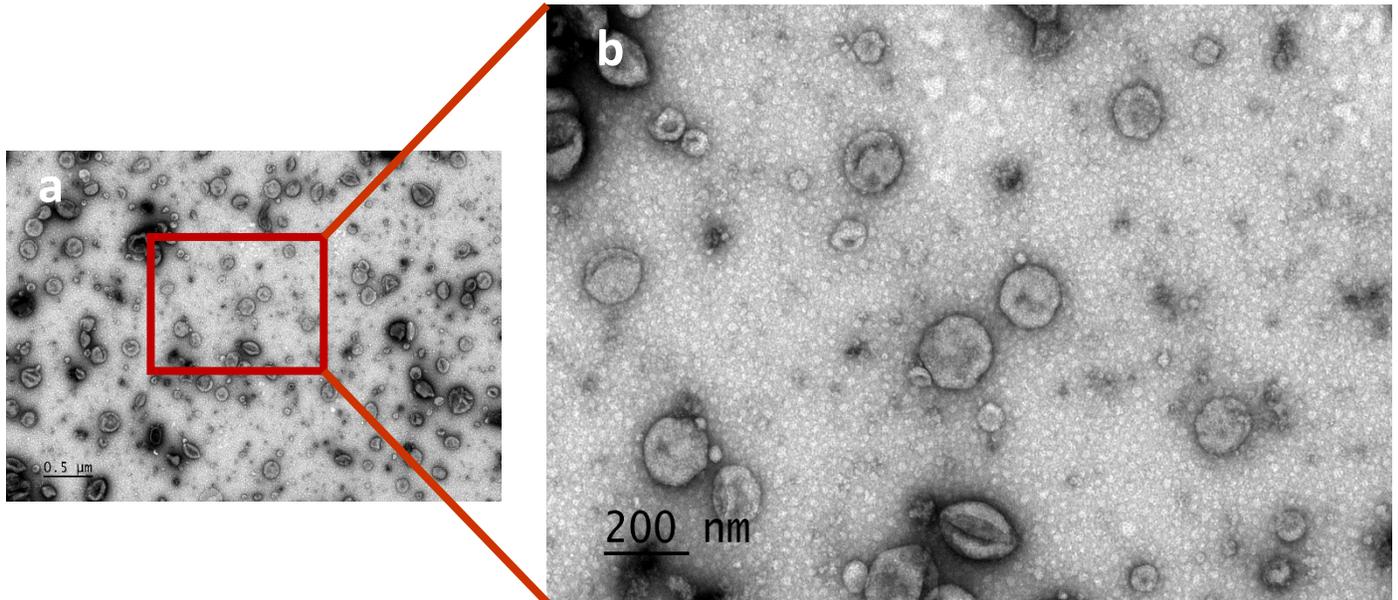


Figura 11 Imágenes de TEM correspondiente las EV aisladas en condiciones de hipoxia.

Se muestra una imagen representativa de las EV en hipoxia; el panel a se observa una marcada diferencia en los tamaños de las EV aisladas, así como zonas electrodensas en donde hay una mayor concentración de EV. Imagen de campo abierto. 20 kV. Barra de calibración 0.5 μm . El panel b es un acercamiento del recuadro rojo en a, aunque se observa la morfología característica de copa, también se puede observar otra morfología más alargada así como EV menor tamaño que el resto. 50 Kv. Barra de calibración 200 μm .

6.6 La morfología de las EV asiladas es predominantemente redonda

Se realizó una cuantificación manual de las vesículas extracelulares de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica. Debido a la morfología heterogénea de ambas poblaciones. De las imágenes de campo abierto se midió

la cantidad y el diámetro (el mayor para las de morfología alargada) de las mismas y se clasificaron en dos subgrupos.

En la figura 12 se observa que la población de vesículas aisladas en condiciones de normoxia presenta dos picos principales entre los tamaños 101-200 nm mientras que en el caso de las de condiciones de normoxia estos picos se encuentran entre el tamaño de 50-150 nanómetros, correspondiendo a un tamaño levemente mayor en condiciones de normoxia.

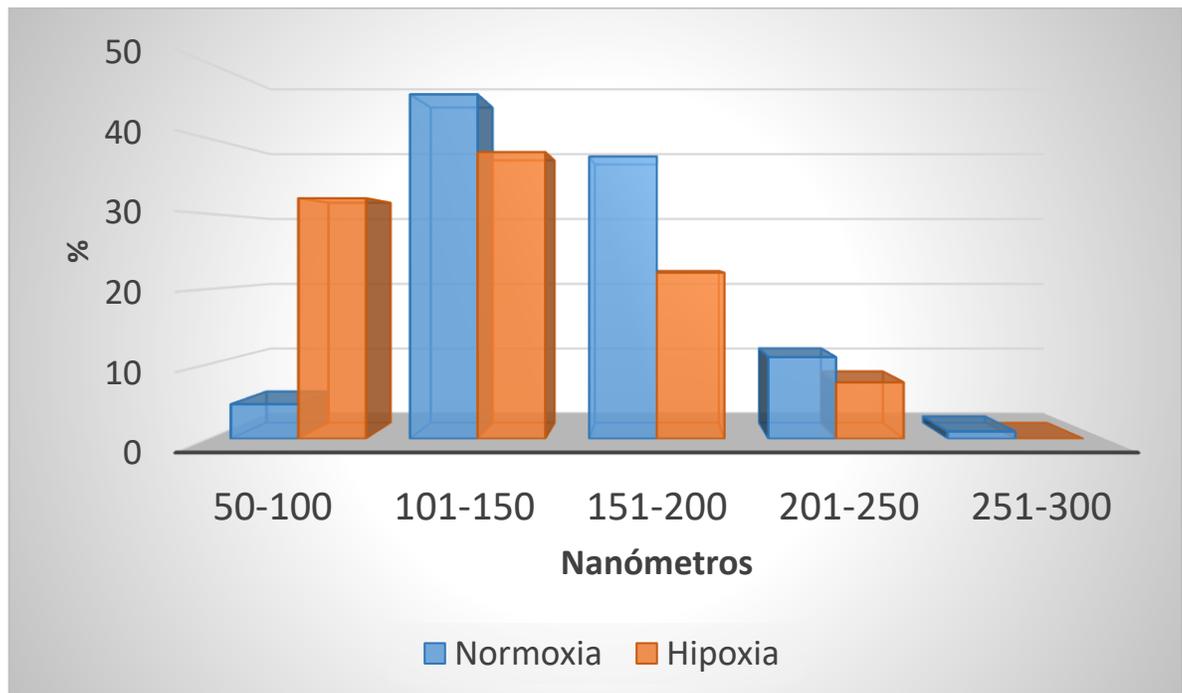


Figura 12 Graficas correspondientes al porcentaje por conteo manual de las EV aisladas.

Se observa en las barras azules las EV aisladas en condiciones de normoxia (n=412), con un pico mayor en la el tamaño correspondiente a 150 nm. En naranja las aisladas en condiciones de hipoxia (n=212) cuyo mayor pico se observa en el tamaño más pequeño correspondiente a 50-100 nm. Conteo realizado a partir de 2 imágenes a campo abierto para cada población.

También se determinó de manera porcentual la morfología predominante en ambos grupos. En figura 13a se observa que en condiciones de normoxia existe porcentaje muy similar entre ambas formas y en el caso de hipoxia (figura 13b) la morfología predominante es redondeada.

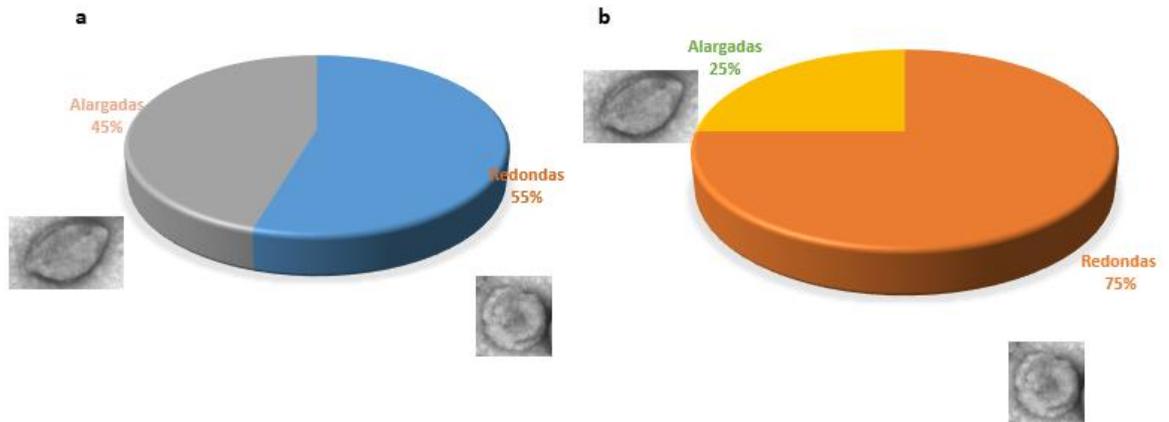


Figura 13 Porcentaje de vesículas aisladas en condiciones de normoxia e hipoxia.

En la gráfica **a** correspondiente a las EV aisladas en condición de normoxia se observa un predominio muy similar entre la morfología alargada y la redondeada ($n=412$), lo que contrasta con las EV aisladas en condición de hipoxia, donde la morfología predominante es la redondeada con 75% ($n=212$). En gris y amarillo vesículas alargadas. En azul y naranja vesículas redondeadas. Porcentajes obtenidos del conteo de 2 imágenes en campo abierto para cada grupo experimental.

De acuerdo a estos hallazgos se puede observar que las microvesículas aisladas de la condición de hipoxia es predominantemente redondeada, en comparación con las de normoxia, a la vez presentan una proporción mayor de vesículas de menor tamaño, lo que puede observarse a simple vista en las imágenes obtenidas por TEM. Al momento se desconoce si esta variación en su morfología podría tener alguna implicación en su función biológica; sin embargo, esta variabilidad morfológica sugiere la existencia de subpoblaciones diferentes que podrían tener una función y bioquímica diferente.

6.7 Las EV liberadas presentan un tamaño heterogéneo.

Se ha reportado que, al ser analizadas mediante NTA, la concentración total de nanopartículas liberadas por algunos tipos celulares tales como algunas líneas celulares de cáncer de seno (King, H. et al., 2012) y las células del túbulo proximal del riñón (W. Zhang et al., 2017) aumentan hasta 1.94 veces y 1.5

veces respectivamente (en comparación con su control en normoxia) cuando estas son sometidas a condiciones de hipoxia.

Para analizar si la cantidad de EV secretadas por las MC en condiciones de hipoxia presentaba un aumento se realizó un análisis de cuantitativo de rastreo de nanopartículas, el cual a través de un rayo láser logra la detección de las partículas suspendidas en líquido del movimiento browniano de cada una de manera individual (Fig. 13). Para este procedimiento, de los pellet obtenidos por ultracentrifugación (del medio condicionado de las células en condición de normoxia e hipoxia) y resuspendidos en 50 μL de PBS, se tomó 1 μL y realizó una dilución 1:800 de cada muestra en PBS 1x.

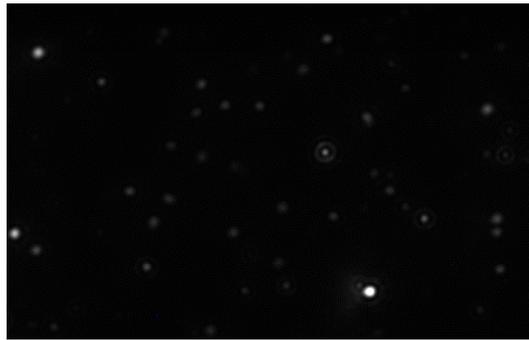


Figura 14 Imagen representativa de las partículas durante el NTA.

En la imagen se observan las partículas con movimiento browniano flotando en el medio líquido de la cámara.

Al evaluar las EV liberadas en condiciones de normoxia de tres muestras se observa que la población de las vesículas presenta poblaciones con tamaños heterogéneos.

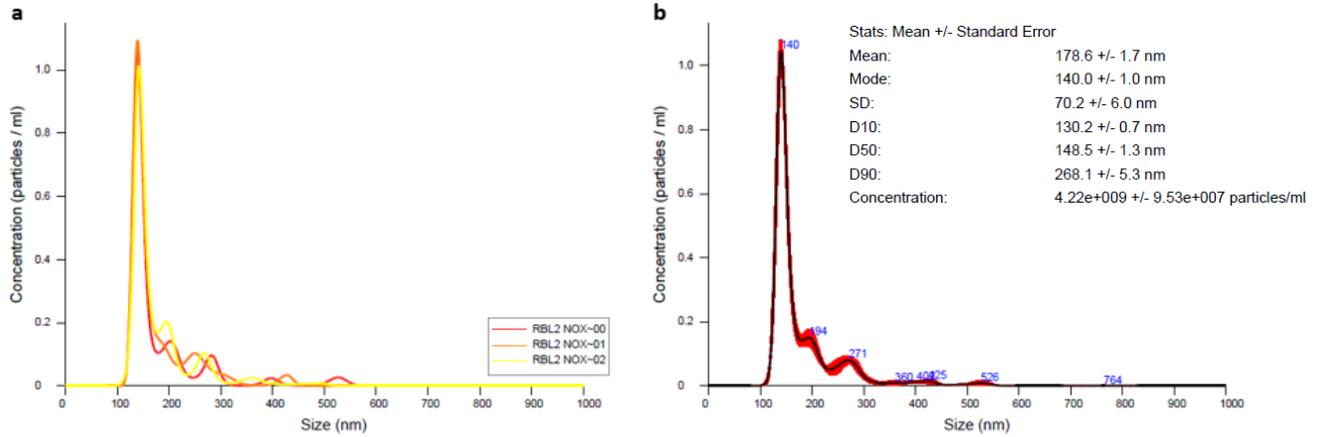


Figura 15 Gráfica representativa de la distribución del tamaño de las partículas analizadas de una muestra mediante NTA en condiciones de normoxia.

a El software genera un gráfico de la distribución de las EV en base al análisis partícula por partícula de tres diferentes mediciones. Cada color representa una medición. **b** Promedio de los tamaños analizados y obtenidos en términos de concentración de números absolutos.

En la gráfica 15a se observa el trazo de tres muestras analizadas de manera independiente. Se puede observar que estas tres líneas siguen la misma trayectoria lo que quiere decir que los tamaños de las tres muestras son muy similares; este fenómeno se observó en las mediciones de todas las muestras. La gráfica 15b muestra el promedio de estas tres mediciones y se observa que las EV tienen un tamaño desde 140 hasta 764 nm, con un pico mayor presentado a los 140 nm de diámetro y otro de dos de menor tamaño en 194 y 271 nm. Estos rangos corresponden a los reportados en la literatura con el tamaño de exosomas y microvesículas.

Respecto a los resultados obtenidos del análisis de las EV obtenidas de la condición de hipoxia en la figura 16a se observa que la distribución del diámetro de las partículas va de 70 a 509 nm con un pico máximo en 137 nm y dos de menor tamaño en 207 y 396 nanómetros, el tamaño de las partículas fue consistente en todas las muestras. (Fig 15b).

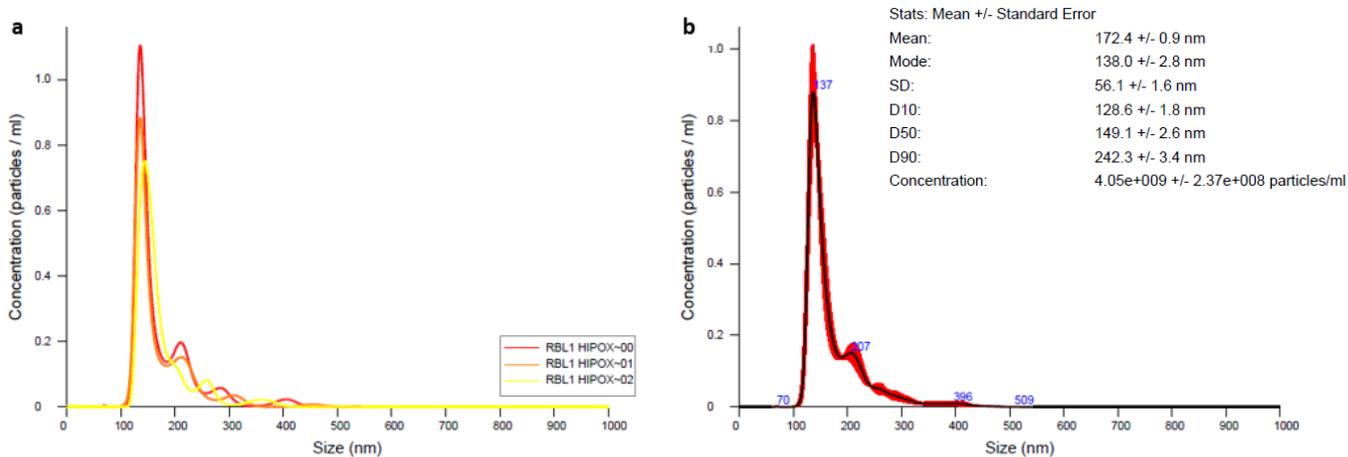


Figura 16 a Gráfica representativa de la distribución del tamaño de las partículas analizadas de una muestra mediante NTA en condiciones de hipoxia. b Promedio de los tamaños analizados en términos de concentración de números absolutos.

Estos resultados contrastan con los obtenidos mediante el conteo óptico de la EV ya que no se observa un pico correspondiente a una población de menor tamaño que 140 nm.

En cuanto a la concentración de partículas obtenidas (Fig. 17) una vez que se normalizadas, en condiciones de normoxia se obtuvo un promedio de 2.60×10^{12} partículas/mL y en condiciones de hipoxia se obtuvieron 2.20×10^{12} partículas/mL.

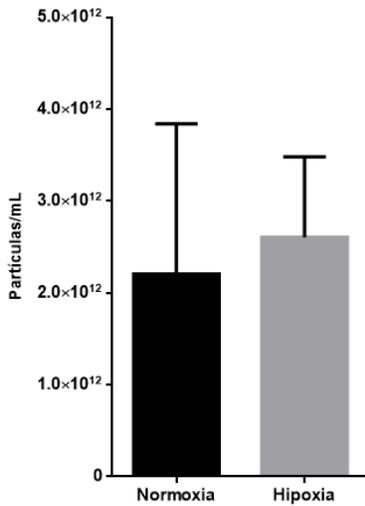


Figura 17 Concentración de EV obtenidas en condiciones de normoxia e hipoxia mediante NTA. Las células RBL 2H3 liberan una cantidad de EV ligeramente mayor en condiciones de 24 h de hipoxia respecto a normoxia, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa. n=3. P=0.7. Prueba t de Student.

De acuerdo a estos resultados el diámetro de las EV liberadas por las células RBL 2H3 coinciden en el pico máximo con la cuantificación manual en las que a mayoría de las vesículas se encuentran en un diámetro entre 150 nanómetros. Sin embargo contrastan con el conteo óptico ya que no se logra detectar a las poblaciones de diámetros menores. Esto pudiera deberse a una falta de sensibilidad del equipo para identificar partículas de menor tamaño. A la vez se observa que la cantidad total de vesículas aisladas en hipoxia no aumenta de manera estadísticamente significativa con respecto a la normoxia.

7. Discusión

Las EV son un campo relativamente nuevo en el cual aún no se cuentan con lineamientos plenamente establecidos para su estudio y cuyos protocolos de estudio se modifican continuamente. En relación a lo que actualmente se conoce, uno de los procesos de comunicación intercelular en los que las EV tienen una gran participación son aquellos que realizan las células de la respuesta inmune. La participación de las MC en esta respuesta cobra relevancia por su papel secretor ampliamente conocido y descrito en procesos alérgicos e inflamatorios en los que, como condición característica, la hipoxia se presenta de manera frecuente. En este proyecto se estudió el efecto de la hipoxia como condición moduladora para la liberación de EV en un modelo de línea celular de MC.

7.1 Aportaciones al área de estudio de las EV a partir de la secretadas por la línea celular RBL 2H3

Las MC son células secretoras por excelencia. La regulación de su secreción por medio de la desgranulación de gránulos preformados que contienen proteoglicanos, aminas biogénicas, enzimas lisosomales, citocinas y factores de crecimiento ha sido ampliamente estudiada. Se ha demostrado que estos gránulos preformados se liberan cuando las células son activadas (Vukman et al., 2017) lo que desencadena en la mejora de la respuesta inmune. Sin embargo, el proceso de secreción mediante la liberación de EV, sus posibles funciones, su implicación en procesos patológicos y los mecanismos que subyacen a este proceso han sido mucho menos explorados.

En este proyecto se obtuvieron cultivos viables y homogéneos de la línea celular RBL 2H3, cuyas características funcionales son muy similares a las MC (Passante et al., 2009) y se cultivaron en condiciones de hipoxia, siendo la primera vez que se estudia la hipoxia como posible mecanismo regulador de la secreción de EV en estas células.

7.2 Consideraciones técnicas para el estudio de las EV

El estudio de las vesículas extracelulares y su función en la comunicación intercelular es un campo reciente, por lo que todavía se encuentra en un periodo de unificación de criterios para su estudio y las pautas existentes son dinámicas. Para el aislamiento de las EV en este proyecto se utilizó una de las técnicas más usada (Gardiner et al., 2016): la ultracentrifugación, un proceso de centrifugación optimizado para generar fuerzas centrífugas excepcionalmente altas de hasta $1000\ 000 \times g$. Esta técnica se basa en la sedimentación de partículas en suspensión presentes en una mezcla heterogénea de acuerdo a su densidad, tamaño y forma. Dependiendo de la fuerza de centrifugación las partículas en suspensión se pueden separar secuencialmente (Li, P. et al., 2017).

Existen otros procedimientos descritos y utilizados en la literatura como la utilización de kits comerciales que, aunque en un principio permiten mayor rendimiento en la obtención de EV, la pureza de sus preparaciones es menor en comparación de la obtenida por ultracentrifugación (Tang et al., 2017). Además ofrece otras ventajas como menor costo (si se cuenta con el equipo) y menor riesgo de contaminación al no requerir reactivos para su separación, así como la posibilidad de procesar un mayor volumen de muestra (Li et al., 2017), por lo que emerge como la técnica de elección para la posible utilización de la población de EV obtenidas, en estudios de cargamento y función.

De hecho nuestros resultados de MET muestran una población bien definida de EV y poca inclusión de contaminantes, y un excelente rendimiento para su obtención pues se requiere una cantidad relativamente pequeña de medio condicionado inicial (30 mL) para su aislamiento.

7.3 Aportaciones a la caracterización de EV secretadas por la línea celular RBL 2H3

La International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) sugiere que las investigaciones en esta materia se dividan en tres categorías principales: características de las EV aisladas (cantidad, tamaño, cargamento, proteómica), la investigación diagnóstica de la función de las EV en alguna patología y la

investigación enfocada en la preparación y uso de las EV en ensayos clínicos (Witwer et al., 2013). Los resultados obtenidos en esta Tesis aportan datos novedosos a la primera categoría, como la presencia de proteínas específicas en la preparación y el efecto de un estímulo como la hipoxia sobre la secreción y morfología de las EV obtenidas.

Existen pocos estudios previos que hayan abordado la caracterización de la secreción de EV en la línea celular RBL 2H3. Los primeros estudios de Laulagnier y colaboradores (2004) describen en las EV secretadas por esta línea celular, la dinámica y la organización de la membrana de los exosomas aislados, la composición lipídica y la pérdida de la asimetría de lípidos que presenta su membrana. Posteriormente describieron que, tras la estimulación mediante ionóforos de calcio y mediante el uso de lípidos fluorescentes, los exosomas liberados por las células RBL 2H3 pueden clasificarse en dos subpoblaciones principales de acuerdo al contenido de lípidos y proteínas en su membrana: una enriquecida en lípidos provenientes del aparato de Golgi y tetraspaninas; y la otra enriquecida en lípidos provenientes de gránulos preformados y proteínas del MHC-II (Laulagnier et al., 2005).

Los mismos autores realizaron un estudio exhaustivo del transporte transcelular de fosfolipasas y prostaglandinas activables mediado por vesículas liberadas por esta línea celular; algunas funciones de estas y otros tipos celulares se regulan mediante la circulación de lípidos bioactivos y por proteínas contenidas en el cargamento de los exosomas liberados, y por su interacción con enzimas como las fosfolipasas A2 y D (Subra et al., 2010).

En este trabajo evaluamos la secreción de EV que se da en estas células de manera constitutiva, es decir en ausencia de activación por medio de ionóforos de calcio. Esto es relevante puesto que se ha descrito previamente que la respuesta secretora de las células cebadas difiere en condiciones constitutivas o de activación e incluso dependiente del tipo de activación. Así por ejemplo cuando las MC son activadas mediante el receptor de alta afinidad para IgE (Fc

ϵ RI) secretan factores como aminas biogénicas, prostaglandinas, leucotrienos entre otros y cuando son activadas por patrones moleculares asociados a patógeno (mediante los receptores tipo Toll) secretan citocinas que activan al sistema inmune y reclutan a otras células (García et al., 2011).

Además del Fc ϵ RI, inmunoglobulinas, anafilotoxinas, hormonas y neuropéptidos también pueden desencadenar la secreción en las MC de varios mediadores como citocinas y moléculas preformadas almacenadas en gránulos secretores y otros sintetizados *de novo* horas después de la estimulación, como el factor de crecimiento endotelial vascular (Theoharides et al., 2012).

Esto sugiere que sería relevante realizar un estudio comparativo entre la secreción de EV en condiciones basales y en condiciones de activación de las células ya que el cargamento y por ende la función de las EV podría variar entre las condiciones.

En este trabajo se describe por primera vez, la expresión enriquecida en la fracción de EV de las proteínas Alix, Lyn y Flotilina-2, lo que se suma a la caracterización previa de CD63, CD81 y MHC-II descrita por Laulagnier y colaboradores. Esto es importante porque, junto al trabajo de otros investigadores, se va obteniendo un catálogo de marcadores protéicos que pudieran ser utilizados posteriormente para un posible aislamiento de poblaciones

7.4 Efecto de la hipoxia sobre la secreción de poblaciones de EV en la línea celular RBL 2H3.

Como se mencionó anteriormente, las MC en condiciones fisiológicas y sobre todo patológicas pueden encontrarse en estado de hipoxia. Se ha explorado previamente a la hipoxia como estímulo para la secreción en células cebadas en cultivo; y, por ejemplo, aunque la hipoxia no parece incrementar la

desgranulación por sí misma (medida por la liberación de triptasa) se ha descrito que la hipoxia *per se* induce la secreción de IL-6 de manera pronunciada (entre otras citocinas) (Gulliksson et al., 2010). Se ha descrito además que las MC son capaces de estabilizar HIF-1 α de manera significativa después de 24 h de hipoxia y que presentan otros cambios en la función de desgranulación como una disminución en la liberación de TNF- α y una elevación en la secreción de histamina. A nivel transcripcional se sabe que existe una regulación a la baja de al menos 13 genes (Möllerherm et al., 2017). También se ha descrito que la secreción de VEGF en las MC es inducida por Cloruro de cobalto (CoCl₂), un estímulo químico que mimetiza un estado de hipoxia, a través de un mecanismo que es promovido por la activación de la cinasa Fyn, vía un proceso dependiente de la producción de radicales libres (García et. al., 2011). En este trabajo los cultivos de RBL 2H3 fueron sometidos a hipoxia de manera artificial en una cámara de desplazamiento de gas con un *set-point* de 1%. Se observó a las 24 h que la viabilidad no se encontraba disminuida, lo que concuerda con lo reportado por Gullikson y colaboradores (2010).

Estudios previos reportan que la liberación de vesículas aumenta hasta 1.5 veces en las células del túbulo proximal renal particularmente a las 12 y 24 h de exposición a hipoxia. En estos experimentos el mayor incremento en la liberación de vesículas se observa a las concentraciones de oxígeno de 0.1, 1 y 2% en comparación con 4 y 8% que no inducen mayor producción de exosomas (W. Zhang et al., 2017). En las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB 231 expuestas a hipoxia moderada (1% O₂) por 48 h se encontró un aumento en la concentración de la fracción exosomal de 1.4 y 1.32 veces respectivamente respecto a la normoxia medida mediante NTA.

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que el estímulo de hipoxia por 24 h no es suficiente para inducir una mayor liberación de EV por parte de estas células. Esto podría deberse a la gran capacidad de adaptación que

presentan ante ambientes hostiles. Una alternativa a estos resultados puede ser aumentar el tiempo de exposición a hipoxia, puesto que se conoce que las MC no presentan disminución en la viabilidad cuando se exponen a hipoxia por periodos de hasta 72 horas; además se podría observar si el cambio en el tamaño y morfología de las EV entre ambas condiciones es mayor.

La secreción constitutiva de exosomas por MC derivadas de médula ósea fue reportada por Skokos y colaboradores (2001). Estos autores describen la población aislada como vesículas redondeadas con un diámetro promedio de 60-100 nm; tanto en condiciones normales como de hipoxia. En nuestros resultados existe una diferencia ya que la mayoría de las vesículas aisladas presentan un tamaño aproximado de 140 nm. Esto podría deberse a que se trata de una línea celular de MC con un origen distinto y a diferencias en el método de aislamiento de las EV. En realidad, la relevancia de estas observaciones se desconoce; las evidencias previas asocian el tamaño de las vesículas con cargamentos o funciones específicas (como las diferencias entre exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos), pero se desconoce si diferencias más discretas en el tamaño de las vesículas como los observados entre ambas condiciones experimentales de este trabajo se asocien también a diferencias en sus funciones.

Nuestro estudio demuestra también variaciones en la morfología de las poblaciones obtenidas a partir de células en condiciones de normoxia e hipoxia. De igual manera se desconoce por falta de evidencias experimentales si un cambio en la forma de las EV podría llegar a tener un impacto en la función de estas. En este sentido Zabeo y colaboradores (2017) encontraron que EV derivados del tipo celular HMC-1 (otra línea celular de MC) presentan morfologías heterogéneas, y asociaron esta heterogeneidad a proteínas asociadas a la membrana o a su composición lipídica por sí misma. Si esto fuera cierto, sería relevante para la utilización de marcadores de membrana que

permitirían aislar las diferentes poblaciones y así poder evaluar su cargamento y funcionalidad.

7.5 El estudio de las EV secretadas por la línea celular RBL 2H3 en condiciones de normoxia e hipoxia: nuevas líneas de investigación.

7.5.1 Evaluación del cargamento

Existen reportes que demuestran que la hipoxia induce cambios en el cargamento y por lo tanto en la función de las EV en varios tipos celulares. Entre otros ejemplos: la línea celular tumoral de carcinoma escamoso A431 secreta exosomas con un incremento de factores angiogénicos, lo que les permite a estas adaptarse a su ambiente hipóxico y facilitan la metástasis al promover la angiogénesis (Park et al., 2010). En células del túbulo renal proximal el cocultivo con exosomas aislados de células en hipoxia condiciona un efecto citoprotector (W. Zhang et al., 2017). Los exosomas derivados de células de glioblastoma multiforme (un tipo de tumor cerebral) cultivadas en hipoxia son potentes inductores de la angiogénesis *ex vivo* e *in vitro* mediante la modulación fenotípica de las células endoteliales (Kucharzewska et al., 2013)

Podemos especular que, aunque la hipoxia no induce un cambio en la cantidad de EV *per se* el cambio podría presentarse en el cargamento. Esto podría incluir contenido proteínas y algunos tipos de RNA que conlleven a una mayor adaptabilidad a su nicho inmunológico. Sería relevante llevar a cabo un estudio general de la evaluación del cargamento vesicular mediante microarreglos, o, en caso de tener genes candidatos involucrados en funciones específicas, la determinación particular de los mismos

7.5.2 Evaluación de la función

Una de las perspectivas más interesantes en el área de estudio de las vesículas extracelulares es el análisis de su función. Se han reportado protocolos experimentales en los que al inyectar exosomas derivados de células dendríticas de manera intradérmica inducen una potente respuesta

inmune que retrasó el crecimiento de tumores como mastocitoma y adenocarcinoma o en una erradicación completa del mismo en modelos animales (Zitvogel et al., 1998).

El papel de las células cebadas en patologías como por ejemplo el cáncer no está bien dilucidado, sin embargo Jiménez-Andrade y colaboradores (2013) encontraron que la activación de las MC por IgE, en ausencia de antígeno, activa a la vez vías de señalización como PI3K/Akt y la síntesis de mediadores inflamatorios que podrían inducir a supervivencia, proliferación celular, angiogénesis y crecimiento tumoral de melanocitos (en tumores como el melanoma) y en las MC del microambiente tumoral.

La cinasa Fyn presente en las MC es la encargada de controlar el crecimiento tumoral de melanomas a través de la regulación positiva de la producción de factores angiogénicos como el VEGF.

Sería interesante evaluar los efectos de las poblaciones de EV obtenidas en diferentes condiciones en el tipo celular igual al de origen, o bien evaluar si las EV tienen la capacidad de inducir nuevas funciones o adaptaciones al microambiente en otras células distintas al de origen.

8. Resumen de resultados

- 1) La línea celular RBL 2H3 secreta vesículas extracelulares de entre 50 a 140 nm de manera constitutiva que contienen Alix, Flotilina-2, Lyn y Actina.
- 2) La hipoxia durante 24 h no estimula una mayor liberación de vesículas extracelulares en esta línea celular
- 3) La hipoxia condiciona un cambio hacia una morfología predominantemente redondeada y a una disminución en el tamaño de las vesículas liberadas.

9. Conclusión

Las células RBL 2H3 secretan vesículas extracelulares de manera constitutiva; la hipoxia por periodos de 24 h no propician un aumento significativo en la liberación de las mismas pero si una morfología predominantemente redondeada y una disminución en su tamaño.

10. Perspectivas

- 10.1** Optimizar los métodos de aislamiento de vesículas extracelulares.
- 10.2** Caracterizar el cargamento de las vesículas secretadas en ambas condiciones, específicamente los miRNA que pudieran estar involucrados en la activación o represión de vías de señalización que regulen la adaptación a hipoxia.
- 10.3** Diseñar protocolos experimentales con variaciones en el tiempo de hipoxia así como llevar el estudio de EV a otros tipos celulares.
- 10.4** Diseñar protocolos experimentales que permitan la evaluación de la función exosomas en las células de origen y otros tipos celulares.

11. Referencias.

- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Biasutto, L., Chiechi, A., Couch, R., Liotta, L. A., & Espina, V. (2013). Retinal pigment epithelium (RPE) exosomes contain signaling phosphoproteins affected by oxidative stress. *Experimental Cell Research*, **319**(13), 2113–2123. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.005>
- Blank, U., & Varin-Blank, N. (2004). La lignée mastocytaire RBL: Modèle expérimental in vitro et application en pharmacologie clinique. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, **44**(1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(03\)00312-5](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(03)00312-5)
- Carroll-Portillo, A., Surviladze, Z., Cambi, A., Lidke, D. S., & Wilson, B. S. (2012). Mast cell synapses and exosomes: Membrane contacts for information exchange. *Frontiers in Immunology*, **3**(46), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00046>
- Cicero, A. Lo, Delevoye, C., Gilles-Marsens, F., Loew, D., Dingli, F., Guéré, C., Raposo, G. (2015). Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nature Communications*, **6**(7506), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms8506>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, **126**(24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- De Gassart, A., Ge, C., & Fe, B. (2003). Lipid raft – associated protein sorting in exosomes. *Proteins*, **102**(13), 4336–4344. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0871>. Supported

- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, **12**(5), 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>
- Eldh, M., Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Olsson, B., Jernås, M., & Lötvall, J. (2010). Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS ONE*, **5**(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015353>
- Faruk Aykan, N. (2012). Intercellular Communication. In S. Najman (Ed.), *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology* (pp. 361–376). Rijeka, Croatia: InTech. <https://doi.org/10.5772/47931>
- Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, **5**(32945), 1–6. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>
- Gulliksson, M., Carvalho, R. F. S., Ullerås, E., & Nilsson, G. (2010). Mast cell survival and mediator secretion in response to hypoxia. *PLoS ONE*, **5**(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012360>
- Ha, D., Yang, N., & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **6**(4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>
- Ivan, M., & Kaelin, W. G. (2017). The EGLN-HIF O₂-Sensing System: Multiple Inputs and Feedbacks. *Molecular Cell*, **66**(6), 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.002>
- Jiang, L., Vader, P., & Schiffelers, R. M. (2017). Extracellular vesicles for nucleic acid delivery: Progress and prospects for safe RNA-based gene therapy. *Gene Therapy*, **24**(3), 157–166. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.8>
- Jiménez-Andrade, G. Y., Ibarra-Sánchez, A., González, D., Lamas, M., & González-

- Espinosa, C. (2013). Immunoglobulin e induces VEGF production in mast cells and potentiates their pro-tumorigenic actions through a Fyn kinase-dependent mechanism. *Journal of Hematology and Oncology*, **6**(56), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-56>
- Katsman, D., Stackpole, E. J., Domin, D. R., & Farber, D. B. (2012). Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Induce Gene Expression Changes in Müller Cells of the Retina. *PLoS ONE*, **7**(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050417>
- King, H. W., Michael, M. Z., & Gleadle, J. M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*, **12**(421), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-421>
- Klingeborn, M., Dismuke, W. M., Bowes Rickman, C., & Stamer, W. D. (2017). Roles of exosomes in the normal and diseased eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, **59**, 158–177. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.04.004>
- Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., ... Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(18), 7312–7317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110>
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., ... Record, M. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochemical Journal*, **380**(1), 161–171. <https://doi.org/10.1042/bj20031594>
- Laulagnier, K., Vincent-Schneider, H., Hamdi, S., Subra, C., Lankar, D., & Record, M. (2005). Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **35**(2), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.05.010>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome

isolation techniques. *Theranostics*, **7**(3), 789–804.
<https://doi.org/10.7150/thno.18133>

Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, **3**(26913), 1–6.
<https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>

Marzec, M., Eletto, D., & Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1823**(3), 774–787.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.013>

Meister, M., & Tikkanen, R. (2014). Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view. *Membranes*, **4**(3), 356–371.
<https://doi.org/10.3390/membranes4030356>

Mercier, V., Laporte, M. H., Destaing, O., Blot, B., Blouin, C. M., Pernet-Gallay, K., ... Sadoul, R. (2016). ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis and signaling. *Scientific Reports*, **6**(26986), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/srep26986>

Möllerherm, H., Branitzki-Heinemann, K., Brogden, G., Elamin, A. A., Oehlmann, W., Fuhrmann, H., ... von Köckritz-Blickwede, M. (2017). Hypoxia modulates the response of mast cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Frontiers in Immunology*, **8**(541), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00541>

Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, **3**(24641), 1–14.
<https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>

Park, J. E., Tan, H. Sen, Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., Sze, S. K. (2010). Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, **9**(6), 1085–1099. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900381->

- Passante, E., & Frankish, N. (2009). The RBL-2H3 cell line: Its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflammation Research*, **58**(11), 737–745. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0074-y>
- Qin, J., & Xu, Q. (2014). Functions and applications of exosomes. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, **71**(4), 537–543.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Rockefeller University Press J. Cell Biol*, **200**(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Rashed, M. H., Bayraktar, E., Helal, G. K., Abd-Allah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., & Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms18030538>
- Skokos, D., Le Panse, S., Villa, I., Rousselle, J.-C., Peronet, R., David, B., ... Mecheri, S. (2001). Mast Cell-Dependent B and T Lymphocyte Activation Is Mediated by the Secretion of Immunologically Active Exosomes. *The Journal of Immunology*, **166**(2), 868–876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.868>
- Sormendi, S., & Wielockx, B. (2016). HIF-pathway proteins: central regulators of tumor immunology. *Translational Cancer Research*, **5**(S7), S1503–S1508. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.12.30>
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., ... Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, **51**(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>
- Tang, Y. T., Huang, Y. Y., Zheng, L., Qin, S. H., Xu, X. P., An, T. X., ... Wang, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine*, **40**(3), 834–844. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>

- Taylor, C. T., & Colgan, S. P. (2017). Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nature Reviews Immunology*, **17**(12), 774–785. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.103>
- Theoharides, T. C., Alysandratos, K. D., Angelidou, A., Delivanis, D. A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Kalogeromitros, D. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, **1822**(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.014>
- Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*, **3**(15), 1–8. <https://doi.org/10.3410/B3-15>
- Trioulier, Y., Torch, S., Blot, B., Cristina, N., Chatellard-Causse, C., Verna, J. M., & Sadoul, R. (2004). Alix, a Protein Regulating Endosomal Trafficking, Is Involved in Neuronal Death. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(3), 2046–2052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309243200>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, **9**(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Vingtdeux, V., Sergeant, N., & Buée, L. (2012). Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology*, **3**(229), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00229>
- Vukman, K. V., Försönits, A., Oszvald, Á., Tóth, E., & Buzás, E. I. (2017). Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **67**, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.02.002>
- Weidemann, A., & Johnson, R. S. (2008). Biology of HIF-1 α . *Cell Death and Differentiation*, **15**(4), 621–627. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.12>
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods

in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, **2**(20360), 1–25. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>

Xiao, W., Nishimoto, H., Hong, H., Kitaura, J., Nunomura, S., Maeda-Yamamoto, M., Kawakami, T. (2005). Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεRI. *The Journal of Immunology*, **175**(10), 6885–6892. <https://doi.org/10.1093/jimmunol/175/10/6885> [pii]

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, **4**(27066), 1–60. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*, **65**(8), 783–797. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>

Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, **13**(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>

Zhang, W., Zhou, X., Yao, Q., Liu, Y., Zhang, H., & Dong, Z. (2017). HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, **313**(4), F906–F913. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00178.2017>

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, **4**(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>

Apéndice

Preparación de medios y soluciones

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con FBS al 10%.

- 1) En un matraz de Erlenmeyer colocar 950 mL de agua milliQ.
- 2) Agregar 13.6 g de medio DMEM (Sigma-Aldrich) y agitar utilizando un magneto.
- 3) Añadir 3.7 g de bicarbonato de sodio, 45 mL de FBS y 10 mL de Antibiótico-Antimicótico, 12 mL de Pen-Strep, 10 mL de Piruvato de sodio y 10 mL de MEM NEAA.
- 4) Filtrar al vacío utilizando un filtro de 2 μ m en campana de flujo laminar.
Almacenar a 4°C.

DMEM con suero depletado de exosomas (medio condicionado para la producción de exosomas).

1. Se prepara de la misma manera que DMEM enriquecido pero se sustituye en FBS por FBS depletado de exosomas (Gibco) al 10%.
Almacenar a 4°C.

Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) 1x

- 1) En 800 mL de agua destilada mezclar 150 mM de cloruro de sodio, 1% NP-40, 0.5% desoxicalato de sodio, 0.1% de SDS, 50 mM de Tris, ajustar el pH a 4.
- 2) Al momento de su utilización agregar (para 1 mL de RIPA) 5 μ L de PMSF, 2 μ L de pepstatina y 2 μ L de β -glicerofosfato.

Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x

- 1) En un matraz de Erlenmeyer colocar 800 ml de agua destilada.
- 2) Agregar 8 g de NaCl, 200 mg de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 240 mgKH₂PO₄.
- 3) Ajustar la solución al pH deseado (7.4)
- 4) Agregar agua destilada hasta un columna de 1 L.