

Facultad de Medicina Departamento de Ciencias Biomédicas

## "Transferencia de vectores vesiculares gliales como mecanismo comunicación en el sistema nervioso central"

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

## **BRUNO A. CISTERNA IRRAZABAL**

Realizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Neurobiología, Laboratorio de Neurociencias y bilogía glial.

> Director de tesis: Felipe Court Goldsmith Supervisor Programa: Pablo Olivero Rebolledo Fecha: Diciembre del 2010

## INDICE

RESUMEN						
1.	INTRO	DUCCIÓN5				
	1.1.	Comunicación intercelular en el sistema nervioso5				
		1.1.1. Comunicación neurona-neurona5				
		1.1.2. Comunicaión bidireccional entre neuronales y células gliales9				
	1.2.	Mecanismos no convencionales de comunicación intercelular11				
		1.2.1. Mecanismos de comunicación por contacto célula-célula11				
		1.2.1.1. Nanotubos11				
		1.2.2. Mecanismos de comunicación mediados por vectores vesiculares				
		1.2.2.1. Microvesículas15				
		1.2.2.2. Exosomas16				
2.	HIPOT	ESIS19				
3.	OBJET	IVO GENERAL19				
4.	OBJET	IVOS ESPECIFICOS20				
5.	MATE	RIALES Y MÉTODOS21				
	5.1.	Cultivo de células TC62021				
	5.2.	Transfección de células TC620 con el plásmido CD63-pEGFP-N321				
	5.3.	Transfección estable TC620-CD63-EGFP22				
	5.4.	Purificación de vesículas secretadas por células de la transfección estable TC22				
	5.5.	Fluorometría del S3000 de las células de la transfección estable23				

	5.6.	Internalización de vesículas fluorescentes en células TC62023
	5.7.	Cuantificación de la internalización de vesículas fluorescentes23
	5.8.	Análisis estadístico24
6.	RESUL	TADOS25
	6.1.	Generación de la transfección estable TC620-CD63-EGFP25
	6.2.	Cuantificación de la fluorescencia de vesículas secretadas por las células da la transfección estable28
	6.3.	Vesículas CD63-EGFP <sup>+</sup> son internalizados por células TC62030
7.	DISCU	CIONES

8.	REFERENCIAS	34
----	-------------	----

#### RESUMEN

La constante e intensa comunicación bidireccional y la estrecha interacción física que existe entre las neuronas y las células gliales han generado una interacción dinámica capaz influenciar y regular el desarrollo, función y mantenimiento en equilibrio entre ambos tipos celulares. Estudios recientes, han descrito en distintos tipos celulares la existencia de un mecanismo de comunicación intercelular mediado por la transferencia de vesículas que pueden contener proteínas, mRNA, microRNA, mtDNA, priones y virus. En el sistema nervioso, se ha postulado que la transferencia de vesículas podría participar en procesos fisiológicos tales como la inhibición de la mielinización y la modulación del desarrollo, y en procesos patológicos que involucran la inducción de fenotipos cancerígenos y la transmisión de virus y priones.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el mecanismo de comunicación intercelular mediado por la transferencia de vesículas se manifiesta en células gliales. Para ello se desarrolló una transfección estable del plásmido CD63-pEGFP-N3 en células de oligodendroglioma TC620, lo cual permitió la obtención, aislamiento y cuantificación de vesículas fluorescentes y la determinación de su internalización en células TC620.

El desarrollo de este trabajo ha permitido establecer y caracterizar la comunicación intercelular mediante vesículas en células gliales, y ha generado una poderosa herramienta para la comprensión de los mecanismos de comunicación mediados por vesículas involucrados en la diferenciación y mantención del fenotipo axonal, así como en las distintas condiciones neuropatológicas.

## 1. INTRODUCCION

#### 1.1 Comunicación intercelular en el sistema nervioso.

La comunicación intercelular es un evento fundamental en la regulación de variados procesos celulares tales como diferenciación, sobrevida, regeneración y muerte. Esta comunicación resulta particularmente esencial en el sistema nervioso dada la estrecha relación entre las células neuronales. El sistema nervioso es el encargado de integrar múltiples procesos autónomos y controlar la respuesta que el animal elabora ante diversos estímulos del el medio externo. Por lo tanto, los procesos de comunicación intercelular son una clave para el funcionamiento del sistema nervioso tal como se ilustra en la Figura 1.

## 1.1.1 Comunicación neurona-neurona

Las neuronas se comunican entre si mediante uniones intercelulares especializadas llamadas sinapsis. Estas conducen el impulso nervioso desde el terminal presináptico hasta el terminal postsináptico. Existen dos tipos de sinapsis, las eléctricas y las químicas, las cuales difieren en su estructura y en la forma en que transmiten el impulso nervioso.

**Sinapsis eléctricas,** corresponden a uniones de comunicación entre las membranas plasmáticas de los terminales presináptico y postsinápticos, mediante uniones de hendidura (*Gap junctions*). Las cuales permiten el flujo directo de iones desde el citoplasma del terminal presinático hacia el citoplasma del terminal postsináptico. Figura 2A.

Sinapsis química, se lleva a cabo en el espacio sinaptico entre los terminales presináptico y postsináptico. El terminal presináptico posee abundantes mitocondrias y vesículas sinápticas, que son organelos revestidos de membrana que contienen neurotransmisores.

Al llegar el impulso nervioso al terminal presináptico ocurren eventos tales como la apertura de canales de Ca<sup>+2</sup> sensibles a voltaje y el aumento de la concentración del Ca<sup>+2</sup> intracelular que activa la exocitosis de las vesículas sinápticas que liberan al neurotransmisor hacia la hendidura sináptica.

Al fusionarse las vesículas sinápticas con la membrana celular, se liberan los neurotrasmisores al espacio sinaptico, con el objetivo de alcanzar los receptores específicos localizados en la membrana postsináptica.

La unión del neurotrasmisor con su receptor induce en la membrana postsinática la apertura de los canales para cationes activados por ligandos determinando cambios en la permeabilidad de la membrana que pueden: inducir la depolarización de la membrana postsinática: sinápsis exhitatorias; o hiperpolarizar a la membrana postsináticas: sinapsis inhibitorias. Figura 2B.

La sumatoria de los impulsos exitatorios e inhibitorios que llegan por todas las sinapsis que se relacionan con a cada neurona (1000 a 200.000) determina si se produce o no la descarga del potencial de acción por el axón de esa neurona.



## Figura 1. Células neuronales y sus interacciones.

Diferentes tipos de células gliales, tales como oligodendrocitos, astrocitos y microglias interactuan con neuronas y con vasos sanguineos. Los oligodendorcitos se caracterizan por producir la vaina de mielina alrededor de los axones, permitiendo aumentar la velocidad de la trasmisión neuronal. Por otra parte, los astocitos se extienden en procesos de obtención de energia a partir de los vasos sangúineos y la modulación de la sinapsis neuronal y la microglia mantiene el cerebro bajo vigilancia ante procesos infecciosos e inflamatorios. (Allen and Barres 2009)



## Figura 2. Comunicación sinaptica puede ser química o electrica.

(A) En la sinapsis química un potencial de acción llega al terminal presinaptico desencadenado la exositosis de las vesículas cargadas con neurotransmisores (gris). Los cuales son liberdos luego al espacio sinaptico y se unen a sus receptore especificos en la célula postsinaptica donde puede abrir o cerrar los canels ionicos, da tal modo de afectar a su conductancia en la membrana. En este ejemplo, la partura de los canales ionicos dependiente de ligando (verde) desencadena un influjo de iones (circulos negros) en la célula postsinaptica. (B) En la sinapsis electrica las uniones de hendidura (*gap junction*) permiten una comunicación directa entre el citoplama de dos células acopladas. Además de los iones (circulos negros), y metabolitos (azul), pequeñas moleculas de segundo mensajero (naranjo) también puede difundir a través de los gap juction. Mientas que la sinapsis química es unidireccional, la sinapsis electrica usualmente ocurre en ambas direcciones. (Hormuzdi, Filippov et al. 2004)

## 1.1.2 Comunicaión bidireccional entre neuronales y células gliales.

La comunicación bidireccional entre las neuronas y las células no neuronales llamadas gliales es esencial para el funcionamiento normal del sistema nervioso, debido a que participa en la conduccion axonal, la transmisión sináptica, y el procesamiento de la información. La comunicación entre las neuronas y las células gliales se realiza mediante flujo de iones, neurotransmisores, moleculas de adhesión celular, y moleculas de señalización especializadas, liberadas desde la region sinaptica y no sinaptica de la neurona.

En contraste con el flujo en serie de la información a lo largo de las cadenas de neuronas, las células gliales se comunican con otras células gliales a través de ondas de calcio intrercelulares y mediante la difusión de mensajeros químicos, como neurotransmisores. La liberación de neurotransmisores y otras señales extracelulares, puede modular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica y tal vez coordinar la actividad a través de las redes neuronales.



## Figura 3. Comunicaión cruzada entre células neuronales en el sistema nerviso central.

Astrocitos sinapticos (amarillo) regulan la transmisión sinaptica en respueta a señales moleculares, como ATP y glutamato, liberados desde la neurona presinaptica durante la transmisión siaptica. Astrocitos se comunica con astocitos adjacentes mediante gap junctions y con astrocitos distante medante liberacion de ATP extracelular. El aumento de Ca<sup>+2</sup> causa liberacion de glutamanto y ATP desde el astrocito, el cual propaga la señalización a las células vecinas. Los astocitos pueden también regular la transmisión sinaptica captando glutamato desde el espacio sinaptico por medio de transportadores de membrana (flecha verde) o liberando glutamato por el mismo trasportador inducido por aumento de la concentacion de Na<sup>+</sup> (flecha roja). Otras sustancias, como la D-serina, fortalece la transmisión sinaptica, o reduce la transmisión sinaptica secretando proteínas de unión sinapticas (TBP). Abajo, una micrografia electronica de una sinapsis rodeada por asteocitos (amarillo). GluR, receptor de glutamato; Ado, adenosina; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; P1, receptor de adenosina; P2, receptor de ATP (Fields and Stevens-Graham 2002).

## 1.2 Mecanismos no convencionales de comunicación intercelular

Actualmente, se ha descito que mecanismos no convencionales de comunicación intercelular estan involucrados en la transferencia de components celulares como proteínas, organelos y material genético específico, y estarían asocidos a un gran número de condiciones fisiológicas y patológicas. Estos mecanismos de comunicación intercelular se clasifican en:

- Mecanismos de comunicación por contacto célula-célula.
- Mecanismos de comunicación mediados por vectores vesiculares.

## 1.2.1. Mecanismos de comunicación por contacto célula-célula

## 1.2.1.1. Nanotubos

En los últimos años, se han descrito estructuras nanotubulares que se originan de novo entre células animales, éstas son disimiles a los plasmodesmatas vegetales, y se cree que participan en la transferencia de organelos, componentes de membrana plasmática y moléculas citoplasmáticas. Los nanotubos fueron caracterizados por primera vez en cultivos de células de la línea celular PC12 (Rustom, Saffrich et al. 2004). El diametro de estas estructuras varia entre 50 y 200 nm y su longitud alcanza los 300  $\mu$ m en algunos casos. Se ha descrito, que la vida media de los puentes nanotubulares es variada. Por ejemplo, en las células T, su vida media va desde algunos segundos hasta no más de 60 minutos (Sowinski, Jolly et al. 2008). Sin embargo, en células PC12 se ha reportados que pueden durar varias horas (Rustom, Saffrich et al. 2004).

Por otra parte, las uniones intercelulares mediante nanotubos pueden generar la continuidad entre las membranas plasmáticas, figura xaaa, así también, estas proyecciones citoplasmáticas pueden producir una invaginación en una de las células, tal como se ilustra el la figura xxbbb que fue obtenida por microscopia de transmisión electrónica.

El proceso de formación de nanotubos no es un evento que se restringe solamente a la participación de dos células, a menudo se generan redes de comunicación tal como se han observado en cultivos de astrocitos (Zhu, Tan et al. 2005) y otros tipos celulares (Gerdes, Bukoreshtliev et al. 2007).

Los sistemas de comunicación intercelular basados en nanotubos promueven la transferencia de diversos cargos, estudios sugieren que estarían impulsados por motores proteicos del tipo miosina Va. Por otra parte, otras investigaciones han demostrado la transferencia de mitocondrias a través de nanotubos de cardiocitos de ratas neonatas a células endoteliales humanas adultas (Koyanagi, Brandes et al. 2005). Asimismo, se ha demostrado la movilización lateral y transferencia de elementos de la membrana plasmatica tales como proteínas ancaldas a lípidos a lo largo de nanotubos formados entre células (Onfelt, Purbhoo et al. 2005).

A la fecha, la formación de nanotubos solo se ha descrito en cultivos celulares y se desconoce si este fenomeno se manifiesta *in vivo*. Sin embargo, los antecendetes indican que los nanotubos podrían tener un participación clave en los procesos fisiológicos de comunicación intercelular.



Figura 4. Mecanismos de formación de nanotubos.

(A) Imagen obtenida por microscopia de transmición electrónica (TEM) de nanotubos conectando dos células, en donde se observa la continuidad de membrana entre el nanotubo y la membrana plasmática en las dos células (A1 y A2). (Figura adaptada de (Rustom, Saffrich et al. 2004). (B) Representación esquematica de un nanotubos mediando la continuida de la membrana plasmatica entre células. (C) Imagen de TEM de un nanotubo formado por una célula (C2) que genera una invaginación en otra célula (C1). (Sowinski, Jolly et al. 2008). (D) Representación esquematica que muetra el borde de la unión. (E) Nanotubo conetando dos células en cocultivo marcadas con la tinción de membrana DiO arriba y DiL abajo (Sowinski, Jolly et al. 2008). Barra de calibracion, 1  $\mu$ m en A y C, 500 nm en A1, A2 y C2 y 10  $\mu$ m en D.

## 1.2.2. Mecanismos de comunicación mediados por vectores vesiculares.

La comunicación mediante vesículas fue propuesto hace décadas (Bastida, Ordinas et al. 1984). Sin embargo, recientemente está adquiriendo mayor relevancia la posibilidad de transferencia de vectores vesiculares desde una célula a otra como un mecanismo paralelo a la comunicación intercelular clásica mediada por hormonas y neurotransmisores entre otros.

La falta de conocimiento de los procesos de regulación y la heterogeneidad de las vesículas liberadas han generado diferentes clasificaciones y nomenclaturas. Así, se puede apreciar una diversidad de nombres adjudicados para estos vectores vesiculares, tales como: (a) exosomas en reticulocitos, mastocitos y diversos fluidos corporales (Johnstone, Adam et al. 1987; Raposo, Nijman et al. 1996; Caby, Lankar et al. 2005); (b) partículas tipo-exosomas en células tumorales (Ristorcelli, Beraud et al. 2008); (c) shedding vesicles en diversos tumores (Shedden, Xie et al. 2003); (d) ectosomas en neutrófilos y fibroblastos (Gasser, Hess et al. 2003); (e) shedding bodies en células neurosecretoras (Cocucci, Racchetti et al. 2007); y (f) microvesículas en plaquetas y monocitos (Koppler, Cohen et al. 2006).

En nuestro caso, las de vesículas secretadas al espacio extracelular se han clasificado, acorde a criterios de origen y tamaño, que permiten identificar dos grandes subtipos de vectores vesiculares: las microvesículas, liberadas directamente a partir de la membrana plasmática y con un diámetro mayor a los exosomas, los cuales son generados de la ruta endosomal.

## 1.2.2.1. Microvesículas

Estudios mediante microscopia confocal y electrónica han demostrados que las microvesículas corresponden a evaginaciones de la membrana plamatica (Moskovich and Fishelson 2007). Los mecanismos involucrados en la liberación aún son desconocidos, no obstante, estudios de inhibidores de colesterol indican la participación de microdominios de membrana, *lipids rafts* (Pilzer and Fishelson 2005). Figura 5.

Morfológicamente, tienen un diámetro que varia entre 100 nm y 1 µm (Thery and Piel 2009). La composición de las microvesículas no está definida completamente, por ejemplo, en células tumorales y neutrófilos son ricas en metaloproteasas y enzimas proteolíticas permitiendo la degradación la matriz extracelular para permitir la progresión inflamatoria y crecimiento del cáncer, mientras que en plaquetas se observan diversos tipos de integrinas, glicoproteínas ancladas a GPI (glucosil fosfatidil inositol) y P-Selectina involucradas en fenómenos de coagulación (Thery and Piel 2009).

En algunas células en reposo la tasa de secreción de micrevesículas aumenta drásticamente ante la presencia de Ca<sup>+2</sup> como ocurre en células dendríticas y microglia (Moskovich and Fishelson 2007), al igual que en presencia ATP que capaz de activar canales purinérgicos del tipo P2X7 en células dendríticas, macrófagos y microglia (Wilson, Francis et al. 2004) o canales de tipo P2Y en células PC12 y plaquetas (Kahner, Dorsam et al. 2008) haciendo sugerir que la secreción de microvesículas se trataría de un proceso regulado.

Tras su liberación las microvesículas pueden ser internalizadas en células diana en forma específica. Sin embargo, se desconoce el mecanismo. La transferencia de microvesículas está involucrada en procesos fisiológicos como coagulación (Polgar, Matuskova et al. 2005) e inflamación (Koppler, Cohen et al. 2006) y procesos patológicos como tumorogénesis (Taraboletti, D'Ascenzo et al. 2002; Mochizuki and Okada 2007).

## 1.2.2.2. Exosomas

Los exosomas fueron descritos por primera vez en estudios de maduración de reticulocitos a eritrocito en ovejas (Pan and Johnstone 1983). Siguiendo el receptor de transferrina en el reticulocitos descubren que era liberado en pequeñas vesículas de 50 nm derivadas de la ruta endosomal que eran capaz de fusionarse con la membrana celular y ser liberadas al espacio extracelular y fueron denominadas como "exosomas" (Johnstone, Adam et al. 1987). Los exosomas corresponden a las vesículas intraluminales de los cuerpos multivesiculares (MVBs), y presentan un diámetro de 40 a 100 nm (Simons and Raposo 2009). Los exosomas son liberados al espacio extracelular mediante fusión de los MVBs con la membrana plasmática (Simons and Raposo 2009; Thery, Ostrowski et al. 2009). Consistente con su origen, los exosomas contienen proteínas relacionadas a la vía endocítica como Rab GTPasas, anexinas, flotilinas, Alix y TSG101; integrinas y tetraspaninas como CD63, CD9 y CD82, y además están enriquecidos en colesterol, ceramidas y esfingolípidos (Simons and Raposo 2009; Ostrowski, Carmo et al. 2010).

Se ha mostrado que la secreción de exosomas es un proceso dependiente de dos proteínas Rab35 (Hsu, Morohashi et al. 2010) y Rab27 (Ostrowski, Carmo et al. 2010), su inhibición produce la acumulación de los cuerpos multivesiculares dentro de la célula y se inhibe la liberación de exosomas.

Existe controversia sobre el mecanismo de internalización en la célula receptora. Algunos autores, de forma indirecta han mostrado que la internalización ocurriría por fusión de la membrana exosómica con la membrana celular y vertimiento de su contenido al citoplasma (Parolini, Federici et al. 2009). Otros postulan que los exosomas son internalizados a través de la vía endocítica, que es dependiente de la polimerización de los microfilamentos de actina (Feng, Zhao et al. 2010; Tian, Wang et al. 2010).

En relación a la función de los exosomas, se ha descrito que la comunicación intercelular mediante estas vesículas está involucrada en varios procesos fisiológicos y patológicos tales como regulación del sistema inmune (Ostrowski, Carmo et al. 2010; Szajnik, Czystowska et al. 2010); transferencia horizontal de material genético como

mRNA y microRNA (Valadi, Ekstrom et al. 2007; Skog, Wurdinger et al. 2008), y propagación del fenotipo cancerígeno al transferir EGFRvIII a células sanas (Al-Nedawi, Meehan et al. 2008).

En el sistema nervioso existen escasos antecedentes sobre la comunicación intercelular mediada por vectores vesiculares. Se ha demostrado que la transferencia de exosomas derivados de astrocitoma en el endotelio microvascular induce angiogénesis (Skog, Wurdinger et al. 2008). Además diferentes tipos celulares producen  $\alpha$ -sinucleina que es secretada en exosomas y produce disminución en la sobrevida neuronal, amplificando y propagando las patologías relacionadas con la enfermedad de Parkinson (Emmanouilidou, Stefanis et al. 2010). También se demostró que las neuronas secretan exosomas que contienen cistatina C y se sugiere que estos podría estar involucrada en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Ghidoni, Paterlini et al. 2009).

Basados en los antecedentes antes descritos, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una herramienta para el estudio de la comunicación intercelular basada en la obtención de vesículas fluorescentes mediante la generación de una transfección estable de células de oligodendroglioma TC620 con el plásmido TC620-CD63-EGFP y la determinación de su transferencia. Los resultados de este trabajo pretenden establecer los primeros antecedentes para posteriores estudios de la comunicación basada en la transferencia de exosomas en el sistema nervioso.



## Figura 5. Modelo de secreción de microvesículas y exosomas.

El tráfico intracelular, ya sea entre los compartimentos subcelulares o hacia la membrana plasmática se produce a través de vesículas que contiene componentes intraluminales. Sin embargo, también es posible la formación de vesícula directamente de la membrana plasmatica y su liberación al extracelular. Por otra parte, las vesículas generadas en los compatimentos internos pueden formar vesículas en su interior que al ser secretadas al medio extracelular pasan a llamarse exosomas (Thery, Ostrowski et al. 2009).

## 2. **HIPOTESIS**

"Vesículas obtenidos de células de oligodendroglioma TC620 son internalizados en células TC620"

## 3. OBJETIVO GENERAL

Obtener vesículas fluorescentes de células de la transfección estable TC620-CD63-EGFP y determinar su internalización en células TC620.

## 4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

# 4.1 Generar una transfección estable de la línea celular TC620 que exprese la proteína CD63-EGFP.

Mediante transfección del plásmido CD63-pEGFP-N3 en células TC620 se generó la línea celular TC620-CD63-EGFP, la cual expresa la proteína CD63-EGFP de forma estable, esto permitió la obtención de vesículas fluorescentes (vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup>).

## 4.2 Aislar vesículas fluorescentes del sobrenadante de la línea celular TC620-CD63-EGFP mediante centrifugaciones y confirmar mediante fluorometría.

A partir del sobrenadante de las células de la transfección estable de TC620-CD63-EGFP, se realizó el aislamiento de vesículas mediante centrifugaciones diferenciales a velocidades creciente. Luego se realizó la cuantificación mediante la medición de fluorescencia en el sobrenadante.

## **4.3** Determinar la internalización de vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup> en células TC620.

Se realizaron incubaciones de vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup> con células TC620, a diferentes tiempos a 37ºC.

## 5. MATERILES Y METODOS

#### 5.1 Cultivo de células TC620.

Las células TC620, gentileza del Dr. Miguel Bronfman, fueron sembradas y mantenidas en medio IMDM completo, compuesto de *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10% más penicilina 100U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (ATB) e incubadas a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Opcionalmente se utilizó medio IMDM con suero, compuesto de medio IMDM con SFB sin ATB.

## 5.2 Transfección de células TC620 con el plásmido CD63-pEGFP-N3.

Se sembraron 2 x  $10^7$  células TC620 en una placa Petri de 60 mm con 6 cubre objetos de 12 mm en su interior y se incubaron durante 24 horas con medio IMDM completo, luego a las células se les cambió el medio de cultivo por IMDM con suero y se incubaron por dos horas. Para la transfección, se diluyeron 8 µg de DNA plasmidial CD63-pEGFP-N3, gentileza del Dr. Juan Falcón-Pérez, en 50 µL de medio IMDM y se mezclaron suavemente. Además se diluyeron 20 µL de Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) en 50 µL de medio IMDM, se mezclaron suavemente y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se mezclaron suavemente las diluciones de DNA y Lipofecatamine y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron los 100 µL de dilución a la placa Petri con células TC620 y se incubaron durante 48 horas. Al cabo de 2 días, se retiraron 2 cubre objetos de la placa con células, se fijaron con paraformaldehido al 4%, se montaron con Vectaschield (vertorLabs) con Hoechst 1:3000 (Sigma) y se observaron por microscopia de fluorescencia para determinar el porcentaje de transfección utilizando el software *ImageJ*.

## 5.3 Transfección estable TC620-CD63-EGFP

Para generar la transfección estable TC620-CD63-EGFP, se agregó el antibiótico Geneticina (G18) (Invitrogen) al medio de cultivo IMDM completo durante dos semanas. Inicialmente a la concentración de 2 mg/mL y luego a 0.5 mg/mL. Al cabo de dos semanas se retiraron los 4 cubre objetos restantes, se fijaron con paraformaldehido al 4%, se montaron con Vectaschield con Hoechst. 2 cubre objetos se observaron por microscopia de fluorescencia para determinar el porcentaje de transfección utilizando el software *ImageJ*, y dos se observaron por microscopia confocal para determinar el patrón de expresión de la proteína DC63-EGFP. Las células de la transfección estable fueron expandidas, utilizando medio IMDM completo con G-418, para los ensayos siguientes.

# 5.4 Purificación de vesículas secretadas por células de la transfección estable TC620-CD63-EGFP.

Se sembraron 3 pocillos de una placa de 24 pocillos con 40.000 células de la transfección estable y 3 pocillos con 40.000 células sin transfectar, se incubaron durante 24 horas en medio IMDM completo con G-418. Luego a las células se les cambio el medio de cultivo por buffer Krebs, 300 µL en cada pocillo, y se incubaron durante 24 horas. A continuación se colectaron 250 µL de sobrenadante celular de cada pocillo y se purificaron mediante el protocolo de centrifugaciones diferenciales para la obtención de microvesículas y exosomas (Valadi, Ekstrom et al. 2007). El sobrenadante celular fue centrifugado a 300 g por 10 minutos, el pellet (P300) fue eliminado y el sobrenadante (S300) fue centrifugado a 3000 g por 10 minutos, el pellet (P3000) fue eliminado y el sobrenadante (S3000) fue guardado a 4ºC para su cuantificación mediante fluorometría.

## 5.5 Fluorometría del S3000 de las células de la transfección estable.

Los sobrenadantes S3000 de las células de la transfección estable y de las células sin transfectar fueron cuantificados por triplicado mediante fluorometría usando el equipo LB 940 Mithras, Berthold Tecnologies. Además, se cuantificó por triplicado la fluorescencia del buffer Krebs que fue utilizada como blanco.

## 5.6 Internalización de vesículas fluorescentes en células TC620.

Se sembraron 40.000 células TC620 por pocillo en dos placas de 24 pocillos con cubre objetos de 12 mm en su interior, y se incubaron por 24 horas con 500 µL de medio IMDM completo. Al cabo de un día de incubación se retiraron 250 µL del medio de cultivo y se agregaron 250 µL del S3000 de la transfección estable, de las células sin transfectar, y buffer Krebs, y se incubaron a diferentes tiempos; 0, 1, 3, 5, 12 y 24 horas a 37°C, por triplicado. Al termino de cada tiempo de incubación las células fueron lavadas dos veces con PBS, luego fueron fijadas por 10 minutos con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, luego fueron lavadas dos veces con PBS y montadas usando Vectashield con Hoechst. Finalmente las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron analizadas utilizando el software *ImageJ*.

## 5.7 Cuantificación de la internalización de vesículas fluorescentes.

Los porcentajes de internalización a cada tiempo se determinaron analizando los parámetros de fluorescencia y utilizando el software *ImageJ*. Primero se contaron 100 células con la tinción nuclear Hoechst. Luego se analizaron tres parámetros de fluorescencia de GFP: (I) el promedio de puntos fluorescentes por célula, (II) el promedio de intensidad de fluorescencia por célula, y (III) el promedio de células con puntos. Utilizando la siguiente formula: % internalización: promedio de puntos fluorescentes por célula x promedio de intensidad de fluorescencia por célula x 100 promedio de células con puntos

## 5.8 Análisis estadístico

Todos los análisis estadístico fueron realizados con el método no paramétrico Kruskal-Wallis y utilizando el software *Prism 5.* 

## 6. **RESULTADOS**

## 6.1. Generación de la transfección estable TC620-CD63-EGFP.

Inicialmente se realizó la transfección del plásmido CD63-pEGFP-N3 en células TC620 utilizando lipofectamina. En la Figura 6A se observa el patrón de expresión de la proteína CD63-EGFP, el cual resultó similar a lo descrito en la literatura (Conde-Vancells, Rodriguez-Suarez et al. 2008). Por otra parte, en la Figura 6B se observa la eficiencia de transfección que fue aproximadamente de un 8%.

A continuación, para la generación de la transfección estable se agregó el antibiótico Geneticina (G-418), a la concentración de 2 mg/mL, al medio de cultivo durante dos semanas. Esta concentración resulto toxica para las células, por lo que se repitió el ensayo utilizando una concentración más baja del antibiótico, 0.5 mg/mL. Al cabo de dos semanas se observaron múltiples colonias resistentes, Figura 7A, y el porcentaje de fluorescencia aumento sobre el 80%, Figuras 7B y 7C. Además, podemos observar que el patrón de expresión se mantuvo, Figura 7D.

Estas colonias fluorescentes fueron expandidas en medio completo más 0.5 mg/mL de G-418 para realizar los ensayos de fluorometría e internalización.



## Figura 6. Transfección de células TC620 con el plásmido CD63-pEGFP-N3.

(A) Célula transfectadas; en verde se observa la proteína CD63-EGFP con su patrón de expresión, y en azul el núcleo con la tinción Hoechst. (B) Campo representativo que ilustra el bajo porcentaje de transfección, aproximadamente un 8%. Barra de calibración, 5  $\mu$ m en A y 50  $\mu$ m en B.



## Figura 7. Transfección estable TC620-CD63-EGFP.

(A) Colonias TC620-CD63-EGFP resistentes tras dos semanas de tratamiento con G-418 a la concentración de 2 mg/mL. (B) Una colonia en baja confluencia; se observa la fluorescencia de la proteína CD63-EGFP, en verde, colocalizada con la imagen en campo claro, en (C) una colonia en alta confluencia. (D) Imagen obtenida por microscopia confocal de dos células tipo de la transfección estable, a la izquierda se observa aumentada una sección de una célula que presenta fluorescencia en vesículas y en membrana. Barra de calibración, 15 μm en **B**, 100 μm en **C** y 5 μm en **D**.

# 6.2. Cuantificación de la fluorescencia de vesículas secretadas por las células da la transfección estable.

Para corroborar que las vesículas secretadas al sobrenadante por las células de la transfección estable presentaban fluorescencia detectable para los ensayos de internalización, cuantificamos la fluorescencia, en unidades arbitrarias de fluorescencia (ua), emitida por el sobrenadante de la segunda centrifugación (S3000) del protocolo de purificación de exosomas, en este sobrenadante la población de vesículas corresponde a la mezcla de microvesículas y exosomas (Cocucci, Racchetti et al. 2009). La cuantificación de fluorescencia se realizó a partir 250 µL de S3000 proveniente de 40.000 células transfectadas (S3000T) y no transfectadas (S3000NT) incubadas durante 24 horas en buffer Krebs (Krebs). Además, medimos la fluorescencia del Krebs. El ensayo se realizó una vez por triplicado y el análisis estadísticos de los grupos se realizó mediante el test no paramétrico *Kruskal-Wallis*, encontrándose diferencias significativa (p < 0,05) al comparar S3000T con S3000NT y Krebs. Por otra parte, no hubo diferencia significativa entre S3000NT y Krebs (p > 0.05, test *t student*), Figura 8.

A continuación, utilizando S3000T se realizó una curva temporal de internalización de vesículas fluorescentes hacia células TC620 no transfectadas.



## Figura 8. Fluorescencia de vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup>.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los sobrenadantes (S3000) de las células de la transfección estable TC620-CD63-EGFP **(S3000T)**, de células TC620 no transfectadas **(S3000NT)** y del buffer Krebs **(Krebs)**. En el análisis estadístico de los grupos se observaron diferencias significativas al comparar S3000T con S3000NT y Krebs (\* p < 0.05, *Kruskal-Wallis*). Por otra parte, al comparar S3000NT con Krebs no se observaron diferencias significativas (p > 0.05, *t student*). Los ensayos se realizaron en triplicado y fueron expresados como el promedio de <u>+</u> la desviación estándar.

## 6.3. Vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup> son internalizados por células TC620.

Finalmente, se realizó una curva temporal de internalización de vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup>, derivadas de células de la transfección estable, en células TC620. Se realizaron incubaciones de células TC620 con sobrenadante se células de la transfección estable S3000T (250 µL) y no transfectadas S3000NT (250 µL) por separado a diferentes tiempos; 0, 1, 3, 5, 12 y 24 horas a 37ºC, por triplicado. Al finalizar los diferentes tiempos, las células fueron lavadas, fijadas con PFA 4% y montadas con Vectashield con Hoechst, y se procedió a la adquisición de imágenes en un microscopio de fluorescencia a los aumentos de 20x, 40x y 100x, luego se colocalizaron las imágenes de fluorescencia con las de campo claro. En la Figura 9 se observan de A a F las células positivas representativas de cada tiempo de incubación. Para determinar el porcentaje de internalización, se analizaron los parámetros de fluorescencia las imágenes mediante el software ImageJ, se contaron 100 células con la tinción Hoechst, en cada tiempo de incubación, y luego se analizaron tres parámetros de fluorescencia de GFP: (I) promedio de puntos fluorescentes por célula, (II) promedio de intensidad de fluorescencia por célula, y (III) promedio de células con puntos. Con estos datos y utilizando la formula descrita en los métodos se calculó el porcentaje de internalización a los diferentes tiempos, como se observa en la Figura 4G. El porcentaje de internalización a los 3, 5 y 12 horas resultó significativamente (p < 0.05, Kruskal-Wallis) mayor comparado con los tiempos 0, 12 y 24 horas.



## Figura 9. Curva temporal de la internalización de vesículas CD63-EGFP $^+$ en células TC620.

(A-F) Imagen más representativa de la internalización de vesículas CD63-EGFP<sup>+</sup> en células TC620 a cada tiempo de incubación; 0, 1, 3, 5, 12 y 24 horas respectivamente. Se colocalizaron las imágenes de campo claro con las de fluorescencia; en azul la tinción nuclear Hoechst y en verde GFP. A la derecha de cada imagen se observa aumentada una célula positiva para la internalización a cada tiempo. (G) Cuantificación de los porcentajes de internalización a cada tiempo de incubación, en 100 células observadas de cada tiempo de incubación. Los ensayos se realizaron en triplicado y fueron expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los porcentajes de internalización a 3, 5 y 12 horas resultaron significativamente mayores que los porcentajes de internalización a los tiempos 0, 1 y 24 horas (p < 0,05, Kruskal-Wallis). Barra de calibración, 15 µm en A, B, C, D, E y F.

## 7. DISCUCIONES

El sobrenadante utilizado para los ensayos de fluorometría e internalización correspondió al sobrenadante de la segunda centrifugación S3000, según el protocolo de obtención de microvesículas y exosomas, en el cual se encuentra una población mixta de vesículas; microvesículas y exosomas. En este sentido, resultaría interesante conocer el aporte de cada población vesicular en los diferentes procesos (secreción e internalización). Para ellos sería necesario completar el protocolo de centrifugación del sobrenadante hasta la obtención de microvesículas y exosomas y exosomas puros y repetir los ensayos.

Analizando las imágenes del ensayo de internalización, es posible observar dos patrones de fluorescencia en la célula receptora; uno punteado e intenso y otro difuso y débil. Con estos resultados no es posible determinar si la internalización ocurrió por endocitosis y/o por fusión. Para ello sería necesario realizar los ensayos de internalización utilizaron microvesículas y exosomas puros, utilizar inhibidores de endocitosis como Citocalacina D y Dynasore (Feng, Zhao et al. 2010), realizar lavados con buffer ácido mas tripsina previo a la fijación (Tian, Wang et al. 2010), y tomar imágenes en un plano focal que nos indiquen si las vesículas internalizadas se encuentran en el citoplasma o en la membrana celular de la célula receptora.

El mayor porcentaje de internalización fue observado entre los tiempos 3 y 12 horas de incubación. A las 24 horas se observa una significativa disminución en el porcentaje de internalización, esto puede deberse a la degradación de la proteína GFP; por parte de la célula receptora, o por componentes del medio de incubación.

El desarrollo de la transfección estable TC620-CD63-EGFP, la cual expresa la proteína CD63, marcadora de microvesículas y exosomas, de forma fluorescentes CD63-EGFP, permitió el desarrollo de una sólida herramienta para el estudio de la comunicación mediante transferencia de vesículas. Del mismo modo, la presencia de fluorescencia endógena en las vesículas sugiere mayor especificidad y eficiencia al momento de su estudio comparado con los marcajes con tinciones lipofílicas tales

como FM1-43 o PKH67 (Bianco, Perrotta et al. 2009). Por otra parte, el empleo de células de oligodendroglioma TC620 nos permite realizar una primera aproximación al estudio de este vesículas y su comunicación en el sistema nervioso.

## 8. **REFERENCIAS**

- Al-Nedawi, K., B. Meehan, et al. (2008). "Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells." <u>Nat Cell</u> <u>Biol</u> **10**(5): 619-24.
- Bastida, E., A. Ordinas, et al. (1984). "Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis." <u>Blood</u> **64**(1): 177-84.
- Bianco, F., C. Perrotta, et al. (2009). "Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells." <u>EMBO J</u> **28**(8): 1043-54.
- Caby, M. P., D. Lankar, et al. (2005). "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma." <u>Int Immunol</u> **17**(7): 879-87.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." <u>Trends Cell Biol</u> **19**(2): 43-51.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2007). "Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both." <u>Traffic</u> **8**(6): 742-57.
- Conde-Vancells, J., E. Rodriguez-Suarez, et al. (2008). "Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes." J <u>Proteome Res</u> **7**(12): 5157-66.
- Emmanouilidou, E., L. Stefanis, et al. (2010). "Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome." <u>Neurobiol Aging</u> **31**(6): 953-68.
- Feng, D., W. L. Zhao, et al. (2010). "Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis." <u>Traffic</u> **11**(5): 675-87.
- Fields, R. D. and B. Stevens-Graham (2002). "New insights into neuron-glia communication." <u>Science</u> **298**(5593): 556-62.
- Gasser, O., C. Hess, et al. (2003). "Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils." <u>Exp Cell Res</u> **285**(2): 243-57.
- Gerdes, H. H., N. V. Bukoreshtliev, et al. (2007). "Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells." <u>FEBS Lett</u> **581**(11): 2194-201.
- Ghidoni, R., A. Paterlini, et al. (2009). "Cystatin C is released in association with exosomes: A new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease." <u>Neurobiol Aging</u>.

- Hormuzdi, S. G., M. A. Filippov, et al. (2004). "Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1662**(1-2): 113-37.
- Hsu, C., Y. Morohashi, et al. (2010). "Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C." <u>J Cell Biol</u> **189**(2): 223-32.
- Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-20.
- Kahner, B. N., R. T. Dorsam, et al. (2008). "Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation." <u>Front Biosci</u> **13**: 433-9.
- Koppler, B., C. Cohen, et al. (2006). "Differential mechanisms of microparticle transfer toB cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles." <u>Eur J Immunol</u> **36**(3): 648-60.
- Koyanagi, M., R. P. Brandes, et al. (2005). "Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes?" <u>Circ Res</u> **96**(10): 1039-41.
- Mochizuki, S. and Y. Okada (2007). "ADAMs in cancer cell proliferation and progression." <u>Cancer Sci</u> **98**(5): 621-8.
- Moskovich, O. and Z. Fishelson (2007). "Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex." <u>J Biol Chem</u> **282**(41): 29977-86.
- Onfelt, B., M. A. Purbhoo, et al. (2005). "Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules." <u>Sci STKE</u> **2005**(313): pe55.
- Ostrowski, M., N. B. Carmo, et al. (2010). "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway." <u>Nat Cell Biol</u> **12**(1): 19-30; sup pp 1-13.
- Pan, B. T. and R. M. Johnstone (1983). "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor." <u>Cell</u> 33(3): 967-78.
- Parolini, I., C. Federici, et al. (2009). "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." <u>J Biol Chem</u> **284**(49): 34211-22.
- Pilzer, D. and Z. Fishelson (2005). "Mortalin/GRP75 promotes release of membrane vesicles from immune attacked cells and protection from complement-mediated lysis." <u>Int Immunol</u> **17**(9): 1239-48.
- Polgar, J., J. Matuskova, et al. (2005). "The P-selectin, tissue factor, coagulation triad." <u>J Thromb Haemost</u> **3**(8): 1590-6.

- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." <u>J Exp Med</u> **183**(3): 1161-72.
- Rustom, A., R. Saffrich, et al. (2004). "Nanotubular highways for intercellular organelle transport." <u>Science</u> **303**(5660): 1007-10.
- Shedden, K., X. T. Xie, et al. (2003). "Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles." <u>Cancer Res</u> **63**(15): 4331-7.
- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **21**(4): 575-81.
- Skog, J., T. Wurdinger, et al. (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." <u>Nat Cell Biol</u> **10**(12): 1470-6.
- Sowinski, S., C. Jolly, et al. (2008). "Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission." <u>Nat</u> <u>Cell Biol</u> **10**(2): 211-9.
- Szajnik, M., M. Czystowska, et al. (2010). "Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)." <u>PLoS One</u> **5**(7): e11469.
- Taraboletti, G., S. D'Ascenzo, et al. (2002). "Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells." <u>Am J Pathol</u> **160**(2): 673-80.
- Thery, C., M. Ostrowski, et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." <u>Nat Rev Immunol</u> **9**(8): 581-93.
- Thery, M. and M. Piel (2009). "Adhesive micropatterns for cells: a microcontact printing protocol." <u>Cold Spring Harb Protoc</u> **2009**(7): pdb prot5255.
- Tian, T., Y. Wang, et al. (2010). "Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy." <u>J Cell Biochem</u>.
- Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." <u>Nat</u> <u>Cell Biol</u> **9**(6): 654-9.
- Wilson, H. L., S. E. Francis, et al. (2004). "Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation." <u>J Immunol</u> **173**(2): 1202-8.
- Zhu, D., K. S. Tan, et al. (2005). "Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes." <u>J Cell Sci</u> **118**(Pt 16): 3695-703.