

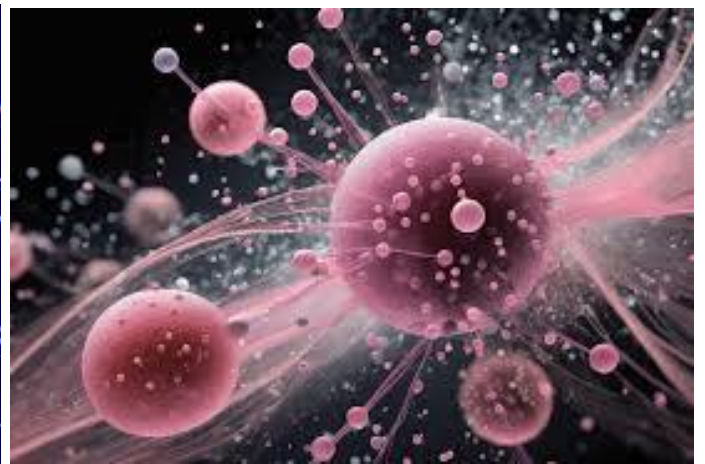


UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



LAGENBIO
Laboratorio de
Genética Bioquímica
Universidad Zaragoza

COMUNICACIÓN MEDIADA POR EXOSOMAS EN ENFERMEDADES DE LA NEURONA MOTORA



Aída Girón Santiago

**TRABAJO FINAL DE GRADO DE
BIOTECNOLOGÍA**

Tutor académico: Dra. M. Teresa Blay Olivé mteresa.blay@urv.cat

En cooperación con: Laboratorio de Genética Bioquímica LAGENBIO

Supervisora: Dra. Raquel Manzano Martínez rmanzano@unizar.es

Data de convocatoria: septiembre 2025

Yo, Aída Girón Santiago, con DNI 49904499I, soy concedora de la guía de prevención del plagio a la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para los estudiantes* (aprobada en julio 2017)

(<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formaciocompetencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que este TFG no constitue ninguna de les conductas considerades como a plagio per la URV.



Tarragona, 3 de septiembre de 2025

Agradecimientos

Me gustaría comenzar estos agradecimientos reconociendo a la Dra. Raquel Manzano Martínez. Gracias a su incansable labor en este campo de la investigación y al proyecto que lidera, he tenido mi primera experiencia como científica. Su dedicación y pasión han sido inspiración para seguir ampliando mis conocimientos y para amar esta profesión tan difícil que es la investigación. También quiero hacer una mención a todas las mujeres científicas que componen el grupo LAGENBIO, que me han acogido y enseñado en estos cinco meses durante las prácticas.

En lo personal, quiero agradecer en especial a mi familia. A mis padres, Luis y Luisa, por dejarme volar para descubrir quién soy y nunca limitarme, por su esfuerzo para que yo haya realizado estos estudios, por aguantarme cuando soy pesada, por confiar en mí y por siempre quererme. A mis hermanas y hermano, Sandra, Luis y Pilar, gracias por siempre animarme a hacer todas las locuras y a perseguir mis sueños, por ser confidentes y apoyarme en los momentos difíciles y por creer en mí. También, quiero agradecer a Zlatin y Miriam, mis cuñados favoritos, por cuidarme como si fuera vuestra hermana. Y no me olvido de mis alegrías, mis sobrinos, Mía y Pablo, mis pequeños motores para seguir adelante y que tengan una tía guay.

Por otro lado, quiero acordarme y agradecer a mi familia elegida, mis amigos. Llegué a Tarragona sola, pero me voy con mucho amor, recuerdos y buenos momentos. Montse, gracias por ser la mejor compañera de piso, por dejarme ser parte de tu familia, por estar en las buenas y en las malas durante estos cinco años, por ser cómplice y por creer en mí, ni cuando yo misma lo hacía. Marina, Aida, Luis y Aritz, nos conocimos en el segundo curso, pero no hemos perdido el tiempo para poder crear esta preciosa amistad, sin vosotros no habría conseguido llegar hasta el final, gracias por acogerme en vuestras familias y ser hogar tan lejos de casa. También, agradecer a mis amigos de Villarrobledo, la distancia no ha permitido que no sintiera vuestro apoyo y gracias por hacerme siempre reír y ser refugio para disfrutar.

Finalmente, quiero agradecer a mis abuelos Luisa Moya y Alfonso Santiago, Fernanda Toledo y Gregorio Girón, que, aunque ya no se encuentran aquí, me han acompañado en el corazón durante todo este viaje, espero que estéis orgullosos, os echo de menos.

Índice

Datos del centro de investigación y colaboración	1
Resumen	2
Palabras clave.....	3
Introducción	4
Hipótesis y Objetivos	15
Metodología	16
Líneas celulares modelo de neurona motora y músculo.....	16
Mantenimiento de las líneas	16
Diferenciación de la línea celular NSC-34	17
Diferenciación de la línea celular C2C12.....	18
Inmunocitoquímica de las neuronas motoras diferenciadas	19
Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) de neuronas motoras diferenciadas	20
Establecimiento de un sistema de co-cultivo entre la línea celular C2C12 y la línea celular NSC-34.....	23
Marcaje y visualización de la formación de uniones neuromusculares	23
Exosomas	24
Aislamiento y purificación de exosomas obtenido de las neuronas motoras (NSC-34)	25
Caracterización de los exosomas procedentes de la línea celular NSC-34, modelo de neurona motora	26
Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía electrónica de transmisión criogénica (Crio-TEM)	27
Visualización de la internalización de exosomas por la línea celular C2C12, modelo de célula muscular	28
Resultados y Discusión	30
Diferenciación de las líneas celulares C2C12 y NSC-34	30
Co-cultivo de células musculares maduras y células neuronales motoras, y formación de uniones neuromusculares.....	35
Caracterización de exosomas liberados por las neuronas motoras de la línea celular NSC-34	36
Conclusiones	40
Bibliografía.....	41

Datos del centro de investigación y colaboración

Este trabajo final de grado se ha llevado a cabo en colaboración con el Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Además, forma parte del Instituto de Investigación Agroalimentaria de Aragón, del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón y del Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

El grupo imparte docencia en diferentes asignaturas del grado de Veterinaria, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, y de Biotecnología. Así como diversos Másteres Universitarios Oficiales. La actividad investigadora del grupo trata aspectos básicos que están aplicados a la producción animal, la bioindustria y la sanidad. Para ello, cuentan con un equipo formado por investigadores predoctorales, doctores, y personal funcionario universitario. El grupo realiza además actividades de transferencia del conocimiento, gracias a contratos y convenios para ofrecer diferentes servicios de identificación y diagnóstico genéticos en áreas como seguridad y calidad alimentaria o diagnóstico de enfermedades hereditarias y no hereditarias, o identificación de individuos susceptibles y portadores. Como reflejo de la I+D+i y desarrollo de la propiedad industrial e intelectual, los componentes del grupo figuran como inventores en un total de 10 patentes.

Este Trabajo de Final de Grado está enmarcado en el proyecto “Neuroxome: La motoneurona encuentra al músculo: Comunicación mediada por exosomas como herramienta para combatir el desgaste muscular en sarcopenia y esclerosis lateral amiotrófica”, liderado por la Dra. Raquel Manzano Martínez y financiado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) en la convocatoria “Proyecto de Generación de Conocimiento” del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. La Dra. Manzano es la coordinadora del Grupo de acción VITALES de Campus Iberus, cuyo objetivo es desarrollar estrategias innovadoras de prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas asociadas al envejecimiento.

Resumen

Las enfermedades neuromusculares suponen un gran desafío en la comunidad científica debido a su heterogeneidad y a la gran variabilidad de sus causas. Por ello, es necesario el uso de herramientas que faciliten su diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Entre estas herramientas destacan los biomarcadores, que son una medida objetiva y cuantificable de un proceso fisiológico, patológico o una respuesta a un tratamiento, un ejemplo son los exosomas. Los exosomas son vesículas extracelulares (VE), que se secretan y liberan al medio extracelular por casi todas las poblaciones de células y cuyo contenido molecular refleja el estado de estas. La función principal de éstos es la comunicación celular, están implicados en procesos fisiológicos y patológicos. En el caso de enfermedades neuromusculares, es necesario la caracterización de los exosomas procedentes de las neuronas motoras que afectan a dichas enfermedades. Asimismo, se pretende demostrar la existencia de comunicación mediada por exosomas entre células neuronales y células musculares. Para cumplir con estos objetivos se realizaron diferentes técnicas como el cultivo celular de las líneas C2C12 y NSC-34 (modelo de neurona motora y músculo respectivamente), inmunocitoquímicas, microscopía electrónica de barrido y transmisión, y análisis de poblaciones de exosomas, entre otras. Los resultados obtenidos demuestran por primera vez la liberación de exosomas por las neuronas motoras y caracterizan estas vesículas, observando su internalización por las células musculares C2C12.

Abstract

Neuromuscular diseases represent a major challenge for the scientific community due to their heterogeneity and the wide variability of their causes. Therefore, the use of tools that facilitate diagnosis, prognosis, and treatment is necessary. Among these tools, biomarkers stand out, as they provide an objective and quantifiable measure of a physiological or pathological process, or a response to treatment; exosomes are one example. Exosomes are extracellular vesicles (EVs) secreted and released into the extracellular environment by almost all cell types, and their molecular content reflects the state of the parental cells. Their primary function is cell-to-cell communication, and they are involved in both physiological and pathological processes. In the case of neuromuscular diseases, it is necessary to characterize exosomes derived from motor neurons that are affected in these conditions. Furthermore, it is intended to demonstrate the existence of exosome-mediated communication between neuronal and muscle cells.

To achieve these objectives, several techniques were employed, including cell culture of the C2C12 and NSC-34 lines (models of muscle and motor neuron, respectively), immunocytochemistry, scanning and transmission electron microscopy, and exosome population analysis, among others. The results obtained demonstrate for the first time the release of exosomes by motor neurons and characterize these vesicles, observing their internalization by C2C12 muscle cells.

Resum

Les malalties neuromusculars representen un gran repte per a la comunitat científica a causa de la seva heterogeneïtat i de la gran variabilitat de les seves causes. Per això, és necessari utilitzar eines que facilitin el diagnòstic, el pronòstic i el tractament. Entre aquestes eines, destaquen els biomarcadors, ja que proporcionen una mesura objectiva i quantificable d'un procés fisiològic o patològic, o d'una resposta a un tractament; un exemple són els exosomes. Els exosomes són vesícules extracel·lulars (EVs) que són secretades i alliberades al medi extracel·lular per gairebé tots els tipus cel·lulars, i el seu contingut molecular reflecteix l'estat de les cèl·lules parentals. La seva funció principal és la comunicació cel·lula a cel·lula, i estan implicats en processos tant fisiològics com patològics. En el cas de les malalties neuromusculars, és necessari caracteritzar els exosomes derivats de les neurones motores que es veuen afectades en aquestes condicions. A més, es pretén demostrar l'existència de comunicació mediada per exosomes entre cèl·lules neuronals i cel·lules musculars. Per assolir aquests objectius, es van emprar diverses tècniques, incloent-hi el cultiu cel·lular de les línies C2C12 i NSC-34 (models de múscul i neurona motora, respectivament), immunocitoquímica, microscòpia electrònica de rastreig i de transmissió, i anàlisi de poblacions d'exosomes, entre altres. Els resultats obtinguts demostren per primera vegada l'alliberament d'exosomes per part de les neurones motores i caracteritzen aquestes vesícules, observant la seva internalització per les cèl·lules musculars C2C12.

Palabras clave

exosome, characterization, neuromuscular diseases, cellular communication, NSC-34 cell line, C2C12 cell line, ExoView

Introducción

Las enfermedades neuromusculares (ENM) se caracterizan por la alteración de las unidades motoras, compuestas por las neuronas motoras, las uniones neuromusculares y el músculo. Estas enfermedades suponen un gran desafío en el diagnóstico y en el tratamiento, debido a su gran heterogeneidad y a la implicación del sistema nervioso central (Dabaj et al., 2024).

La causa de estas enfermedades es diversa y pueden ser provocadas por defectos genéticos, desregulación del sistema inmune, factores iatrogénicos o, tener un origen desconocido. Por lo tanto, pueden ser enfermedades adquiridas o heredadas (Dabaj et al., 2024). Asimismo, son enfermedades que se pueden presentar en cualquier etapa de la vida humana, es decir, desde el nacimiento hasta la vejez (Castiglioni et al., 2018).

Existen alrededor de 150 enfermedades neuromusculares (ENM), según la Federación Mundial de Neurología (Wei et al., 2018). La mayoría de ellas son consideradas enfermedades raras, ya que no afectan a más de 1 de cada 2000 personas, por ejemplo, la distrofia muscular Duchenne (DMD) tiene una incidencia de 1 cada 3500 en la niñez o la incidencia de la atrofia muscular espinal (AME) es de 1 en 11000 nacidos vivos (Castiglioni et al., 2018). Esta denominación puede conllevar a la creencia de que su impacto social y económico a nivel mundial es poco significativo, no obstante, representan un porcentaje cada vez mayor de las enfermedades crónicas que afectan al ser humano (Wei et al., 2018).

El impacto económico depende del tipo de enfermedad neuromuscular y se agrupa en diferentes tipos de costos. Los tipos de costos dependen del análisis o los datos que se hayan recogido a la hora de realizar el estudio, por ejemplo, costes directos (en los cuales se pueden incluir coste médicos directos e indirectos) y costes indirectos. Normalmente los costes se agrupan en:

- Directos: asistencia médica, el cuidado ambulatorio del paciente y tratamientos.
- Indirectos: engloban la disminución de la productividad laboral del paciente o de los cuidadores, bien por absentismo o por mortalidad prematura.

Un reciente estudio ha realizado una revisión sistemática de la literatura existen para determinar el impacto económico de la atrofia muscular espinal (AME), el cual ha concluido que los costos anuales totales varían desde 3.752\$ a 593.517\$, con un costo total promedio por paciente de 109.096\$ (Elshahawy et al., 2025), siendo el coste total la

suma del coste total directo (coste médico directo y coste médico indirecto) y el coste indirecto. Otro ejemplo, es un estudio canadiense sobre el impacto económico de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en el cual se calculó que los gastos directos de pacientes con ELA y sus familias era de 32.337\$ anuales, de los que 19.574\$ eran pagados por los propios pacientes o sus familias. Cabe destacar que los gastos más importantes eran debidos a la adecuación del domicilio, ayudas para la movilidad, gastos médicos y de cuidadores privados. Y también calcularon los costes indirectos por pérdida de ingresos en 56.821\$ anuales (Camacho et al., 2018).

A nivel médico, las enfermedades neuromusculares representan entre 2,8 y 18% de los motivos de consulta en un servicio de neurología. Los síntomas difieren según el tipo de enfermedad neuromuscular, aunque uno de los más frecuentes es la alteración del tono muscular, el cual puede manifestarse como hipotonía (disminución del tono muscular) o, en algunos casos, como espasticidad. Estos síntomas pueden presentarse como dificultad para caminar, moverse o agarrar objetos. Otros síntomas habituales son los espasmos, las contracciones y las miotonías, que pueden generar calambres, dolores, sensación de fatiga y alteraciones en la sensibilidad de la piel. En algunos enfermos también, se puede observar atrofia muscular, que deriva a una pérdida de volumen de la masa muscular, o hipertrofia muscular, desarrollo anormal de la masa muscular.

En definitiva, son enfermedades crónicas, progresivas y debilitantes, lo cual deriva en un importante nivel de discapacidad y dependencia, lo cual repercute en los costes sanitarios y sociales asociados a las enfermedades (Camacho et al., 2018).

Para tener una visión de la complejidad de este tipo de enfermedades es importante entender la función de las células, tejidos y sistemas implicados.

Las neuronas motoras son células nerviosas que se dividen en dos grupos: superiores e inferiores, dependiendo de la localización en el sistema nervioso. Las neuromas motoras superiores (NMS) se localizan en la corteza motora en el lóbulo frontal y envían sus prolongaciones axonales que se agrupan a medida que avanzan hacia la cápsula interna. Es ahí donde, los axones se compactan y forman el fascículo corticoespinal, el cual desciende hasta el bulbo raquídeo. Allí, se da lugar la decusación de la vía para continuar hasta la médula espinal, donde hace relevo con las neuronas motoras inferiores (NMI) en el asta anterior. Con los nervios craneales sucede un proceso similar, con la diferencia que esta información viaja por el fascículo corticobulbar y termina en los grupos nucleares del tallo (Uribe Olivares, 2018).

Las NMI se localizan en el asta anterior de la médula espinal y en los núcleos de los nervios craneales, como anteriormente se menciona, sus axones se extienden fuera del sistema nervioso central para inervar las fibras musculares, llegando a la placa neuromuscular y formando la unidad motora (Dabaj et al., 2024). A continuación, en la *figura 1*, se pueden observar las diferentes enfermedades neuromusculares y su localización dependiendo de que parte se vea afectada.

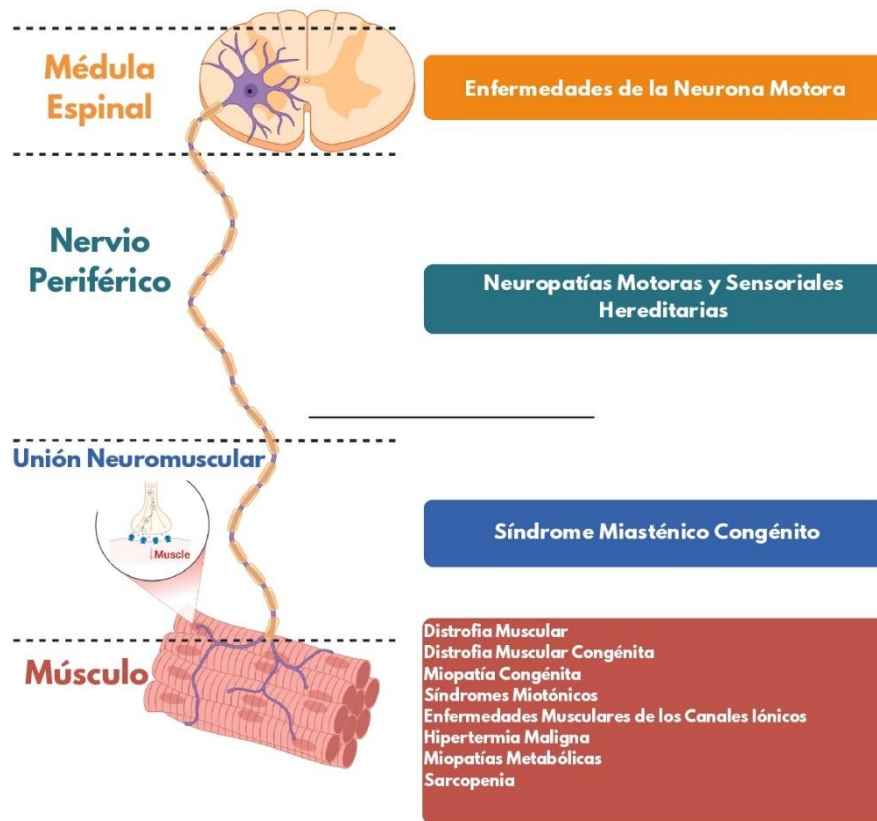
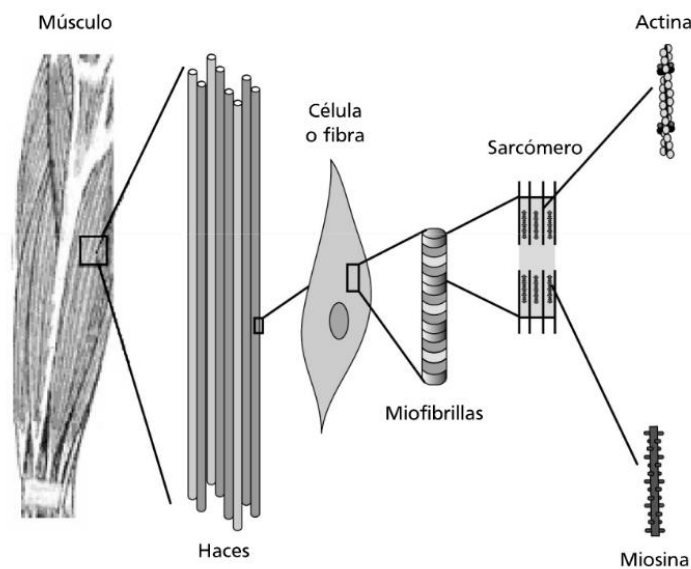


Figura 1. Relación entre enfermedades neuromusculares y la región de la vía motora afectada. Tomada de: Neuromuscular disorders in the omics era, Dabaj, I., Ducatez, F., Marret, S., Bekri, S., & Tebani, A. (2024). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 553, 117691.

Las fibras musculares son las células musculares, a las cuales su membrana citoplasmática se les denomina sarcolema. Cada fibra está compuesta por unidades funcionales más pequeñas llamadas miofibrillas, estas a su vez están compuestas por 200 a 300 sarcómeros. Estas fibras musculares están separadas unas de otras por una capa fina de tejido conectivo llamado endomisio. Asimismo, un número variable de fibras musculares (y el endomisio), alrededor de 150 fibras, se unen formando un haz de fibras. Los diferentes haces de fibras musculares o fascículos se encuentran separados por el perimisio. Finalmente, un conjunto de haces de fibras forma el músculo (*figura 2*), el cual



se encuentra rodeado por el epimisio (Minuchin, 2011).

Figura 2. Estructura jerárquica del músculo esquelético. Tomada de: *Fisiología del ejercicio II: sistemas cardiorrespiratorio, muscular, sanguíneo y nervioso*: (ed.). Minuchin, P. S. (2011). Editorial Nobuko.

Por lo tanto, la unidad motora es la unidad funcional constituida por la neurona y las fibras musculares a las que inerva (Minuchin, 2011). Un músculo se encuentra innervado por entre 100 y 200 neuronas motoras, músculos más grandes necesitan mayor números de ellas (Dabaj et al., 2024). Las uniones neuromusculares o sinapsis están compuestas por la zona presináptica, correspondiente al terminal nervioso de la neurona motora y una zona postsináptica, perteneciente a la fibra muscular (*figura 3*). Durante la contracción muscular, el potencial de acción muscular desencadena un ciclo de

excitación-contracción-relajación, que provoca la contracción y posterior relajación de la fibra muscular (Dabaj et al., 2024).

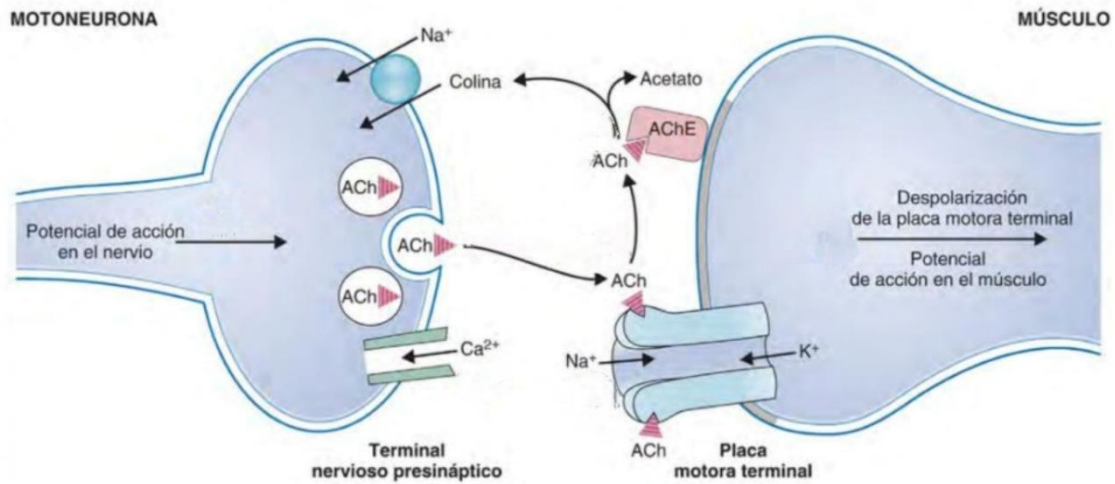


Figura 3. Unión Neuromuscular-Sinapsis entre la neurona motora y el músculo.

El potencial de acción viaja por la neurona motora hacia el terminal presináptico, provocando una despolarización que abre los canales de Ca^{2+} y permitiendo su entrada. Este movimiento de iones provoca la salida de acetilcolina (ACh) por exocitosis a la hendidura sináptica. La ACh se une a los receptores en la placa motora terminal (zona postsináptica), provocando la apertura de los canales de Na^+ y K^+ . Este movimiento de iones provoca en la placa motora terminal su despolarización, causando así la generación del potenciales de acción en el tejido muscular adyacente. La ACh se degrada a colina y acetato por la acetilcolinesterasa (AChE) y la colina se reabsorbe por parte del terminal presináptico en un cotransportador de Na^+ -colina. Tomada de: Fisiología (7.^a ed.). Elsevier España. Costanzo, L. S. (2023). ISBN-13: 978-84-1382-381-2

Para facilitar un mejor diagnóstico, las enfermedades neuromusculares se encuentran clasificadas. La clasificación puede basarse en su origen genético o en la localización de la disfunción. La clasificación es:

1. **ENM que afectan a las células del asta anterior.** La mejor definición para este grupo de ENM es la atrofia muscular espinal (AME), ya que es la más típica y esclarecedora. AME es una enfermedad autosómica recesiva en la cual se encuentran afectados los genes que codifican para la proteína de neurona motora de supervivencia (NMS) NMS1 y NMS2, ubicados en el cromosoma 5 del brazo largo. Esta alteración provoca la disminución o ausencia de concentración de la

proteína de la neurona motora de supervivencia. Dicha degradación provoca debilidad muscular y un deterioro secundario de moderado a grave. Existen cinco subtipos que se basan en la edad de inicio y la severidad de los síntomas (Mary et al., 2018).

2. **Neuropatías periféricas.** Son las enfermedades que afectan a los nervios fuera del cerebro y la médula espinal, causando alteraciones en la transmisión de señales entre el sistema nervioso central y el resto del cuerpo. Unos ejemplos de esta categoría son: las neuropatías motoras hereditarias distales (NMHd), formado por un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la aparición en la infancia de una neuropatía sensoriomotora; y la neuropatía motora y sensorial hereditaria (CMT). En este caso, el tipo de neuropatía abarca una gama de afecciones caracterizadas por polineuropatía motora y sensitiva, predominante en las extremidades inferiores distales. Los primeros síntomas comienzan sobre los diez años (Dabaj et al., 2024).
3. **ENM ejercen su acción en las uniones neuromusculares:** son trastornos en los que se altera la transmisión del impulso nervioso entre la neurona motora y la fibra muscular en la placa motora. Por lo tanto, existe una interferencia en la comunicación entre nervio y músculo, provocando debilidad y fatiga muscular. En este grupo destaca la miastenia gravis (MG). Afecta al músculo estriado, provocando debilidad muscular esta varía con el paso del tiempo y empeora con la actividad física. Los músculos extraoculares y los músculos inervados por el bulbo raquídeo se encuentran comprometidos, así como a su vez, el aparato locomotor (Iolascon et al., 2019).
4. **ENM que se inciden en la estructura del músculo esquelético:** en esta clasificación las ENM suelen ser patologías genéticas o adquiridas que afectan directamente a la integridad y función del tejido muscular (Iolascon et al., 2019). El síntoma característico es debilidad muscular progresiva. Las enfermedades más destacada son la distrofia muscular de Duchenne (DMD), que afecta a todos los músculos del cuerpo y está ligada al cromosoma X con carácter recesivo; o la distrofia muscular de Becker (DMB), también afecta al cromosoma X, aunque es capaz de producir la distrofina, pero es anormal y daña las células musculares (Dabaj et al., 2024).

5. **Miopatías metabólicas:** es un grupo muy heterogéneo, en el que se encuentra una disrupción en almacenamiento de colágeno, la vía glucolítica y en el metabolismo lipídico
6. **Sarcopenia:** es una enfermedad neuromuscular, que se define por la progresiva pérdida de masa muscular, fuerza y funcionamiento de los músculos en personas de avanzada edad (Aparicio et al., 2024).

Por todo lo anterior, la comunidad científica se encuentra en la búsqueda de herramientas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades neuromusculares. Para ello, es esencial disponer de biomarcadores para identificar la enfermedad y monitorizar su evolución o la respuesta al tratamiento de cada paciente. Los biomarcadores son “una medida objetiva y cuantificable de un proceso fisiológico, un proceso patológico o una respuesta a un tratamiento (excluidas las mediciones de cómo se siente o funciona un individuo)” según lo definido por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 2025. De entre los posibles biomarcadores, los exosomas han tomado protagonismo en los últimos años debido al descubrimiento de su participación en la comunicación intercelular, y en sus diversos procesos fisiológicos y patológicos.

Los exosomas son vesículas extracelulares (VEs) producidas por las células eucarióticas, que se secretan y liberan al medio extracelular por casi todas las poblaciones de células (Gurung et al., 2021). Dichas vesículas poseen una bicapa lipídica con una composición específica; esta característica, junto con su pequeño tamaño (entre 30 y 150 nm), les confiere la capacidad de cruzar cualquier membrana biológica, incluida la barrera hematoencefálica (Shao et al., 2024).

El proceso de biogénesis de exosomas comienza con una curvatura de la membrana plasmática (MP), la cual es necesaria para iniciar la endocitosis. Durante esta invaginación, tanto proteínas de la MP como proteínas solubles del entorno extracelular quedan atrapadas, dando lugar a la formación del endosoma temprano. Este paso inicial depende de proteínas multiméricas como clatrina y caveolina, así como de la distribución asimétrica de lípidos, en particular ceramida y colesterol.

A partir del endosoma temprano, se generan vesículas intraluminales (VILs) mediante la invaginación de su membrana limitante. En esta etapa, el endosoma se denomina cuerpo multivesicular (MVB). Este proceso puede llevarse a cabo a través de una vía dependiente del complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) o de una vía independiente de ESCRT (Lai et al., 2022).

El aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (RE) también desempeñan un papel en la biogénesis de VILs, influyendo tanto en su carga como en su destino. En particular, la interacción entre los MVB y el RE regula si los MVB se dirigen a la degradación lisosomal o a la fusión con la MP para la liberación de exosomas. Cuando el destino de los MVB es la secreción, las proteínas Rab facilitan su transporte hacia la MP, donde las proteínas SNARE median la fusión de membranas, lo que finalmente permite la liberación de exosomas (Arya et al., 2023).

Por lo tanto, la biogénesis de exosomas puede dividirse en cuatro procesos (*figura 4*): 1) invaginación de la MP, 2) formación del endosoma temprano, 3) desarrollo de MVB y 4) fusión de los MVB con la MP que conduce a la liberación de exosomas en el espacio extracelular (Shao et al., 2024).

La vía descrita anteriormente se considera la vía canónica; sin embargo, existen rutas alternativas para la formación de MVB que también dan lugar a exosomas. Por ejemplo, vesículas mitocondriales de doble membrana pueden fusionarse con MVB canónicos durante la homeostasis, lo que provoca la liberación de exosomas que contienen ADN mitocondrial junto con exosomas canónicos. Otro ejemplo ocurre durante la apoptosis, en la cual se secretan exosomas de tipo apoptótico (Arya et al., 2023)

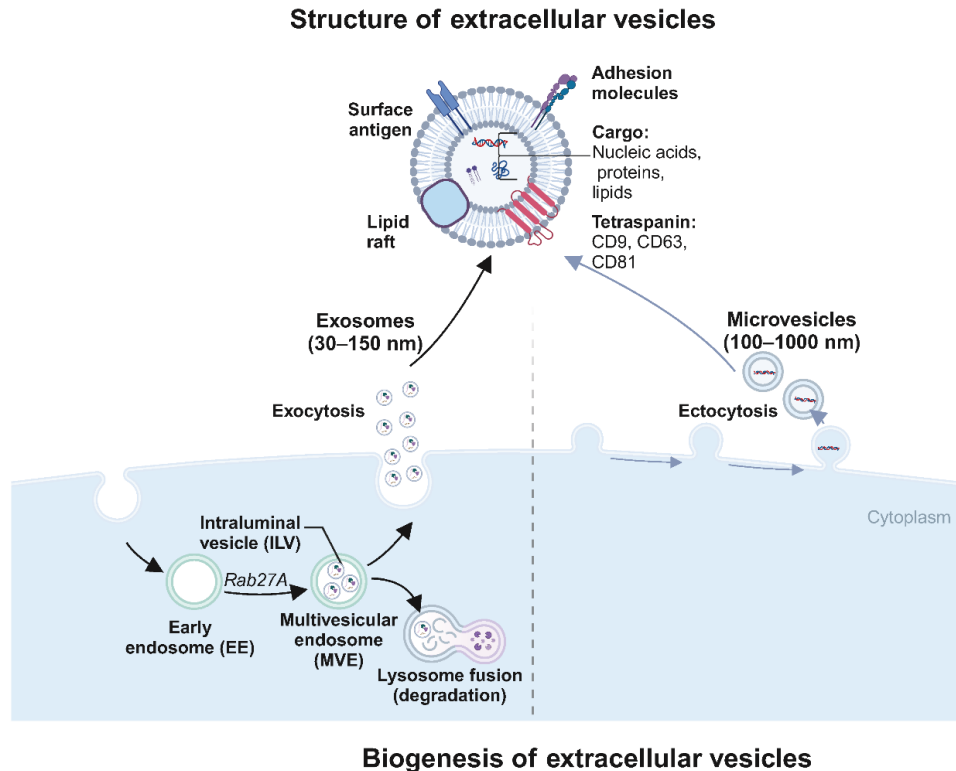
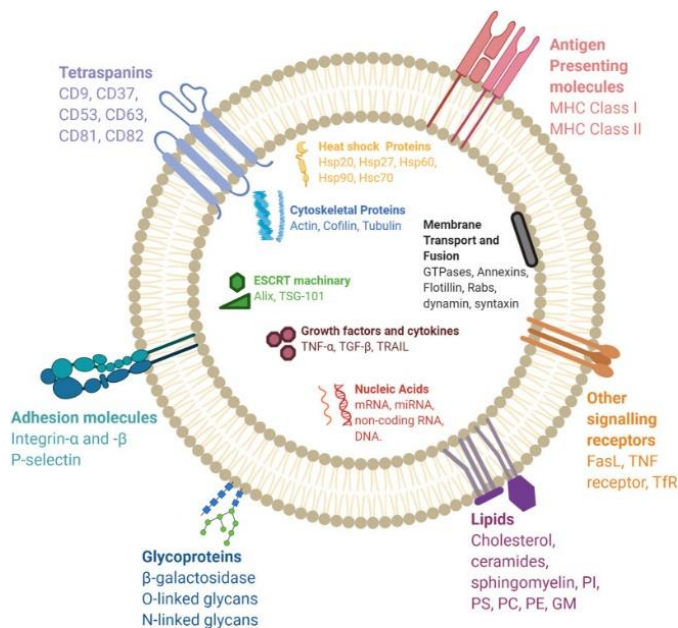


Figura 4. Estructura y Biogénesis de los Exosomas. Fuente: *Exosomes: Key Factors in Ovarian Cancer Peritoneal Metastasis and Drug*

Resistance. Biomolecules, 14(9), 1099. Shao, M., Gao, Y., Xu, X., Chan, D. W., & Du, J. (2024).

La composición bioquímica de los exosomas es característica y puede variar según las condiciones celulares, el estado fisiológico del individuo o durante una patología. Este hecho permite una detección y aislamiento de subtipos de exosomas basados en diferentes propiedades. Los exosomas pueden contener:

- **Proteínas:** las más características son las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81, se encuentran en la membrana del exosoma y tienen funciones como la fusión de la membrana, señalización y tráfico de proteínas. Además, se pueden encontrar en la membrana otros tipos de proteínas como integrina alfa, moléculas presentadoras de antígeno de MHC clase I y II (Lai et al., 2022).
- **Ácidos nucleicos:** la composición de ARN y ADN en los exosomas refleja el estado de la célula parental. Los ácidos nucleicos presentes en los exosomas incluyen ADN, ARNm, ARN no codificante, microARN y ARN mitocondrial. Por ejemplo, los microARN desempeñan un papel fundamental en procesos como la exocitosis, la hematopoyesis y la angiogénesis. Otros tipos de ARN, como el ARN nuclear pequeño, el ARN ribosomal y el ARN no codificante largo, entre otros, se asocian con el desarrollo tumoral (Gurung et al., 2021)
- **Lípidos:** no se encuentran tan caracterizados, pero se han identificado más de 100 diferentes en las membranas de los exosomas. Los más comunes son el colesterol, la fosfatidilcolina y la esfingomielina, y sus derivados. Cuando el contenido de esfingomielina y colesterol en la membrana plasmática es mayor que el existente en sus células progenitoras, contribuye a una mayor rigidez en los exosomas. Lo que puede conferirle una resistencia a su degradación y por ello, que sea eficaz en el transporte de proteínas y ácido nucleicos (Lai et al., 2022).



En la figura 5, se puede observar de manera más visual la composición más completa de los exosomas.

Figura 5. Composición de los exosomas. Nota: Figura extraída de *The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling*, Gurung, S., 2021, *Cell communication and signaling: CCS*, 19(1), 47.

Las funciones de los exosomas abarcan varias vías biológicas dentro de la comunicación intercelular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Esta comunicación está mediada con las proteínas en la membrana, las cuales tienen un rol en la activación y supresión del sistema inmune y pueden modular la respuesta inmunitaria a través de la presentación de antígenos en sus superficies. Y también, con el suministro de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos a células diana (Lai et al., 2022).

Un ejemplo de la funcionalidad se ha comprobado en el sistema del músculo esquelético, en el que los exosomas participan en la miogénesis mediada por células madre, proporcionando señales bioquímicas para la regeneración muscular, síntesis proteica e hipertrofia (Lai et al., 2022).

En un estudio reciente de nuestro equipo, se ha demostrado que los pacientes con sarcopenia cuentan con vesículas extracelulares portando proteínas específicas (PF4 y CIR) y que se encuentran relacionadas con el metabolismo del calcio y el colágeno, la respuesta inmune y la inflamación. Esta relación, está ligada a la fisiopatología de la enfermedad y presenta la posibilidad de utilizar estas proteínas específicas como biomarcadores de diagnóstico (Lai et al., 2022).

Por último, quiero destacar que los exosomas comprenden un nuevo campo en la biología celular y molecular. Por su importante rol en la comunicación celular, la posibilidad de estudiar sus funciones fisiológicas y patológicas y la información de la célula de la cual provienen. Los exosomas han emergido como candidatos para la próxima generación de estrategias diagnósticas y terapéuticas dentro de la biología celular.

Hipótesis y Objetivos

Con estos antecedentes, el proyecto “Neuroxome” plantea la hipótesis de que existe un tráfico basado en exosomas entre las neuronas motoras y el músculo esquelético y que las alteraciones que se observan en enfermedades neuromusculares, como la sarcopenia, pueden derivar de los fallos en dicha comunicación. En el proyecto se plantea que los exosomas liberados desde las neuronas motoras son potenciales biomarcadores y están implicados en mecanismos patológicos en enfermedades neuromusculares.

En este contexto, la hipótesis de este Trabajo Final de Grado plantea la existencia de la liberación activa de exosomas por parte de las neuronas motoras y que dichos exosomas son capaces de ser internalizados por las células musculares.

Para corroborar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar las poblaciones de exosomas liberados por las neuronas motoras al medio extracelular. Para ello se utilizará la línea celular NSC-34 y se medirá la concentración, morfología, el tamaño y las diferentes poblaciones de los exosomas determinadas por la presencia de marcadores proteicos específicos.
- Demostrar la internalización de los exosomas obtenidos de las neuronas motoras (línea celular NSC-34) por parte de las células musculares (línea celular C2C12) y su localización dentro del citoplasma.
- Desarrollar un sistema de co-cultivo *in vitro* de las células neuronales motoras (NSC-34) y las células musculares (C2C12) donde se generen conexiones neuromusculares, con la finalidad de estudiar las interacciones entre las dos líneas celulares en tiempo real.

Metodología

Líneas celulares modelo de neurona motora y músculo

Mantenimiento de las líneas

Para llevar a cabo los diferentes objetivos, el principal trabajo se ha realizado mediante cultivos celulares, en los cuales se han utilizado dos líneas celulares, C2C12 y NSC-34 como modelo de células musculares y células neuronales motoras, respectivamente.

La línea C2C12 (*Cytion*, EE. UU., 400476) es una línea celular de mioblastos, específicamente un subclon de mioblastos de ratón, la cual se diferencia rápidamente, formando miotubos contráctiles y produciendo proteínas musculares características.

La línea NSC-34 (*Cederlane*, Canadá, CLU140) es una línea celular híbrida, producida por la fusión de células embrionarias de médula espinal de ratón enriquecidas con neuronas motoras con células inmortales de neuroblastoma de ratón.

Con el propósito de utilizar las líneas celulares crio-conservadas, éstas fueron previamente descongeladas. Una vez extraídas del nitrógeno líquido, se introdujeron en el baño termostático a 37 °C durante unos breves segundos. A continuación, se transfirió 1 mL de cada línea celular a un tubo cónico de 15 mL que contenía 9 mL de medio de crecimiento. Dicho medio es común para ambas y se componía de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (*Sigma Aldrich*, Alemania, D5796) suplementado con 20% suero fetal bovino (FBS) (*Gibco-ThermoFisher*, EE. UU., A5256701) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (*Sigma Aldrich*, Alemania, P0781). Posteriormente, en el caso de las células C2C12 se realizó una centrifugación a 4 °C, 1180 g durante 5 minutos. Este paso se realizó para eliminar los restos de dimetilsulfóxido (DMSO) un criopreservante (*Sigma-Aldrich*, Alemania, D2650), ya que a temperatura ambiente es tóxico para la celular, aunque es utilizado para evitar la formación de cristales de hielo en el interior celular a la hora de la congelación. Una vez finalizada la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet, que contenía las células, en 0,5-1 mL (dependiendo del volumen del pellet) de medio de crecimiento. Por último, se añadieron entre 10-12 mL de medio de crecimiento más, se homogenizó y se añadió a un frasco de 75 cm², que previamente había sido rotulado con el nombre de la línea celular, fecha y nombre del estudiante. La cantidad de células añadidas se adaptó al tamaño del frasco, para ello se realizó un recuento de las células en la cámara de Neubauer.

Por otra parte, en el caso de la línea NSC-34, la suspensión celular se añadió directamente a un frasco de 25 cm^2 , seguido de un periodo de incubación de 6 horas, a 37 °C y con una atmósfera de 5% CO₂. Pasado este tiempo, se comprobó que las células se habían adherido correctamente al fondo del frasco y se procedió a realizar un cambio con medio de crecimiento (5 mL).

Una vez establecidos los cultivos, en ambos tipos celulares para el mantenimiento de las células se utilizó un medio de crecimiento compuesto por DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS y 1% de P/S. Este medio se denominó medio de crecimiento 10% FBS.

Para evitar el sobrecrecimiento de las células en las dos líneas celulares, cuando la confluencia era superior a 80% se despegaron del frasco mediante la incubación con tripsina (Sigma Aldrich, Alemania, T4049). Para el tratamiento con tripsina, previamente se realizó un lavado con “phosphate-buffered saline” (PBS), para eliminar los restos del medio. A continuación, se añadió 8 mL de tripsina, el periodo de incubación para las células C2C12 fue de 5 minutos a 37° C y para las células NSC-34 fue de un minuto a 37 °C. Después, se añadió medio de crecimiento 10% FBS para parar la reacción y se procedió a su centrifugación a 1180 g, durante 5 minutos a 4 °C. Una vez, finalizó la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con medio de crecimiento, dependiendo de la cantidad de pellet se resuspendían con 3-5 mL y se añadía un tercio de la suspensión a un frasco nuevo, este previamente tenía 12 mL de medio de crecimiento 10% FBS.

Con la finalidad de cumplir objetivos se indujo la diferenciación de las líneas celulares NSC-34 y C2C12 a neurona motora y músculo maduro, respectivamente. El protocolo varió en función de la línea celular empleada, y si se realiza de forma individual o en co-cultivo.

Diferenciación de la línea celular NSC-34

Para el comienzo de la diferenciación de las células NSC-34, se contaron las células mediante el uso de una cámara de Neubauer, ya que se quería añadir 5000 *células/cm²*. Previamente al conteo se separaron las células de los frascos fuente mediante tripsina. A continuación, se añadió el medio de crecimiento 10% FBS a la placa de cultivo, la cual era diferente según el objetivo del experimento, por ejemplo, para la internalización de exosomas se usaron placas de cultivo de 8 pocillos. También, se

añadieron la cantidad correspondiente de células en función del formato del recipiente del cultivo. Después de 24 horas, se sustituyó el medio por un medio de diferenciación de neuronas, compuesto por DMEM F-12 (*Gibco-Thermo Fisher*, EE. UU, 11320033) y suplementado con 0,5% FBS, 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) (*Gibco-Thermo Fisher*, EE. UU, 11140050), 1% P/S y 10 μM de ácido retinoico (*Sigma Aldrich*, Alemania, R2625), que debía de añadirse inmediatamente antes de su utilización. Las células se mantuvieron en diferenciación durante 11 días, considerando día cero el día del sembrado y día uno el del primer cambio a medio de diferenciación neuronal. El medio de diferenciación neuronal se renovó cada 48 horas.

Para los experimentos cuyo objetivo era la recolección de exosomas liberados por las neuronas motoras al medio extracelular, el protocolo se modificó en el último paso de la siguiente forma: en el último cambio de medio de cultivo (día 9) se sustituyó el FBS por un FBS sin exosomas (*Gibco-ThermoFisher*, EE.UU., A2720803), realizando previamente un lavado con PBS. Esto es debido a que, como anteriormente se ha mencionado, los exosomas son vesículas extracelulares que se secretan y se liberan al medio extracelular por diferentes poblaciones de células. Por ello, el propio FBS contiene exosomas procedentes del feto bovino y si se usara en estos experimentos estaríamos recolectando exosomas de una procedencia diferente a la de las neuronas. Por lo tanto, se usó un FBS que ha sido tratado para la eliminación de los exosomas.

Diferenciación de la línea celular C2C12

La finalidad de la diferenciación de las células C2C12 fue obtener miotubos, es decir, células musculares maduras que se asemejen lo máximo posible al tejido *in vivo*. Para ello, se comenzó con la siembra de las células C2C12 en la placa o frasco de cultivo que fuéramos a utilizar. La densidad celular que utilizamos fue de 10 000 células/ cm^2 o 5000 células/ cm^2 dependiendo de la confluencia deseada en la experimentación. Como anteriormente he explicado, se separaron las células del frasco fuente mediante tripsina y, seguidamente, fueron contadas en la cámara de Neubauer para añadir así la cantidad correcta. Las células C2C12 se sembraron en el medio de crecimiento 10% FBS, descrito con anterioridad al comienzo del apartado, y se mantuvieron durante 24 horas, para una correcta adhesión de las células. El día del sembrado se considera día cero. Al

día siguiente, se sustituyó el medio de crecimiento por un medio de diferenciación muscular, compuesto por DMEM alta glucosa suplementado con 2% suero de caballo (HS) (*Pan Biotech*, Alemania, P30-0702) y 1% de P/S. El proceso de diferenciación se llevó a cabo durante cinco días, a partir del primer cambio de medio, realizándose una sustitución de este cada 48 horas.

Inmunocitoquímica de las neuronas motoras diferenciadas

Con la finalidad de observar la diferenciación de la línea celular NSC-34, se realizaron inmunocitoquímica para detectar proteínas específicas que actúan como marcadores de diferenciación neuronal en estas células.

En primer lugar, se fijaron las células. Las células de la neurona motora se encontraban diferenciadas en una placa de cultivo de ocho pocillos (*Sigma Aldrich*, Alemania, CLS354118). El protocolo de fijación consistió en retirar el medio, lavar con PBS dos veces e incubar con paraformaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se retiró el paraformaldehído y lavó con PBS dos veces, dejándolo reposar cinco minutos, y, por último, dejar con PBS. Posteriormente, se realizó la permeabilización de las células con una solución de PBS-0,3% (v/v) de Tritón X-100 (*Sigma Aldrich*, Alemania, T9284) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este paso es determinante, ya que la permeabilización permite que los poros de la membrana se abran y los anticuerpos puedan unirse a proteínas localizadas en el citoplasma, núcleo, mitocondrias u otros compartimentos.

Después, se realizaron tres lavados con PBS, dejándolo reposar durante 5 minutos cada uno. A continuación, se realizó una incubación de 30 minutos con solución de bloqueo (PBS-3% BSA (*Sigma Aldrich*, Alemania, 47036-50G-F)), este paso se realizó para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, saturando los sitios no específicos de unión. Seguidamente, se añadieron los anticuerpos primarios mencionados en la tabla X. La dilución del anticuerpo se realizó en la solución de bloqueo. Se dejó incubando durante toda la noche a una temperatura de 4 °C en una cámara húmeda, la cual se utiliza para mantener las condiciones de humedad y evitar que las soluciones se evaporen durante el periodo de incubación. Al día siguiente, se retiraron y se realizaron tres lavados con PBS con una duración de cinco minutos cada uno. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario compatible con cada anticuerpo primario, la dilución se realizó también con solución de bloqueo) (Tabla X). Los anticuerpos secundarios se dejaron incubando

durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Por último, se retiraron los anticuerpos secundarios y se lavó tres veces con PBS.

En todas las inmunocitoquímicas, se realizó como paso final una tinción con “4,6-diamidino-2-fenilindol” (DAPI) (Molecular Probes, EE. UU, D3571), la cual consistió en una dilución de DAPI 1/1000 (respecto al stock) con solución de bloqueo y una incubación de cinco minutos a temperatura ambiente. El DAPI un colorante fluorescente azul que se utilizó para marcar los núcleos celulares, ya que se une específicamente a regiones ricas en adenina y timina del ADN (Jiang et al., 2023).

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la línea celular NSC-34 se especifican en la *tabla 1*.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios para inmunocitoquímica de la línea celular NSC-34.

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
Colina acetiltransferasa (ChAT)	AB144P goat Anti-ChAT (70 kDa)	1/200	A488 DαD (Donkey anti-goat)	1/500
Factor de transcripción del islote-1 (ISLET-1)	Sc-390793 IgG mouse ISLET-1 (45 kDa)	1/200	488 goat anti-mouse IgG1 A21121	1/500

Finalmente, se realizó un último lavado con agua estéril (*Sigma Aldrich*, Alemania, 4.86505) y se añadió el medio de montaje (*Vectashield*, EE. UU, H-1000). Hay que destacar que se hicieron controles negativos, es decir, sin anticuerpo primario y se trataron igual que las demás muestras.

Una vez, finalizado todo el procedimiento las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia

Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) de neuronas motoras diferenciadas

La funcionalidad de realizar una qPCR era confirmar que las células NSC-34 han sido correctamente diferenciadas a neuronas motoras.

Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión génica de ChAT, “homeobox protein” (HB9), Islet-1, factor de transcripción (Islet-2), marcadores de las neuronas motoras, y como gen de referencia se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (*tabla 2*).

Se emplearon en este experimento células NSC-34 diferenciadas en neuronas motoras, como se menciona en el apartado “diferenciación de la línea celular NSC-34”. Estas células procedían de la experimentación de la recolección de exosomas, y la qPCR se realizó para certificar que estos provienen de unas células maduras. Se utilizaron células NSC-34 no diferenciadas como control. Por lo tanto, las condiciones fueron neurona motoras diferenciadas y neuronas motoras no diferenciadas, y se hicieron tres réplicas de cada condición.

Una vez diferenciadas o no las células, se procedió a la extracción del ARN utilizando Direct-zol RNA Miniprep Kits (*Zymo Research*, EE. UU., R2052), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó y se determinó su pureza mediante el espectrofotómetro *NanoDrop* (*ThermoFisher*, EE. UU.). Dicha pureza viene determinada por dos índices: la relación A260/A280, la cual indica si hay contaminación por proteínas en la muestra y que debe tener un valor entre 1,8 y 2; y la relación A260/230, que refleja si hay contaminación de polifenoles y su valor debe encontrarse entre 1,4 y 2. Una vez se confirmó la concentración y la calidad de pureza del ARN, se calculó la dilución necesaria para obtener una cantidad final de 500 ng de ARN. Para la dilución se utilizó agua libre de DNasas/RNasas.

A continuación, se realizó la retrotranscripción, para la cual se utilizó el reactivo qScript (*Quantabio*, EE. UU., 66259580). Esta reacción se lleva a cabo en el termociclador (con las siguientes condiciones: 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C y conservación final a 4 °C). El objetivo de proceso fue convertir el ARN en ADN complementario (ADNc) para poder amplificarlo y cuantificarlo, ya que la ADN polimerasa utilizada en la qPCR solo amplifica ADN.

Seguidamente, con la muestra de ADNc se procedió a realizar la qPCR. Para ella se utilizaron cebadores diseñados para amplificar los genes anteriormente mencionados. Además, se utilizó SYBR Green (*Appliedbiosystems*, EE. UU., 4385612) para la amplificación, un colorante fluorescente que se une al surco pequeño del ADN. Las condiciones del termociclador (*QuantStudio 3, ThermoFisher Scientific*, EE. UU.) fueron

95 °C durante 20 segundos, 3 segundos a 95 °C y 60 °C durante 30 segundos. Se realizaron 40 ciclos.

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizados en qPCR. Los cebadores procedían de la marca *Invitrogen*, EE. UU.

Cebadores		Secuencia
ChAT	Sentido	5'-CCA ACC AAG CCA AGC AAT CT-3'
	Antisentido	5'-AAG GAT AGG GGA GCA GCA ACA A-3'
HB9	Sentido	5'-CGC TCA TGC TCA CCG AGA CT- 3'
	Antisentido	5'-TTC TCC TCA CTG CCG CCT TT-3'
ISL-1	Sentido	5'-CTG AGG GTT TCT CCG GAT TT-3'
	Antisentido	5'-TGA AGC CTA TGC TGC ACT TG-3'
ISL-2	Sentido	5'-CAG ATC CAC GAC CAG TT ATC C-3'
	Antisentido	5'-GAT GCC GAA CAG CCT GAC G 3'
GADPH	Sentido	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'
	Antisentido	5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'

Finalmente, una vez se obtuvieron los resultados se procedió al análisis y normalización de los datos para evaluar la expresión génica diferencial entre las células control (NSC-34 no diferenciadas) y las células NSC-34 diferenciadas. La normalización de datos se hizo mediante el método 2^(-delta delta Ct) y el análisis estadístico se realizó con el test t Student, que compara dos grupos, con un nivel de significación de p<0,05.

El método 2^(-delta delta CT) se utilizó para analizar la expresión relativa de los genes de interés en comparación con el gen de referencia GADPH y normalizarlo con respecto a una muestra control. Se calculó la diferencia del Ct entre el gen de interés y el gen de referencia para cada muestra (ΔCt), luego se resta el ΔCt de la muestra control ($\Delta\Delta Ct$). Finalmente, el cambio relativo en la expresión génica se obtiene con la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Rao et al., 2013).

Establecimiento de un sistema de co-cultivo entre la línea celular C2C12 y la línea celular NSC-34

El objetivo principal de este co-cultivo celular fue observar la formación de uniones neuromusculares para certificar la comunicación mediante exosomas existente entre ambas líneas celulares. El protocolo fue extraído del conjunto de dos artículos “*Neuromuscular Junction Model Optimized for Electric Platforms*” (Solomon et al., 2021) y “*Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the in vitro*” (Inoue et al., 2021). Este comenzó con la siembra de las células C2C12 en placas de cultivo a una densidad celular de 5000 células/cm².

La siembra se realizó con el medio de crecimiento 10% FBS, que se mantuvo durante 24 horas. Al día siguiente (día uno), se reemplazó por el medio de diferenciación muscular, detallado en el apartado “*diferenciación de la línea celular C2C12*”, dicho medio se mantuvo durante cuatro días y se sustituyó cada 48 horas. Como en los casos previos, se consideró el día la siembra de las células y el día uno cuando se realiza el primer cambio al medio de diferenciación.

En el día cinco, se llevó a cabo la siembra de las células NSC-34 en los pocillos que contienen las células C2C12 diferenciadas, con una densidad celular de 5000 células/cm². A partir de este momento, se utilizó el medio de co-cultivo compuesto por DMEM F-12 suplementado con 2% de HS, 1% de NEAA y 1% P/S. Dicho medio se mantuvo durante ocho días, es decir, hasta el día 13 de experimentación, realizándose un cambio de medio cada 48 horas.

Marcaje y visualización de la formación de uniones neuromusculares

Una vez se finalizó el co-cultivo, se procedió a su fijación, usando el paraformaldehído con una incubación de 15 minutos.

Al finalizar la fijación se realizó la inmunocitoquímica, para la cual se utilizó un anticuerpo primario, monoclonal anti-neurofilamento (*Sigma Aldrich*, Alemania, N0142), con unión específica a los neurofilamentos, los cuales son elementos estructurales clave del citoesqueleto neuronal y principalmente en los axones, y anticuerpo secundario Goat-Antimouse IgG1 488 (*ThermoFisher*, EE. UU, A21121). Para las células C2C12 se utilizó la bungarotoxina (*Biotium*, EE. UU, BTIU00012), que se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina.

Una vez fijadas las células se procedió a su permeabilización con PBS-0,3 (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich, Alemania, T-9284) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se lavó con PBS tres veces, dejando reposar durante cinco minutos. Seguidamente, se realizó una incubación de 30 minutos con la solución de bloqueo (PBS-3% BSA) a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se retiró la solución de bloqueo y se procedió a añadir el anticuerpo primario, anti-neurofilamento, diluido 1:500 con la solución de bloqueo y la bungarotoxina, para la cual se utiliza una dilución de 1µL por 1 mL, ya que el stock se encuentra con una concentración de 1000 µg/mL (1000X). El anticuerpo primario y la toxina se incubaron durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se retiró la solución y se realizaron tras lavados de PBS con una duración de cinco minutos cada uno. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario Goat-Antimouse IgG1 488 en una dilución 1:200 (con solución de bloqueo) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras finalizar el tiempo, se retiró y se lavó dos veces con PBS durante cinco minutos cada una.

También se realizó una tinción con DAPI, con dilución 1:1000 respecto al stock en solución de bloqueo e incubación durante cinco minutos. Finalmente, se realizó un lavado con agua estéril y se añadió el medio de montaje para su visualización en el microscopio de fluorescencia.

Cabe destacar que se realizó un control negativo que consistió en la ausencia del anticuerpo primario, se utilizó un pocillo en la misma placa que se realizó todo el marcaje. Los pocillos que fueron control negativo se realizaron bajo las mismas condiciones que las demás muestras.

Exosomas

Los exosomas son el eje principal de este trabajo final de grado, así como una de las partes más delicadas de la metodología. Esto se debe a su pequeño tamaño y al limitado conocimiento existente sobre ellos en la actualidad, ya que hay diversas formas de obtenerlos.

Aislamiento y purificación de exosomas obtenido de las neuronas motoras (NSC-34)

Como se menciona en el apartado de la hipótesis, el objetivo fue caracterizar los exosomas liberados por neuronas motoras. El primer paso para ello fue su recolección. Una vez se han diferenciado las células NSC-34, en el último día (día 11) de diferenciación, se procedió a recoger el medio de cultivo en contacto con las células, donde se encuentran los exosomas. A este medio se le denomina medio condicionado. A continuación, se siguieron los pasos incluidos en el protocolo de la columna cromatográfica por exclusión de tamaño (SEC), PURE-EVS (*HansaBioMed*, Estonia, HBM-PEV-P5) para el tratamiento de la muestra, así como para todo el proceso. Brevemente, el primer paso consistió en una centrifugación del medio condicionado en un tubo cónico a 300 g, 4 °C durante 10 minutos. Una vez acabada, se descartó el pellet, que puede contener restos celulares o posibles contaminantes, y se conservó el sobrenadante, que se volvió a centrifugar a 1200 g, 4 °C durante 20 minutos, con el objetivo de eliminar restos celulares más pequeños.

Posteriormente, para obtener la cantidad indicada en el protocolo, se realizó una centrifugación en un tubo con filtro de 100 kDa (*Sigma Aldrich*, Alemania, UFC910024). Previamente a su uso, el filtro se lavó con PBS. La centrifugación fue a 2000g, 4 °C y durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se descartó la fracción que pasa a través del filtro (filtrado) y se conservó el volumen retenido. Este paso se repitió hasta conseguir un volumen final de 2 mL. Mientras se realizaba este proceso se preparó la columna cromatográfica para su uso, la cual se limpió con 30 mL de PBS y se dejó eludir el PBS, con precaución para evitar secar la columna.

Posteriormente, se añadieron los 2 mL de medio condicionado concentrado y se recogieron 24 fracciones de 500 µL (*figura 6*). La fase móvil fue PBS y se añadió alrededor de 20 mL. Una vez se habían obtenido las fracciones, la columna se lavó nuevamente con 20 mL de PBS y se guardó con este mismo buffer hasta su nuevo uso.

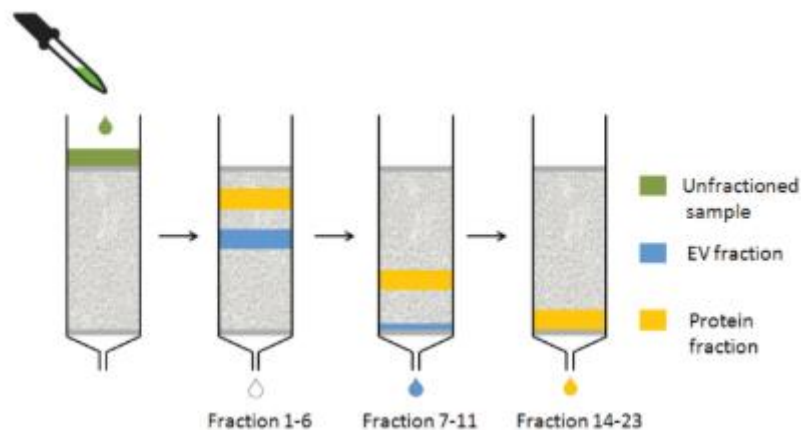


Figura 6. Esquema del sistema de cromatografía por exclusión de tamaño utilizado para el aislamiento y purificación de los exosomas. Imagen obtenida del protocolo PURE-EVS (*HansaBioMed*, Estonia, HBM-PEV-P5).

Siguiendo las indicaciones del fabricante, las fracciones que contenían los exosomas eran las fracciones 7-11. Seguidamente, estas fracciones se combinaron en un volumen total de 2,5 mL, se dividieron en alícuotas y se almacenaron -80 °C hasta su uso.

En caso de necesitar concentrar más las muestras de exosomas obtenidas tras la purificación, se realizó una centrifugación a 2000 g, 4 °C, durante 20 minutos con un tubo con filtro 3K. Este proceso se repitió hasta conseguir el volumen deseado.

Caracterización de los exosomas procedentes de la línea celular NSC-34, modelo de neurona motora

Para caracterizar los exosomas se utilizó la tecnología denominada ExoView. Esta consiste en un sistema de chips encargados de capturar los exosomas según la presencia del marcador de superficie en puntos de captura de anticuerpos impresos. Los puntos de captura se encuentran por triplicado y también se permite la captura personalizada de los exosomas mediante la adición de anticuerpos fluorescentes seleccionados (Price et al., 2023). En este caso, se utilizó el kit *Leprechan Exosome Mouse Tetraspanin kit* (*Unchained Labs*, EE.UU, 251-1046), el cual contiene los anticuerpos CD81, CD9, Ham IgG y Rat IgG, siendo estos dos últimos utilizados como control. Estos anticuerpos fueron los encargados capturar a los exosomas. Se realizaron triplicados por cada anticuerpo.

El protocolo consistió en los siguientes pasos. Primero se hizo una lectura del chip, con el objetivo de tener una medición de referencia, para detectar posibles señal de autofluorescencia o ruido del chip y calibrar el equipo. Después, se realizó una dilución de la muestra con el tampón del kit, esta dilución se ajustó empíricamente en función de la concentración de exosomas deseada. Las muestras que se utilizaron fueron de medio condicionado y de exosomas concentrados, para cada una de ellas se empleó un chip diferente. Una vez diluida las muestras, se añadieron al chip y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Al día siguiente, se lavó el chip de forma automatizada (CW100 chip washer *NanoView biosciences*, EE. UU), seguidamente se añadieron los anticuerpos del kit, mencionados anteriormente, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Finalmente, se realizó un último lavado con el buffer del kit y se escaneó el chip en el instrumento ExoView R200 (*NanoView biosciences*, EE. UU).

Esta técnica fue realizada por el Servicio de Separación Celular y Citometría del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS).

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía electrónica de transmisión criogénica (Crio-TEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión criogénica (Crio-TEM) permiten obtener imágenes detalladas de los exosomas, ya que estas vesículas extracelulares tienen un tamaño 30-150 nm. El SEM permitió observar la superficie y morfología general, mientras que con el Crio-TEM se analizó la estructura interna (doble membrana y componentes moleculares)

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se depositó la muestra sobre un trozo limpio de oblea de silicio y se dejó secar parcialmente sobre un pin stub utilizando cinta de carbono. Luego, la muestra fue deshidratada mediante una serie creciente de soluciones de etanol. Se añadió una gota de etanol al 30% durante 10 minutos y el exceso se eliminó con un trozo de papel de filtro. El mismo procedimiento se repitió con etanol al 50% (10 min), al 70% (10 min) y al 100% (dos veces, 10 min cada una). Después de la deshidratación con alcohol, las muestras se dejaron secar completamente y se recubrieron con 14 nm de paladio, y se observaron en un instrumento Inspect F-50 SEM (*FEI Company, ThermoFisher Scientific*) utilizando un voltaje de aceleración de 10 kV.

Microscopia electrónica de transmisión criogénica (Crio-TEM)

La preparación de la muestra consistió en su vitrificación con etano líquido. Este paso al enfriar muy rápido la muestra impide la formación de hielo cristalino y al formarse una fina capa de hielo amorfo protege el material de los daños causado por los haces de electrones. El proceso de vitrificación se realizó en un Vitrobot® de Thermofisher, una gota de 3 μ L de los exosomas se colocó en una rejilla de carbono TEM Quantifoil®, el exceso de agua se eliminó con el Vitrobot® con papel de filtro y la rejilla se sumergió por congelación en etano líquido. Después, la muestra se transfirió a un criotransfer TEM Gatan, equipado con un depósito de nitrógeno líquido, haciendo que las muestras se manipulen y se observen a una temperatura de 100 K. El equipo donde se visualizaron y tomaron imágenes de la vesículas fue en el Tecnai T20 (Thermofisher, EE. UU).

Ambas técnicas fueron realizadas mediante el servicio de microscopía avanzada del Laboratorio de Microscopías Avanzada (LMA) de la Universidad de Zaragoza.

Visualización de la internalización de exosomas por la línea celular C2C12, modelo de célula muscular

Para comprobar la capacidad de las células musculares de internalizar los exosomas procedentes de las neuronas motoras. Se procedió de la siguiente forma (figura 7). Se utilizó una placa de ocho pocillos (Sigma Aldrich, Alemania, CLS354118).

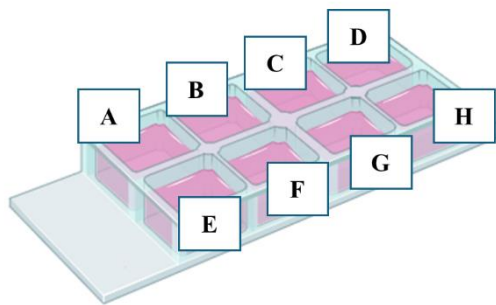


Figura 7. Esquema de las diferentes condiciones del experimento. A: miotubos con exosomas incubados 24 horas. B: miotubos con exosomas incubados 12 horas. C: miotubos con exosomas incubados 24 horas. D: miotubos sin exosomas (control doble negativo). E: mioblastos con exosomas incubados 24

horas. F: mioblastos con exosomas incubados 12 horas. G: mioblastos sin exosomas. H: mioblastos con exosomas después de fijación. C y D no se tiñeron con faloidina, todas las demás condiciones si se tiñeron con faloidina. Imagen realizada con BioRender en julio de 2025.

El primer paso fue sembrar las células musculares en los pocillos A, B, C, D (figura X), las cuales se diferenciarían en miotubos (células musculares maduras) (día 0). Para este paso se ha de seguir el protocolo mencionado en el apartado de “diferenciación de la línea celular C2C12”. Una vez las células se habían diferenciado (día 6), seis días después del primer cambio al medio de diferenciación muscular, se realizó la siembra de los mioblastos en los pocillos E, F,G y H (figura X). Estos permanecieron 24 horas con el medio de crecimiento para su correcta adhesión a la placa de cultivo. También se siguió el protocolo explicado en el apartado de “diferenciación de la línea celular C2C12”.

Después de las 24 horas (día 7), se procedió a la tinción de los exosomas mediante la utilización del kit *Exosome labeling and cleaning kit* (Norgen Biotek, Canadá, 68400). Los exosomas derivados de la neurona motora y procedentes del proceso de aislamiento y purificación, se encontraban concentrados y congelados.

Posteriormente, se añadieron los exosomas a los pocillos A, B, C, E, y F. Una vez se hubo finalizado el periodo de incubación se procedió al lavado doble con PBS para eliminar los exosomas no internalizados y a la fijación de las células con paraformaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó con PBS dos veces, dejándolo reposar cinco minutos, y, se almacenaron en este mismo buffer. Después del lavado, se añadieron los exosomas al pocillo H se dejaron durante 1 hora, al finalizar se realizaron los lavados.

Como controles se incluyeron los pocillos G (mioblastos sin exosomas), H (mioblastos con exosomas añadidos tras la fijación), C y D (miotubos sin marcado con faloidina). El control en el pocillo G era un control negativo para los exosomas; un control doble negativo en los pocillos C y D, ya que no contenía exosomas y tampoco se marcaron con faloidina; y en el pocillo H se quería demostrar que la internalización no era pasiva.

Una vez las células había sido fijadas, se procedió a su marcación. Para ello se utilizó faloidina (*Invitrogen-ThermoFisher*, EE. UU., A12379), un péptido bicíclico perteneciente a una familia de toxinas aisladas a partir de la seta *Amanita phalloides*, dicho péptido, marcado con fluorescencia, proporciona fluorescencia verde. La faloidina tiene

una gran selectividad de unión con la F-actina. El protocolo de marcación consistió en la dilución 1:200, respecto a el stock, con solución de bloqueo (PBS-1% p/v BSA (*Sigma Aldrich*, Alemania, A7906-100G) -0,1% p/v Saponina (*Sigma Aldrich*, Alemania, 47036-50G-F)) e incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda en oscuridad. Al terminar el tiempo de incubación se retiró y se lavó tres veces con PBS. A continuación, se realizó una tinción con DAPI, diluido con la solución bloqueante a 1:1000 a partir del stock, se dejó incubar durante 5 minutos, se lavó con agua estéril y se añadió una gota de medio de montaje.

La visualización de todos los pocillos se realizó en un microscopio de fluorescencia confocal LSM 880 (*ZEISS*, Alemania). Esta visualización de realizada a través del Servicio Científico y Técnico del departamento de Microscopía e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS)

Resultados y Discusión

Diferenciación de las líneas celulares C2C12 y NSC-34

La correcta diferenciación de las líneas celulares es crucial para conseguir los objetivos de este trabajo. Es por ello, que con los resultados obtenidos se pudo confirmar que los protocolos de diferenciación funcionaron.

En el caso de la línea celular C2C12, se observó una progresiva formación de miotubos a lo largo del tiempo (*figura 8*), ya que al comienzo se observaron células musculares redondeadas y con el paso de los días las células comenzaron a linearse y fusionarse, formando estructuras alargadas y multinucleadas. Dicha observación, se pudo también observar mediante la marcación de la faloidina (*figura 9*), en la que se pudieron ver perfectamente los filamentos que forman parte del citoesqueleto en células alargadas y fusionadas, esta experimento se realizó como prueba para ver que la faloidina actuaba correctamente. Hay que destacar, que la confluencia de las células es inferior al 80 %, lo que puede limitar formación de miotubos secundarios más grandes. A pesar de la baja confluencia, esta etapa de diferenciación concuerda con estudios previos, donde se reportan que confluencias altas (80-90%) favorecen la fusión y maduración de miotubos secundarios (Mitra & Thanabalu, 2017).

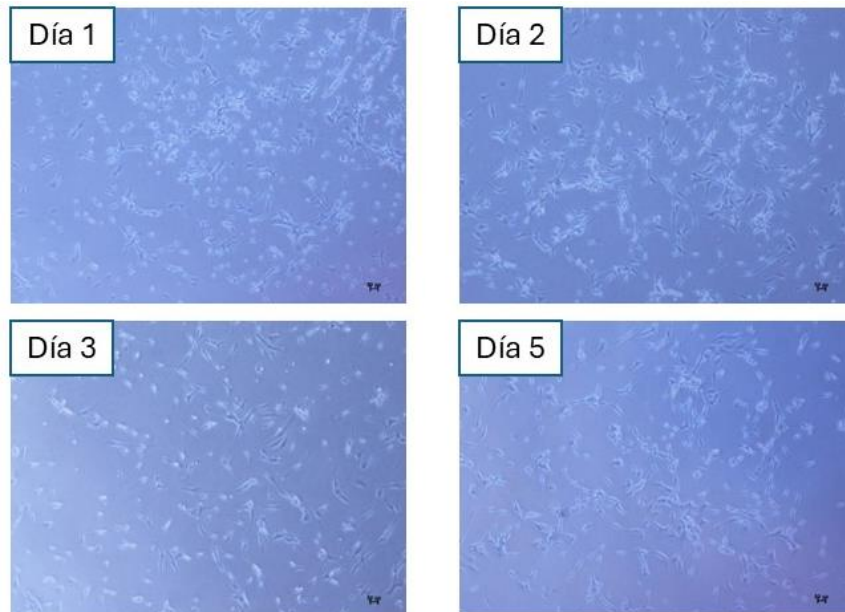


Figura 8. Conjunto de imágenes de la línea celular C2C12 durante el proceso de diferenciación. Visualización en un microscopio óptico (*Leica Microsystems*, Alemania) con aumento 4X

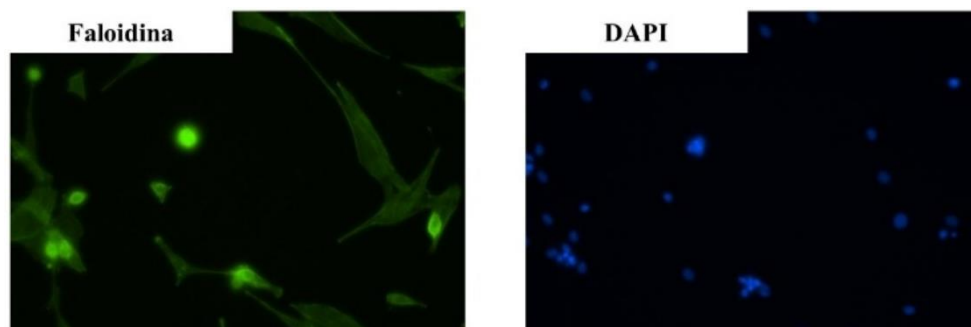


Figura 9. Resultado de la prueba de marcación de la línea celular C2C12 con faloidina. Observadas mediante microscopio de fluorescencia con aumento 10X

La línea celular NSC-34 se diferenci3 a neuronas motoras durante 11 d3as siguiendo el protocolo especificado en la secci3n “diferenciaci3n de la l3nea celular NSC-34”. Los resultados mostraron una progresiva diferenciaci3n celular en las im3genes obtenidas mediante microscop3a 3ptica (*figura 10*), estas permitieron visualizar el alargamiento de los axones de las neuronas motoras y el establecimiento de contacto entre ellas.

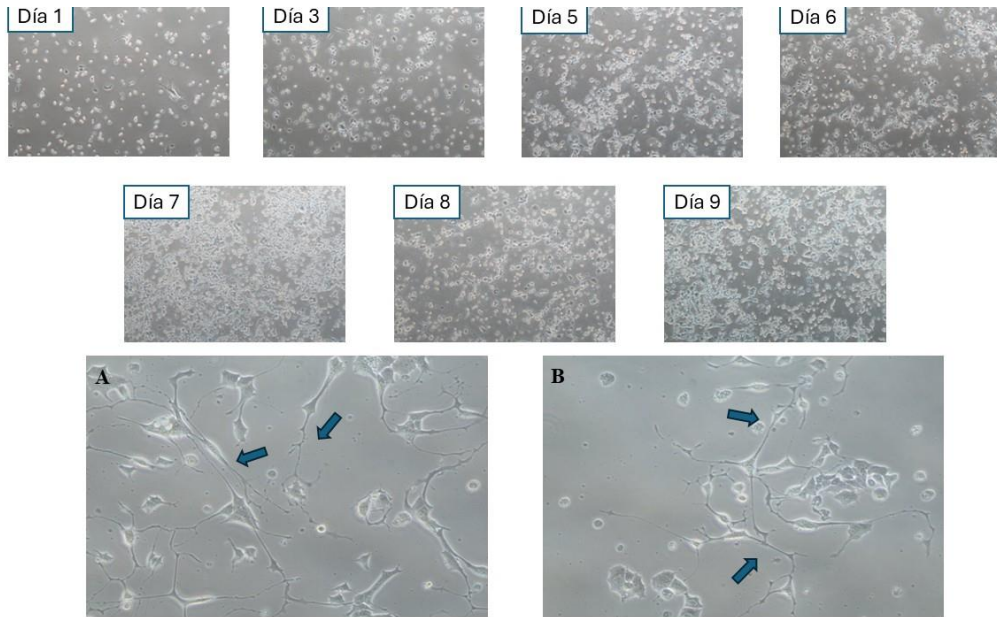


Figura 10. Conjunto de im3genes de la l3nea celular NSC-34 durante el proceso de diferenciaci3n. A) y B) c3lulas de la l3nea celular NSC-34 en el d3a 9 de diferenciaci3n con un aumento de 10X. Flechas se3alan a los axones de las neuronas motoras. Visualizaci3n en microscopio 3ptico.

Los resultados conseguidos a trav3s de la prueba inmunocitoqu3mica (*figura 11*) ofrecieron un resultado positivo para determinar la maduraci3n de las neuronas motoras.

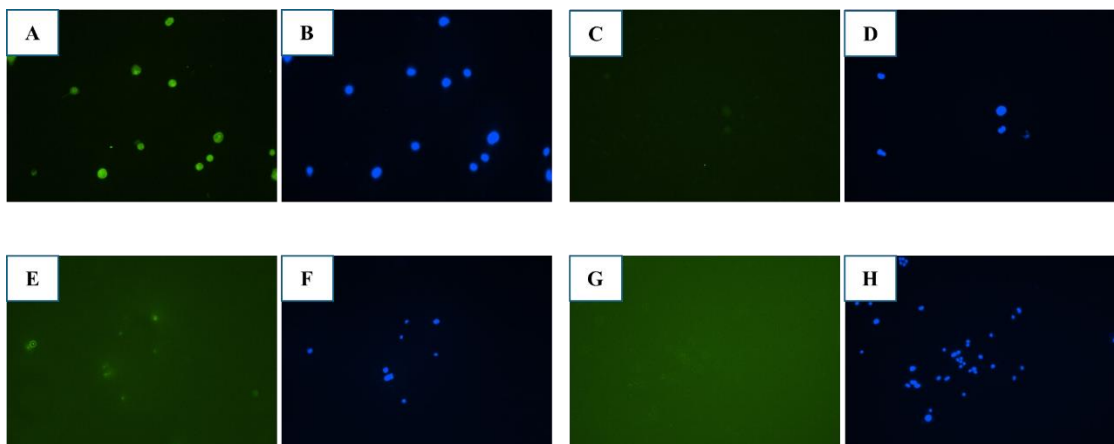


Figura 11. Resultados de la prueba inmunocitoquímica a la línea celular NSC-34, con neuronas motoras diferenciadas. A-B y C-D corresponden a ISLET-1; siendo A la muestra que contiene el anticuerpo primario y C es el control negativo. E-F y G-H son los pocillos correspondientes al uso del anticuerpo anti-ChAT, la imagen E contiene la muestra con el anticuerpo primario, y G es el control negativo. Las imágenes B, D, F y H son las muestras con DAPI. Los anticuerpos primarios y secundarios se encuentran descritos en la tabla x.

Los anticuerpos Islet-1 y ChAT dieron una señal positiva en las imágenes A y E de la *figura 11*, respectivamente, acompañada de una señal nula en los controles negativos (*figura 11*: C y G). La expresión de Islet-1 indicó que las células se encontraban en un estado de madurez acorde con las características de neuronas motoras en diferenciación, mientras que la expresión de ChAT reflejó la funcionalidad típica de estas neuronas para la síntesis de acetilcolina. Por lo tanto, se confirma la presencia de estas proteínas y la especificidad de la inmunotinción, lo que significa que las neuronas motoras de la línea celular NSC-34 se han diferenciado correctamente con el protocolo definido en el apartado “*diferenciación de la línea celular NSC-34*”.

Para confirmar la diferenciación de los cultivos mediante expresión de marcadores a nivel genético se utilizó la técnica de qPCR. Los resultados mostraron una clara diferencia en la expresión de los genes entre las células no diferenciadas y las diferenciadas

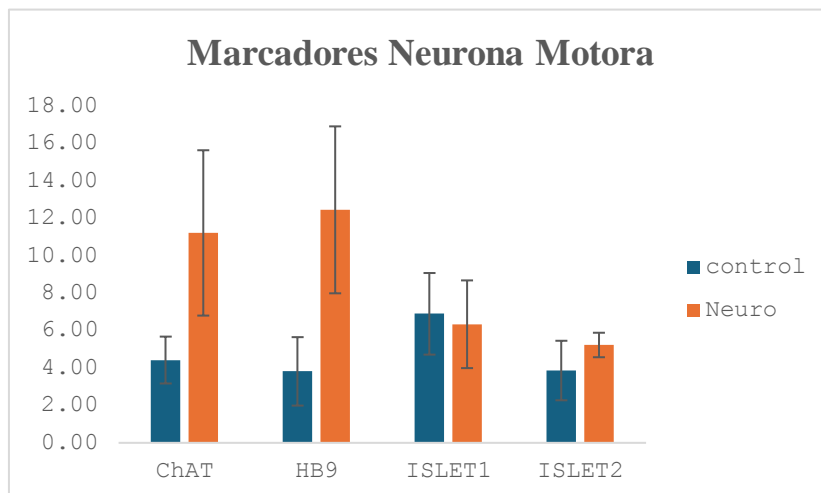


Figura 12. Expresión relativa de los genes ChAT, HB9, ISLET-1 e ISLET-2 en la línea celular NSC-34 determinada mediante qPCR. Se comparan células NSC-34 no diferenciadas (barra azul) y NSC-34 diferenciadas (barra naranja). Los datos representan la media de cuatro réplicas biológicas, calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se utilizó GAPDH como gen de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar.

Los genes ChAT, HB9, ISLET-1 e ISLET-2, solo se encuentran en las neuronas motoras maduras, es decir, en células neuronales desarrolladas. Por lo tanto, lo que se esperaba es que existiera un aumento en la expresión de estos genes en las neuronas motoras diferenciadas respecto a las no diferenciadas. Este aumento se obtuvo, como se puede observar en la *figura 12*, la mayor diferencia se dio en el gen ChAT y HB9. Además, estos genes se consideran de lo más significativos. ChAT es el gen encargado de sintetizar acetilcolina y su expresión se encuentra estrictamente regulada y se activa durante la diferenciación para que las neuronas motoras puedan establecer conexiones funcionales con las fibras musculares. Mientras que, HB9 es un gen que sintetiza un factor de transcripción crucial para establecer la identidad y función de las neuronas motoras durante el desarrollo, asimismo, es necesario para que las células progenitoras adopten el destino de neurona motora diferenciada; en las neuronas no diferenciadas está ausente o poco expresado (Carlier et al., 2000).

Por otro lado, las barras de error (*figura*) son grandes, lo que significa que la desviación estándar es elevada, por lo tanto, nos dio la información de que existe una alta variabilidad o dispersión entre las réplicas o las muestras.

Los resultados no alcanzaron a significación estadística, lo cual se evidenció en la prueba t Student realizada (*tabla 3*), ya que los valores de *p* obtenidos son superiores a 0,05. Esto pudo deberse a la variabilidad entre réplicas, ya que en las cuatro réplicas que se emplearon las muestras eran procedentes de cultivos celulares distintos.

Tabla 3. Resultado de la prueba estadística t Student de la expresión relativa de los genes ChAT, HB9, ISLET-1 e ISLET-2 en la línea celular NSC-34, $p < 0,05$

ChAT	HB9	Islet-1	Islet-2
0,2233	0,1482	0,8672	0,4717

Co-cultivo de células musculares maduras y células neuronales motoras, y formación de uniones neuromusculares

El desarrollo de un sistema de co-cultivo es una herramienta para poder demostrar la internalización de los exosomas derivados de la neurona motora por parte de las células musculares maduras y observa las uniones neuromusculares. Por ello, mediante los protocolos definidos anteriormente, se obtuvieron los siguientes resultados.

Los resultados obtenidos por microscopía óptica de campo claro determinaron que hay coexistencia de ambas líneas celulares (*figura 13*). Por lo tanto, se comprobó que no había toxicidad celular como se indicaba en algunos artículos.

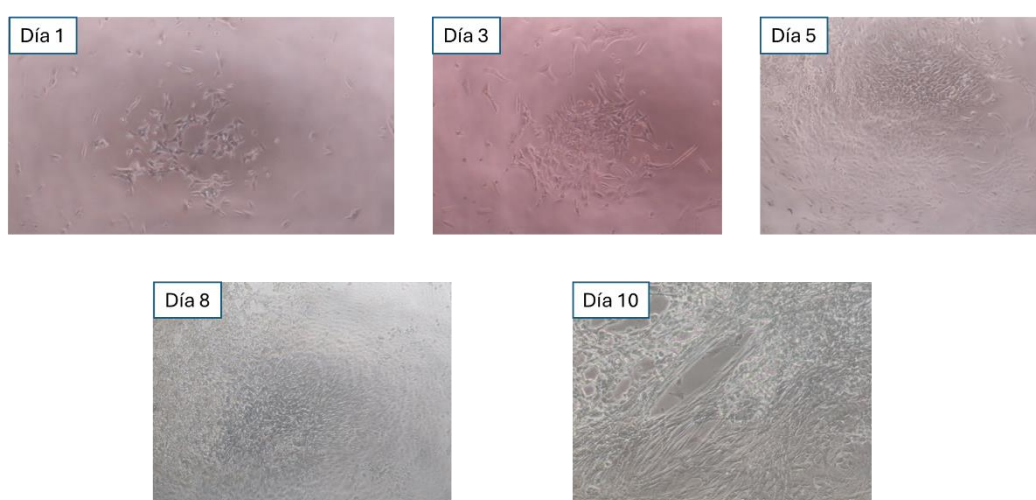


Figura 13. Conjunto de imágenes a lo largo del proceso del co-cultivo. Día 1: C2C12 con medio de diferenciación muscular. Día 5: siembra de línea celular NSC-34 y uso del medio de co-cultivo. Día 1 al 8: imágenes tomadas en microscopio óptico con aumento de 4X. Día 10: imagen tomada en un microscopio óptico con un aumento 10X.

Para la visualización de las uniones neuromusculares se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que en el caso de la bungarotoxina para la unión específica a los receptores nicotínicos de acetilcolina en células C2C12 no generó señal detectable. Este resultado podría explicarse por una diferenciación insuficiente de las células C2C12. Una maduración incompleta implica que los receptores funcionales de acetilcolina no se encuentren adecuadamente desarrollados, impidiendo así la interacción con la bungarotoxina.

Una posible solución a este problema sería a largar el tiempo de diferenciación de la línea celular C2C12, pasar de cinco días de diferencia a siete; o cambiar el medio de co-cultivo y probar otro más favorables para las células musculares.

Además, el control negativo para el anticuerpo primario anti-neurofilamento produjo señal de fluorescencia (*figura 14 C*). Este resultado ha podido deberse a una unión inespecífica del anticuerpo secundario, bloqueo insuficiente o un error en la ejecución del protocolo. Por lo tanto, se debería realizar una segunda prueba con dicho anticuerpo primario para descartar los errores de manipulación. Si ofreciera el mismo resultado, habría que revisar detalladamente el protocolo o buscar otro tipo de anticuerpo que se adecue mejor a las condiciones.

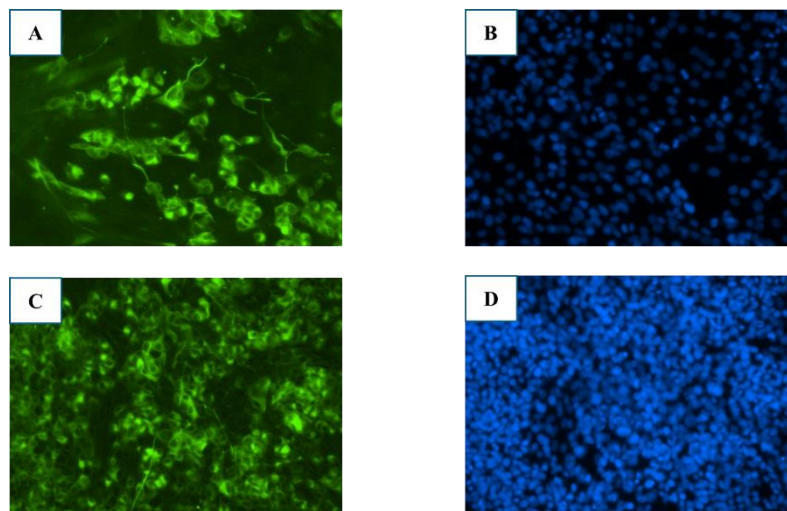


Figura 14. Resultado de la prueba de inmunocitoquímica para visualización de uniones neuromusculares. A: control positivo, tinción específica para el anticuerpo primario: anti-neurofilament. C: control negativo. B: muestra A con tinción nuclear, DAPI. D: muestra C con tinción nuclear, DAPI.

Caracterización de exosomas liberados por las neuronas motoras de la línea celular NSC-34

La caracterización de exosomas es el objetivo principal de este trabajo de fin de grado, ya que el conocimiento de las características principales de los exosomas supone un acercamiento a la confirmación de la hipótesis desarrollada. Como se ha mencionado en la parte metodológica, se realizaron diferentes pruebas para la caracterización. Estas fueron microscopía electrónica de transmisión y de barrido, análisis de marcadores mediante ExoView, y la internalización de exosomas por las células C2C12. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Gracias a la microscopía electrónica de barrido (figura 15), se determinó que el tamaño de los exosomas liberados por las neuronas motoras de la línea células NSC-34 se encontraba entre 60-160 nm. Además, confirmó su morfología esférica y la bicapa lipídica mediante la microscopía electrónica de transmisión criogénica, y también se vio contenido orgánico dentro de los exosomas (figura 16).

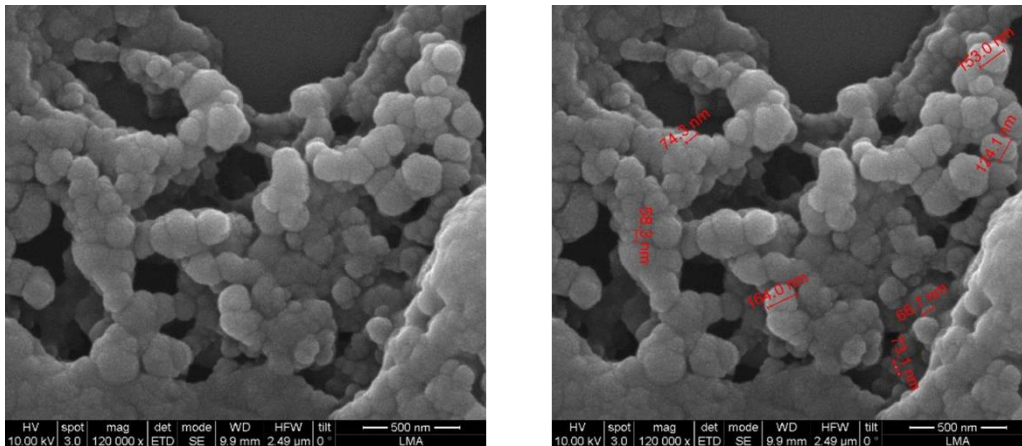


Figura 15. Micrografías de exosomas aislados mediante exclusión por tamaño SEC, muestra con dilución 1:100. Obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observa su característica morfología y tamaño.

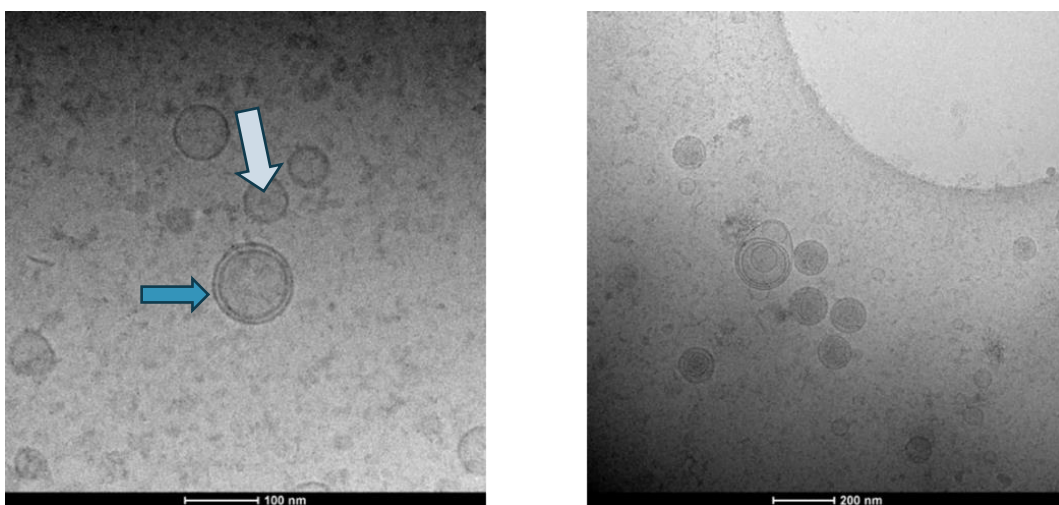


Figura 16. Exosomas aislados con la técnica de exclusión por tamaño (SEC). Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión criogénica (Crio-TEM). Observación de la característica morfología y tamaño de los exosomas. La flecha

azul oscura indica la bicapa lipídica, mientras que la flecha azul clara señala el material de contenido orgánico.

Con los resultados del análisis del ExoView, se obtuvieron las características de los exosomas derivados de neuronas motoras que aislábamos mediante la exclusión por tamaño (SEC). En los gráfico (figura 14), se puede observar que el marcador más abundante en los exosomas aislados es la tetraspanina C9 (color azul), tanto en la muestra de medio condiciona como en la de exosomas después del (SEC).

Aunque si la captura se realizó con anticuerpos contra CD81 o CD9, la mayoría de las exosomas detectadas resultan positivas para CD9, indicando que estos exosomas pueden coexpresar ambos marcadores, pero siendo más dominante CD9 para la detección en estas condiciones. La presencia menor de exosomas positivos para CD81 o CD63 sugirió una posible heterogeneidad en las subpoblaciones de exosomas.

Además, para comprobar si había una gran pérdida de poblaciones al realizar la técnica SEC, se compararon los resultados obtenidos de los exosomas purificados con los del medio condicionado (que no ha sufrido la cromatografía de exclusión por tamaño). Los resultados mostraron que no había una gran diferencia entre las poblaciones de exosomas entre medio condicionado y exosomas de SEC. Esto significó que al realizar la exclusión por tamaño no se perdieron subpoblaciones por tamaño y se obtenía una muestra representativa del total. Por lo tanto, la técnica por exclusión de tamaño (SEC) nos proporcionaba la concentración de los exosomas y la eliminación de impurezas que puedan interferir en otros experimentaciones.

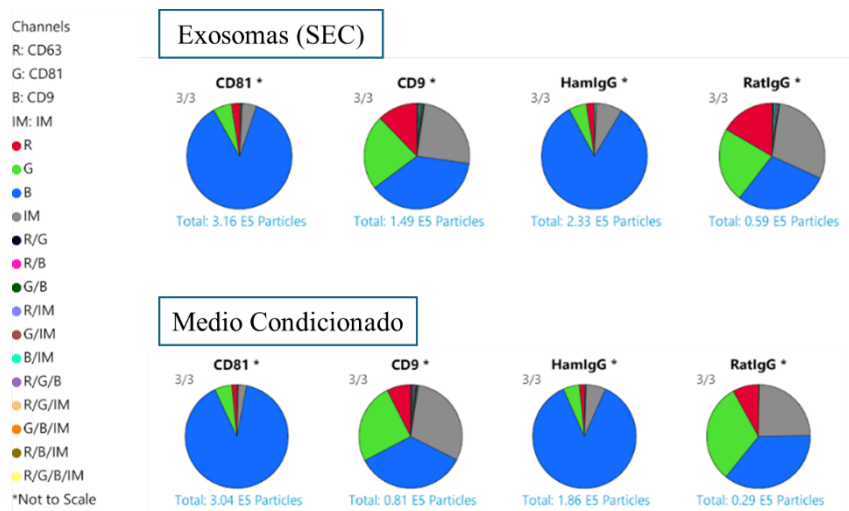


Figura 16. Resultados del análisis de ExoView de los exosomas aislados mediante la exclusión por tamaño (SEC) y del medio condicionado. Análisis realizado mediante ExoView R200 (EE. UU., *NanoView biosciences*).

Tabla 4. Análisis estadísticos de todas las partículas mediante el ExoView, incluyendo exosomas aislados a través de la exclusión por tamaño (SEC) y el medio condicionado.

	Exosomas (SEC)			Medio Condicionado		
	Mean	SD	n	Mean	SD	n
CD81	302321	9961	3	296322	17593	3
CD9	112276	25738	3	56908	3414	3
HamIgG	214763	21241	3	175491	19113	3
RatIgG	42166	1827	3	22213	1896	3
Total	414597			353230		

El experimento para la observación de la internalización de exosomas por parte de la línea celular C2C12 confirmó que los exosomas no son vesículas de deshecho que se encuentran en el medio extracelular, sino que son vesículas capaces de ser captadas por otras células. Además, se ratificó la comunicación célula a célula, ya que los exosomas procedían de la línea celular NSC-34 y fueron internalizados por la línea celular C2C12.

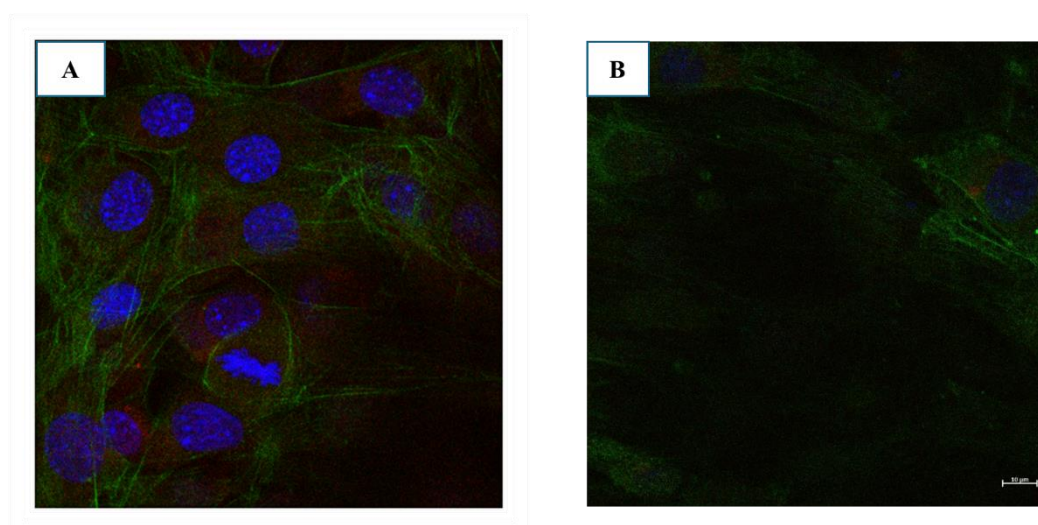


Figura 15. Inmunofluorescencia de la internalización de exosomas por parte de las células C2C12. A: microtubos tratados con exosomas durante 24 horas. Tinción con

faloïdina (verde) para los filamentos de actina de las células C2C12, DAPI (azul) para el núcleo de las células y para los exosomas (rojo). B: miotubos sin exosomas.

Conclusiones

A partir de los resultados de los experimentos realizados en este trabajo fin de grado se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Los protocolos de cultivo y diferenciación individuales de las líneas celulares C2C12 y NSC-34 permitieron generar miotubos y neuronas motoras, proporcionando un modelo *in vitro* del sistema neuromuscular.
2. Los resultados relacionados con las uniones neuromusculares no fueron concluyentes, ya que el control negativo del anticuerpo primario mostró señal y la bungarotoxina no produjo señal detectable. Esto indica que el protocolo requiere optimización, ya sea mediante un tiempo de diferenciación más prolongado de las células musculares, ajusten en la ejecución experimental, o la búsqueda de anticuerpos o toxinas con mayor afinidad.
3. Se ha demostrado por primera vez la liberación de exosomas por parte de las neuronas motoras, caracterizándose su número, tamaño, morfología y la presencia de proteínas marcadoras CD81 y CD9.
4. Se observó la internalización de exosomas derivados de la neurona motora por parte de las células musculares, localizándose en el citoplasmas de estas. Esto sugiere que los exosomas son una potencial vía de comunicación entre estas dos poblaciones celulares. Siendo el primer paso para determinar la implicación de los exosomas en enfermedades neurodegenerativas.

Quedan por determinar las posibles implicaciones de esta comunicación mediada por exosomas entre las neuronas motoras y el músculo en condiciones fisiológicas y patológicas, como las enfermedades neuromusculares. Resulta relevante caracterizar el contenido proteico, de ácidos nucleicos y lípidos de los exosomas liberados por las neuronas motoras, así como su potencial aplicación como biomarcadores.

Finalmente, utilizando modelos adicionales *in vitro* e *in vivo*, será relevante explorar qué efectos tienen estos exosomas aislados de células sanas y de individuos con enfermedades neuromusculares sobre las células musculares maduras.

En conclusión, este trabajo de fin de grado avanza en la comprensión de la comunicación mediada por exosomas en el sistema neuromuscular, y abre nuevas vías para explorar la relevancia de este nuevo sistema y su potencial aplicación en el diagnóstico y tratamiento de estas patologías.

Bibliografía

-
- Aparicio, P., Navarrete-Villanueva, D., Gómez-Cabello, A., López-Royo, T., Santamaría, E., Fernández-Irigoyen, J., Ausín, K., Arruebo, M., Sebastian, V., Vicente-Rodríguez, G., Osta, R., & Manzano, R. (2024). Proteomic profiling of human plasma extracellular vesicles identifies PF4 and C1R as novel biomarker in sarcopenia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *15*(5), 1883–1897. <https://doi.org/10.1002/JCSM.13539>,
- Arya, S. B., Collie, S. P., & Parent, C. A. (2023). THE INS-AND-OUTS OF EXOSOME BIOGENESIS, SECRETION, AND INTERNALIZATION. *Trends in Cell Biology*, *34*(2), 90. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2023.06.006>
- Camacho, A., Esteban, J., & Paradas, C. (2018). Informe de la Fundación Del Cerebro sobre el impacto social de la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades

- neuromusculares. *Neurología*, 33(1), 35–46.
<https://doi.org/10.1016/J.NRL.2015.02.003>
- Carlier, M. F., Nioche, P., Broutin-L'hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., & Pantaloni, D. (2000). GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural wiskott-aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21946–21952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000687200>
- Castiglioni, C., Jofré, J., & Suárez, B. (2018). Enfermedades neuromusculares. Epidemiología y políticas de salud en Chile. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(6), 594–598. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2018.09.003>
- Dabaj, I., Ducatez, F., Marret, S., Bekri, S., & Tebani, A. (2024). Neuromuscular disorders in the omics era. *Clinica Chimica Acta*, 553.
<https://doi.org/10.1016/J.CCA.2023.117691>
- Elshahawy, R., Elezbawy, B., Ashmawy, R., Elshahawy, R., Mahmoud, Y. S., Korra, N., Abaza, S., Alnajjar, A., Al-Abdulkarim, H. A., Al-Omar, H. A., Fahmy, S., Dallal, S. Al, & Fasseeh, A. N. (2025). Global Economic Burden of Spinal Muscular Atrophy: A Systematic Literature Review. *Cureus*, 17(3), e81023.
<https://doi.org/10.7759/CUREUS.81023>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12964-021-00730-1>,
- Inoue, T., Ohkawara, B., Bushra, S., Kanbara, S., Nakashima, H., Koshimizu, H., Tomita, H., Ito, M., Masuda, A., Ishiguro, N., Imagama, S., & Ohno, K. (2021). Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the in vitro neuromuscular junction. *Neuropharmacology*, 195.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108637>
- Iolascon, G., Paoletta, M., Liguori, S., Curci, C., & Moretti, A. (2019). Neuromuscular Diseases and Bone. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 794.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00794>
- Jiang, J., Moore, R., Jordan, C. E., Guo, R., Maus, R. L., Liu, H., Goode, E., Markovic, S. N., & Wang, C. (2023). Multiplex Immunofluorescence Image Quality Checking Using DAPI Channel–referenced Evaluation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 71(3), 121. <https://doi.org/10.1369/00221554231161693>
- Lai, J. J., Chau, Z. L., Chen, S. Y., Hill, J. J., Korpany, K. V., Liang, N. W., Lin, L. H., Lin, Y. H., Liu, J. K., Liu, Y. C., Lunde, R., & Shen, W. T. (2022). Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development. *Advanced Science*, 9(15), 2103222.
<https://doi.org/10.1002/ADVS.202103222;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Mary, P., Servais, L., & Vialle, R. (2018). Neuromuscular diseases: Diagnosis and management. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 104(1), S89–S95.
<https://doi.org/10.1016/J.OTSR.2017.04.019>
- Minuchin, P. S. . (2011). *Fisiología del ejercicio. II, Sistemas: cardiorrespiratorio, muscular, sanguíneo y nervioso*.
- Mitra, P., & Thanabalu, T. (2017). Myogenic differentiation depends on the interplay of Grb2 and N-WASP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(3), 487–497. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.12.011>

- Price, J. M. J., Hisada, Y., Hazeldine, J., Bae-Jump, V., Luther, T., Mackman, N., & Harrison, P. (2023). Detection of tissue factor–positive extracellular vesicles using the ExoView R100 system. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100177>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4280562/>
- Shao, M., Gao, Y., Xu, X., Chan, D. W., & Du, J. (2024). Exosomes: Key Factors in Ovarian Cancer Peritoneal Metastasis and Drug Resistance. *Biomolecules*, 14(9), 1099. <https://doi.org/10.3390/BIOM14091099>
- Solomon, E. A., Rooney, A. M., Rodriguez, A. M., Micheva-Viteva, S., Bashir, R., Iyer, R., & Harris, J. F. (2021). Neuromuscular Junction Model Optimized for Electrical Platforms. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 27(4), 242–252. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEC.2020.0292>,
- Uribe Olivares, R. A. (2018). Fisiopatología. La Ciencia Del Porque Y El Como. *Elsevier*, 1, 327–333. https://artedelosdioses.com/wp-content/uploads/2021/06/1_4918105645502169421.pdf
- Wei, Y., McCormick, A., MacKenzie, A., O’Ferrall, E., Venance, S., Mah, J. K., Selby, K., McMillan, H. J., Smith, G., Oskoui, M., Hogan, G., McAdam, L., Mabaya, G., Hodgkinson, V., Lounsbury, J., Korngut, L., & Campbell, C. (2018). The Canadian Neuromuscular Disease Registry: Connecting patients to national and international research opportunities. *Paediatrics and Child Health (Canada)*, 23(1), 20–26. <https://doi.org/10.1093/PCH/PXX125>
- Caulfield, J. (2021, 29 de abril). Cómo citar una página web en formato APA. Scribbr. <https://www.scribbr.es/normas-apa/ejemplos/pagina-web/>
- Clínica Universitaria La Salle. (2018, 15 de noviembre). ¿Qué son las enfermedades neuromusculares? Clínica Universitaria La Salle. <https://www.clinicauniversitarialasalle.es/las-enfermedades-neuromusculares/>