



Universidad Autónoma de Guerrero
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Maestría en Ciencias Biomédicas



**Análisis de la expresión de marcadores de neuroprotección presentes en
exosomas secretados por astrocitos hiperglucémicos**

Tesis

Para obtener el título de
Maestro en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Q.B.P. Jaime Arcos Valenzo

Directora:

Dra. Isela Parra Rojas

Codirectora:

Dra. Mónica Ramírez Ruano

Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, Enero del 2023

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Proteómica y Genómica Funcional de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo, Guerrero.

Bajo la Dirección de la Dra. Isela Parra Rojas

La Codirección de la Dra. Mónica Ramírez Ruano

Y con la invaluable asesoría de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dr. Eduardo Martínez Martínez

Este trabajo fue financiado por los proyectos de CONACyT INFRA 2016 269696 y de investigación básica A1-S-34290.

Durante el periodo en el que se cursó la maestría el QBP Jaime Arcos Valenzo recibió una beca de CONACYT con número de registro 1006406.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 18 días del mes de noviembre del año dos mil veintidós, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **Análisis de la expresión de marcadores de neuroprotección presentes en exosomas secretados por astrocitos hiperglucémicos**, presentada por el alumno **Jaime Arcos Valenzo**, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Isela Parra Rojas
Dirección de tesis

Dra. Mónica Ramírez Ruano
Codirección de tesis

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Eduardo Martínez Martínez

Vo. Bo



Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas



Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Vo. Bo
Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi gratitud hacia todas las personas que con su apoyo me ayudaron para que pudiese a culminar este trabajo de investigación.

Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Isela Parra Rojas, por su comprensión, paciencia, consejos, sugerencias y por sus conocimientos compartidos conmigo durante el desarrollo de este trabajo. Gracias, por la confianza brindada, así como el interés y motivación para realizar este proyecto.

A la Dra. Mónica Ramírez Ruano, quien ha compartido toda su experiencia y desde la licenciatura conmigo. Agradezco su orientación, su cobijo y su discusión crítica, que me permitió desarrollar nuevas habilidades para la conclusión de este proyecto. Gracias por la ayuda y paciencia durante todo el tiempo que desarrolle este proyecto en el laboratorio y, a quien no solo considero como una excelente catedrática, sino también una muy buena persona, llena de sabiduría, siempre frontal y directa, pero al mismo tiempo protectora, pendiente de los aspectos más humanos, entusiasta y optimista. Gracias, por no “tirar la toalla conmigo”.

A mis amigos del laboratorio de Proteómica y Genómica Funcional, que me apoyaron, y motivaron durante mi estancia. Considero que son pieza clave para que yo no me diera por vencido

Al Dr. Eduardo Martínez Martínez, mi asesor externo, que por cuestiones de la pandemia no pude verlo en persona, pero estoy muy agradecido por la veces que compartió su conocimiento para la conclusión de este proyecto.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo, quien es encargada del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, quien nos brindó en algún momento especímenes usados en este proyecto, además de dichas instalaciones. Y claro, agradezco el aporte de ideas para la conclusión de este proyecto.

A la Dra. Olga Garibay, por las observaciones realizadas para que el proyecto tuviera un mejor rumbo. Siempre objetiva y puntual en todas las sugerencias que realizaba, gracias.

Al laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular: al Dr. José Ángel Cahua Pablo, por su amistad, disposición, y compromiso. Además, de permitirme usar las instalaciones de dicho laboratorio. Su ayuda fue importante para concluir este proyecto.

Al Laboratorio de Biomedicina Molecular: al Dr. Hugo Rodríguez, por brindarme su apoyo en el laboratorio, su apoyo para el análisis de aspectos puntuales en el desarrollo del proyecto. Gracias por la paciencia y la disposición.

DEDICATORIAS

A Dios.

Darle las gracias por todo lo vivido durante mi estancia en la maestría, ha sido difícil pero no he dejado de agradecerte. Gracias, porque durante este trayecto de mi vida me he vuelto mejor persona.

“El principio de la sabiduría es el temor de Jehová” Salmos 111:10.

A mis padres.

Jaime Arcos y Margarita Valenzo, por la motivación y apoyo para que yo pudiese entrar a la maestría. Gracias, porque esto lo realicé por y para ustedes. Gracias, por su cariño, su amor y consejos para poder continuar en los momentos difíciles que viví durante esta estancia en la maestría. Los amo.

A mis hermanas.

Aleyda Saraí y Jessica Magdiela, por el impulso que me han dado para no dejar de estudiar, por los consejos que han sabido darme, son y seguirán siendo pilares importantes en mi vida. Las amo.

A Anayeli y Arya

Anayeli, porque tú me motivaste a ser mejor persona, me ayudaste a no darme por vencido en los momentos más duros no solo de la maestría, sino en esta etapa de mi vida, gracias porque en los momentos de ya no querer seguir, siempre tuviste palabras indicadas para hacerme sentir mejor. Me comprendiste y me escuchaste. Gracias.

A ti Arya, hija, esto también lo hice por ti, y aunque ya no estés presente para ver la culminación de esto, espero que allá donde estas, sientas un poco de orgullo por tu papá, te amo.

A mis amigos.

Raúl Castro, viejo, solo tú conoces cuanto esfuerzo nos costó a ambos poder culminar un proyecto personal como este. Gracias por tu apoyo y amistad, ambos aspectos fueron necesarios para que no me “bajara del barco”.

A Kenia Morales y Abner Jiménez, que pesar del tiempo siguen siendo amigos auténticos y leales de los cuales su amistad y apoyo jamás faltó, eso fue y será importante para obtener es tipo de logros.

A la M.C. Claudia Paola, mi amiga y compañera de laboratorio. Pao, gracias por tus consejos no solo académicos, si no por los consejos para que yo siguiera adelante con mi vida. Aprendí mucho de ti, y valoro mucho que jamás me dejaste, ni me negaste tu ayuda. Eres una mentora para mí.

Paola Molina, gracias por escucharme, ayudarme, aconsejarme y decirme que podía terminar esto. Gracias.

A la Dra. Martha Isela, que cada que requería su apoyo y consejo, lo tuve. Por escucharme, y por considerarme tu igual, por ser también, una mentora para mí.

A los ya mencionados, a los que no puedo mencionar por el espacio y las personas que conocí este año y me han ayudado a seguir, le agradezco infinitamente a Dios por su amistad y cariño hacia a mí. Los amo mucho.

- Jaime Arcos Valenzo.

INDICE

I. Marco teórico	1
1. Diabetes y cerebro.....	1
1.2 Metabolismo de la glucosa en el cerebro.....	1
1.3 Astrocitos y sus funciones.....	3
1.4 Características de las vesículas extracelulares	5
1.5 Función e importancia de los exosomas	6
1.6 Exosomas de astrocitos en procesos de neuroprotección	7
I. Planteamiento del problema	10
II. Justificación	11
III. Hipótesis.....	13
IV. Objetivos.....	14
V. Diseño de investigación	15
VI. Materiales y métodos	17
VII. Diagrama de trabajo.....	20
VIII. Resultados	21
IX. Discusión	28
X. Conclusiones.....	34
XI. Sugerencias y perspectivas.....	35
XII. Anexos	36
XIII. Referencias	42

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de células del sistema nervioso central.....	2
Tabla 2. Clasificación de los tipos principales de EVs con base en origen, tamaño, función, marcadores moleculares y el contenido	6
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos del miRNA-29a y U6 para qPCR	19

Índice de figuras

Figura 1. Cultivos de astrocitos de la línea celular C8-D1A tratadas a concentraciones diferentes de glucosa durante 7 días	21
Figura 2. Determinación de la viabilidad celular de astrocitos de la línea celular C8-D1A.....	22
Figura 3. Fotografía tomada por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	23
Figura 4. Identificación de proteínas constitutivas de exosomas de medio condicionado derivados de astrocitos C8-D1A.....	24
Figura 5. Análisis de nanopartículas	25
Figura 6. Expresión de <i>miRNA-29a</i> en células de línea celular C8-D1A.....	26
Figura 7. Arreglo de 23 proteínas con funciones inflamatorias y neuroprotectoras	27
Figura 8. Resultados del panel de proteínas con funciones neuroprotectoras y neuroinflamatorias.....	39

Índice de abreviaturas

ANG1: Angiopoyetina 1
ApoD: Apolipoproteína D
bFGF: Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BHE: Barrera hematoencefálica
CXC3L1: Fractalquina
CXCL1: Ligando de quimiocinas 1
CXCL5: El ligando de quimiocinas 5
DM: Diabetes mellitus
DM2: Diabetes mellitus Tipo 2
EEF2: Factor de alargamiento eucariote 2
ESCRT: Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte
EVs: Vesículas extracelulares
Fas L: Ligando de Fas
GCSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GLAST: Transportador de glutamato/aspartato
HSPA8: Proteína 8 de choque térmico
IFN gamma: Interferón gama
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1 alfa: Interleucina alfa
IL-1 beta: Interleucina 1 beta
IL-10: Interleucina 10
IL-4: Interleucina 4
KC: Quimiocina
Kir4.1: Proteína de canal de potasio rectificador interno dependiente de ATP
LIX: Quimiocina
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDA: Malondialdehído
MIP-1 alfa: Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
MMP-2: Metaloproteinasas de matriz-2
MMP-3: Metaloproteinasas de matriz-2
MV: Microvesículas
NEG: Negativo
Ngb: Neuroglobina
PDGFR α : Factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa
POS: Positivo
RAGE: Receptor para compuestos de glicosilación avanzada

ROS: Especies reactivas de oxígeno
SDF-1 alfa: Factor derivado de células estromales alfa-1
SNC: Sistema Nervioso Central (SNC).
SNP: Sistema nervioso periférico
TARC: Quimioquina (C-C motif) ligando 17
TEM: Microscopia electrónica de transmisión
TGF-beta: Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

Los astrocitos son fundamentales para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Diversos estudios han demostrado que los exosomas son fundamentales para la comunicación intercelular debido al contenido de diversas biomoléculas que pueden transportar. En un estado patológico, los exosomas, podrían potenciar o aminorar el desarrollo de complicaciones, dependiendo del contexto fisiopatológico. Los niveles crónicos de hiperglicemia a nivel de SNC, alteran la funcionalidad de las células gliales y por lo tanto podrían afectar las propiedades neuroprotectoras moduladas por los astrocitos. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión marcadores de neuroprotección en exosomas derivados de astrocitos cultivados en condiciones de hiperglucemia. Se realizaron estudios *in vitro*, en astrocitos de la línea celular C8-D1A, expuestos a concentraciones de 5.5 mM (normal) y 25 mM de glucosa (elevada), por siete días. Posteriormente se aislaron los exosomas del medio condicionado y se analizaron los cambios en la secreción de exosomas, en el perfil de 23 de proteínas neuroprotectoras o neuroinflamatorias, así como los cambios en la expresión del miR-29a exosomal. Los resultados indican una disminución en la secreción de exosomas en los astrocitos cultivados en concentraciones de glucosa alta. También se observa una mayor expresión de miR-29a en los exosomas aislados en condiciones de glucosa elevada. Además, se observó que existe una disminución de IGF-I y IL-10, y un aumento de expresión de MCP-1 y MCSF en exosomas aislados en condiciones de glucosa elevada. Los niveles elevados de glucosa en astrocitos modifican la tasa secreción de exosomas, el perfil de expresión de proteínas y del miR29a, moléculas relacionadas con procesos de neuroprotección.

Palabras clave: astrocitos, exosomas, hiperglicemia, miR-29a, proteínas neuroprotectoras

Abstract

Astrocytes are essential for the proper functioning of the nervous system. Various studies have shown that exosomes are essential for intercellular communication due to the content of various biomolecules that they can transport. In a pathological state, exosomes could enhance or reduce the development of complications, depending on the pathophysiological context. Chronic levels of hyperglycemia at the CNS level alter the functionality of glial cells and therefore could affect the neuroprotective properties modulated by astrocytes. The objective of this work was to analyze the expression of neuroprotection markers in exosomes derived from astrocytes cultured under hyperglycemic conditions. In vitro studies were carried out in astrocytes of the C8-D1A cell line, exposed to concentrations of 5.5 mM (normal) and 25 mM (high) glucose, for seven days. Subsequently, the exosomes were isolated from the conditioned medium and the changes in exosome secretion, in the profile of 23 neuroprotective or neuroinflammatory proteins, as well as changes in the expression of exosomal miR-29a were analyzed. The results indicate a decrease in exosome secretion in astrocytes cultured at high glucose concentrations. Higher expression of miR-29a is also observed in exosomes isolated under elevated glucose conditions. In addition, it was observed that there is a decrease in IGF-1 and IL-10, and an increase in the expression of MCP-1 and MCSF in exosomes isolated under high glucose conditions. Elevated glucose levels in astrocytes modify the secretion rate of exosomes, the expression profile of proteins, and miR29a, molecules related to neuroprotection processes.

Keywords: astrocytes, exosomes, hyperglycemia, miR-29a, neuroprotective proteins

I. Marco teórico

1. Diabetes y cerebro

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizado por hiperglucemia crónica originada por defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o inclusive ambas (Punthakee *et al.*, 2018). Existen distintos tipos de DM, pero la más prevalente es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que se caracteriza por resistencia a la insulina, es decir, el organismo es capaz de producir insulina, pero la acción de ésta es ineficaz.

Los niveles elevados de glucosa en sangre de manera crónica generan el desarrollo de complicaciones que afectan el corazón, los vasos sanguíneos, retina, riñones, el sistema nervioso periférico (SNP) y el sistema nervioso central (SNC) (Sanzana y Durruty, 2013). En el caso específico del SNC las concentraciones elevadas de glucosa en sangre de forma crónica también causan complicaciones, con un impacto más severo a nivel celular (Jaramillo, 2013). En el cerebro, un control metabólico deficiente de glucosa aumenta la actividad mitocondrial y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), que deterioran las funciones celulares y promueven el desarrollo de patologías, como déficit cognitivo, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, demencia, entre otras (Brownlee, 2001).

1.2 Metabolismo de la glucosa en el cerebro

El cerebro humano tiene alrededor de 170 mil millones de células, que consumen de entre el 20 y 22% de toda la glucosa que es ingerida, debido a que las células cerebrales están en constante actividad metabólica, ya que requieren una demanda energética elevada (Baez, *et. al.*, 2016; Mergenthaler, 2013).

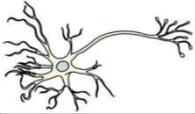
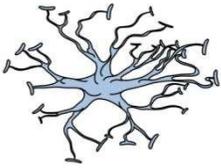
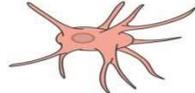
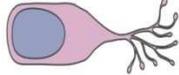
El suministro de glucosa al cerebro está regulado por el acoplamiento neurovascular. La glucosa ingresa al cerebro desde la sangre atravesando la barrera hematoencefálica (BHE) a través de transportadores de glucosa (principalmente GLUT1). La distribución rápida de glucosa en el cerebro es asistida

por una red metabólica acoplada de células gliales que incluyen a los astrocitos, microglía, tanicitos, polidendrocitos y oligodendrocitos (Tabla 1) y neuronales interconectadas por uniones gap (Parpura *et al.*, 2012; Kimelberg, 2010).

El metabolismo de la glucosa proporciona energía para las funciones fisiológicas cerebrales a través de la generación de ATP. Además, la glucosa es fundamental para el mantenimiento neuronal, así como para la producción de neurotransmisores (Mergenthaler *et al.*, 2013).

Si bien, para la función correcta del cerebro se requiere glucosa, en patologías como la DM las concentraciones elevadas de glucosa de forma crónica pueden causar defectos en el funcionamiento de las neuronas y de las células gliales, particularmente en los astrocitos (Mergenthaler *et al.*, 2013).

Tabla 1. Tipos de células en el sistema nervioso central.

TIPO CELULAR	MARCADORES CELULARES	FUNCIONES CELULARES
NEURONA 	-Sinapsina -Nestina	-Procesamiento de información. -Integración de entradas sensoriales. -Modulación del comportamiento.
ASTROCITO 	-Proteína ácida fibrilar glial (GFAP). -Aldehído deshidrogenasa miembro de la familia (ALDH1). -Transportador de glutamato/aspartato (GLAST).	-Soporte metabólico. -Recaptura de neurotransmisores. -Acoplamiento neurovascular. -Producción de gliotransmisores.
MICROGLÍA 	-CD11b -Receptor fractalina (CX3CR1) -IBA1	-Poda sináptica. -Fagocitosis de restos celulares. -Vigilancia inmunológica -Inflamación.
OLIGODENDROCITO 	-O4 -Glicoproteína oligodendrocito de mielina (MOG). -Proteína básica de mielina (MBP).	-Mielinización. -Soporte trófico para neuronas.
POLIDENDROCITO (NG2) 	-Factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α). -NG2. -SOX10.	-Precursor de oligodendrocitos. -Neurogénesis. -Integridad de la barrera hematoencefálica.
TANICITO 	-Vimentina. -Transportador de glutamato/aspartato (GLAST). -RAX.	-Neurogénesis. -Integridad de la barrera hematoencefálica. -Importación de nutrientes al sistema nervioso central.

En esta tabla se resume los diferentes tipos de células encontradas en el SNC, los marcadores moleculares y las funciones principales (Kimelberg, 2010).

1.3 Astrocitos y sus funciones

Las interacciones de astrocitos con las neuronas permiten la homeostasis sistémica de la glucosa, debido a que los astrocitos poseen la mayor proporción de las reservas de glucógeno en el SNC, y que apoyan al metabolismo neuronal (Guillamón-Viviancos *et al.*, 2015).

Las células gliales son relevantes en el funcionamiento y desarrollo del cerebro, ya que participan en la proliferación neuronal, la supervivencia y la sinaptogénesis, además de mantener la transmisión sináptica. Así mismo, transportan nutrientes dentro del cerebro, expresan receptores para numerosos neuropéptidos, neurotransmisores y factores de crecimiento, producen moléculas neuroactivas y expresan enzimas necesarias para la detección y procesamiento de señales nutricionales (Douglass *et al.*, 2017). Los astrocitos también poseen funciones antioxidantes, debido a que expresan proteínas involucradas en la neutralización de radicales libres, que son dañinos y alteran de forma directa la homeostasis de la glucosa en el cerebro (McBeen, 2018).

No obstante, a pesar de los requerimientos de glucosa, en un ambiente hiperglucémico los astrocitos muestran alteraciones en diversas funciones celulares, principalmente las relacionadas con la adhesión, la migración, la proliferación, la apoptosis y la expresión de proteínas importantes para la captación de K^+ y glutamato. Por ejemplo, diversas investigaciones han descrito que la exposición de forma prolongada a concentraciones de glucosa elevada puede causar un deterioro irreversible en las uniones gap, afectando la comunicación entre astrocitos; además, se describió una disminución en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Ghandi *et al.*, 2010). Otras investigaciones han demostrado que las concentraciones elevadas de glucosa pueden inhibir el crecimiento de los astrocitos. La proliferación de los astrocitos es un proceso relevante en el SNC, ya que es importante para que se lleve a cabo el proceso de

astroglisis reactiva en respuesta a diversos tipos de daño (Li *et al.*, 2018). En patologías como la DM se ha demostrado que las concentraciones elevadas de glucosa de manera crónica inhiben la activación de los astrocitos después de un accidente cerebrovascular isquémico (Bylicky *et al.*, 2018). Además de los cambios ya mencionados que pueden presentarse en los astrocitos como consecuencia de la hiperglicemia, los astrocitos también presentan cambios metabólicos, como el aumento de la glucólisis, la producción de lactato y ATP (Li *et al.*, 2018).

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el SNC derivadas de la hiperglucemia, afectan el funcionamiento de los astrocitos, disminuyendo la expresión de factores de crecimiento que participan en la integridad estructural de la barrera hematoencefálica, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y la angiopoyetina 1 (ANG1). En estudios realizados en nuestro grupo de trabajo, se ha comprobado que al exponer astrocitos hipotalámicos a concentraciones elevadas de glucosa (25 mM), ocurre un aumento en la expresión de genes importantes para el metabolismo de la glucosa y neurotransmisión glutamatérgica, como: el gen de la *hexocinasa*, *GLUT1*, *GLAST* y *GLT-1*, esto debido posiblemente al incremento de las ROS (Arcos y Morales, 2018). Se ha documentado que las ROS inducen en los astrocitos la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α (Wang *et al.*, 2012). La secreción continua de factores de crecimiento y mediadores proinflamatorios provocan como resultado la expresión de proteínas proapoptóticas, como la proteína 11 similar a Bcl-2 (BIM), que promueven la muerte de los pericitos y neuronas (Wang *et al.*, 2012). Las concentraciones elevadas de glucosa de manera crónica también afectan la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis iónica, una de ellas es la proteína de canal de potasio rectificador interno dependiente de ATP (Kir4.1), que participa en la formación de canales iónicos en la membrana de los astrocitos para la captación de K⁺ y parcialmente del glutamato liberado durante los procesos sinápticos (Rivera-Aponte *et al.*, 2015).

La disfunción provocada por la DM en astrocitos puede comprometer su relación funcional con otros tipos celulares, así como la capacidad para mantener la homeostasis energética.

1.4 Características de las vesículas extracelulares

Es un hecho que el procesamiento de información en el cerebro depende de conexiones sinápticas entre neuronas. Existen también numerosas evidencias que en este proceso participan también los astrocitos. Este acoplamiento de los astrocitos en el procesamiento de señales pre y postsinápticas es denominado sinapsis tripartita (Heller *et al.*, 2017). Sin embargo, la relación fisiológica estrecha entre los astrocitos y las neuronas ha llevado al planteamiento de interrogantes importantes que podrían contribuir al conocimiento de esta relación intercelular. Se ha propuesto que las vesículas extracelulares (EVs) podrían tener una contribución relevante en la comunicación astrocito-neurona (Akers *et al.*, 2013).

Las EVs son partículas provenientes de la membrana celular, que están involucradas en la comunicación celular para la regulación de procesos fisiológicos normales e incluso patológicos en el organismo (Akers *et al.*, 2013). Las EVs son secretadas por la mayoría de las células y pueden transportar moléculas biológicamente activas a sus células blanco. Existen diferentes tipos de EVs y se clasifican dependiendo de su biogénesis y propiedades biofísicas. Actualmente la clasificación está dada en tres tipos principales: exosomas, microvesículas (MV), y cuerpos apoptóticos (Tabla 2) (Lee *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013).

Tabla 2. Clasificación de los tipos principales de EVs con base en origen, tamaño, función, marcadores moleculares y el contenido (Lee *et al.*, 2012)

	Exosomas	MV	Cuerpos apoptóticos
Origen	Vía endocítica	Membrana plasmática	Membrana plasmática
Tamaño	50-100 nm	50-1,000 nm	500-2,000 nm
Función	Comunicación intercelular	Comunicación intercelular	Facilitar la fagocitosis
Marcadores	Alix, Tsg101, tetraspaninas (CD81, CD63, CD9), flotilina-1	Integrinas, selectinas, CD40	Anexina V, fosfatidilserina
Contenido	Proteínas y ácidos nucleicos (mRNA, miRNA y otros RNAs no codificantes)	Proteínas y ácidos nucleicos (mRNA, miRNA y otros RNA no codificantes)	Fracciones nucleares, orgánulos celulares

Resumen de la clasificación de los diferentes tipos de EVs.

En diversas investigaciones las EVs han tomado relevancia como un mecanismo de comunicación celular y se ha descrito que podrían contribuir en el desarrollo de ciertas patologías como DM, y con ello promover complicaciones derivadas de esta enfermedad. Uno de los tipos de EVs más estudiados y que se ha relacionado con el desarrollo de patologías, son los exosomas (Borges *et al.*, 2013).

1.5 Función e importancia de los exosomas

Los exosomas son el tipo de EVs de menor tamaño, son fundamentales en la regulación de procesos fisiológicos en las células receptoras, además pueden ser transportados a través de diversos fluidos corporales y se forman en los orgánulos endosomales denominados cuerpos multivesiculares (MVB) (Kawikova y Askenase, 2015). La liberación de los exosomas al medio extracelular ocurre por etapas: la formación de vesículas intraluminales dentro de los MVB, el transporte de los MVB a la membrana plasmática y, por último, la fusión de los MVB con la membrana plasmática (Hessvik y Llorente, 2018). Los exosomas liberados pueden fusionarse

con su célula blanco a través de un proceso endocítico activo no clásico, que es regulado por la proteína de la balsa lipídica, caveolina-1 (Svensson *et al.*, 2013).

El impacto en la función fisiológica mediada por los exosomas se debe al contenido molecular que transportan, que es heterogéneo e incluye proteínas, lípidos, y hasta ácidos nucleicos como mRNAs o RNAs no codificantes (Willis *et al.*, 2017).

Los exosomas en su superficie poseen diversos marcadores, como: tetraspaninas (CD81, CD63 y CD9), flotilina-1, la proteína 8 de choque térmico (HSPA8) y el factor de alargamiento eucariote 2 (EEF2). También presentan marcadores endosómicos como Alix y Tsg101 (Zhao *et al.*, 2014). Estas proteínas permiten la identificación diferencial de los exosomas con respecto a otros tipos de microvesículas.

1.6 Exosomas de astrocitos en procesos de neuroprotección

Los exosomas pueden participar en la comunicación intercelular en el SNC, ya sea para potenciar una patología o bien contribuir en procesos de neuroprotección (Bakhti *et al.*, 2011; Goetzl *et al.*, 2016). Existe evidencia de que los astrocitos podrían secretar exosomas a las neuronas para protegerlas y garantizar que lleven a cabo sus funciones de manera óptima. Por ejemplo, se ha reportado la transferencia del miRNA-133b que participan en la plasticidad neuronal, promueve la remodelación de las neuritas y recuperación funcional después de un accidente cerebrovascular (Xin *et al.*, 2017). El miRNA-361 también es secretado por los exosomas astrocíticos y cumple con funciones anti-apoptóticas (Bu *et al.*, 2020). Sin embargo, y de forma particular se ha reportado evidencia de que la familia miRNA-29 se expresa de manera enriquecida en los astrocitos y se ha especulado que este miRNA podría secretarse en los exosomas para regular procesos de neuroprotección (Ouyang, *et al.*, 2014). La familia miRNA-29 consta de tres miembros: a, b y c. No obstante, el miRNA-29a se expresa en mayor proporción durante el desarrollo del cerebro y está relacionado con procesos de neuroprotección (Ouyang, *et al.*, 2014). Por ejemplo, se han realizado estudios en

los que se compara el crecimiento de astrocitos, neuronas primarias y cerebrales postnatales, y al sobreexpresar al miRNA-29a, los astrocitos y las neuronas crecían más rápido. Sin embargo, los niveles de expresión en los astrocitos cultivados eran de 20 a 40 veces más elevados que en las neuronas cultivadas (Ouyang, *et. al.*, 2013). Algunos estudios indican que el aumento en la expresión del miRNA-29a, protege a las neuronas de la apoptosis durante la maduración neuronal e isquemia. Otro estudio, reporta que el miRNA-29a puede regular la expresión de PUMA, evitando la activación de proteínas proapoptóticas como BAX y BAK e impidiendo que se lleve a cabo el proceso de apoptosis durante un evento isquémico focal. Además, se demostró que el miRNA-29a, protege la función mitocondrial y reduce la lesión celular en los astrocitos, evitando así la degeneración de estas células y protegiendo a las neuronas de isquemia focal (Ouyang, *et. al.*, 2013; Smirnova, *et. al.*, 2005).

Por otro lado, se ha descrito la transferencia de proteínas en exosomas secretados por astrocitos, como la apolipoproteína D (ApoD) que, en un ambiente de estrés oxidativo, como el provocado por la DM, los astrocitos secretan exosomas cargados con ApoD, para disminuir los hidróxidos generados por los radicales libres a hidróxidos lipídicos inertes, que permite la supervivencia neuronal y la reparación de membranas dañadas (Pascua-Maestro *et al.*, 2019). Otro ejemplo de la transferencia de proteínas neuroprotectoras es la neuroglobina (Ngb), proteína con una alta expresión en las células de la retina pero que también se expresa a nivel cerebral en regiones como, la corteza, el tálamo, el cerebelo, el hipocampo y el hipotálamo. La Ngb, se expresa neuronas, y se ha descrito que los astrocitos también tienen la capacidad de sintetizarla y secretarla en exosomas (Wystub, *et. al.*, 2003; Venturini *et al.*, 2019). Aunque la concentración de Ngb en el cerebro es relativamente más baja, se especula que la neuroglobina podría ser una de las moléculas que desempeñen ciertos roles en el mantenimiento de la función neuronal normal y en la respuesta a agresiones patológicas (Yu, *et. al.*, 2009).

Por otra parte, existe información escasa sobre la secreción de exosomas de astrocitos en una condición hiperglucémica, pero se ha especulado que el contenido de los exosomas secretados por estas células también podría modificarse, contribuyendo así al curso de la enfermedad y a las afectaciones en el SNC. El aumento de ROS y algunas citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α podrían causar que la carga de proteínas o miRNAs importados en los exosomas se modifique, repercutiendo en procesos de neuroprotección (Chaudhuri *et al.*, 2018).

No obstante, no solo el contenido de los exosomas puede verse modificado como consecuencia de concentraciones elevadas de glucosa de forma crónica, sino también la tasa en que las EVs son secretadas. Algunos estudios en personas con DM2, han reportado que las concentraciones elevadas de glucosa de manera crónica provocan una mayor secreción de exosomas, esto puede deberse al incremento en la síntesis de proteínas pro-apoptóticas o proteínas antiinflamatorias (Freeman *et al.*, 2018; Shaimardanova *et al.*, 2019). Si bien, este tipo de investigaciones no fueron realizadas en el SNC, sí brindan una pauta de la importancia de realizar estudios enfocados en el análisis de los exosomas secretados por astrocitos y como la neuroprotección se ve comprometida en una condición diabética.

I. Planteamiento del problema

¿Los exosomas secretados por astrocitos de la línea celular C8-D1A en condiciones de hiperglucemia, aumentarán la expresión de marcadores de neuroprotección?

II. Justificación

Los astrocitos han demostrado ser fundamentales para el funcionamiento correcto del SNC. Las modificaciones en su actividad podrían contribuir a las alteraciones relacionadas a nivel de SNC. En enfermedades como la DM2, las concentraciones elevadas de glucosa de forma crónica deterioran la funcionalidad de los astrocitos, que eventualmente impacta en las funciones cerebrales, aumentando el riesgo de padecer, accidentes cerebrovasculares, convulsiones, demencia y deterioro cognitivo.

En diversos estudios se ha demostrado que los exosomas son fundamentales para la comunicación intercelular debido al contenido de diversas biomoléculas. En un estado patológico, los exosomas, podrían potenciar o aminorar el desarrollo de complicaciones, dependiendo del contexto fisiopatológico.

Los astrocitos son elementos imprescindibles en la homeostasis neuronal. Sin embargo, durante la progresión de una enfermedad o daño neuronal, los astrocitos pueden desempeñar un papel dual, ya sea participando en la protección de las células neuronales o bien exacerbando el daño. En el desarrollo de estos procesos se ha sugerido que los exosomas podrían participar activamente. En patologías como la DM, que provoca alteraciones en los astrocitos, el contenido de los exosomas secretados por estas células podría verse alterado, repercutiendo en la expresión de algunas proteínas neuroprotectoras o bien la expresión de miRNAs involucrados en procesos de neuroprotección como el miRNA-29a.

El número de investigaciones enfocadas en el análisis de los exosomas provenientes de astrocitos hiperglucémicos es limitado y este trabajo se enfocará en estudios *in vitro*, utilizando astrocitos de la línea celular C8-D1A en condiciones de hiperglucemia, planteando la posibilidad de que los exosomas secretados por estas células, modificarán la expresión de marcadores de neuroprotección y el miRNA-29a o bien si de esta forma, la neuroprotección se ve comprometida.

Los hallazgos de esta investigación serán de utilidad para ampliar el conocimiento sobre las alteraciones en la glía y el rol que desempeñan los exosomas en una condición diabética. Además, de generar evidencias que sugieran los posibles mecanismos moleculares que podrían estar implicados en el desarrollo de complicaciones a nivel cerebral causadas por la DM2.

III. Hipótesis

Los exosomas secretados por astrocitos de la línea celular C8-D1A en condiciones de hiperglucemia, aumentarán la expresión de marcadores de neuroprotección.

IV. Objetivos

Objetivo General:

Analizar la expresión marcadores de neuroprotección de exosomas derivados de astrocitos cultivados en condiciones de hiperglucemia.

Objetivos específicos:

1. Comparar la cantidad de exosomas secretados por astrocitos de la línea celular C8-D1A, cultivados en una condición de normo e hiperglucemia.
2. Determinar la expresión del gen *miRNA-29a* en exosomas derivados de astrocitos de la línea celular C8-D1A en condiciones de glucosa elevada.
3. Determinar los cambios en la expresión de proteínas exosomales relacionadas con daño neuronal o neuroprotección en células C8-D1A cultivadas en una condición de normo e hiperglucemia.

V. Diseño de investigación

Tipo de estudio: experimental.

a) Criterios de selección de los sistemas de estudio.

Se emplearán astrocitos de la línea celular C8-D1A

b) Características del grupo control o del grupo o grupos de estudio.

Grupo control:

- Astrocitos de la línea celular C8-D1A cultivados en concentraciones normales de glucosa (5.5 mM).

Grupo de estudio:

- Astrocitos de la línea celular C8-D1A cultivados en concentraciones elevadas de glucosa (25 mM).

c) Número de comparaciones entre los grupos de estudio.

Tres experimentos independientes por triplicado

d) Variables.

Dependientes:

Cambios en la expresión de proteínas neuroprotectoras y cambios en la expresión del *miRNA-29a*

Cantidad de exosomas secretados

Independiente:

Concentraciones diferenciales de glucosa.

Modificadoras de efecto:

Número de pasajes celulares previo a los ensayos.

Tiempo de exposición de los astrocitos a concentraciones elevadas de glucosa.

e) Consideraciones éticas y de bioseguridad.

Los residuos peligrosos biológicos-infecciosos producidos serán manejados considerando la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

f) Análisis de datos.

Los datos fueron expresados con media +/- desviación estándar. La evaluación estadística de las diferencias significativas será analizada usando la prueba t de Student, mediante el software STATA 14. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con el valor de $p < 0.05$.

VI. Materiales y métodos

Cultivo celular de la línea celular C8-D1A

Se utilizó la línea celular C8-D1A de astrocitos de ratón para realizar el cultivo. Las células fueron mantenidas en medio DMEM/F12/1% antibiótico-antimicótico adicionado con 5% SFB (GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% CO₂.

Subcultivo de la línea celular C8-D1A

Una vez que las células C8-D1A alcanzaron el 80% de confluencia, se realizó el subcultivo, desprendiendo mecánicamente a las células, para ser sembradas en medio DMEM-F12/N2/B27/1% antibiótico-antimicótico (GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA). A partir de este cultivo, el SFB fue sustituido por suplementos para evitar la contaminación por exosomas presentes en este fluido. Los cultivos de la línea celular C8-D1A fueron mantenidos a 37°C con 5% de CO₂ hasta exponerlos al tratamiento con glucosa. Las células control fueron tratadas con concentraciones de 5 mM de glucosa, mientras que los cultivos del grupo de estudio fueron tratados con concentraciones de 25 mM de glucosa, cambiando el medio cada 48 h.

Aislamiento de exosomas

A partir de los cultivos de la línea celular C8-D1A, se realizó el aislamiento de exosomas utilizando el protocolo basado en ultracentrifugación descrito por Kucharzewska *et. al*, 2013. Después del tratamiento con glucosa, se recuperó el medio condicionado y fue centrifugado a 400 g por 10 min, el sobrenadante fue recuperado y se centrifugó a 2000 g por 10 min. El sobrenadante recuperado fue transferido a tubos nuevos, y se centrifugó a 16,500 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a tubos para ultracentrífuga y se ultracentrifugó (Sorvall S50-A™, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 118,000 g por 73 min a 4°C. Posteriormente, el botón fue recuperado añadiendo 1.2 mL de PBS 1X y trasladado a tubos de Eppendorf de 1.5 mL para realizar la segunda

ultracentrifugación (Sorvall S55-A2™, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 118,000 g por 45 min a 4°C. Por último, se recuperó el botón que contiene los exosomas y fue resuspendido en 100 µL de RIPA para estudios posteriores.

Cuantificación de exosomas por Nanosight

Los exosomas fueron cuantificados utilizando el NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Columbia, Maryland, USA) en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El equipo utiliza tecnología de análisis de rastreo de nanopartículas que usa las propiedades tanto de dispersión de luz como de movimiento Browniano para obtener mediciones de concentración y distribución del tamaño de las partículas en una suspensión líquida. El software rastrea las partículas individualmente y por medio de la ecuación de Stokes-Einstein calcula el diámetro hidrodinámico de cada una de ellas.

Western blot para la caracterización de exosomas

Las muestras de exosomas fueron resuspendidos en RIPA y se cuantificaron las proteínas totales. Se adicionó el buffer de carga 4x Laemmli a la de muestra de exosomas aislados, se colocando 40 µg de c/muestra, corriendo el gel a 100 V por 1 h, y transfiriendo a la membrana de PVDF, a 60 V por 1 h. La membrana fue colocada en TBS-T-5%-leche y bloqueada por 2 h, posteriormente se añadió el anticuerpo primario (anti-CD9, anti-Anexina V) y diluido en TBS-T-1%-leche e incubado a 4°C por 18 h, la membrana fue lavada e incubada con el anticuerpo secundario correspondiente y diluido en TBS-T-1%-leche por 1 h. Finalmente, la membrana fue lavada con TBS-T a temperatura ambiente. La detección de las bandas se realizó por quimioluminiscencia.

Extracción ARN de exomas y síntesis del ADNc por RTqPCR

Para la extracción del ARN de exosomas se empleará el kit DNA, RNA, and protein purification (NucleoSpin), siguiendo la instrucción del fabricante. Al obtener el ARN de los exosomas se cuantificará en un NanoDrop 2000c. Posteriormente, se realizará la síntesis del ADNc a partir de 5 µg de ARN total (con el kit microScript microRNA cDNA Synthesis) utilizando el termociclador CFX96 de Biorad.

PCR en Tiempo Real (qPCR)

El nivel de expresión del miRNA-29a en astrocitos de la línea celular C8-D1A, se determinó por PCR en Tiempo Real utilizando el SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix®, utilizando los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido para cada gen (Tabla 1), en el termociclador CFX96 de Biorad.

<i>Gen</i>	<i>Sentido</i>	<i>Antisentido</i>
<i>miRNA-29a</i>	AACCGATTCAGATGGTGCT	ACCCCTTAGAGGATGACTGAT
<i>U6</i>	CGCTTCGGCAGCACATATAC	AAAATATGGAACGCTTCACGA

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos del miRNA-29a y U6 para qPCR.

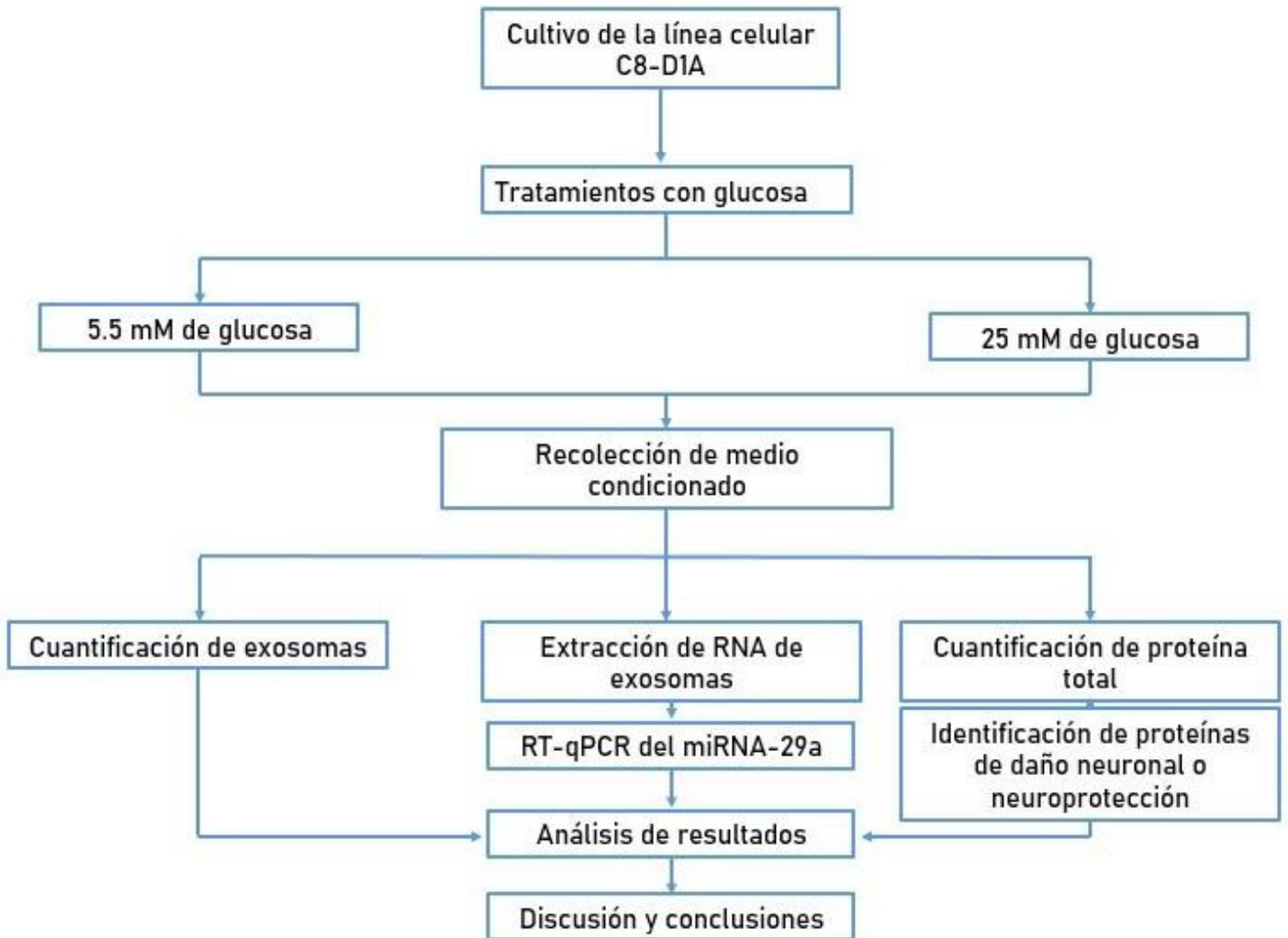
A cada reacción de PCR, se le añadió la Máster Mix (mezcla de reactivos para PCR), los primers para *miRNA-29a* y *U6* (como control interno), todo bajo concentraciones óptimas para la amplificación de los moldes de ADNc.

Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo sin ADNc. Para las condiciones de amplificación se consideraron las recomendadas por el fabricante del kit y del termociclador.

Efecto funcional de los exosomas en la expresión de proteínas de neuroprotección y citocinas proinflamatorias

Para determinar los cambios en la expresión de proteínas neuronales y citocinas se utilizó el arreglo de proteínas comercial RayBio C-Series Mouse Neuro Discovery Array C1 Kit (Raybiotech, Atlanta, Georgia, USA). Detectando 23 proteínas de ratón neurológicamente relevantes. Adecuado para suero, plasma, medios de cultivo celular y otros tipos de muestras líquidas. Siguiendo las instrucciones del fabricante.

VII. Diagrama de trabajo



VIII. Resultados

Tratamientos con glucosa en los astrocitos de la línea celular C8-D1A

La línea celular de astrocitos C8-D1A, fue sembrada en frascos de 75 cm³ con medio DMEM-F12/antibiótico-antimicótico, suplementado con SFB 5%, e incubado a 37°C con 5% CO₂, durante 5 días para llegar a confluencia de 80%. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos con glucosa durante 7 días; para el grupo control las células fueron tratadas con 5.5 mM de glucosa, mientras que para el grupo experimental a 25 mM de glucosa (Fig.1). Transcurridos los 7 días de tratamientos, se puede observar una disminución en el número de células en el grupo experimental, en comparación con el grupo control.

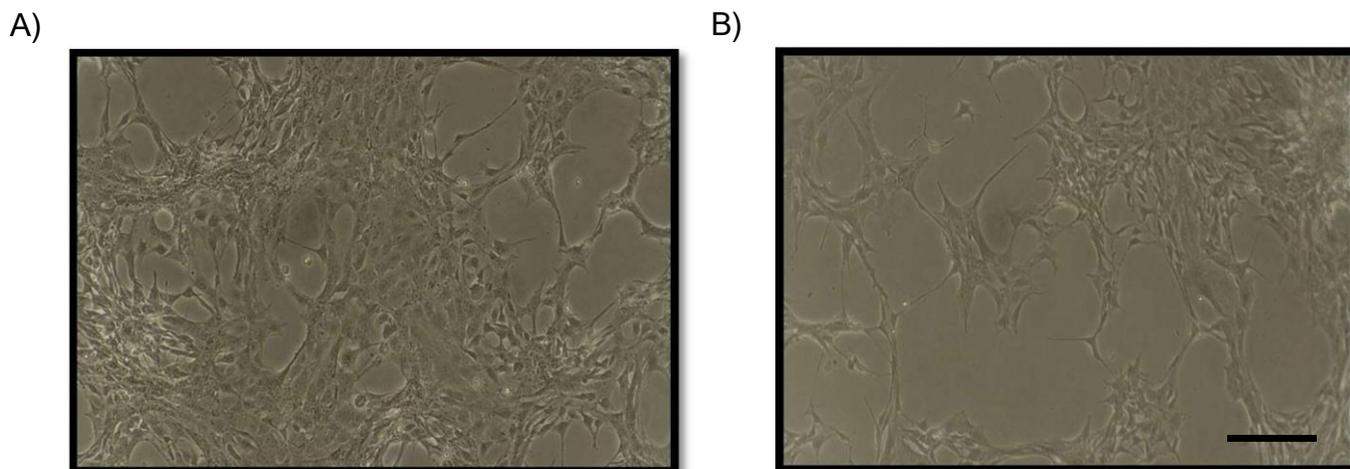


Fig. 1. Cultivos de astrocitos de la línea celular C8-D1A tratadas a concentraciones diferentes de glucosa durante 7 días. La figura A muestra los astrocitos que fueron expuestos a concentraciones de 5.5 mM de glucosa. La figura B muestra a las células astrocíticas a la concentración de 25mM de glucosa. Barra de calibración 50µm.

Ensayos de la viabilidad celular de los astrocitos de la línea celular C8-D1A a diferentes concentraciones de glucosa

Se realizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular de los astrocitos de la línea celular C8-D1A tratados a diferentes concentraciones de glucosa, con la finalidad de observar como las concentraciones de glucosa pueden afectar la viabilidad de las células. Para este fin, se utilizaron las concentraciones de glucosa de 5 mM, 12.5 mM, 25 mM, además, se usó sorbitol a una concentración de 19.5 mM para determinar si la reducción de la viabilidad celular es ocasionada por alteraciones en la presión osmótica. El ensayo mostró que la viabilidad celular de las células C8-D1A tratadas a 12.5 mM de glucosa fue de 81.3%. Sin embargo, se observa una reducción más notoria en las células tratadas a 25 mM de glucosa, la con una viabilidad celular de 65%. Con respecto al tratamiento con sorbitol, no hubo diferencias significativas, ya que se encontró una viabilidad del 96% (Fig. 2).

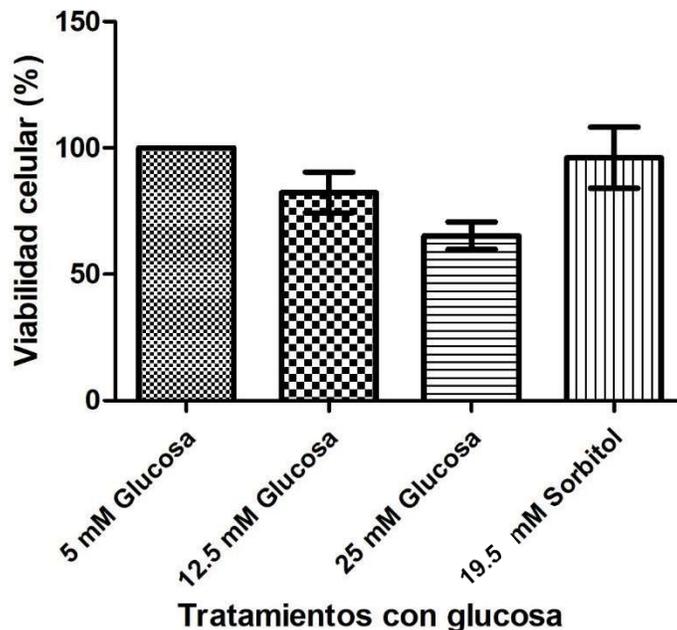


Fig 2. Determinación de la viabilidad celular de astrocitos de la línea celular C8-D1A. Las células de la línea celular C8-D1A fueron tratadas con las diferentes concentraciones de glucosa durante 7 días.

Aislamiento de exosomas de medio condicionado por ultracentrifugación

Una vez transcurridos los 7 días de tratamientos, se realizó la recolección del medio condicionado para aislar a los exosomas secretados por los astrocitos de la línea C8-D1A como respuesta a los tratamientos con glucosa. Para este fin, la técnica elegida fue la ultracentrifugación.

Microscopia electrónica de trasmisión

Como parte de la caracterización de exosomas, mediante el uso de la microscopia electrónica de transmisión (TEM) se identificaron las vesículas aisladas, que muestran la morfología característica de los exosomas. Los exosomas fueron aislados de cada una de las condiciones de normo e hiperglicemia. En los campos observados en la condición de normoglucosa, se observa un mayor número de exosomas (5.5 mM de glucosa) (Fig. 4A) a diferencia de los exosomas aislados de la condición de hiperglicemia (25 mM de glucosa) (Fig. 4B).

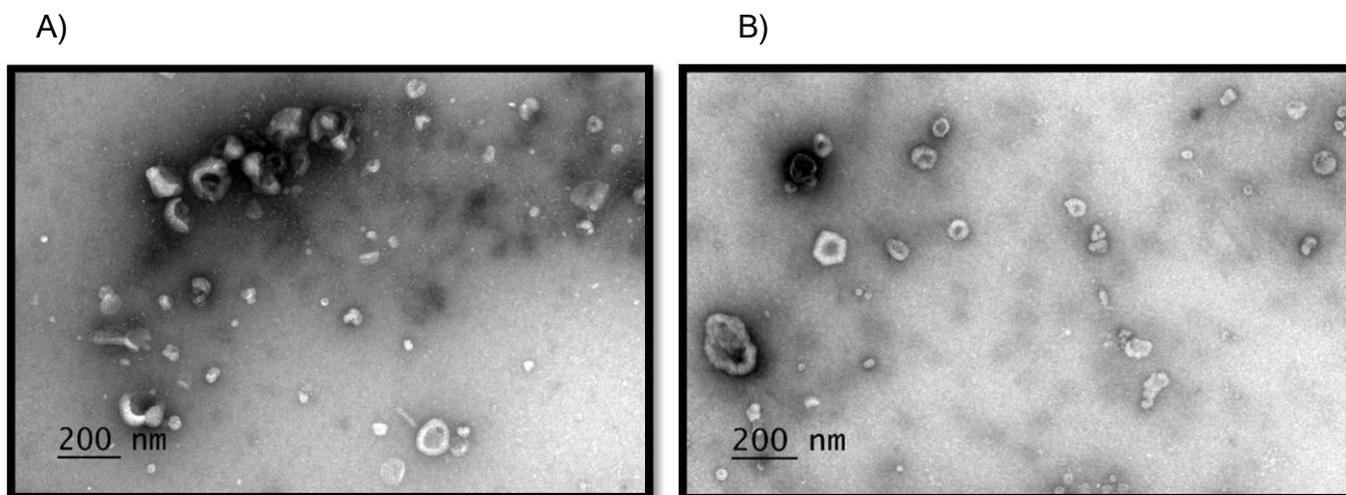


Fig. 3. Fotografía tomada por medio de microscopia electrónica de transmisión (TEM). La imagen A, muestra exosomas en condiciones de 5.5 mM de glucosa. En la figura B, se pueden observar exosomas en condiciones de 25 mM de glucosa. En ambas figuras se muestra una morfología tipo cup-shaped (forma de copa) que se ha descrito en la literatura como la forma característica de tipo de EVs.

Detección de proteínas constitutivas de exosomas CD9 y Anexina V

Con la finalidad de asegurarnos que las vesículas extracelulares aisladas por ultracentrifugación correspondían a exosomas, se realizó la detección de proteínas constitutivas de exosomas por medio de western blot.

Posterior a la cuantificación de proteína total de exosomas, se realizó el western blot para la detección de la tetraspanina CD9 y de la proteína anexina V (Fig. 4). Concluyendo, que el aislamiento de exosomas mediante ultracentrifugación es eficiente.

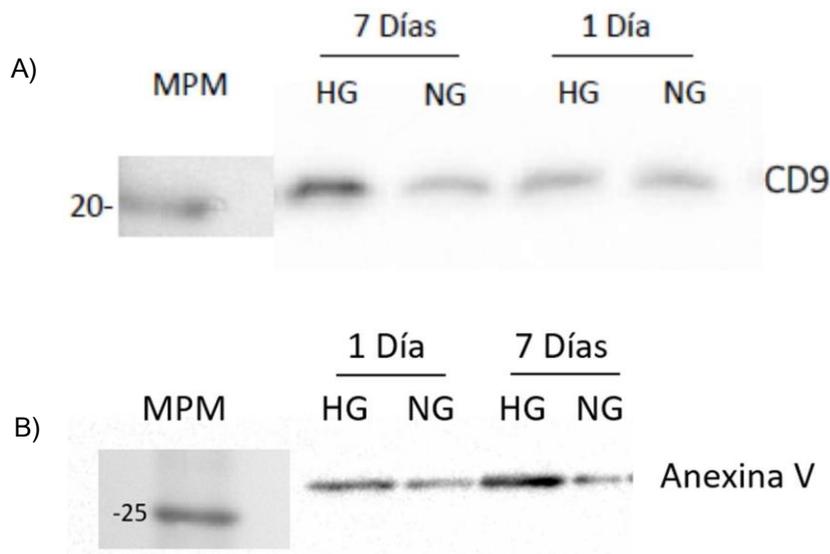


Fig. 4. Identificación de proteínas constitutivas de exosomas de medio condicionado derivados de astrocitos C8-D1A. A) Identificación de CD9, carril 1: marcador de peso molecular (MPM), el carril 2 y 3: exosomas aislados después de 7 días de tratamiento a 25 mM y 5.5 mM de glucosa (respectivamente), el carril 4 y 5: exosomas después de 1 día de tratamiento con glucosa a 25 y 5.5 mM (respectivamente). B) Identificación de Anexina V, carril 1: marcador de peso molecular (MPM), carril 2 y 3: exosomas aislados después de 1 día de tratamiento a 5.5 mM y 25 mM de glucosa (respectivamente), carril 4 y 5: exosomas después de 7 días de tratamiento con glucosa a 5.5 y 25 mM (respectivamente).

Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

Para determinar si existían modificaciones en el número de exosomas como consecuencia de la glucosa elevada, se realizó el NTA, comparando ambos grupos de estudio, normoglicemia (5.5 mM de glucosa) e hiperglicemia (25 mM de glucosa). En el medio condicionado aislado a los 7 días de tratamiento en la concentración de 5.5 mM de glucosa, se observó una mayor cantidad de exosomas en el rango de tamaño de entre los 100 y 150 nm, en comparación con los exosomas aislados de la condición de hiperglicemia (Fig. 5).

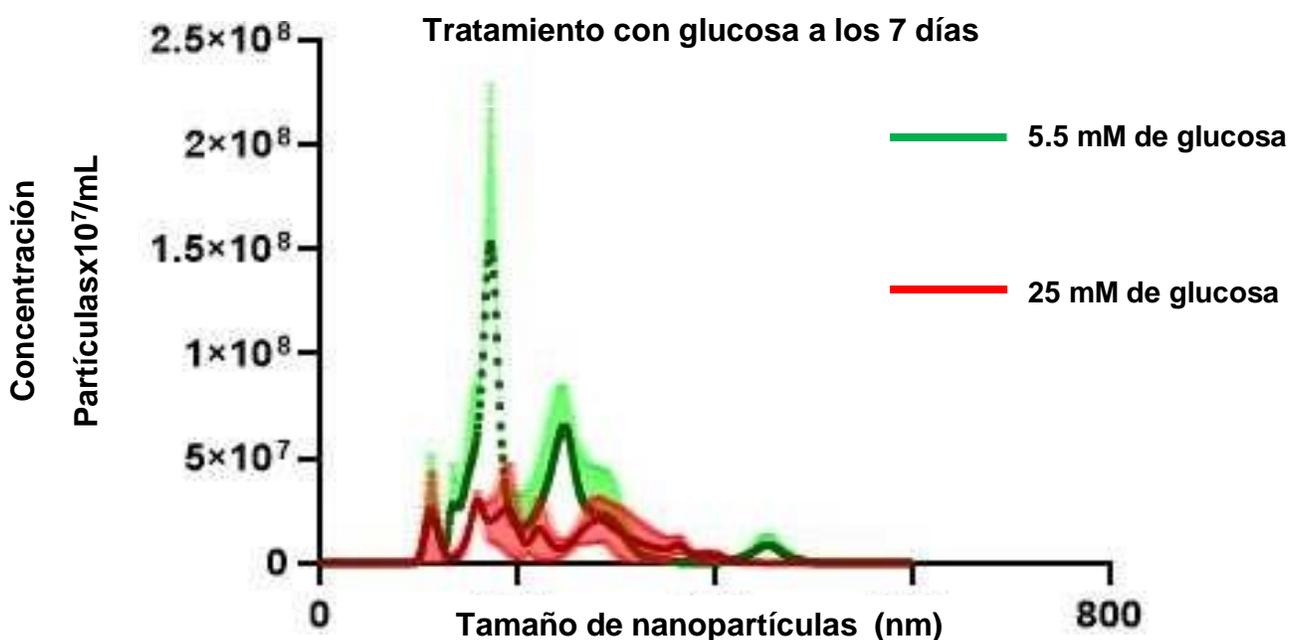


Fig. 5. Análisis de nanopartículas. Se analizaron las concentraciones de exosomas a los 7 días, tanto en la condición control (5.5 mM de glucosa) como de estudio (25 mM de glucosa). La concentración de exosomas en la condición de 5.5 mM de glucosa fue de $8.69 \times 10^7 \pm 2.81 \times 10^7$ partículas/mL. Mientras que en el grupo control la concentración de exosomas fue de $3.93 \times 10^7 \pm 3.20 \times 10^6$ partículas/mL.

Expresión relativa del miR-29a normalizado con U6 en células de la línea celular C8-D1A

Estudios indican que el aumento en la expresión del miRNA-29a, protege a las neuronas de la apoptosis durante la maduración neuronal, mejora y protege la función mitocondrial, evitando la neurodegeneración (Ouyang, *et. al.*, 2013). Por ello, se realizó el análisis de la expresión de este RNA en exosomas (Fig 6). Los

resultados muestran que la expresión del RNAm del miRNA-29a a los siete días de exposición aumenta, particularmente en la condición de glucosa elevada, comparado con el gen control.

Por otro lado, al primer día de exposición a la glucosa a las concentraciones de 5.5 mM, como a 25 mM de glucosa, la detección de la expresión del RNAm del miRNA-29a, fue muy baja, comparado con el gen control (U6).

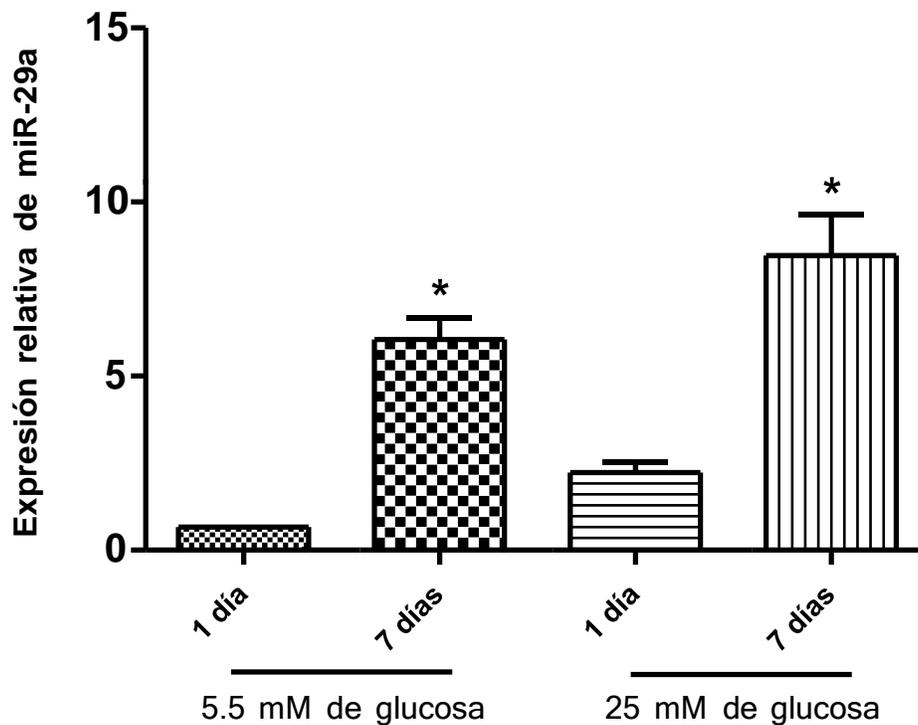


Fig. 6. Expresión de *miRNA-29a* en células de línea celular C8-D1A. Los cultivos la línea celular C8-D1A fueron mantenidos con glucosa elevada (5.5 mM de glucosa), y con glucosa normal (25 mM de glucosa). La expresión se determinó con PCR cuantitativa y normalizada con respecto a *U6* (método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$). Utilizando la prueba estadística de ANOVA y el método comparativo de Tukey. Valor de $P=0.0011$.

Análisis de proteínas neuroprotectoras contenidas en exosomas

Para realizar el análisis de las proteínas neuroprotectoras, que estaban contenidas en los exosomas, se utilizó una matriz de anticuerpos semicuantitativa, detectando 23 proteínas. El análisis de estas proteínas fue realizado en ambas condiciones de cultivo contempladas en nuestro estudio (5.5 mM de glucosa y 25 mM de glucosa). En los exosomas, aislados a la concentración de 25 mM de glucosa se observaron cambios en la expresión de algunas citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-4, TNF-alfa y proteínas como VEGF. En contraparte, las proteínas analizadas de los exosomas aislados de medio condicionado con la concentración de 25 mM, que aumentaron su expresión fueron MCP-1, MCSF, TGB-beta y algunas proteínas antiinflamatorias como IL-10. Sin embargo, en esta condición también se modificó la expresión de proteínas como IGF-1, IL1-alfa (Fig. 7).

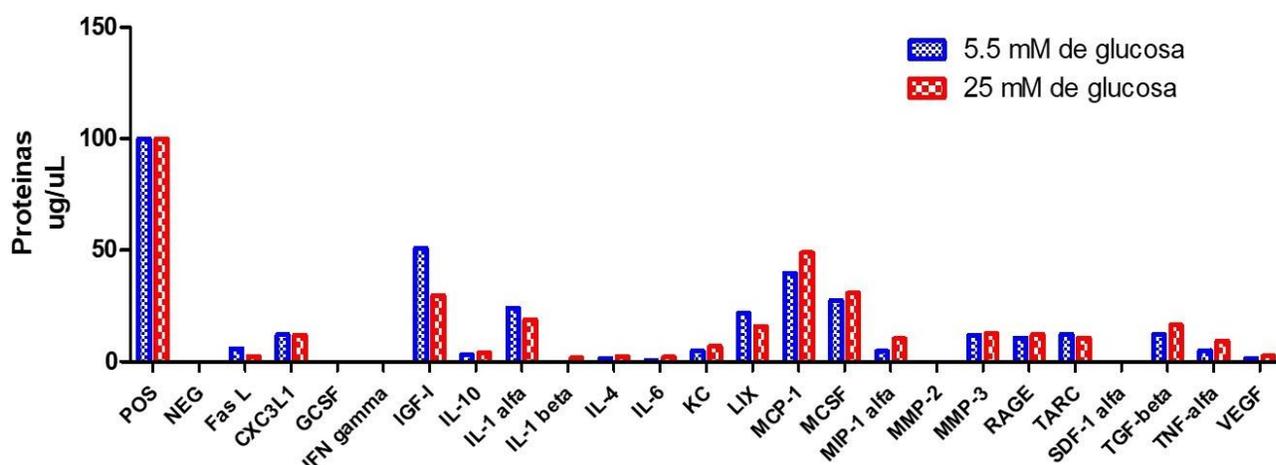


Fig. 7. Arreglo de 23 proteínas con funciones inflamatorias y neuroprotectoras. Los exosomas fueron aislados de cultivos de la línea celular C8-D1AI, mantenidos con glucosa elevada (25 mM de glucosa), y con glucosa normal (5 mM de glucosa) durante siete días. Para el análisis del panel de proteínas de utilizo el extracto de proteína total. Gráficas individuales de las principales proteínas que modifican su expresión se muestran en el anexo de este trabajo.

*POS: Positivo, *NEG: Negativo, *Fas L: Ligando de Fas, *CXCL1: Fractalquina, *G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos, *IFN gamma: Interferón gama, *IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1, *IL-10: Interleucina 10, *IL-1 alfa: Interleucina alfa, *IL-1 beta: Interleucina 1 beta, *IL-4: Interleucina 4, *KC: Quimiocina CXCL1, *LIX: Quimiocina CXCL5, *MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1, *MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, *MIP-1 alfa: Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa, *MMP-2: Metaloproteinasas de matriz-2, *MMP-3: Metaloproteinasas de matriz-2, *RAGE: Receptor para compuestos de glicosilación avanzada, *TARC: Quimioquina (C-C motif) ligando 17, *SDF-1 alfa: Factor derivado de células estromales alfa-1, *TGF-beta: Factor de crecimiento transformante beta 1, *TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa, *VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

IX. Discusión

La diabetes es una enfermedad de origen multifactorial, que es caracterizada por el incremento de glucosa en la sangre. Las concentraciones de glucosa de manera crónica tienden a alterar el funcionamiento del tejido cerebral, lo que posteriormente conlleva al deterioro neurológico. El tejido cerebral no solo está compuesto por células neuronales, sino también por astrocitos. Los astrocitos, son células que llevan a cabo diferentes funciones en el microambiente cerebral, una de esas funciones es la del soporte metabólico a las neuronas. Por lo tanto, es relevante analizar los efectos que provocan las concentraciones altas de glucosa forma crónica en los astrocitos.

Por otro lado, los exosomas son un tipo vesículas extracelular, que cumplen con funciones de comunicación celular. A nivel de SNC, los astrocitos pueden secretar exosomas que impactan directamente en la funcionalidad de las neuronas, debido a que el contenido que transporta es altamente heterogéneo y depende del contexto fisiológico.

En el presente estudio se analizó la expresión marcadores de neuroprotección de exosomas utilizando una línea celular de astrocitos (C8D-1A) cultivada en condiciones de hiperglicemia.

Como se mencionó anteriormente, la proliferación de astrocitos es un componente importante de la gliosis reactiva, que se activa en respuesta a diversos tipos de daño cerebral. Durante el desarrollo del estudio, uno de los primeros cambios observados en las células astrocíticas al ser expuestas a las concentraciones de glucosa fue una disminución en el número de células en el grupo experimental (25 mM de glucosa), en comparación con el grupo control (5.5 mM de glucosa), considerando que la presión osmótica ejercida por las concentraciones de glucosa utilizadas, pudiera ser la responsable de este efecto, se realizaron ensayos de MTT para determinar si las concentraciones de glucosa usadas eran las responsables de la disminución en la viabilidad, observando que en los astrocitos tratados con 25 mM de glucosa, había una reducción en la viabilidad celular del 65%. Investigaciones

centradas en el metabolismo glucolítico de los astrocitos, han reportado que la presión osmótica no afecta la viabilidad de los astrocitos en concentraciones 5.5 mM y 25 mM de glucosa. Se ha descrito, que a una concentración de 5.5 mM de glucosa la osmolaridad suele ser de 333 mOsm/L y a que 25 mM de glucosa la osmolaridad suele ser de 336 mOsm/L. Estos estudios sugieren que la diferencia en la osmolaridad no es la causante inhibición de la proliferación de los astrocitos (Li, *et. al*, 2018).

Ahora bien, diversas investigaciones, mencionan que las fluctuaciones de los niveles de glucosa inducen daño glial al disminuir la proliferación celular (Quincozes-Santos, *et. al*. 2017). Se ha demostrado, que niveles de glucosa elevada pueden inhibir de forma irreversible la proliferación de astrocitos debido al arresto del ciclo celular, sin afectar la apoptosis. De forma particular, investigaciones han utilizado Citometría de flujo para analizar el ciclo celular de los astrocitos, observando que dichas células al ser expuestas a concentraciones de 25 mM de glucosa presentan un aumento en la fase G2/M, lo que sugiere un arresto del ciclo celular en esta fase. También, se ha descrito que, en los astrocitos expuestos a concentraciones de 25 mM de glucosa, existe una disminución en la expresión de las ciclinas D1 y D3, ciclinas importantes en la progresión de la fase G2 y fase M del ciclo celular (Li, *et. al*, 2018). Por otra parte, las concentraciones altas de glucosa mejoran la vía de señalización de AMPK en astrocitos. Sin embargo, esto suele ser contraproducente, ya que cuando esta vía se encuentra sobreactivada, suele afectar la proliferación de los astrocitos (Motoshima, *et. al.*, 2006).

Aunque los exosomas pueden ser secretados de una amplia variedad de células, comparten proteínas estructurales y funcionales comunes, como Rab GTPasas, SNARE, anexinas, Alix, Tsg101 y tetraspaninas (Gurunathan, *et. al.*, 2019). Por ello, es que también se pueden utilizar diferentes técnicas para realizar la caracterización de estas VE. Se realizaron ensayos de western blot, detectando proteínas presentes en exosomas. La proteína CD9, es una tetraspanina ubicuamente expresada sobre la superficie de los exosomas y es considerada como un marcador exosomal que tiene la función de molécula de adhesión. Por otro lado, anexina V, es una proteína

que tiene dominios de unión a fosfolípidos y que está involucrada en eventos de fusión de membrana celular, y también es considerada un marcador constitutivo de exosomas (Zhu, *et al.*, 2020).

La microscopía electrónica de transmisión permitió observar que los exosomas aislados por medio de la técnica de UC, tenían la forma característica cup-shaped (forma de copa), como algunos autores la describen. Además, las fotomicrografías muestran más exosomas aislados de las células expuestas a la condición de normoglucosa (5.5 mM de glucosa) a diferencia de los exosomas aislados de la condición de hiperglicemia. Estos datos tienen relación con lo observado en el análisis de nanopartículas, ya que, a la concentración de 5.5 mM de glucosa, había una concentración mayor de exosomas en el rango de tamaño de entre los 100 y 150 nm, en comparación con los exosomas aislados de la condición de hiperglicemia. Sin embargo, en la condición de hiperglicemia, los exosomas aislados mostraban una fluctuación en cuanto a la secreción y diferencias en el tamaño. Estudios realizados en otros tipos celulares, utilizando un modelo de ratón diabético, indican una disminución en la secreción de exosomas. El motivo por el que ocurre la disminución en la secreción exosomas, aún no se ha descrito, pero se especula que las concentraciones elevadas de glucosa afecten la expresión de proteínas que conforman el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), complejo que es necesario para la formación de exosomas (Wen *et. al.*, 2020).

Los exosomas, son vesículas que transportan diferentes de tipos de moléculas, entre ellas microRNAs. Estudios muestran que de forma general el miRNA-29 es importante para la regulación del metabolismo de la glucosa y ha sido relacionado con enfermedades como la obesidad y DM (Dooley *et al.*, 2016). Sin embargo, a nivel cerebral, el miRNA-29a cumple con otras funciones como la neuroprotección. En el presente estudio se pudo notar que dependiendo del tiempo de exposición a las concentraciones de glucosa la expresión del miRNA-29a, se modifica. Nuestros hallazgos muestran que la expresión del miRNA-29a en células C8-D1A, expuestas una concentración de 5.5 de mM de glucosa y 25 mM de glucosa durante un día, la

expresión aumenta ligeramente. Para contrastar estos resultados, se analizó la expresión del miRNA-29a células de la línea celular C8-D1A, observando que a las concentraciones de 5.5 mM de glucosa y a de 25 mM de glucosa existe expresión de este microRNA (datos no mostrados).

En el caso del análisis del miRNA-29a aislado de exosomas, a los siete días de exposición a la concentración de 25 mM de glucosa, se pudo observar un aumento en la expresión. Derivado de estos resultados, y aunque que no se analizó si existía un incremento en los ROS, en las células C8-D1A, investigaciones afirman que en enfermedades como la DM los niveles incrementados de glucosa de forma crónica dan como resultado un aumento en los niveles de ROS. La acumulación excesiva de ROS favorece a la disfunción mitocondrial, la apoptosis y la activación de la inflamación, esta alteración se ha demostrado que está involucrada en el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia (Moshapa, *et. al.*, 2019). Sin embargo, se ha demostrado que un incremento en los niveles de expresión del miR-29a, suele tener un efecto protector y está relacionado con la disminución los ROS. Usando citometría de flujo, se ha descrito que los niveles incrementados de glucosa producen ROS, pero en presencia del miR-29a, estos suelen decaer y brindar protección a la membrana mitocondrial de células HLE B-3. En este mismo estudio se observó que los niveles incrementados del miR-29a, afectan la expresión de marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído (MDA) y aunado a esto la sobreexpresión del miR-29a resultó en una mayor expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y una menor expresión de la proteína proapoptótica Bax en células epiteliales tratadas con concentraciones elevadas de glucosa (Hua, *et. al.*, 2021).

Por último, para analizar la expresión de proteínas neuroprotectoras y citocinas proinflamatorias, se utilizó un arreglo de proteínas comercial, observando que los exosomas aislados de las células C8-D1A expuestas a concentraciones de normoglucosa, había una disminución de proteínas proinflamatorias como IL-1 alfa, IL-6, IL-4, TNF-alfa. Si bien los estudios que se han realizado en astrocitos con relación a concentraciones elevadas de glucosa son escasos, evidencias muestran

que estas células suelen ser inmunocompetentes es decir son capaces de detectar señales de daño cerebral y responder a ellas secretando citocinas y quimiocinas, y activando la defensa inmune adaptativa (Farina, *et. al.*, 2007). Retomando lo mencionado en párrafos anteriores, la astrogliosis es un mecanismo de los astrocitos que se activa como respuesta a agresiones a nivel de SNC, es un estado que se regula de manera específica y un factor importante es el tiempo del estímulo nocivo. Aunque el tiempo de exposición a la glucosa de las células C8-D1A fue durante siete días, posiblemente la respuesta inflamatoria no se activó.

En el caso de las células C8-D1A a las concentraciones de 25 mM de glucosa, había una mayor expresión de proteínas con funciones inflamatorias como MCP-1, MCSF. Diversos estudios afirman que los niveles elevados de glucosa de manera crónica aumentan la expresión de proteínas con funciones inflamatorias, que se relacionan con el desarrollo de complicaciones a nivel cerebral (Freeman, *et. al.*, 2018).

Por otro lado, también se observó un aumento de proteínas con funciones antiinflamatorias como IL-10 y TGB- β . Se ha descrito, que los exosomas procedentes de macrófagos pueden activar P-AKT y reducir los niveles de MMP-9, reducir significativamente la secreción de citocinas proinflamatorias y promover la proliferación y migración de células endoteliales para mejorar la cicatrización de heridas en la diabetes mellitus. Además, este estudio mostro una reducción en la expresión de TNF- α , IL-1 β e iNOS y un aumentó en la expresión de IL-10 (Li, *et. al.*, 2019).

Como puede observarse la respuesta de los astrocitos parece ser dual, se observó un aumento de proteínas inflamatorias, pero también antiinflamatorias. La literatura indica que el resultado de la astrogliosis depende de las proteínas presentes en la superficie de los astrocitos y en su citoplasma. Una regulación positiva de proteínas como STAT3, ER α y BDNF se ha relacionado con un perfil protector, mientras que la regulación positiva de proteínas como NF κ B, ligando de citocinas como CCL2, CXCL10 y VEGF se ha relacionado con el perfil perjudicial. Un fenotipo protector conduce a una mejoría clínica, reducción de la astrogliosis, inmunosupresión y supervivencia neuronal, mientras que el fenotipo perjudicial se asocia con deterioro

clínico, aumento de la astrogliosis, reclutamiento de células inmunitarias, estrés oxidativo y neurodegeneración (Colombo, *et al.*, 2016).

Por último, considerando los resultados obtenidos de expresión del miRNA-29a y la expresión de proteínas neuroprotectoras como inflamatorias, existe evidencia de que dicho miRNA puede regular expresión de citocinas proinflamatorias. Estudios de correlación muestran que la expresión del miRNA-29 tiene relación con incremento de proteínas inflamatorias, como MCP-1 y MCSF que promueve la supervivencia de células inmunitarias como monocitos las cuales participan en el proceso inflamatorio. Existen otras proteínas que pueden ser reguladas por miembros de la familia miRNA-29, como las citocinas proinflamatorias IL-6 o TNF-alfa, que, si bien en los resultados obtenidos en los arreglos de proteínas no se observa su aumento tan marcado en las concentraciones de 25 mM de glucosa, sería importante analizar si este miRNA puede regular la expresión de proteínas de este tipo en células astrocíticas en una condición de hiperglicemia (Guo, *et. al.*, 2017).

X. Conclusiones

- Existe una disminución en la secreción de exosomas en las células C8-D1A a los 7 días de exposición con concentraciones de 25 mM de glucosa.
- La expresión del miRNA-29a contenido en exosomas aislados de las células C8-D1A a los siete días de exposición aumenta, particularmente en la condición de glucosa elevada, comparado con el gen control.
- El tiempo de exposición a la glucosa de las células C8-D1A durante siete días, posiblemente no activo una respuesta específica (una respuesta neuroprotectora o neuroinflamatoria).

XI. Sugerencias y perspectivas

- Determinar la expresión de proteínas que forman parte del complejo ESCRT, en exosomas aislados de astrocitos a concentraciones de 5 mM y 25 mM de glucosa
- Realizar la búsqueda de blancos neuroprotectores o neuroinflamatorios que son regulados por el miRNA-29a, a nivel de mensajero y proteína, en exosomas aislados a de células astrocíticas expuestos a condiciones hiperglicémicas
- Aumentar el tiempo de exposición a la glucosa de las células C8-D1A, para activar una respuesta específica en estas células (una respuesta neuroprotectora o neuroinflamatoria).

XII. Anexos

Anexo 1

Extracción de ARN en células de cultivo por el reactivo de TRIzol (Likhite y Warawdekar, 2011).

- a) A la caja de cultivo de 25 cm se adiciona 1000 μ L de TRIzol frío, se homogeniza vigorosamente y se deja incubar 5 minutos en frío. Se recupera la suspensión celular en un tubo Eppendorff nuevo y estéril.
- b) Se agregan 200 μ L de cloroformo y se agita en vórtex durante 15 segundos. Incubar en hielo por 10 minutos.
- c) Se centrifuga a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- d) Después de este paso, se obtienen tres fases:
 - 1) Fase acuosa (Transparente) ARN.
 - 2) Interfase (Blanco) ADN.
 - 3) Fase orgánica (Rosa) proteínas.
- e) El ARN (fase acuosa o transparente) se transfiere a otro tubo nuevo tratado en DEPC y se dispone en hielo (no tocar la interfase).
- f) Adicionar 500 μ L de isopropanol frío y mezclar por inversión 15 segundos.
- g) Incubar toda la noche a -20°C o a -80°C.
- h) Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (en caso del que el botón sea poco, dejar un poco de isopropanol).
- i) Eliminar el sobrenadante con pipeta.
- j) Lavar el paquete de ARN con 400 μ L de etanol al 75% en DEPC y agitar suavemente.
- k) Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos.

NOTA: si el botón está muy sucio, dar 4 lavados.

- 1) Decantar inmediatamente, resuspender el botón en agua mili-Q en DEPC con aproximadamente 20-50 μ L, dependiendo del tamaño del botón.
- 2) Guardar a -80°C.

Anexo 2

Cuantificación de ARN total y ADNc en NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, 2009).

- a) Desinfectar el área de trabajo con etanol al 70%. Utilizar guantes de látex.
- b) Utilizar muestras almacenadas en el congelador, y colocarlas en hielo frapeado.
- c) Trasladar las muestras al equipo NanoDrop 2000c.
- d) Abrir el software e indicar el tipo de muestra a analizar (ácido nucleico). En este caso se seleccionará ARN, si requiere cuantificar el ARN, en caso de que la cuantificación se ADNc, se seleccionara la opción de ADNc.
- e) Abrir un nuevo trabajo, leer un blanco utilizando 1 μ L de agua destilada. Limpiar con papel seda al finalizar.
- f) Colocar 1 μ L de la muestra a cuantificar. Registrar con un nombre para su cuantificación.

Anexo 3

Extracción de ARN de exosomas por columnas

1. Al término de la segunda UC, el PBS donde se encuentra el botón de exosomas, es decantado.
2. El botón de exosomas es resuspendido en 200 uL de trizol. Posteriormente se añaden 40 uL de cloroformo (homogenizar vigorosamente), dejando la mezcla en hielo durante 5 min.
3. La mezcla se centrifuga a 13,500g durante 15 minutos a 4°C.
4. Al término de la centrifugación se toma la Fase acosa (Fase transparente donde está el RNA) sin tocar la fase intermedia. Transportar la fase acuosa a un tubo de 600uL estéril.
Importante: medir el volumen que se obtiene de la fase acuosa.
5. La Fase acuosa es transportada a la columna, puesta ya en el tubo recolector. Agregar el mismo volumen que se obtuvo de la fase acuosa de Etanol absoluto o Etanol al 95% a la columna. Centrifugar un 1 min. a 13500g a temp ambiente y descartar el flujo del tubo colector.
6. Tratamiento con DNAsa: Añadir 400uL del buffer de lavado ARN a la columna y centrifugar.
7. En un tubo sin ARNasa (no incluido), se agregan 5uL de DNasa I, 75 µL de tampón de digestión de ADN (mezclar mediante inversión suave). Agregue la mezcla directamente a la matriz de la columna.
8. Incubar a temperatura ambiente (20-30 °C) durante 15 min. Continúe con el paso 9.
9. Añadir 400 µL de Direct-zol RNA PreWash a la columna y centrifugar un min 1 a 13500g. Deseche el flujo continuo y repita este paso.
10. Añada 700 µL de tampón de lavado de ARN a la columna y centrifugue durante 2 min para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Posteriormente se transfiere la columna con cuidado a un tubo sin ARNasa.
11. Para eluir el ARN, agregue 50 µL de agua libre de ADNasa/ARNasa directamente a la matriz de la columna y centrifugue 1 min. a 13500g.

Anexo 4

Resultados obtenidos de los arreglos de proteínas neuroprotectoras y citocinas proinflamatorias

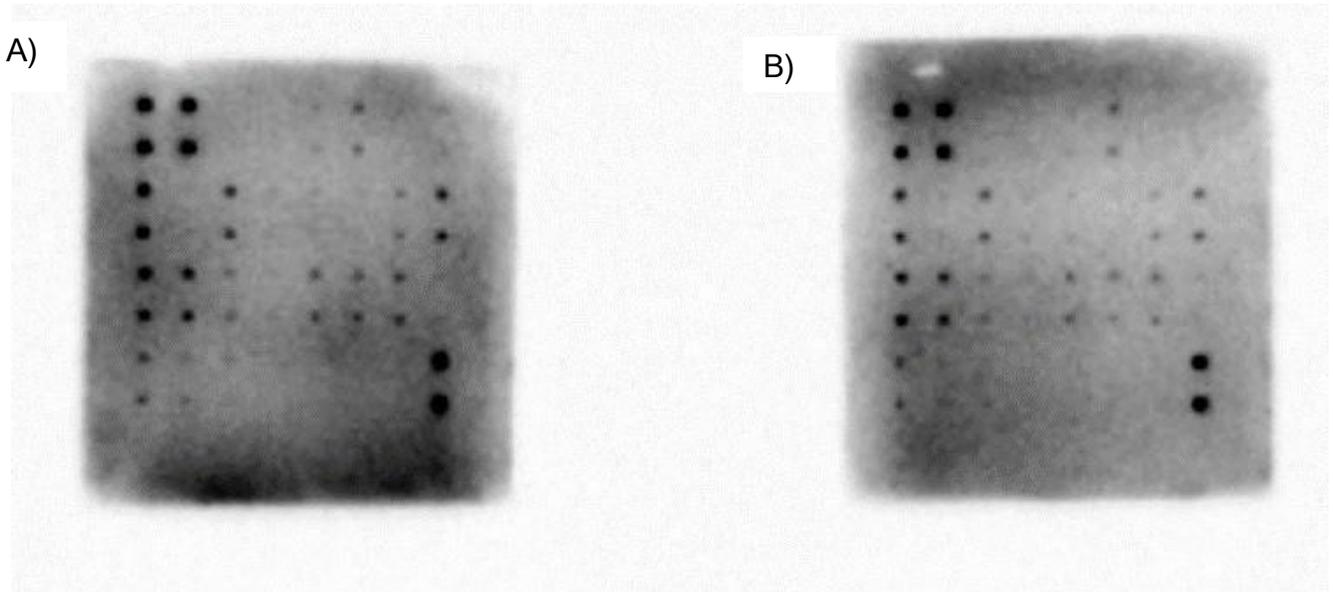
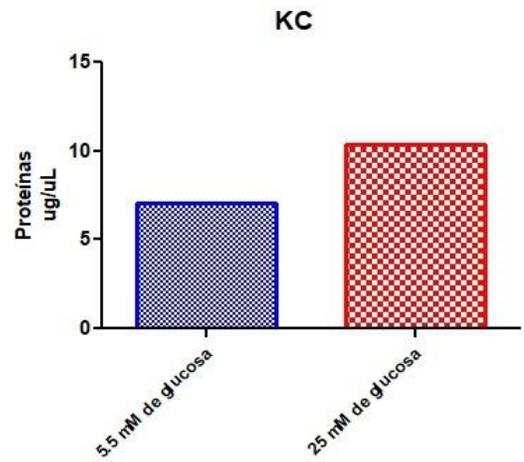
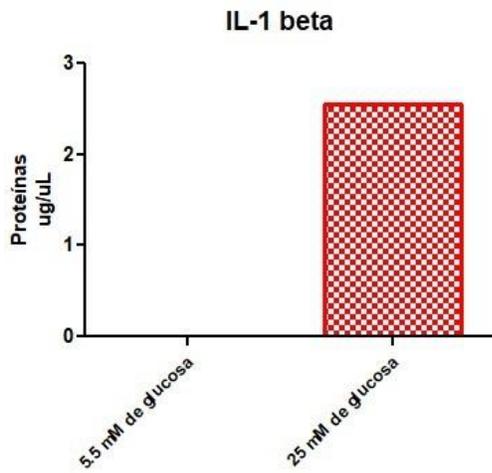
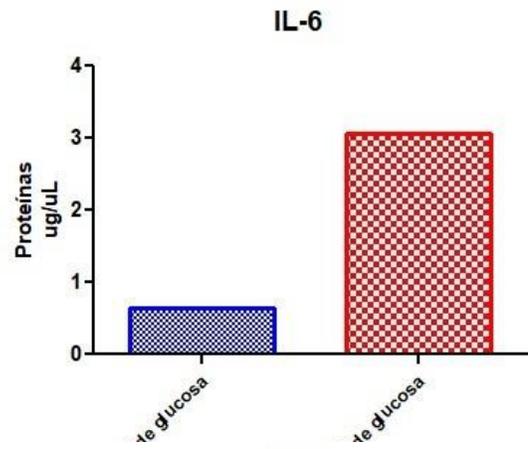
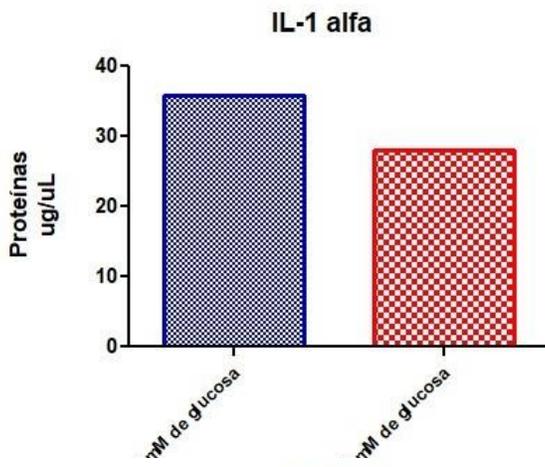
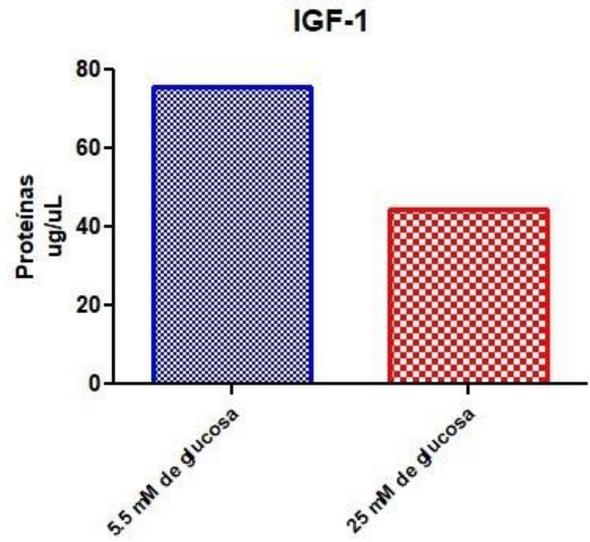
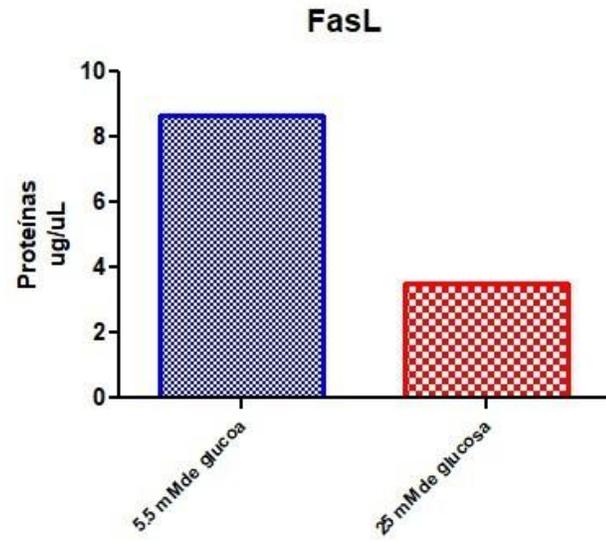
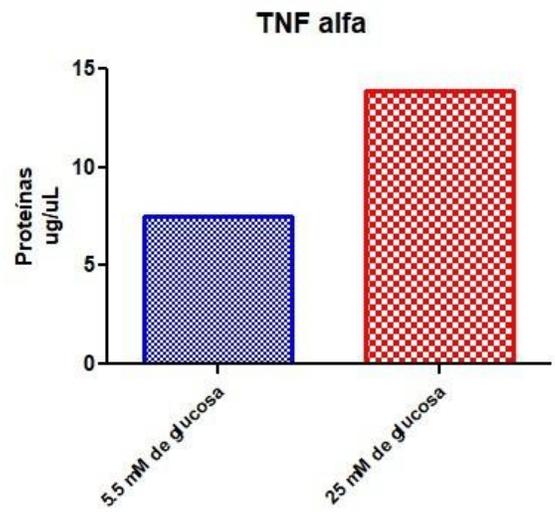
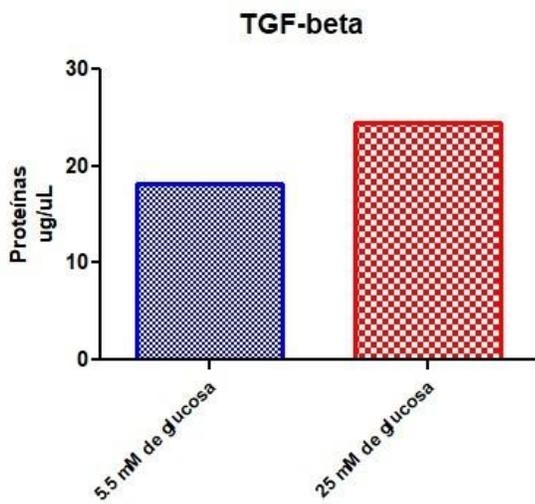
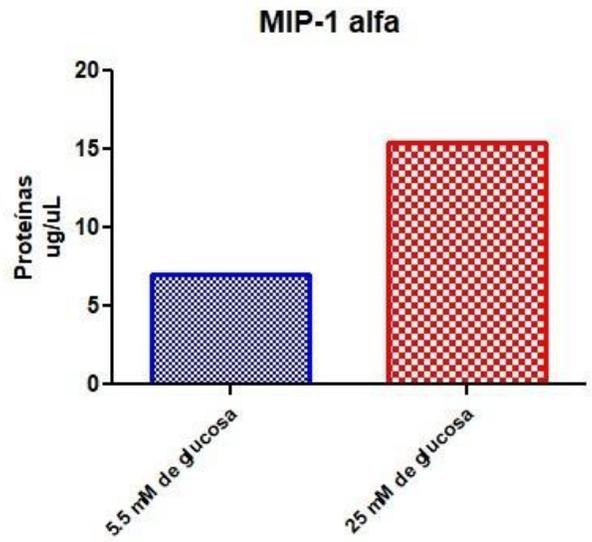
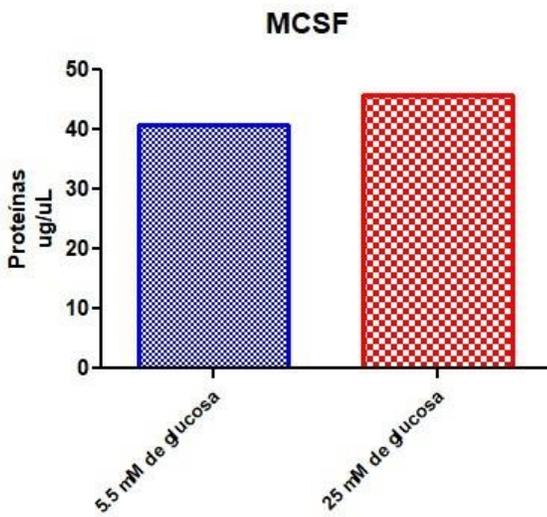
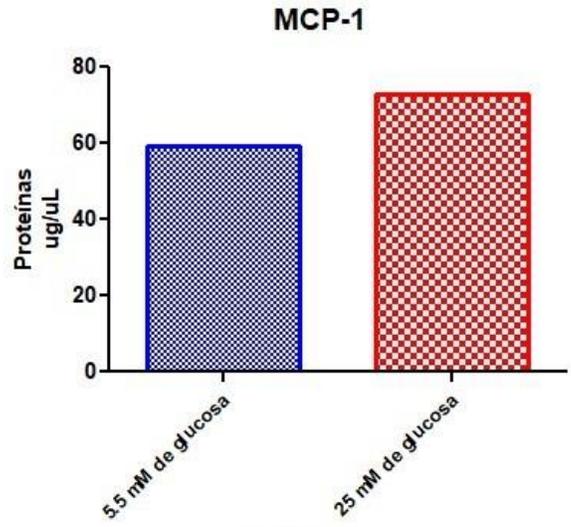
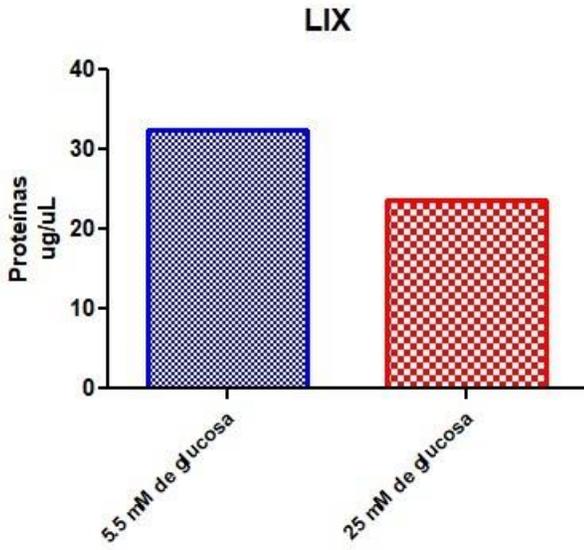


Fig. 8. Resultados del panel de proteínas con funciones neuroprotectoras y neuroinflamatorias. En la figura A) se puede observar el resultado del panel de proteínas aisladas de exosomas de la línea celular C8-D1A a 5.5 mM de glucosa. En la figura B) se observa el resultado obtenido del panel de proteínas aisladas de los astrocitos a la concentración 25 mM de glucosa

Anexo 5

Expresión significativa de proteínas neuroprotectoras y neuroinflamatorias a 5.5 mM y 25 mM de glucosa





XIII. Referencias

- Akers J.C., Gonda D., Kim R, Carter B.S., Chen C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 113 (1): 1-11.
- Amado A. J., Cansell C, Denis R.G., Delbes A.S., Castel J., *et. al.*, (2014). The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 28 (5): 725-37.
- Arcos J. y Morales J. E., (2018). Cambios en la expresión de los genes *GLUT-1*, *GLT-1*, *GCK* y *GLAST* inducidos por glucosa elevada en astrocitos hipotalámicos. Licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Baez E., Echeverria V., Cabezas R., Ávila-Rodríguez M., Garcia-Segura L.M, *et. al.*, (2016). Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies. *Front Neurol.* 7 (146): 1-10.
- Bakhti M., Winter C., Simons M. (2011) Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 286: 787-796.
- Basso M., Pozzi S., Tortarolo M., Fiordaliso F., Bisighini C., *et. al.*, (2013). Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 288(22):15699-711.
- Guo J., Li J., Zhao J., Yang S., Wang L., Cheng G., *et al.*, (2017) MiRNA-29c regulates the expression of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy by targeting tristetraprolin. 24: 7(1): 2314.
- Borges F.T., Reis L.A., and Schor N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 46: 824-830.
- Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 13: 813-820.
- Bu X. Li D., Wang F., Sun Q., Zhang Z. (2020). Protective Role of Astrocyte-Derived Exosomal microRNA-361 in Cerebral Ischemic-Reperfusion Injury by Regulating the AMPK/mTOR Signaling Pathway and Targeting CTSB. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020(16):1863-1877
- Bylicky M. A., Mueller G. P., & Day, R. M. (2018). Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2018: 1-16
- Chaudhuri A.D., Dastgheyb R.M., Yoo S.W., Trout A., Talbot C.C., *et. al.*, (2018). TNF α and IL-1 β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons. *Cell Death Dis.* 9 (3): 363.

- Colombo E., Farina C. (2016) Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* 37:608-620.
- Dooley J., Garcia-Perez, J. E. Sreenivasan S.M., Schlenner R., Vangoitsenhoven A.S., Papadopoulou L., et. al. (2016) The microRNA-29 family dictates the balance between homeostatic and pathological glucose handling in diabetes and obesity. *Diabetes.* 65: 53-61.
- Douglass J. D., Dorfman M. D., Thaler J. P. (2017). Glia: silent partners in energy homeostasis. *Diabetologia.* 60 (2): 226-236.
- Farina C., Aloisi F., Meinl E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28:138-145.
- Federacion internacional de diabetes (F. I. D.) (2017). Atlas de la diabetes de la F.I.D . (Consultado el 21 de septiembre del 2019 <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>).
- Freeman D.W., Noren H. N., Eitan E., Green J., Mode N.A., et. al. (2018). Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes.* 67(11): 2377-2388.
- Freeman D.W., Noren Hooten N., Eitan E., Green J., Mode NA, Bodogai M, et al. (2018) Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes. *Diabetes.* 67(11):2377 - 2388.
- Fröhlich D., Kuo W.P., Frühbeis C., Sun J.J., Zehendner C.M., et. al., (2004). Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369 (1652): 1 – 13.
- Gandhi G.K., Ball K., Cruz N.F., Diemel GA. (2010). Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro.* 15 (2): 57-73.
- Goetzl E.J., Mustapic M., Kapogiannis D., Eitan E., Lobach I.V., et. al., (2016) Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 30: 3853-3859.
- Gordon J., Amini S., White M. K. (2013). General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol.* 1078:1-8.
- Guillamón-Vivancos T., Gómez-Pinedo U., Matías-Guiu J., (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia.* 30 (2): 119-29.
- Gurunathan S., Kang M.H., Jeyaraj M., Qasim M., Kim J.H. (2019) Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 3;8(4):307.
- Hattangady N.G. y Rajadhyaksha M.S. (2009). A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 29 (4): 143-9.
- Heller J.P. y Rusakov D.A. (2017). The Nanoworld of the Tripartite Synapse: Insights from Super-Resolution Microscopy *Front Cell Neurosci.* 11 (374): 1-14.

- Hessvik N.P. y Llorente A. (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75:193-208.
- Hua Li., Lingxiao Xu & Hui Song (2021) MiR-29a Alleviates High Glucose-induced Inflammation and Mitochondrial Dysfunction via Modulation of IL-6/STAT3 in Diabetic Cataracts. *Current Eye Research*. 46(9): 1325-1332.
- Jaramillo J. (2013). Metabolismo cerebral. *Revista Mexicana de anestesiología*. 36 (1): 183-185.
- Jia-You F., Chih-Hung L., Tse-Hung H., Shih-Yi C. (2019). In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity. *Nutrients*. 11 (3): 530.
- Kang L., Routh V.H., Kuzhikandathil E.V., Gaspers L.D., Levin B.E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes*. 53: 549 -559.
- Kawikova I., Askenase P.W. (2015) Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases. *Brain Res*. 1617: 63-71.
- Kimelberg H. K., Nedergaard M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*. 7 (4) 338-342.
- Kucharzewska P., Christianson H.C., Welch J.E., Svensson K.J., Fredlund E, *et. al.*, (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci*.110 (18): 7312-7.
- Lange C. S., Bak L. K., Waagepetersen H. S., Schousboe A., Norenberg D. M., (2012). Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res*. 37 (11): 2569-2588.
- Lee, Y., Andaloussi, S., and Wood, M. (2012). Exosome and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics*. 21: 125-135.
- Li M., Wang T., Tian H., Wei G., Zhao L., Shi Y. (2019) Macrophage-Derived Exosomes Accelerate Wound Healing Through Their Anti-Inflammation Effects in a Diabetic Rat Model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 47(1):3793-803.
- Li W., Choudhury G. R., Winters A., Prah J., Lin W., Liu R., *et. al.*, (2018). Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging Dis*. 9 (4): 674- 684.
- Li W., Roy Choudhury, G Winters, A Prah, J Lin, W Liu, R. *et. al.* (2018). Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging and disease*. 9(4): 674-684.
- Lu D. y Xu A.D. (2016). Mini review: Circular RNAs as potential clinical biomarkers for disorders in the central nervous system. *Front Genet* 7: 53.
- McBeen J.G., (2018). Astrocyte Antioxidant Systems. *Antioxidants (Basel)*. 7 (9): 112.

- Mergenthaler P., Lindauer U., Dienel G., Meisel A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Cell press.* 36: 587-97.
- Moshapa F.T., Riches-Suman K., Palmer T.M. (2019). Therapeutic targeting of the proinflammatory IL-6-JAK/STAT signalling pathways responsible for vascular restenosis in Type 2 diabetes mellitus. *Cardiol Res Pract.*
- Motoshima H., Goldstein B.J., Igata M., Araki E. (2006). AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J Physiol.* 574 (1):63-71.
- Oliveira K.C., Da Conceição R.R., Piedade G.C., De Souza J.S., Sato M.A., et. al., (2015) Thyroid hormone modulates neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Metab Brain Dis.* 30(6):1401-1408.
- Ouyang Y.B., Xu L., Lu Y., Sun X., Yue S., et. al., (2013). Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia.* 61(11):1784-94
- Ouyang, Y. B., Xu, L., Yue, S., Liu, S., & Giffard, R. G. (2014). Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. *Neuroscience letters.* 565: 53-58.
- Parpura. V., Heneka M.T., Montana V, Oliet S.H., Schousboe A., et. al., (2012). Glial cells in (patho) physiology. *J Neurochem.* 121 (1): 4-27.
- Pascua-Maestro R., González E., Lillo C., Ganfornina M.D., Falcón-Pérez J.M., et. al., (2019). Extracellular Vesicles Secreted by Astroglial Cells Transport Apolipoprotein D to Neurons and Mediate Neuronal Survival Upon Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci.* 12 (526): 1-12.
- Punthakee Z., Goldenberg R., Katz P. (2018). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Can J Diabetes.* 42 (1): 10-15.
- Q. J., Ma Z., Livingston M.J., Zhang W., Yuan Y., Guo C. et al., (2020). Decreased secretion and profibrotic activity of tubular exosomes in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 319(4).
- Quincozes-Santos A., Bobermin L.D., de Assis A.M., Gonçalves C.A., Souza D.O. (2017) Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* (1): 1-14.
- Sanzana G., Durruty B.Q. (2016). Otros tipos específicos de diabetes mellitus. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 27 (2): 160-170.
- Saper B. y Lowell B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology.* 124 (23): R1111-6.
- Shaimardanova A.A., Solovyeva V.V., Chulpanova D.S., James V., Kitaeva K.V., et. al., (2019). Extracellular vesicles in the diagnosis and treatment of central nervous system diseases. *Neural Regen Resc.* 15: 586-96.

- Shoge K., Hiromu K. M., Satoshi M., Makoto Shinya., Kumatoshi I., *et. al.*, (1999). Rat retinal ganglion cells culture enriched with the magnetic cell sorter. *Neurosci Lett.* 259 (2): 111 - 4.
- Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J. Diabetes Investig.* 5: 349-358.
- Smirnova L., Gräfe A., Seiler A., Schumacher S., Nitsch R., *et. al.*, (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* (6):1469-77.
- Staricha K., Meyers N., Garvin J., Liu Q., Rarick K, Harder D., *et al.* (2020) Effect of high glucose condition on glucose metabolism in primary astrocytes. *Brain Res.* 1732 (1): 146702.
- Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., *et. al.*, (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem.* 288 (24): 17713-24.
- Tiso M., Tejero J., Basu S., Azarov I., Wang X., *et. al.*, (2011) Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase. *J Biol Chem* (2011) 286:18277-18289.
- Venturini A., Passalacqua M., Pelassa S., Pastorino F., Tedesco M., *et. al.* (2019). Exosomes From Astrocyte Processes: Signaling to Neurons. *Frontiers in pharmacology.*10 (1452): 1-11
- Wang G., Dinkins M., He Q., Zhu G., Poirier C., Campbell, A., *et. al.* (2012). Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD). *The Journal of biological chemistry.* 287 (25): 21384-21395.
- Willis C.M., Ménoret A., Jellison E.R., Nicaise A.M. Vella A.T., *et. al.*, (2017). A Refined Bead-Free Method to Identify Astrocytic Exosomes in Primary Glial Cultures and Blood Plasma. *Front Neurosci.* 11 (335): 1-12.
- Wystub S., Laufs T., Schmidt M., Burmester T., Maas U., *et. al.*, (2003). Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci Lett.* 346(1-2):114-6.
- Xin H., Li Y, Liu Z, Wang X, Shang X, Cui Y, Zhang ZG, Chopp M. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells* 2013; 31(12): 2737-46.
- Xin H., Wang F., Li Y., Lu Q.E., Cheung W.L., *et. al.*, (2017). Secondary Release of Exosomes From Astrocytes Contributes to the Increase in Neural Plasticity and Improvement of Functional Recovery After Stroke in Rats Treated with Exosomes Harvested From MicroRNA 133b-Overexpressing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Transplant.* 26 (2): 243-257.
- Yu Z., Fan X., Lo E. H., Wang X. (2009). Neuroprotective roles and mechanisms of neuroglobin. *Neurological research,* 31(2): 122-127.

- Zhao, W., Zheng, X. L., and Zhao, S. P. (2014). Exosome and its roles in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev.* 20: 337-348.
- Zhu L., Sun H.T., Wang S. et al. (2020) Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *J Hematol Oncol.* 13, 152.