

Futuro de la terapia y el diagnóstico con vesículas extracelulares

(Future of therapeutics and diagnostics with extracellular vesicles)

Johan Alvarado-Ocampo¹, Elizabeth Abrahams-Sandí², Lissette Retana-Moreira³

Afiliación Institucional:

¹Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. San José, Costa Rica.

 0000-0002-9623-9627

²Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Departamento de Parasitología. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). San José, Costa Rica.

 0009-0005-0373-9550

³Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Departamento de Parasitología. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). San José, Costa Rica.

 0000-0001-5215-582X

Abreviaturas:

VE; vesículas extracelulares.
ESCRT; endosomal sorting complexes required for transport.
ARNm, ARN; mensajero.
miARN; micro-ARN.
EXs; exosomas.
EMV; endosomas multivesiculares.
MV; microvesículas.
CO; célula de origen.
CA; célula aceptora.

Fuentes de apoyo: Este trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación C-2600: "Secreción de vesículas extracelulares por *Naegleria fowleri* y evaluación de su potencial rol inmunomodulador en un modelo *in vitro*", financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

✉ lissette.retanamoreira@ucr.ac.cr



Esta obra está bajo una licencia internacional: Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0.

Resumen

Las vesículas extracelulares son nanopartículas secretadas por células procariotas y eucariotas, con funciones variadas que van desde la comunicación intercelular hasta la modulación de la respuesta inmune. La investigación en este tema se enfocó inicialmente en el aislamiento, identificación y caracterización, para luego abarcar los mecanismos fisiológicos en los que se ven involucradas. Más recientemente, la investigación, particularmente centrada en exosomas, ha permitido abrir campo a novedosas hipótesis sobre su utilidad en inmunoterapia y como marcadores biológicos. Esta revisión explora aspectos básicos sobre la biogénesis y la composición de los exosomas, así como su uso en diagnóstico y tratamiento, a partir del conocimiento generado sobre su aislamiento y purificación, distribución de cargos específicos y su relación con la respuesta inmune. Los hallazgos sobre su aplicabilidad en procesos cancerosos son promisorios; sin embargo, existe toda una ventana de posibilidades para investigar esta plataforma molecular como potenciales vacunas acelulares y marcadores de pronóstico, diagnóstico y alerta, tanto en cáncer como en patologías causadas por agentes infecciosos.

Descriptor: vesículas extracelulares, exovesículas, inmunoterapia, vacunas, biomarcadores.

Abstract

Extracellular vesicles are nanoparticles released by prokaryotic and eukaryotic cells, with a variety of functional roles in intercellular communication and even in modulation of the immune response. Research in this topic was initially focused on isolation, identification and characterization of the vesicles, with subsequent understanding of the physiological mechanisms in which they are involved. Furthermore, recent studies, particularly with exosomes, have opened the field to novel hypotheses about their usefulness in immunotherapy and as biological markers. This review explores general aspects about the biogenesis and composition of exosomes, as well as their potential use in diagnosis and treatment, based on the knowledge generated about their isolation, production, cargoes, delivery engineering and relationship with the immune response. The findings on its applicability in cancerous processes are promising, but there is still a variety of investigation possibilities of this molecular platforms as cell-free vaccines and as prognostic, diagnostic and/or warning markers, both in cancer but also in infectious diseases.

Keywords: extracellular vesicles, exovesicles, immunotherapy, vaccines, biomarkers.

Fecha de recibido: 23, mayo, 2023

Fecha de aceptado: 16, abril, 2024

Hace aproximadamente un par de décadas se reconocían solamente dos formas principales de comunicación intercelular: el contacto célula-célula y la secreción de moléculas. Recientemente, se empezó a prestar más atención a la liberación de vesículas extracelulares (VE) como vehículos de comunicación que transportan diversas moléculas de una célula a otra, provocando cambios en la célula receptora. La liberación de VE se ha estudiado tanto en células hematopoyéticas como en células no hematopoyéticas y se ha dejado atrás la creencia de que se relacionan solamente con productos de desecho celular.¹ El aumento en la cantidad de investigaciones sobre esta temática, enfocadas hace algunos años en los exosomas, se debe fundamentalmente al rol que se ha confirmado poseen en la comunicación intercelular, la transmisión de moléculas como proteínas, lípidos, ADN, ARN mensajero (ARNm) y micro-ARNs (miARN), así como su potencial papel en el desarrollo de ciertas patologías, en la modulación de la respuesta inmune e incluso como transportadores de fármacos, además de su potencial empleo en diagnóstico (biopsia líquida) y como vacunas.²⁻⁵ El estudio de la terapia con exosomas está en boga en los tratamientos contra el cáncer, donde se utilizan como alternativas de administración de agentes quimioterapéuticos y destacan sus ventajas, como ser mejor tolerado por el paciente y mostrar baja inmunogenicidad respuesta inmune.⁶

El objetivo de esta revisión es presentar aquellos aspectos más relevantes de la biogénesis, composición, fisiología e investigación en exosomas, el tipo de VE más ampliamente estudiado a la fecha, un campo de estudio con muchas vertientes de acción por explotar y con aplicabilidad en las ciencias biomédicas.

Formación y tráfico

Dentro de las vesículas extracelulares se encuentran los exosomas,⁷ término acuñado para aquellas vesículas de aproximadamente 40 - 200 nm, y los ectosomas, (también conocidos como microvesículas), que comprenden vesículas de un tamaño mayor, generalmente alrededor de 200 - 1000 nm de diámetro, aunque puede haber vesículas de este tipo tan pequeñas como de 100 nm.⁷⁻⁹

La Figura 1 resume las rutas biogénicas básicas de las VE y su interacción con la célula blanco. Brevemente, dentro del citoplasma de una célula, que llamaremos célula origen, están presentes los cuerpos multivesiculares que contienen a las llamadas vesículas intraluminales, las cuales se forman por medio de una maquinaria compuesta por los complejos proteicos ESCRT (“endosomal sorting complexes required for transport”) que reconocen proteínas de membrana que han sido ubiquitinadas en el citosol; es decir, que han sido “marcadas” con un péptido como parte de un proceso intracelular de regulación. Cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática de la célula, se liberan las vesículas intraluminales al medio, convirtiéndose en los exosomas.

Es importante aclarar que no todas las vesículas intraluminales siguen esta ruta de secreción, ya que los cuerpos multivesiculares podrían fusionarse alternativamente con lisosomas o ser insumo para la generación de organelas especializadas. Aquellas vesículas ricas en colesterol parecen ser las que terminan en la membrana plasmática, aunque su regulación en general es desconocida.¹⁰ A diferencia de los exosomas, los ectosomas se originan directamente por evaginación de la membrana plasmática.

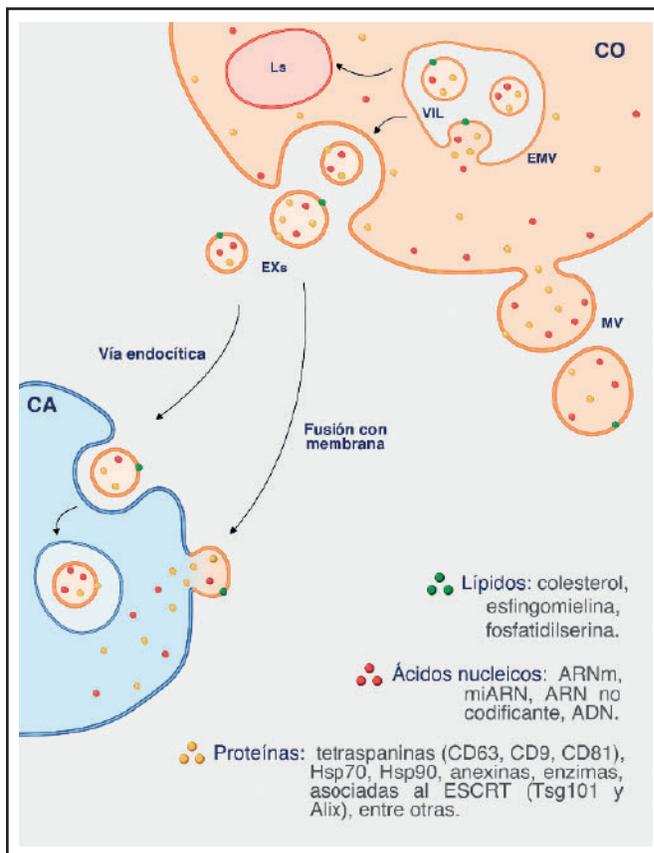


Figura 1. La biogénesis de los exosomas (EXs) parte de cuerpos multivesiculares (también conocidos como endosomas multivesiculares; EMV) que contienen vesículas intraluminales y, eventualmente, se fusionan con la membrana plasmática en la célula de origen (CO) para liberar estas vesículas al espacio extracelular; o bien, puede haber evaginaciones de esta membrana que permite la liberación de microvesículas (MV). La llegada de las vesículas a la célula aceptora (CA), usualmente, está relacionada a la interacción con ligandos específicos y la interacción puede darse por medio de la vía endocítica o por fusión directa de las membranas. Las moléculas que conforman el contenido no se distribuyen uniformemente en todos los exosomas de la misma célula. Ls: lisosoma. Adaptado de:¹¹⁻¹³

La Figura mostrada también describe el proceso de llegada a la célula diana. Para que los exosomas puedan producir una respuesta en células receptoras por señalización celular, estos actúan mediante diversos mecanismos: se ha visto que son capaces de fusionarse directamente con la membrana plasmática e ingresar vía endocitosis (son engolfados), para luego liberar su contenido al citosol. También, pueden adherirse a la superficie de la célula.

la para interactuar con receptores.^{2, 11-13} Aunque existen muchos estudios en los que se analizan las rutas de formación y el tráfico de las vesículas extracelulares, existen aún algunos vacíos importantes con respecto a este tema.

Es importante aclarar que, actualmente, se prefiere el término genérico “vesícula extracelular” a todas aquellas partículas naturalmente liberadas por las células que están delimitadas por una bicapa lipídica y no se replican, tal como lo sugiere la “International Society for Extracellular Vesicles”.¹⁴

Composición y moléculas asociadas

El contenido de un exosoma (también denominado “carga”) puede ser definido por ubiquitinación, cuando se trata de proteínas de membrana, o por medio de concentración de factores citosólicos a través de mecanismos desconocidos.² Este también puede responder a estímulos extracelulares como el estrés oxidativo, la hipoxia o choques térmicos, e incluso a vías de señalización intercelular.¹²

Al ser los exosomas compartimentos intermediarios dinámicos, no poseen marcadores biológicos que permitan su identificación específica, aunque se han propuesto algunos como el CD63 y Tsg101, involucrados en la formación independiente y dependiente de ESCRT. La proteína ALIX, también se ha encontrado concentrada en VE, especialmente en exosomas.^{2, 15, 16} La posibilidad de moléculas biológicas o cargos asociados a estas estructuras es variada, e incluye lípidos, ácidos nucleicos y diversas proteínas,¹¹⁻¹³ tal y como se indica en la Figura.

Aislamiento

Aunque no todas las células producen exosomas, porque no todas poseen un sistema endomembranoso,² estos se han hallado en diferentes fluidos biológicos de origen humano. En el laboratorio, en un modelo *in vitro*, son aisladas principalmente de sobrenadante de cultivos celulares por medio de centrifugación diferencial y ultracentrifugación.⁷ Los exosomas se pueden separar de otras partículas aprovechando su baja densidad, pues contaminantes y partículas de mayor tamaño pueden formar un pellet antes que los exosomas, a través de velocidades crecientes de centrifugación, mientras que las pequeñas VE sedimentan a velocidades muy altas (aprox. 100,000 xg).¹⁷ Sin embargo, es importante anotar que, a la fecha, no se cuenta con metodologías específicas para garantizar la pureza de los productos aislados, es decir, que las fracciones contengan únicamente un tipo de vesícula extracelular, pues normalmente se obtienen también ectosomas pequeños durante el proceso de purificación.¹⁸ Esto representa una limitante en el estudio de vesículas extracelulares que se debe considerar desde el diseño metodológico, con el fin de definir los criterios para obtener una población mayoritaria de aquellas vesículas de interés, tomándose en cuenta que esa población podría

incluir otro tipo de vesículas en una menor proporción. Debido a su potencial terapéutico y diagnóstico, ahora es posible encontrar kits comerciales para su aislamiento; sin embargo, es necesaria su caracterización a través de técnicas variadas y múltiples como Western blot, espectrometría de masas, análisis de tamaño de las nanopartículas o técnicas de imagen como la microscopía electrónica y la microscopía de fuerza atómica, entre otras.⁷

Actividades fisiológicas

Los exosomas se han visto involucrados en la activación de células de la respuesta inmune, tales como linfocitos y células dendríticas; sin embargo, dado que no solo las células inmunes se asocian a la actividad de vesículas extracelulares (a pesar de que se han estudiado principalmente en estas), también se habla de otras tareas específicas como la modulación de la síntesis de melanina en queratocitos¹⁹ o la estimulación de procesos angiogénicos por parte de exosomas derivados de células madre mesenquimales.²⁰

Dentro de las funciones de corte inmunológico descritas para los exosomas se encuentran: la activación de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC-I, MHC-II) para la presentación de antígenos, la regulación/inhibición de la respuesta inmune y la regulación del sistema nervioso central.¹² En este rol inmunomodulador, el estudio de exosomas derivados de células dendríticas ha permitido el desarrollo de diferentes modelos que demuestran la activación, tanto de células inmunitarias como no inmunitarias, a partir de exosomas de células dendríticas maduras, en tanto que aquellos que provienen de células dendríticas inmaduras inducen supresión inmune y regulación.²¹ También, se ha demostrado la secreción de citoquinas proinflamatorias como interleucinas y TNF α en macrófagos ante el estímulo de exosomas derivados de líneas celulares tumorales.²²

En su rol en la comunicación celular, los exosomas pueden fungir como vehículos de señales que eventualmente pueden desencadenar procesos patológicos, como lo son diferentes péptidos (β -amiloide, tau, priones, alfa-sinucleína, superóxido dismutasa I) asociados a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, encefalopatía espongiiforme, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.² También se han relacionado con enfermedades cerebrovasculares, pues están involucrados en calcificaciones vasculares y procesos de isquemia.²³ Sin embargo, la dispersión de estos factores o señales asociadas a la enfermedad es poco comprendida.

El estudio de este tema en la biología del cáncer ha sido clave, pues, por ejemplo, se han demostrado vínculos entre exosomas derivados de líneas celulares tumorales de cáncer gástrico y los niveles de efectores proinflamatorios que derivan en la migración y proliferación de células tumorales, por medio de la vía de

señalización NF- κ B en macrófagos.²⁴ También, se ha visto un favorecimiento del crecimiento tumoral promovido por exosomas de células madre cancerosas renales.²⁵ Por otra parte, en aquellos derivados de células de cáncer de pulmón tratados con calor se ha hipotetizado mayor poder quimioatrayente para estimular células dendríticas y células T como parte de una respuesta antitumoral.²⁶

Además, se han realizado ensayos *in vitro* con ARNm y miARN contenidos en exosomas que ejercen efectos en células receptoras. Se ha visto regulación a partir de miARNs de exosomas derivados de líneas celulares tumorales de cáncer de mama sobre células no cancerígenas, con efectos tumorigénicos.²⁷ Asimismo, particularmente en exosomas de levaduras, se han descrito funciones de procesamiento y degradación de estos ácidos nucleicos, siendo que, como parte de su estructura, poseen dominios con actividad endoribonucleasa y exoribonucleasa.²⁸

Por otro lado, también se ha estudiado el rol de los exosomas en el manejo de desechos celulares en procura de la homeostasis, al servir como acarreadoras de estresores celulares como la caspasa 3, molécula inductora de la apoptosis.²⁹ Así, se fundamenta la hipótesis del rol que tienen los exosomas como protectores y de garantes de sobrevivencia celular.

Aplicaciones clínicas de la investigación en vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares poseen una serie de características estructurales y funcionales que son de interés en el desarrollo de terapias y diagnóstico, ya que pueden ser vistas como copias de sus células de origen en términos del perfil antigénico, contenido de ARN, citoquinas y factores de crecimiento. Además, pueden cruzar la barrera hematoencefálica, tienen limitada inmunogenicidad, son estables en sangre y protegen su contenido de la degradación, por lo que se han propuesto como una herramienta potencialmente segura.¹²

Regulación de procesos biológicos

Como moduladores de la respuesta inmune, se han visto involucradas en efectos antitumorales, siendo posible que su utilidad dependa de la dosis y el contexto de aplicación.⁹ Aquellos modelos donde se ensayan exosomas derivados de células madre mesenquimales en animales o líneas celulares específicas han sido ampliamente utilizados para el estudio de diferentes enfermedades. Por medio de estos modelos se ha demostrado la capacidad de los exosomas y sus cargos para inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias y apoyar la regeneración de tejidos como el cardiovascular y el nervioso.³⁰⁻³⁴

La influencia de exosomas sobre reguladores de la condrogénesis se ha demostrado con resultados positivos en modelos de osteoartritis³⁵ y con efectos

anti-inflamatorios al suprimir la respuesta inmune en modelos de artritis inducida por colágeno.³⁶ Por otro lado, en un ensayo preclínico, la terapia con exosomas administrados vía intranasal en ratones 5XFAD (modelo utilizado para estudiar la enfermedad de Alzheimer) redujo el declive cognitivo y se describieron hallazgos sugestivos de reducción de la inflamación crónica.³⁷ La relación que existe entre los exosomas y ciertas patologías ha generado hipótesis sobre el efecto de regular su liberación como forma de combatir la enfermedad.²

Aplicaciones terapéuticas

Los exosomas también han sido evaluados como sistemas de distribución de drogas terapéuticas, al controlar su contenido a través de condiciones de cultivo o estímulos dados, según el interés de aplicación. Esto también se podría lograr por medio de la pre-carga en las células de origen¹³ o con técnicas como la electroporación para la encapsulación o incorporación de ARN o moléculas en su membrana.^{13,38} Existen plataformas estratégicas de producción de exosomas para el fin de distribución de drogas, como el caso de las células madre mesenquimales, que cuentan con un tropismo por procesos inflamatorios y tumorales, o las células dendríticas que poseen maquinaria de activación inmune, así como también la línea celular HEK293 que resalta por su fácil manejo y alta eficiencia de transfección.³⁹

De hecho, en el contexto de la pandemia por SARS-CoV-2, se ha evaluado la aplicación de exosomas derivados de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea como tratamiento contra la COVID-19, por el cóctel de factores de crecimiento y moléculas con efectos inmunomodulares que ofrecen.⁴⁰

En línea con la idea de fungir como nano-vehículos, la superficie de los exosomas puede ser modificada para conferirle mayor especificidad, esto mediante técnicas de: a) ingeniería genética, transfectando células con plásmidos que codifican para proteínas de membrana (como LAMP-2B o PDGFR) fusionadas con ligandos y b) modificación química, a través de la manipulación de grupos funcionales para crear conjugados o inserción de moléculas anfipáticas en la bicapa lipídica.¹⁵ Por ejemplo, exosomas derivados de células madre mesenquimales fueron manipulados para unirles, por medio de una reacción de cicloadición de azidas y alquinos, un péptido afín a integrinas del endotelio vascular cerebral y probar en un modelo de isquemia cerebral en ratones la actividad de la curcumina, administrando los exosomas modificados vía intravenosa.⁴¹

Diagnóstico y pronóstico

El estudio de las exovesículas como posibles biomarcadores podría dar pie al desarrollo y empleo para diagnóstico y pronóstico, pues se han hallado moléculas (expresadas diferenciadamente) en exosomas liberados

bajo condiciones de salud como enfermedad renal, diabetes insípida y cáncer.⁴²

Con respecto al cáncer, el rol de las VE como biomarcadores ha sido muy estudiado y, por ejemplo, se han encontrado diferencias entre los perfiles moleculares particulares en células metastásicas de cáncer colorrectal y de cáncer de próstata.^{43,44} En esta misma línea, Hsu et al.⁴⁵ desarrollaron una revisión sobre potenciales biomarcadores lipídicos y proteicos sugeridos para uso diagnóstico por su predominancia en exosomas de pacientes con cáncer de pulmón y líneas celulares de esta malignidad. Además, se han realizado análisis proteómicos de exosomas en tejido canceroso y suero (CD5L), y saliva y suero (A1AG1, AQP5, ENO1), para la detección de cáncer de pulmón,^{46,47} así como en plasma (Tim-3 y galectina-9) para apoyar su pronóstico.⁴⁸

Por otro lado, Yu et al.⁴⁹ realizaron una recopilación de moléculas en exosomas, dentro de las que destacan los miARN como herramientas de diagnóstico temprano en malignidades de origen hepático, pancreático y tejido ovárico. Estas moléculas también se han encontrado como marcadores en orina en pacientes con cáncer de próstata.⁵⁰ Esta amplia gama de marcadores para la identificación de procesos cancerosos en otras matrices biológicas, que requieren técnicas de recolección mínimamente invasivas, es lo que da origen al término de biopsia líquida. Es importante reconocer que la utilización de múltiples marcadores como forma de identificar bioquímicamente un exosoma y, por ende, asociarlo a alguna patología, es una opción válida y más precisa para ciertos casos.^{2,45}

Profilaxis vacunal

En el desarrollo de vacunas, los exosomas también han sido objeto de estudio. Por ejemplo, los exosomas derivados de líneas celulares tumorales poseen antígenos que, siendo administrados, pueden inducir una respuesta inmune antitumoral, convirtiéndose en una potencial herramienta en la inmunoterapia contra el cáncer.²¹ Un argumento base para su estudio podría ser que los exosomas derivados de células dendríticas son más estables y eficientes que las mismas vacunas basadas en células dendríticas, por su capacidad para estimular células T y células NK;⁵¹ de hecho, el uso de exosomas derivados de células dendríticas con antígenos tumorales autólogos podría ser una herramienta con resultados prometedores en el caso de tratamiento contra el melanoma.⁵² Sin embargo, también se ha planteado una mejora del rendimiento inmunitario y supresor cuando las células dendríticas son activadas con exosomas derivados de líneas celulares tumorales que traen consigo antígenos relacionados al tumor.⁵⁵

Desde la perspectiva de las enfermedades infecciosas, se han visto efectos similares con antígenos de *Toxoplasma gondii*, polisacáridos de la cápsula de *Strep-*

tococcus pneumoniae y la proteína spike de SARS-CoV, al lograr inducir respuestas protectoras.^{42,51} Los problemas para llevar esto a la práctica son, por ejemplo, la obtención de exosomas con la composición correcta de antígenos para conferir protección o el efecto de antígenos extraños presentes en las células usadas para producirlos.²¹ A pesar de las dificultades, el campo se sigue explorando como una alternativa celular de protección en infecciones por patógenos tan diversos como *Bordetella pertussis* o *Schistosoma mansoni*, debido a la presencia de inmunógenos promisorios en vacunas candidatas.^{54,55}

Es importante reconocer los retos que enfrenta el desarrollo de estas posibles plataformas terapéuticas y diagnósticas, entre ellos: asegurar la producción de cantidades suficientes y el control de la heterogeneidad que caracteriza a estos cuerpos vesiculares, la estandarización de procedimientos de aislamiento y obtención que garanticen una pureza adecuada, la correcta evaluación de la eficacia de estas aplicaciones con ensayos epidemiológicos, así como los métodos de conservación a implementar.³³

Los estudios de biología celular y molecular en el entendimiento del desarrollo de tumores han brindado importantes pistas para su abordaje terapéutico y diagnóstico. La investigación sobre vesículas extracelulares representa una novedosa estrategia por explorar, analizar y validar. Desde comprender los mecanismos de formación y caracterización estructural, hasta ensayar las posibilidades de reingeniería molecular, son requeridos para hacer frente a sus desventajas como plataforma de aplicación clínica, y sacar provecho de sus privilegios biofuncionales.

A pesar de que ya se cuenta con un paso adelante en fases preclínicas y estudios epidemiológicos de evaluación para diferentes propuestas de uso, se vislumbran retos no solo científicos, como lo puede ser la demostración de una eficacia vacunal y la acogida en los sistemas de salud, sino también logísticos en relación con la factibilidad de implementación de métodos de detección de biomarcadores o los costos operativos y comerciales de la inmunoterapia con exosomas.

En nuestro país, el trabajo sobre VE ha sido también de reciente inicio y se ha enfocado en la caracterización de VE provenientes de cultivos de amebas de vida libre como *Naegleria fowleri*,⁵⁶ agente causal de la fatal meningoencefalitis amebiana primaria, y *Acanthamoeba*,⁵⁷ que puede causar cuadros de queratitis y encefalitis. Estos trabajos incluyen el hallazgo de cargo proteico inmunogénico y ensayos funcionales preliminares sobre su efecto en cultivo celular y en la expresión de efectores moleculares de la respuesta inmune⁵⁸. Asimismo, la amplitud de líneas de investigación que ofrece esta área ha permitido, además, la formulación de nuevas propuestas sobre carga de fármacos en VE derivadas de monocitos (resultados sin publicar).

Referencias

1. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulmonary Circulation*. 2013; 3:329–340. DOI: [10.4103/2045-8932.114760](https://doi.org/10.4103/2045-8932.114760)
2. Edgar JR. Q & A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol*. 2016; 14: 1-7. DOI: [10.1186/s12915-016-0268-z](https://doi.org/10.1186/s12915-016-0268-z)
3. Ciferri MC, Quarto R, Tasso R, Bernardi S. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: from pre-clinical to clinical applications. *Biol*. 2021; 10: 1-14. DOI: [10.3390/biology10050359](https://doi.org/10.3390/biology10050359)
4. Kodam SP, Ullah M. Diagnostic and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2021; 20:1-10. DOI: [10.1177/15330338211041203](https://doi.org/10.1177/15330338211041203)
5. Barnie PA, Afrifa J, Gyamerah EO, Amoani B. Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Cancers. In: Paul MK, Brzozowski T. *Extracellular Vesicles - Role in Diseases, Pathogenesis and Therapy*. London: IntechOpen; 2022. 1-25. DOI: [10.5772/intechopen.101783](https://doi.org/10.5772/intechopen.101783)
6. Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*. 2016; 12:655–664. DOI: [10.1016/j.nano.2015.10.012](https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012)
7. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; 200:373–383. DOI: [10.1083/jcb.201211138](https://doi.org/10.1083/jcb.201211138)
8. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JEK, Gould SJ, et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol*. 2006; 172:923–35. DOI: [10.1083/jcb.200508014](https://doi.org/10.1083/jcb.200508014)
9. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020; 367: eaau6977. DOI: [10.1126/science.aau6977](https://doi.org/10.1126/science.aau6977) Kodam SP, Ullah M. Diagnostic and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2021; 20:1-10. DOI: [10.1177/15330338211041203](https://doi.org/10.1177/15330338211041203)
10. Möbius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, Oorschot VMJ, Shimada Y, Fujimoto T, et al. Immunoelectron Microscopic Localization of Cholesterol Using Biotinylated and Non-cytolytic Perfringolysin O. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50:43-55.
11. Théry C. Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*. 2011; 3:1-8. DOI: [10.3410/B3-15](https://doi.org/10.3410/B3-15)
12. Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:1-32. DOI: [10.3390/ijms17020171](https://doi.org/10.3390/ijms17020171)
13. Liang Y, Duan L, Lu J, Xia J. Engineering exosomes for targeted drug delivery. Vol. 11, *Theranostics*. 2021; 11:3183–3195. DOI: [10.7150/THNO.52570](https://doi.org/10.7150/THNO.52570)
14. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV 2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV 2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7:1535750. DOI: [10.1080/20013078.2018.1535750](https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750)
15. Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic*. 2014;15:197–211. DOI: [10.1111/tra.12139](https://doi.org/10.1111/tra.12139)
16. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2012; 1: 18397. DOI: [10.3402/jev.v1i0.18397](https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397)
17. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; 30. DOI: [10.1002/0471143030.cb0322s30](https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30)
18. Mathieu M, Névo N, Jouve M, Valenzuela JI, Maurin M, Verweij FJ, et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat Commun*. 2021; 12:4389. DOI: [10.1038/s41467-021-24384-2](https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2)
19. Lo Cicero A, Delevoeye C, Gilles-Marsens F, Loew D, Dingli F, Guéré C, et al. Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nat Commun*. 2015; 6:7506. DOI: [10.1038/ncomms8506](https://doi.org/10.1038/ncomms8506)
20. Merino-González C, Zuñiga FA, Escudero C, Ormazabal V, Reyes C, Nova-Lamperti E, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: Potencial clinical application. *Front Physiol*. 2016; 7: 1-9. DOI: [10.3389/fphys.2016.00024](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00024)
21. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Rep*. 2015; 16:24–43. DOI: [10.15252/embr.201439363](https://doi.org/10.15252/embr.201439363)
22. Chow A, Zhou W, Liu L, Fong MY, Champer J, van Haute D, et al. Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NF-κ B. *Sci Rep*. 2014; 4:5750. DOI: [10.1038/srep05750](https://doi.org/10.1038/srep05750)
23. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: An alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res*. 2013; 113(1):72–77. DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.113.301036](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301036)
24. Wu L, Zhang X, Zhang B, Shi H, Yuan X, Sun Y, et al. Exosomes derived from gastric cancer cells activate NF-κB pathway in macrophages to promote cancer progression. *Tumor Biol*. 2016; 37:12169–80. DOI: [10.1007/s13277-016-5071-5](https://doi.org/10.1007/s13277-016-5071-5)
25. Soares Lindoso R, Collino F, Camussi G. Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro-tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2015; 6:7959-7969.
26. Chen T, Guo J, Yang M, Zhu X, Cao X. Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and Act as Efficient Tumor Vaccine. *J Immunol*. 2011; 186:2219–2228. DOI: [10.4049/jimmunol.1002991](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002991)
27. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2014; 26(5):707–721. DOI: [10.1016/j.ccell.2014.09.005](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.005)

28. Schaeffer D, Tsanova B, Barbas A, Reis FP, Dastidar EG, Sanchez-Rotunno M, et al. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol.* 2009; 16:56–62. DOI: [10.1038/nsmb.1528](https://doi.org/10.1038/nsmb.1528)
29. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012; 64:676–705. DOI: [10.1124/pr.112.005983](https://doi.org/10.1124/pr.112.005983)
30. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2010; 4(3):214–222. DOI: [10.1016/j.scr.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003)
31. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells.* 2012; 30:1556–1564. DOI: [10.1002/stem.1129](https://doi.org/10.1002/stem.1129)
32. Lopez-Verrilli MA, Picou F, Court FA. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia.* 2013; 61:1795–1806. DOI: [10.1002/glia.22558](https://doi.org/10.1002/glia.22558)
33. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 2019; 8:307. DOI: [10.3390/cells8040307](https://doi.org/10.3390/cells8040307)
34. Yang Z, Li Y, Wang Z. Recent Advances in the Application of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Cardiovascular and Neurodegenerative Disease Therapies. *Pharmaceutics.* 2022; 14:618. DOI: [10.3390/pharmaceutics14030618](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030618)
35. Mao G, Zhang Z, Hu S, Zhang Z, Chang Z, Huang Z, et al. Exosomes derived from miR-92a-3poverexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9:247. DOI: [10.1186/s13287-018-1004-0](https://doi.org/10.1186/s13287-018-1004-0)
36. Cosenza S, Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, Blanc-Brude O, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics.* 2018; 8(5):1399–1410. DOI: [10.7150/thno.21072](https://doi.org/10.7150/thno.21072)
37. Cone AS, Yuan X, Sun L, Duke LC, Vreones MP, Carrier AN, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate Alzheimer's disease-like phenotypes in a preclinical mouse model. *Theranostics.* 2021; 11:8129–8142. DOI: [10.7150/THNO.62069](https://doi.org/10.7150/THNO.62069)
38. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:341–345. DOI: [10.1038/nbt.1807](https://doi.org/10.1038/nbt.1807)
39. Xie S, Zhang Q, Jiang L. Current Knowledge on Exosome Biogenesis, Cargo-Sorting Mechanism and Therapeutic Implications. *Membranes.* 2022; 12:498. DOI: [10.3390/membranes12050498](https://doi.org/10.3390/membranes12050498)
40. Sengupta V, Sengupta S, Lazo A, Woods P, Nolan A, Bremer N. Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19. *Stem Cells Dev.* 2020; 29(12):747–754. DOI: [10.1089/scd.2020.0080](https://doi.org/10.1089/scd.2020.0080)
41. Tian T, Zhang HX, He CP, Fan S, Zhu YL, Qi C, et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials.* 2018; 150:137–149. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2017.10.012](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.012)
42. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic.* 2008; 9:871–881. DOI: [10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x)
43. Ji H, Greening DW, Barnes TW, Lim JW, Tauro BJ, Rai A, et al. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics.* 2013; 13(10–11):1672–1686. DOI: [10.1002/pmic.201200562](https://doi.org/10.1002/pmic.201200562)
44. Duijvesz D, Burnum-Johnson KE, Gritsenko MA, Hoogland AM, Vredendregt-van Den Berg MS, Willemsen R, et al. Proteomic profiling of exosomes leads to the identification of novel biomarkers for prostate cancer. *PLoS One.* 2013; 8:e82589. DOI: [10.1371/journal.pone.0082589](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082589)
45. Hsu MT, Wang YK, Tseng YJ. Exosomal Proteins and Lipids as Potential Biomarkers for Lung Cancer Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Cancers.* 2022; 14:1–35. DOI: [10.3390/cancers14030732](https://doi.org/10.3390/cancers14030732)
46. Sun Y, Liu S, Qiao Z, Shang Z, Xia Z, Niu X, et al. Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva and serum for the detection of lung cancer. *Anal Chim Acta.* 2017; 982:984–95. DOI: [10.1016/j.aca.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.005)
47. Choi ES, Faruque H al, Kim JH, Kim KJ, Choi JE, Kim BA, et al. Cd5l as an extracellular vesicle-derived biomarker for liquid biopsy of lung cancer. *Diagnostics.* 2021; 11:1–18. DOI: [10.3390/diagnostics11040620](https://doi.org/10.3390/diagnostics11040620)
48. Gao J, Qiu X, Li X, Fan H, Zhang F, Lv T, et al. Expression profiles and clinical value of plasma exosomal Tim-3 and Galectin-9 in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 498(3):409–415. DOI: [10.1016/j.bbrc.2018.02.114](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.114)
49. Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer.* 2022; 21:56. DOI: [10.1186/s12943-022-01509-9](https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9)
50. Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, et al. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer.* 2017; 16:156. DOI: [10.1186/s12943-017-0726-4](https://doi.org/10.1186/s12943-017-0726-4)
51. Santos P, Almeida F. Exosome-Based Vaccines: History, Current State, and Clinical Trials. *Front Immunol.* 2021; 12:711565. DOI: [10.3389/fimmu.2021.711565](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711565)
52. Karami Fath M, Azargoonjahromi A, Jafari N, Mehdi M, Alavi F, Daraei M, et al. Exosome application in tumorigenesis: diagnosis and treatment of melanoma. *Med Oncol.* 2022; 39:19. DOI: [10.1007/s12032-021-01621-8](https://doi.org/10.1007/s12032-021-01621-8)
53. Zuo B, Qi H, Lu Z, Chen L, Sun B, Yang R, et al. Alarmin-painted exosomes elicit persistent antitumor immunity in large established tumors in mice. *Nat Commun.* 2020; 11:1790. DOI: [10.1038/s41467-020-15569-2](https://doi.org/10.1038/s41467-020-15569-2)
54. Hozbor DF. Outer membrane vesicles: an attractive candidate for pertussis vaccines. *Expert Review of Vaccines.* 2017; 16(3):193–196. DOI: [10.1080/14760584.2017.1276832](https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1276832)

Aplicación de exovesículas en diagnóstico y tratamiento

55. Sotillo J, Pearson M, Potriquet J, Becker L, Pickering D, Mulvenna J, et al. Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contain protein vaccine candidates. *Int J Parasitol.* 2016; 46:1–5. DOI: [10.1016/j.ijpara.2015.09.0](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.09.0)
56. Retana Moreira L, Steller Espinoza MF, Chacón Camacho, N, Cornet-Gomez A, Sáenz-Arce G, Osuna A et al. Characterization of extracellular vesicles secreted by a clinical isolate of *Naegleria fowleri* and identification of immunogenic components within their protein cargo. *Biology.* 2022; 11(7): 983. DOI: [10.3390/biology11070983](https://doi.org/10.3390/biology11070983)
57. Retana Moreira L, Vargas Ramírez D, Linares F, Prescilla Ledezma A, Vaglio Garro A, Osuna A et al. Isolation of *Acanthamoeba* T5 from water: characterization of its pathogenic potential, including the production of extracellular vesicles. *Pathogens.* 2020; 9(2), 144. DOI: [10.3390/pathogens9020144](https://doi.org/10.3390/pathogens9020144)
58. Retana Moreira L, Cornet-Gomez A, Sepulveda MR, Molina-Castro S, Alvarado-Ocampo J, Chaves Monge F, et al. Providing an in vitro depiction of microglial cells challenged with immunostimulatory extracellular vesicles of *Naegleria fowleri*. *Front Microbiol.* 2024; 15:1346021. DOI: [10.3389/fmicb.2024.1346021](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1346021)