



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE
NANOVESÍCULAS AISLADAS DEL ZUMO DE GUANÁBANA (*Annona
muricata*) EN LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS”**

CAIZA QUILLUPANGUI, KARLA PATRICIA

DIRECTOR: TORRES ARIAS, MARBEL Ph.D

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE NANOVESÍCULAS AISLADAS DEL ZUMO DE GUANÁBANA (*Annona muricata*) EN LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS**" fue realizado por la señorita *Caiza Quillupangui, Karla Patricia* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de Junio 2019

Firma:

.....
Torres Arias Marbel, Ph.D

C.C: 1802949154



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Caiza Quillupangui, Karla Patricia*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "*Determinación de la actividad proliferativa de nanovesículas aisladas del zumo de Guanábana (Annona muricata) en líneas celulares cancerígenas*" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 28 de Junio 2019

Firma:

.....
Karla Patricia Caiza Quillupangui

C.C: 1723173215



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Caiza Quillupangui Karla Patricia*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación "*Determinación de la actividad proliferativa de nanovesículas aisladas del zumo de Guanábana (Annona muricata) en líneas celulares cancerígenas*" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de Junio 2019

Firma:

.....
Karla Patricia Caiza Quillupangui

C.C: 1723173215

DEDICATORIA

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”

Marie Curie

Dedico el presente trabajo a mi pilar fundamental, mis padres Luz América Quillupangui y José Rafael Caiza, a mis hermanas Delia y Jimena quienes han estado en todo momento conmigo apoyándome constantemente en cada meta que me he propuesto.

Karla Patricia Caiza Quillupangui

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Luz América y José Rafael, que han inculcado en mí todo el amor y los mejores principios mediante su ejemplo, logrando convertirme en lo que soy hoy en día. Ustedes son mi vida. Esto es también su logro.

A mis hermanas Delia y Jimena, por no ser solo mis hermanas sino mis amigas, gracias por ser una guía y estar presentes en mis victorias y fracasos.

A las doctoras Marbel Torres y Ligia Ayala investigadoras del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por permitirme realizar mi proyecto de titulación y por sus valiosos aportes en la realización del mismo.

A mi directora de proyecto Dra. Marbel Torres por su completa entrega en el proyecto y por haber depositado su confianza en mí para la realización del mismo.

Al Dr. Alexis Debut investigador del Laboratorio de Microscopia Electrónica por su colaboración brindada para la adquisición de las imágenes de mi tesis.

Al Dr. Washington Cárdenas de la Escuela Politécnica del Litoral–Guayaquil, por abrirme las puertas de su laboratorio de Biomedicina, para la utilización de equipos indispensables para la culminación del trabajo.

A mis amigas, hermanas de corazón, Andrea, Fernanda, Camila, Grace, Nathali, Gaby por estos años de amistad, por compartir tantos momentos, locuras, tristezas y siempre tener una palabra de aliento, gracias por estar siempre ahí y por lo que significan para mí.

A mis compañeros de laboratorio Michu, Tephi, Sebas, Carlitos, Ari, Marquito, Alex, Andrea, Luis por su colaboración durante mi proyecto y por haber logrado ser una familia y no tan solo un equipo de trabajo.

Karla Patricia Caiza Quillupangui

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	I
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	II
AUTORIZACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2.JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3.OBJETIVOS.....	6
1.3.1.Objetivo general.....	6
1.3.2.Objetivos específicos.....	6
CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1.GUANÁBANA (<i>ANNONA MURICATA</i>).....	7
2.1.1Descripción botánica.....	7
2.1.2.Taxonomía de la Guanábana.....	8
2.1.3.Origen y distribución.....	8
2.1.4.Composición química y fotoquímica.....	9
2.1.4.1. Acetogeninas Anonáceas.....	10
2.1.4.2. Alcaloides.....	12
2.1.4.3. Compuestos fenólicos.....	13
2.1.5.Usos medicinales tradicionales.....	14
2.2.VESICULAS EXTRACELULARES.....	16

2.2.1. Vesículas extracelulares secretadas por plantas.....	17
2.2.2. Clasificación de las vesículas extracelulares.....	19
2.3. NANOVESÍCULAS (EXOSOMAS).....	21
2.3.1. Composición de nanovesículas.....	22
2.3.1.1. Carga de proteínas.....	23
2.3.1.3. Carga de lípidos.....	25
2.3.1.4. Carga de RNA.....	25
2.3.2. Biogénesis de las nanovesículas.....	27
2.3.2.1. Biogénesis mediante la vía dependiente de ESCRT en plantas.....	28
2.4. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS.....	29
2.5. APLICACIONES DE LOS EXOSOMAS.....	31
2.5.1. Aplicaciones de exosomas de plantas.....	32
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA.....	34
3.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE NANOVESÍCULAS DE GUANÁBANA (<i>ANNONA MURICATA</i>)....	34
3.2.1. Preparación de la muestra de Guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	34
3.2.2. Aislamiento de nanovesículas mediante centrifugaciones seriadas.....	35
3.2.3. Aislamiento de nanovesículas por ultracentrifugación.....	35
3.2.4. Purificación de nanovesículas usando un gradiente de sucrosa-deuterio.....	36
3.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE NANOVESÍCULAS A PARTIR DE CÉLULAS.....	37
3.4. CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	37
3.4.1. Caracterización de microvesículas mediante (STEM).....	37
3.4.2. Caracterización de nanovesículas mediante (TEM).....	37
3.5. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EXOSOMALES EN NANOVESÍCULAS.....	38
3.5.1. Obtención de extractos celulares.....	38
3.5.2. Cuantificación de proteínas totales.....	38
3.5.3. Preparación de muestras para western blot.....	41
3.5.4. Electroforesis vertical.....	41
3.5.5. Verificación de presencia de proteínas en gel.....	43
3.5.6. Transferencia de proteínas a membrana en medio semi- seco.....	43

3.5.7.Verificación de proteínas en membrana.....	44
3.5.8.Inmunomarcaje de proteínas.....	44
3.5.9.Análisis de imágenes.....	46
3.5.9.1. Determinación del peso molecular de proteínas.....	46
3.6.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA.....	46
3.6.1.Cultivo de celular.....	46
3.6.2.Ensayo MTT.....	46
3.6.3.Ensayo de Apoptosis.....	47
3.6.4.Toma de Imágenes.....	47
3.7.ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
CAPITULO IV: RESULTADOS.....	48
4.1 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	48
4.1.1. Caracterización de microvesículas mediante (STEM).....	48
4.1.2. Observación de nanovesículas mediante (TEM).....	49
4.2. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EXOSOMALES EN NANOVESÍCULAS.....	50
4.2.1. Perfil proteico de extractos de células y nanovesículas del zumo de guanábana.....	50
4.2.2. Detección de proteínas exosomales.....	51
4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA EN LÍNEAS CELULARES.....	53
4.3.1. Ensayo de MTT en líneas celulares.....	53
4.3.2. Ensayo de morfología y apoptosis en líneas celulares.....	56
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	65
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Taxonomía de <i>Annona muricata</i></i>	8
Tabla 2 <i>Composición química de la pulpa de guanábana</i>	9
Tabla 3 <i>Características fisicoquímicas de los diferentes tipos de vesículas extracelulares</i>	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Incidencia de cáncer infantil 2013-2017.....	4
Figura 2 Nanovesículas como herramientas terapéuticas.....	5
Figura 3 <i>Annona muricata</i>	7
Figura 4 Estructuras químicas de las seis acetogeninas aisladas de <i>A. muricata</i>	11
Figura 5 Estructura química de los alcaloides presentes en <i>A. muricata</i>	13
Figura 6 Estructuras químicas de los compuestos fenólicos presentes en <i>A. muricata</i>	13
Figura 7 Beneficios de los extractos de <i>Annona muricata</i> en el tratamiento de enfermedades	14
Figura 8 Comunicación intercelular a través de vesículas extracelulares.....	17
Figura 9 MVB con vesículas de tamaño variable del hongo <i>Blumeria graminis</i>	18
Figura 10 Representación esquemática de subtipos de EVs liberados por una célula.....	21
Figura 11 Morfología típica de exosomas observados por TEM.....	22
Figura 12 Composición de los exosomas.....	23
Figura 13 Esquema de la estructura molecular de la tetraspanina.....	24
Figura 14 Biogénesis de los exosomas.....	27
Figura 15 Modelo de ESCRT en plantas.....	29
Figura 16 Técnicas utilizadas para el aislamiento, caracterización y análisis	31
Figura 17 Proceso de aislamiento de nano-vesículas	36
Figura 18 Purificación de nano-vesículas, colchón de sucrosa/tris/deuterio	36
Figura 19 Principio del ensayo Bradford.....	39
Figura 20 Ensayo Bradford en placa de 96 pocillos.....	40
Figura 21 Preparación de geles de poliacrilamida en el soporte <i>gel casting</i> de Bio-Rad.....	42

Figura 22 Electroforesis vertical mediante el sistema Mini-PROTEAN	42
Figura 23 Sánduche de transferencia en Trans-Blot Turbo.....	44
Figura 24 Microvesículas de <i>A. muricata</i> aisladas y observadas por STEM.....	48
Figura 25 Nanovesículas aisladas y purificadas de <i>A. muricata</i>	49
Figura 26 Perfil proteico de extractos de células y aislados de nanovesículas	51
Figura 27 Western blot para detección de nanovesículas aisladas de guanábana.....	52
Figura 28 Ensayo de viabilidad celular MTT a las 48 horas.....	54
Figura 29 Ensayo de viabilidad celular MTT a las 72 horas.....	55
Figura 30 Ensayo de apoptosis en células HFF	58

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ac 1°	Anticuerpo primario
Ac 2°	Anticuerpo secundario
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALIX	Proteína X que interactúa con ALG-2, <i>ALG-2-interacting protein X</i>
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
BSA	Albumina de suero bovino
CD	Grupo de diferenciación, cluster of differentiation
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (por sus siglas en inglés “ <i>Dulbecco’s modified Eagle’s medium</i> ”)
ESCRT	Maquinaria del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, <i>endosomal sorting complex required for transport</i>
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GTPasas	Guanosina trifosfatasa
HRP	Peroxidasa de rábano, <i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Proteína de choque térmico <i>heat shock protein</i>
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
miARNA	Micro ácido ribonucleico
MVBs	Cuerpos multivesiculares, <i>multivesicular bodies</i>
NET A₅₉₀	Absorbancia neta a 590nm
PBS	Buffer fosfato salino
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

RIPA	Ensayo de radio-inmunoprecipitación, <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
SBF	Suero bovino fetal
SDS-PAGE	Electroforesis vertical con dodecilsulfato de sodio, <i>sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Microscopio electrónico de transmisión
STEM	Microscopio electrónico de barrido modo transmisión
TEM	Microscopio electrónico de barrido
TEMED	Tetrametiletildiamina
TSG101	Proteína del gen 101 de uceptibilidad tumoral
TSPAN12	Tetraspanina 12
VPS	Proteína vacuolar de clasificación, <i>Vacuolar protein sorting</i>

RESUMEN

En los últimos años las nanovesículas aisladas de frutas han sido de gran interés debido a que mediante el transporte de: mRNA, miARN, lípidos y proteínas a células animales se los ha involucrado en la comunicación célula –célula potenciándolas como un nuevo enfoque en la nanomedicina. Por ende, el objetivo del estudio es determinar la actividad proliferativa de nanovesículas aisladas del zumo de Guanábana (*Annona muricata*) en líneas celulares cancerígenas; logrando aislar nanovesículas de guanábana homogéneas en un rango de 40-60nm observadas al microscopio electrónico de transmisión, además mediante la caracterización de proteínas exosomales se evidenció la presencia de la proteína ALIX involucrada en la biogénesis de las vesículas extracelulares. Finalmente, se logró determinar que las nanovesículas aisladas del zumo de guanábana presentaron actividad antiproliferativa en las dos líneas celulares correspondientes a cáncer de pulmón A549 y cáncer de glioblastoma maligno U251, mostrando una disminución de la proliferación celular dependiente de la dosis.

PALABRAS CLAVES:

- **NANOVESÍCULAS**
- ***ANNONA MURICATA***
- **PROLIFERATIVA**

ABSTRACT

In recent years, fruit nanovesicles have been of great interest in research and because of their ability of mRNA, miRNA, lipids and proteins transport in animal cells they have been attributed as an important element in cell communication empowering them as a new approach in nanomedicine. Therefore, the objective of this study was to determine the proliferative activity of nanovesicles isolated from soursop juice (*Annona muricata*) in cancer cell lines; achieving homogeneous isolated soursop nanovesicles in a range of 40-60nm observed in a transmission electron microscope, furthermore, through characterization of exosomal proteins the presence of ALIX, an element of biogenesis of extracellular vesicles, was found. Finally, it was determined that the nanovesicles isolated from the soursop juice presented antiproliferative activity in two cell lines corresponding to lung cancer A549 and cancer of malignant glioblastoma U251, showing a decrease in cell proliferation dependent on the dose.

KEYWORDS:

- **NANOVESICLES**
- **SOURSOP**
- **PROLIFERATIVE**

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

A. muricata ha sido de gran interés investigativo por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas debido a sus múltiples compuestos bioactivos y fitoquímicos (Mariam, Wahab, Jantan, Haque, & Arshad, 2018).

Desde años atrás, se logró evidenciar que los extractos de hojas, cortezas, raíces, tallos y semillas presentaban actividad antibacteriana contra diversos patógenos *in vitro* (Moghadamtousi, Fadaeinasab, Nikzad, & Mohan, 2015; Sundarrao et al., 1993). Del mismo modo se observó que las acetogeninas anóxicas presentes en hojas, frutas, semillas y tallos demostraron ser citotóxicas contra varias líneas celulares cancerígenas (Chang & Wu, 2001; Sun, S., Liu, J., Kadouh, H., Sun, X., & Zhou, K, 2014).

Para demostrar la actividad antiproliferativa en el 2012 se reveló su capacidad de inhibir múltiples vías de señalización en células de páncreas, mediante la inducción de necrosis y la reducción de la expresión de moléculas de la glucólisis llevando a una disminución de la actividad tumoral (Torres et al., 2012).

Por otra parte, en 1960 se describió por primera vez en diversas plantas un grupo de esferas pequeñas envueltas en membranas denominadas cuerpos multivesiculares (MVB) (Marchant & Robards, 1968). Este hallazgo fue similar a los mostrados en la década de 1980, donde se dieron los primeros reportes de nanovesículas en mamíferos (Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987).

Las primeras investigaciones que dieron a conocer la liberación de la carga de los MVB's tras fusionarse con la membrana plasmática fue en un modelo de hojas de *Arabidopsis* (Collins, y otros, 2003; Eggert, Feechan, Böhlenius, Ueda, & Thordal-christensen, 2012); en donde se evidenció que durante el ataque de hongos la célula de la planta reforzaba su material de defensa en la pared celular con el fin de evitar que el patógeno rompa la membrana plasmática (Collins, y otros, 2003). Durante este proceso de defensa se observó dos proteínas críticas PEN1 y ROR2 homólogas a la proteína de mamíferos SNARE, permitiendo elucidar que ambas permitían la formación y liberación de los exosomas en la defensa contra patógenos (Rutter & Innes, 2017).

En plantas el rol de los exosomas todavía no estaba completamente elucidado, sin embargo, estudios realizados con nanovesículas aislados de girasoles produjeron cambios morfológicos en células fúngicas además de la inhibición de su crecimiento, catalogándolos como vehículos para entregar información o componentes para la defensa de la planta (Regente, Pinedo, Clemente, Balliau, & Jamet, 2017).

Se han logrado aislar diversas vesículas tipo exosomal de frutas como la uva (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Deng, et al., 2013), la toronja (Q. Wang, Zhuang, Mu, Deng, Jiang, Zhang, et al., 2013), jugos de *Citrus limón* (Raimondo et al., 2015), que están involucradas en la comunicación célula-célula debido al transporte de ARNm, miARN, lípidos y proteínas a células animales, potenciándolas como un nuevo enfoque en la nano medicina (Mingzhen Zhang, Viennois, Xu, & Merlin, 2016).

En los últimos años, las investigaciones buscan descubrir el rol de nanovesículas derivadas de plantas (uva y jugo de *Citrus limon*), mediante la implementación de ensayos *in vitro*; observándose que existe un aumento en la proliferación de células madres intestinales en ratones

con colitis tras una administración oral (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Deng, et al., 2013; Mingzhen Zhang et al., 2016) y una inhibición de la proliferación celular en modelos con leucemia mieloide crónica por la vía de muerte celular apoptótica mediada por TRAIL (Raimondo et al., 2015).

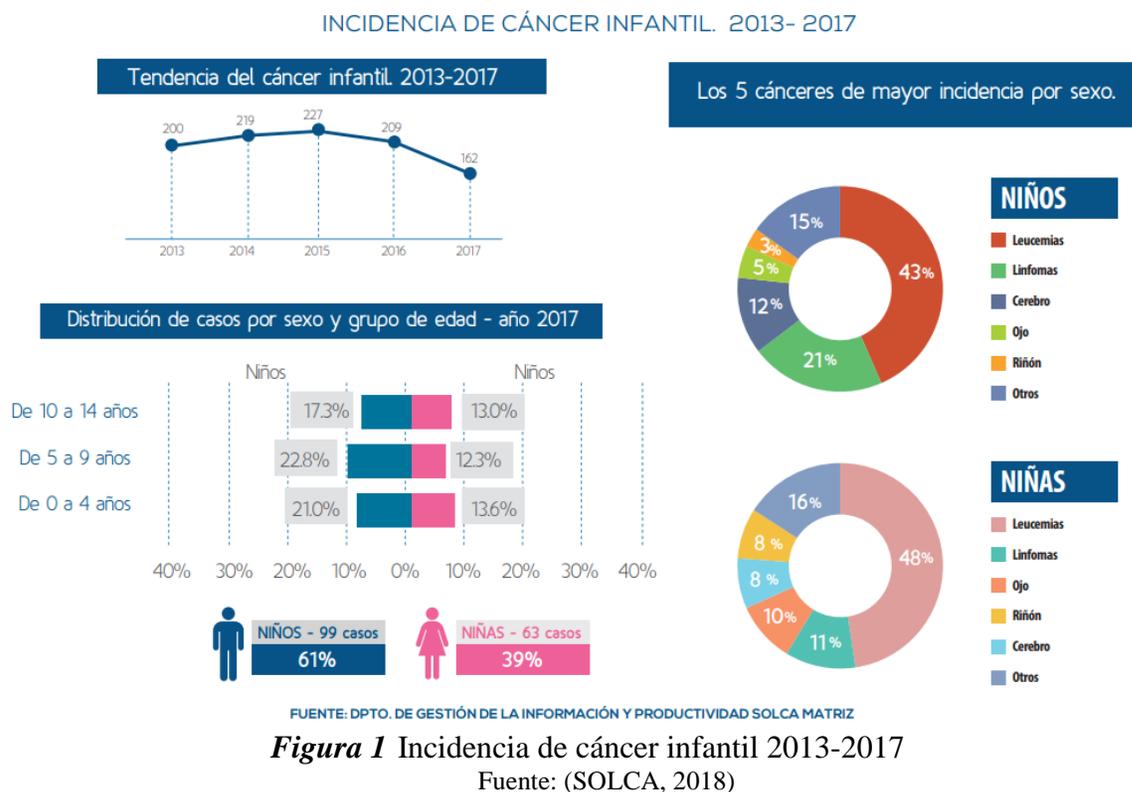
1.2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer se conoce como un conjunto de enfermedades relacionadas en las que existe un proceso descontrolado en la división celular causado por anomalías en el material genético (Baker, 2015). Estos cambios genéticos pueden darse por daño del ADN, exposición a agentes carcinogénicos o ser heredados de los padres (Colditz, Sellers, & Trapido, 2006). Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es considerada una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y la segunda causa de mortalidad en el mundo (Siegel, Miller, & Jemal, 2019).

Según reportes de SOLCA (2018), en el Ecuador la incidencia de cáncer ha presentado una tendencia creciente del 4 % entre el periodo de 2011-2017, mostrando una incidencia de cáncer infantil mayor en niños con respecto a niñas. Los cinco cánceres de mayor incidencia según el sexo son leucemia, linfomas, ojos, cerebro, riñón como se muestra en la Figura 1.

Por lo cual se ha buscado nuevos tratamientos que en comparación con los quimioterapéuticos convencionales no levantan toxicidad en tejidos sanos (Torres et al., 2012). Enfocándose en el extracto de *Annona muricata* que presenta compuestos en forma natural capaces de inhibir múltiples vías de señalización involucradas en el metabolismo, ciclo celular, supervivencia y propiedades metastásicas en las células cancerígenas, llevando a una disminución de la

proliferación celular (Torres, Rachagani, Purohit, Pandey, Joshi, & S, 2012; Syed Najmuddin, Romli, Hamid, Alitheen, & Abd Rahman, 2016).



Se ha demostrado que las nanovesículas están involucradas en la comunicación intracelular actuando como mediadores en la transferencia de biomoléculas entre células animales (Yoon, Kim, & Gho, 2014), por tal motivo, la nanotecnología es un enfoque prometedor debido a la capacidad de administrar medicamentos encapsulados y miARN para tratar enfermedades Figura 2 (Q. Wang, Zhuang, Mu, Deng, Jiang, Xiang, et al., 2013).

La implementación de nanovesículas liberadas por diferentes células de mamíferos como vehículos (Q. Wang, Zhuang, Mu, Deng, Jiang, Xiang, et al., 2013) debido a sus propiedades intrínsecas permite el suministro de moléculas endógenas o exógenas a las células dianas, debido

que su membrana protege el contenido, evita la degradación y su pequeño tamaño evita la eliminación logrando su entrada en tejidos y una mejor interacción con tejidos específicos tras ser modificada (Mallocci et al., 2019), es así que supera los desafíos en la entrega, posibles efectos, seguridad y toxicidad (Q. Wang, Zhuang, Mu, Deng, Jiang, Xiang, et al., 2013).

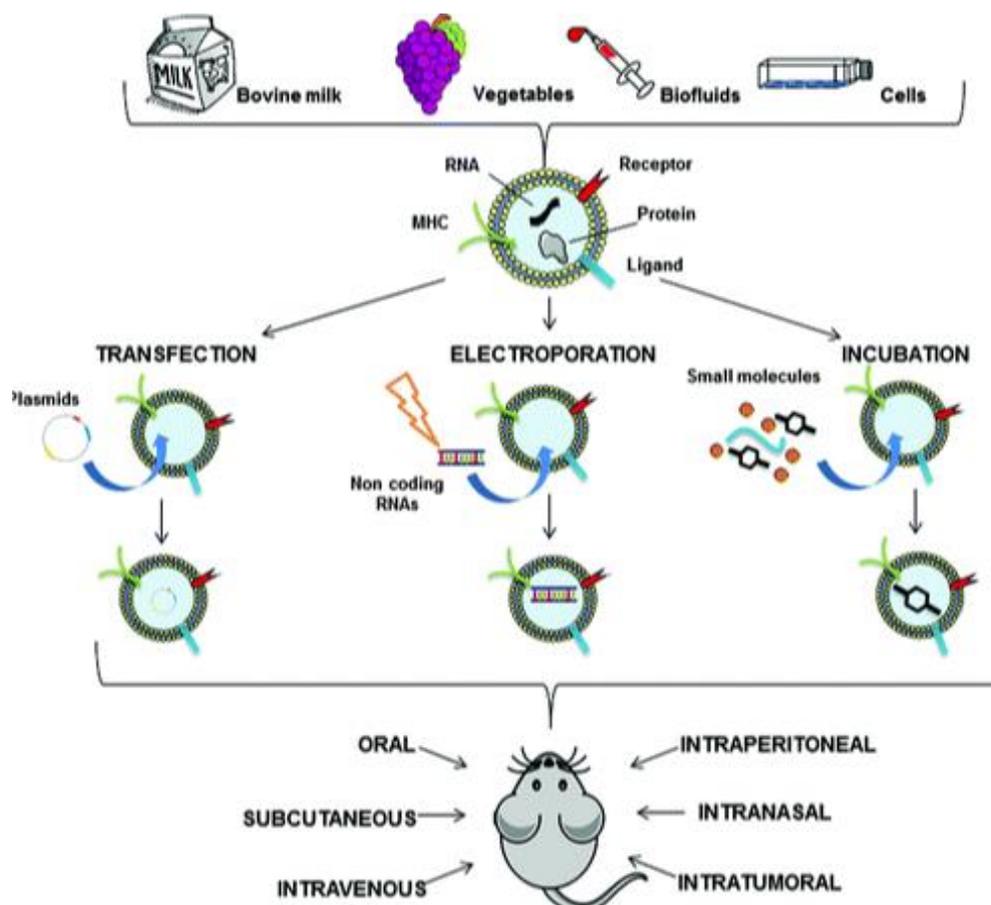


Figura 2 Nanovesículas como herramientas terapéuticas

Fuente: (Mallocci et al., 2019)

Sin embargo, en plantas la información de cómo las nanovesículas similares a exosomas son capaces de desempeñar un papel en la comunicación entre especies está iniciando (Ju, y otros, 2013), esto se logra evidenciar tras las nuevas investigaciones realizadas en el tejido de fruta

comestible de toronja, en el cual se han identificado nanovesículas usadas en modelos de cultivo de células *in vitro* demostrando que son capaces de entregar de manera eficiente una variedad de agentes terapéuticos (fármacos quimioterapéuticos, vectores de expresión de ADN, y proteínas) concluyendo ser excelentes candidatos para la entrega de una variedad de diferentes tipos de agentes terapéuticos (Wang Q. , y otros, 2013).

Por lo tanto, esta investigación es de gran interés ya que pretende abordar si las nanovesículas derivados de frutas como la guanábana son capaces de servir como mensajeros de agentes terapéuticos en células cancerígenas y tener un efecto biológico sobre estas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Determinar la actividad proliferativa de nanovesículas aisladas del zumo de Guanábana (*Annona muricata*) en líneas celulares cancerígenas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Aislar nanovesículas por ultracentrifugación y purificar mediante gradiente de Tris-sucrosa-deuterio del zumo de Guanábana (*Annona muricata*).
- Caracterizar las proteínas exosomales en nanovesículas aisladas del zumo de Guanábana (*Annona muricata*).
- Estudiar la actividad proliferativa de nanovesículas del zumo de Guanábana (*Annona muricata*) en líneas celulares cancerígenas.

CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Guanábana (*Annona muricata*).

2.1.1. Descripción botánica

Es un árbol perenne de 5-8 m de altura y 15-83 cm de diámetro (Figura 3.A), con ramas bajas y hojas de color verde, alternas, lisas, brillantes de 6 a 20 cm de largo y de 2-6 cm de ancho como se observa en la Figura 3.B (González B., Contreras A. C., Lipcovich J. Q., Centeno D. M., 2004).

La guanábana es una baya comestible, ovoide de color verde oscuro, aproximadamente de 15-20 cm de largo y de 8-10 cm de ancho que alcanza un peso de 4 kg o más (Figura 3.C) (Schultes, R., & Raffauf, 1990). Su cobertura presenta espinas largas dobladas hacia abajo correspondientes cada una a carpelos (Pinto, A., Cordeiro, M., De Andrade, S., Ferreira, F., & Filgueiras, 2005) y una superficie interna con segmentos fibrosos de color crema que contienen una semilla ovalada, lisa, dura y negra de 1.25 a 2cm (Figura 3.D) (Morton, 1980).

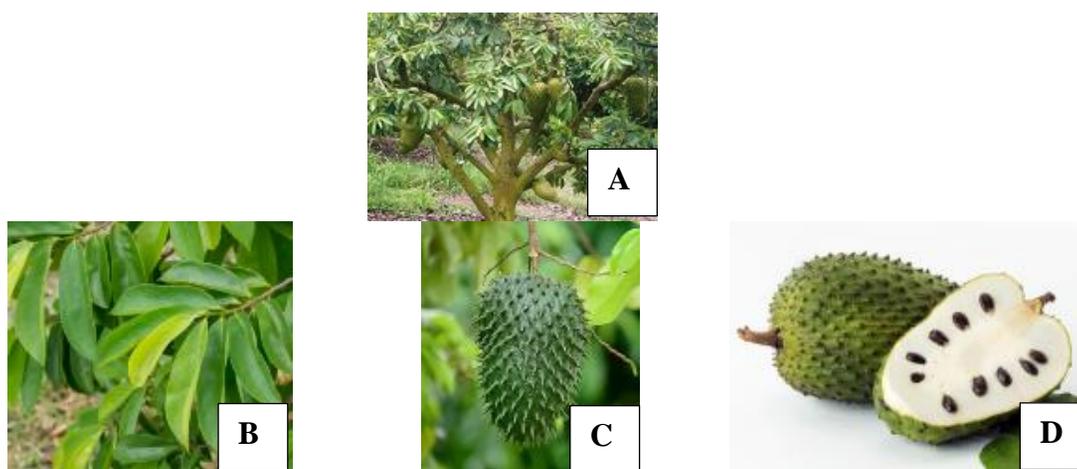


Figura 3 *Annona muricata* A) Planta B). Hoja C). Fruta D). Semilla

2.1.2. Taxonomía de la Guanábana

Annona muricata es conocida como Soursop (inglés), Graviola (portugués), Guanábana para el español latino, y otros nombres según la localidad indígena. La taxonomía de la guanábana se detalla a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de Annona muricata

TAXONOMÍA	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Magnoliales
Familia:	Annonaceae
Género:	Annona
Especie:	A. muricata

Fuente: (Pinto, A., Cordeiro, M., De Andrade, S., Ferreira, F., & Filgueiras, 2005)

2.1.3. Origen y distribución

La Guanábana (*Annona muricata*) es un frutal tropical nativa de las Antillas, el sur de México hasta el Perú y el norte de Argentina (Hanelt, 2001). Sin embargo, en los últimos años se ha catalogado como nativa de Puerto Rico (USDA-NRCS, 2014) y de los territorios del Caribe (ITIS, 2014).

Está distribuida en las zonas tropicales y subtropicales de América, Asia y África (Adewole & Caxton-Martins, 2011) en altitudes inferiores a 1200 m sobre el nivel del mar, temperaturas de

25- 28°C, humedad relativa de 60 y 80 % y una precipitación anual por encima de 1500 mm (Pinto, A., Cordeiro, M., De Andrade, S., Ferreira, F., & Filgueiras, 2005).

Además en estudios del Programa de Fruticultura del INIAP en el Ecuador las principales áreas de producción se ubican en la Península de Santa Elena y Guayas con lotes totalmente tecnificados con aproximadamente 120 hectáreas mientras que en forma endémica se ubican en zonas del Sur de Manabí y áreas rurales de Santo Domingo de los Colorados (INIAP, 2014).

Según datos reportados por el Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2014) en el Ecuador se producen aproximadamente 3000 toneladas de guanábana fresca anualmente y de acuerdo al Banco Central del Ecuador (BCE), en el 2007 se exportaba 0,12 toneladas de la fruta y para el 2015 existió un aumento significativo a 5,31 toneladas.

2.1.4. Composición química y fotoquímica.

Según Arango (1975), la composición química de la guanábana reveló algunos minerales esenciales como K, Ca, Na, Cu, Fe y Mg que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2
Composición química de la pulpa de guanábana.

COMPOSICIÓN	CONTENIDO
Agua	82,2 g
Proteínas	0,9 g
Lípidos	0,7 g
Carbohidratos	16,3 g
Calcio	2,2 mg
Fosforo	2,8 mg

Hierro	0,6 mg
Sodio	18 mg
Vitamina A	20 mg
Vitamina B	0,07 mg
Vitamina C	206 mg
Niacina	0,9 mg

Fuente: (Arango, 1975)

La guanábana es ampliamente utilizada en la medicina complementaria ya que es una fuente de metabolitos químicamente activos que poseen diversas actividades curativas (Zorofchian Moghadamtousi, Karimian, Rouhollahi, Paydar, Fadaeinasab, & Abdul Kadir, 2914). Referente a los compuestos fitoquímicos se ha obtenido como resultado una alta concentración de metabolitos secundarios (212 metabolitos), de los cuales en su mayoría son acetogeninas seguido de alcaloides, fenoles y otros compuestos.

2.1.4.1. Acetogeninas Anonáceas

Las acetogeninas son los principales metabolitos secundarios aislados de diferentes partes de las plantas de la familia Annonaceae (Yajid, Ab Rahman, Wong, & Wan Zain, 2018) .

Estos metabolitos pueden distinguirse por presentar una cadena alifática de 35 a 38 carbonos unidos a un anillo γ -lactona α , β -insaturada sustituida con metilo, y a lo largo de la cadena con uno o dos tetrahidrofurano (THF) y grupos de oxígeno (hidroxilo, acetoxilos, cetonas, epoxis) (Zafra, Figadèrea, Gallardo, Tormo, & Cortes, 1998; Gavamukulya, Wamunyokoli, & El-shemy, 2017).

En *Annona muricata* la mayoría de acetogeninas reportadas presentan un anillo de THF sin embargo, también se han observado la presencia de dos tetrahidrofurano (THF) adyacentes o no adyacentes, además de ser lineales y con grupos epoxi. En la Figura 4 se observa las seis estructuras básicas químicas de las acetogeninas aisladas (Coria-Téllez, Montalvo-González, Yahia, & Obledo-Vázquez, 2018).

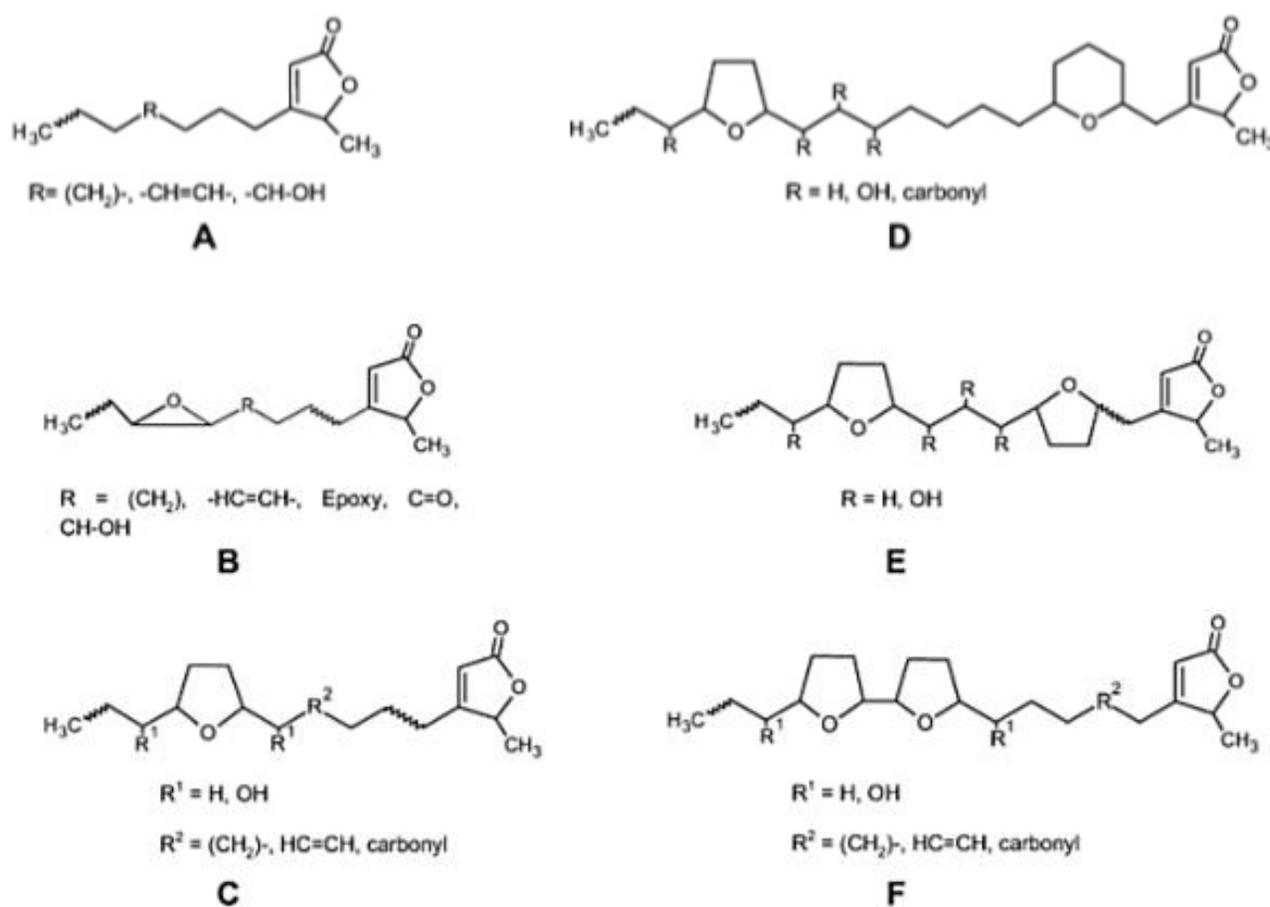


Figura 4 Estructuras químicas de las seis acetogeninas aisladas de *A. muricata* A) Estructura química de derivados lineales B). Estructura química de acetogeninas epoxi C). Estructura química de acetogeninas mono THF D). Estructura química de acetogeninas mono THF, mono THP E). Estructura química de acetogeninas no adyacentes al Bis-THF F). Estructura química de acetogeninas adyacentes al Bis-THF.

Fuente: (Coria-Téllez et al., 2018)

Las acetogeninas presentan una mayor citotoxicidad con respecto a los alcaloides, siendo de gran interés debido a sus diferentes mecanismos citotóxicos en ensayos *in vitro* contra células cancerígenas (Agu, Okolie, Falodun, & Engel-Lutz, 2017).

El principal mecanismo de la acción citotóxica de las acetogeninas en células cancerígenas es la inhibición de la NADH oxidasa ubicada en la membrana plasmática observado tras la exposición a una acetogenina denominada bullatacina en células cancerígenas HL-60 (Morre, Cabo, Farley, Oberlies, & McLaughlin, 1995). Además en estudios realizados por Torres et al., 2012 se demostró que los extractos de *A. muricata* bloquean la fosforilación oxidativa en la ruta de la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) y la ruta del fosfatidilinositol 3' quinasa (PIK/Akt) encargados en la proliferación y supervivencia en células de cáncer de páncreas.

Estos mecanismos limitan el ATP e inducen a la asfixia celular (Wolvetang, Johnson, Krauer, Ralph, & Linnane, 1994), llevando a la muerte celular programada siendo más selectivo contra células cancerígenas debido a su mayor actividad de NADH oxidasa y su alta demanda de ATP (Torres et al., 2012).

2.1.4.2. Alcaloides

En *A. muricata*, las hojas presentan una mayor concentración de alcaloides con respecto a raíces, talos y frutos (Coria-Téllez et al., 2018). En la Figura 5 se muestra las estructuras químicas de los alcaloides reportados en *A. muricata* provenientes de la isoquinolina, tipo aporfina y protoberberina (Mohanty et al., 2008).

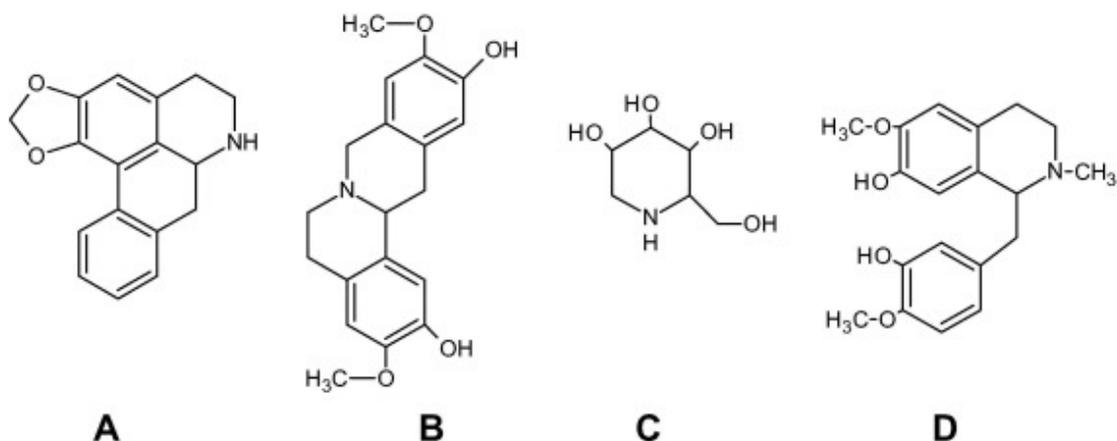


Figura 5 Estructura química de los alcaloides presentes en *A. muricata* A) Tipo de aporfina B) Tipo de protoberberina C) Tipo iminosugar D) Tipo de isoquinolina
Fuente: Mohanty et al., 2008

2.1.4.3. Compuestos fenólicos

En *A. muricata* los compuestos fenólicos que se han informado corresponden a quercetina y ácido gálico (Nawwar et al., 2012), además, en la pulpa se ha informada la presencia de flavonoides y compuestos antioxidantes lipofilos como son los tocoferoles y tocotrienoles. Siendo estos compuestos fitoquímicos responsables de la actividad antioxidante (Correa, Ortiz, Larrahondo, Sánchez, & Pachón, 2011).

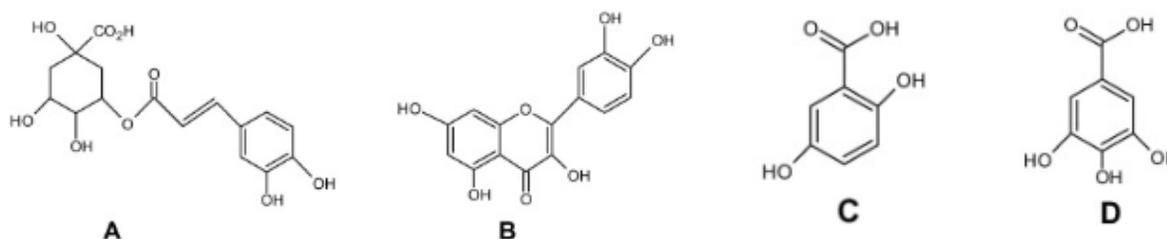


Figura 6 Estructuras químicas de los compuestos fenólicos presentes en *A. muricata*. A) Tipo de ácido clorogénico B) tipo de flavonoide C) Tipo de hidroquinona D) Tipo de tanino

Fuente : Correa, Ortiz, Larrahondo, Sánchez, & Pachón, 2011

2.1.5. Usos medicinales tradicionales

Estudios etnobotánicos han indicado que la guanábana (*Annona muricata*), posee un alto potencial terapéutico, debido a que la mayoría de sus partes son utilizados como medicamentos tradicionales en el tratamiento de diversas enfermedades como se muestra en la Figura 7 (Yajid et al., 2018).

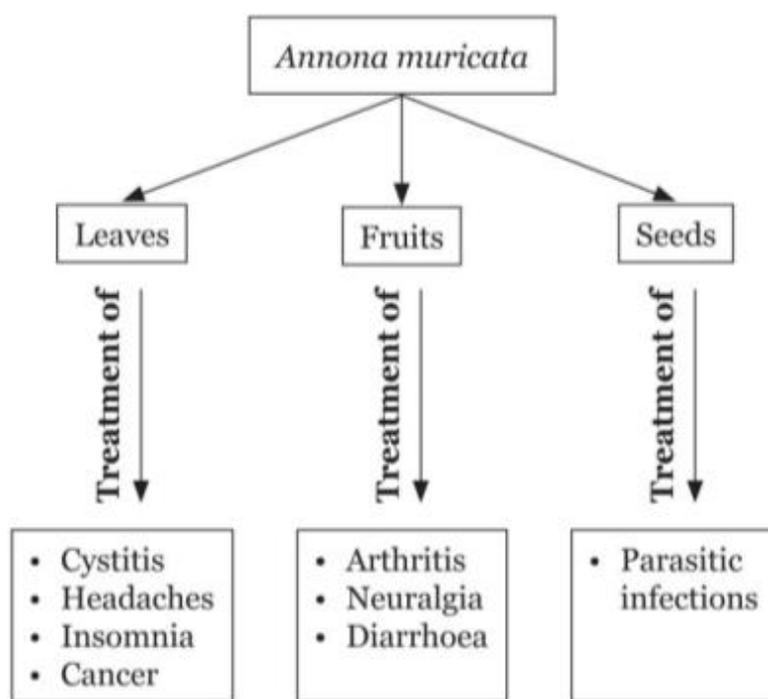


Figura 7 Beneficios de los extractos de *Annona muricata* en el tratamiento de enfermedades

Fuente: (Yajid, Ab Rahman, Wong, & Wan Zain, 2018).

Las semillas y el fruto presentan actividad antiparasitaria (Leatemia & Isman, 2004), además el jugo de la fruta y la infusiones de las hojas son utilizadas en el tratamiento contra la fiebre (Magaña, Alberto, Gama, & Mariaca, 2010). En los últimos años se ha utilizado ampliamente en el tratamiento contra el cáncer (Monigatti, Bussmann, & Weckerle, 2013).

Un estudio realizado a partir del extracto de hojas de *Annona muricata* mostró mayor toxicidad en contra de líneas celulares cancerígenas como MCF-7, MDA-MB-231 y 4 T1, en comparación con células normales (Syed Najmuddin, Romli, Hamid, Alitheen, & Abd Rahman, 2016).

Ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el extracto de fruta de guanábana regula la expresión del gen EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), el cual aumenta su expresión en el cáncer de mama, presentando actividad selectiva en la proliferación de células MDA-MB-468 mas no en células normales (Dai et al., 2011).

Los compuestos que están en forma natural en el extracto de *Annona muricata* revelaron su capacidad de inhibir múltiples vías de señalización en células de cáncer de páncreas, regulando el metabolismo celular mediante la inducción de necrosis de las células; además de la reducción de la expresión de moléculas de la glucólisis necesarias para la sobrevivencia de las células cancerígenas (HIF-1 α , NF- κ B, GLUT1, GLUT4, HKII y LDHA) llevando a una disminución de la actividad tumoral (Torres et al., 2012).

Estudios realizados de hoja de *A. muricata* han mostrado que existe un efecto citotóxico contra células de pulmón A549 (Moghadamtousi et al., 2014) y células HL-60 (Pieme et al., 2014). Ambos resultados mostraron elevados niveles de ROS, la interrupción de la potencial de membrana plasmática y la detección en la fase G0/G1 sugiriendo que los extractos de *A. muricata* presentan un potencial antiproliferativo y la inducción de apoptosis (Moghadamtousi, Kadir, Paydar, Rouhollahi, & Karimian, 2014; Pieme et al., 2014).

En recientes estudios se ha logrado aislar tres nuevas acetogeninas mono THF (muricina M, N y muricenina) de la fruta de *A. muricata*, las mismas que presentaron actividad antiproliferativa contra células de cáncer de próstata PC-3(Sun et al., 2016).

2.2. Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EV) han sido consideradas como subproductos del metabolismo extracelular desde finales de los años 60 del siglo XX , sin embargo, han llamado la atención en investigaciones recientes debido a que están involucradas como mediadores de las comunicaciones celulares (Yoon, Kim, & Gho, 2014).

Las EV son vesículas de 30-2000 nm de diámetro, cubiertas de una bicapa lipídica, liberadas en un proceso evolutivo conservado por células de diferentes organismos tales como procariotas, eucariotes superiores y plantas (Yáñez-Mó et al., 2015). Una vez liberadas en el espacio extracelular, las EVs están cargadas con varias proteínas, lípidos, mRNA, miRNA, metabolitos que influyen en diversas funciones fisiológicas y patológicas de células receptoras como parentales mediante interacciones ligando –receptor, fusión e internalización a través de endocitosis mediada por receptor o macropinocitosis como se muestra en la Figura 8 (Yoon, Kim, & Gho, 2014).

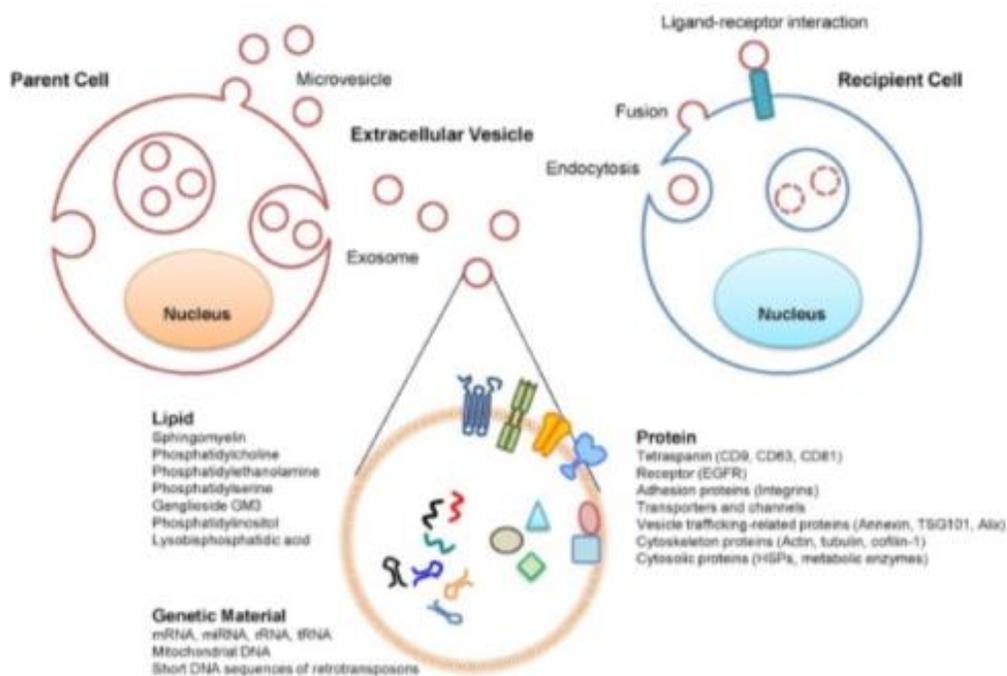


Figura 8 Comunicación intercelular a través de vesículas extracelulares.

Fuente: (Yoon, Kim, & Gho, 2014)

2.2.1. Vesículas extracelulares secretadas por plantas

Las células vegetales en su entorno extracelular presentan un proteoma complejo y dinámico que está involucrado en diversas funciones del metabolismo y la señalización de las plantas (Regente, Pinedo, Elizalde, & De la Canal, 2012).

La secreción de proteínas extracelulares implica el reconocimiento de un péptido de señal en el extremo N-terminal por la vía secretora (Regente et al., 2012). Sin embargo, se ha proporcionado evidencia sobre la secreción proteica evitando la vía del aparato de Golgi (Cheng, Zamski, Guo, Pharr, & Williamson, 2009).

Estudios enfocados en cebada han revelado que los MVB son secretados por la pared celular de las hojas como respuesta al ataque por el hongo *Blumeria graminis*, liberando así su contenido

en el espacio paramural, dando indicios de la existencia de nano vesículas en plantas (An, Ehlers, Kogel, Van Bel, & Hüchelhoven, 2006).

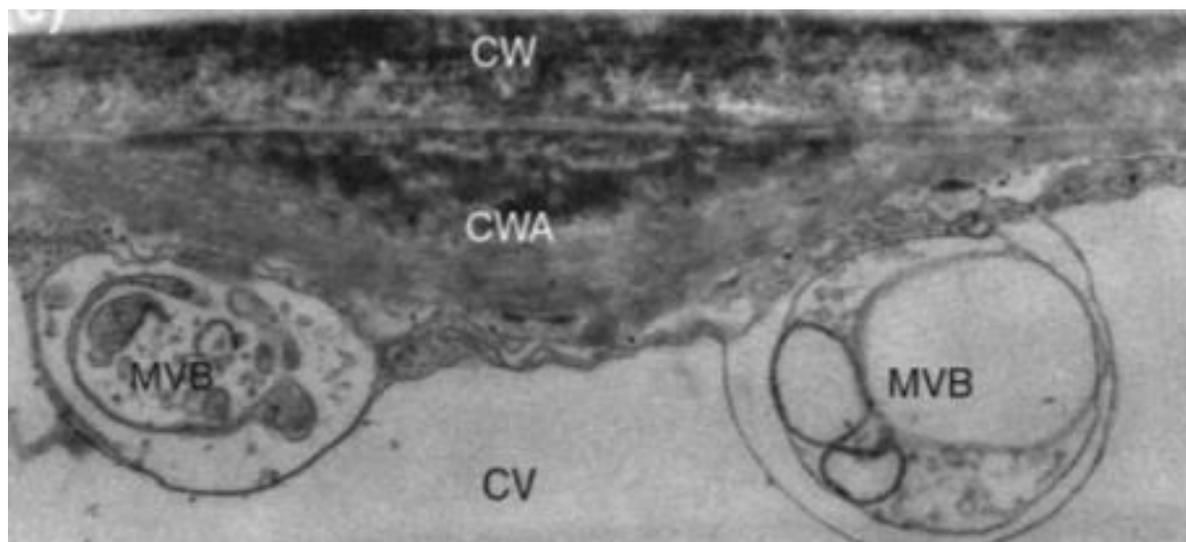


Figura 9 MVB con vesículas de tamaño variable y túbulos debajo de una papila inducidos por intentos tardíos de penetración del hongo *Blumeria graminis*
Fuente : An, Ehlers, Kogel, Van Bel, & Hüchelhoven, 2006

Alrededor del 60 % de las proteínas analizadas en el proteoma extracelular no son dependientes del péptido señal clásico de la ruta secretora, por lo que se sugiere que son dependientes del exosoma (Pinedo et al., 2012), ya que se ha observado la presencia de estructuras similares a exosomas en los proteomas apoplásticos de *Brassica*, *Arabidopsis*, arroz (M, Corti-Monzón, Maldonado, Pinedo, Jorrín, & De la Canal, 2009).

En los últimos años se ha buscado establecer cuál es el rol de los MVBs con respecto al tráfico de membrana en el reconocimiento de patógenos, la respuesta en función de la defensa por lo que en recientes estudios realizados en plantas se determinó la presencia de una proteína similar a la Rab11GTPasas en la fracción extracelular de girasol (Regente et al., 2009); se conoce que en plantas las proteínas Rabs están implicadas en el movimiento, anclaje y acoplamiento de

vesículas además de la regulación en la formación de vesículas de la membrana donante (Molendijk, Ruperti, & Palme, 2004), proteína observada en exosomas derivados de diferentes células (Théry et al., 2019).

Ciertas investigaciones reflejan que las nanovesículas aisladas de vegetales presentan propiedades de transporte y funciones biológicas, debido a que comparten ciertas proteínas incluidas las proteínas HSP70, aquaporina y lípidos (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Xiang, et al., 2013).

Se ha demostrado que a lo largo de las vías de tráfico endosomal se produce una serie de eventos dinámicos, sin embargo, es un campo que requiere mucha investigación para comprender si las vesículas extracelulares de plantas participan en la comunicación intercelular y la defensa de las plantas (Stanly, Fiume, Capasso, & Pocsfalvi, 2016).

2.2.2. Clasificación de las vesículas extracelulares

Las principales características para definir a los diferentes tipos de vesículas son la función, su biogénesis, origen celular y la función biológica clasificando así en cuerpos apoptóticos, microvesículas y nanovesículas (Zumaquero Martínez, 2010) como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3

Características fisicoquímicas de los diferentes tipos de vesículas extracelulares

Características	Vesículas Apoptóticas	Micro vesículas	Nano vesículas
Tamaño	50- 5000 nm	De 100- 1000 nm	De 30- 100 nm
Densidad en sacarosa	1.16 – 1.28 g /mL	No determinado	1.13 -1.19 g/mL

Apariencia en microscopio electrónico	Regular	Irregular	Regular
Sedimentación	1200 g – 10 000 xg	10000 -100 000 x g	>100 000 x g
Composición lipídica	No determinada	Fosfatidilcolina	Enriquecido con colesterol, esfingomielina, ceramida.
Principales marcadores	Histonas, Organelos	Integrinas, selectinas CD40 ligando	LAMP-1, Tetraspaninas (CD63, CD9), Alix, TSG100, HSP 70, MCH-I.II
Origen intracelular	Celulas que sufren apoptosis	Membrana plasmática	Compartimientos internos (endosomas)

Fuente: Zumaquero Martínez, 2010

En la Figura 10 se muestra una representación de los tres tipos de vesículas extracelulares secretados por una célula eucariota (Y. Chen, Tang, Long, & Zhang, 2016).

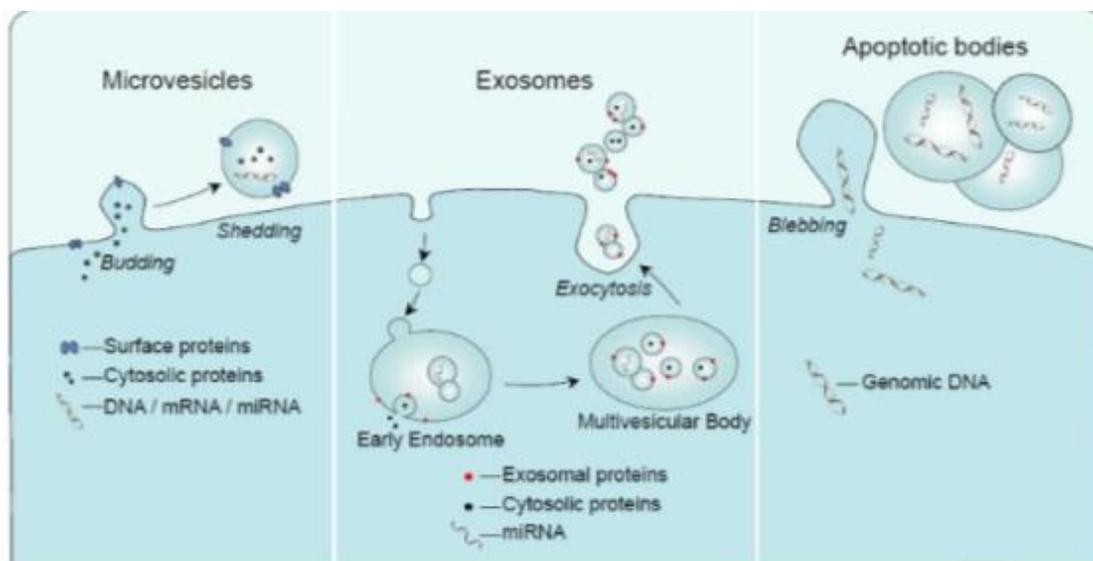


Figura 10 Representación esquemática de subtipos de vesículas extracelulares (EV) liberados por una célula
Fuente : (Y. Chen et al., 2016)

2.3. Nanovesículas (exosomas)

Los exosomas en los últimos años han sido de gran interés, debido a que están presentes en cantidades significativas en la mayoría de fluidos corporales (Kowal, Tkach, & Théry, 2014), además, de estar implicados en diferentes funciones celulares y diferentes estadios de enfermedades atribuyéndose como valiosos biomarcadores (Simons & Raposo, 2009).

Las nanovesículas son homogéneas de 30–120 nm de diámetro y una densidad de 1.13- 1.19 g/ml (Simons & Raposo, 2009). Con una morfología similar a un balón desinflado al ser observada en el microscopio electrónico de transmisión (Figura 11A) (Mathivanan, Ji, & Simpson, 2010). En estudios recientes se ha logrado el aislamiento y purificación de nanovesículas derivadas de plantas (uva, tomate, zanahoria, jengibre) homogéneas a los exosomas aislado en mamíferos (Mu et al., 2014) como se observa en la Figura 11.B.

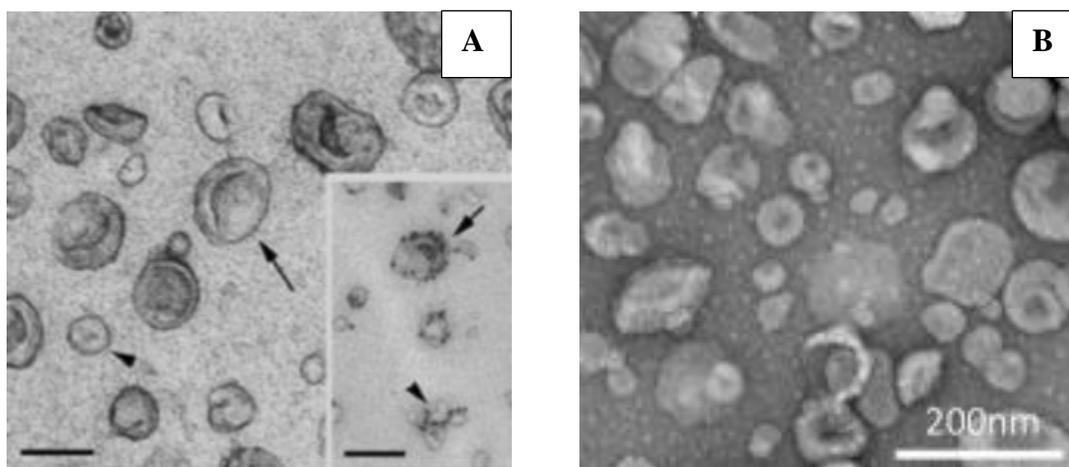


Figura 11 Morfología típica de exosomas observados por TEM.
 A) Exosomas aislados de células dendríticas; B) Exosomas aislados de uva
 Fuente : (Milosevits, Szebeni, & Krol, 2015) (Mu et al., 2014).

Las vesículas tipo exosomas derivadas de plantas que se han logrado aislar han presentado mecanismos de transporte y funciones biológicas únicas (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Deng, et al., 2013) permitiendo generar estrategias novedosas, seguras y económicas como agentes terapéuticos o vehículos en la administración de medicamentos.

2.3.1. Composición de nanovesículas

Los exosomas están comprendidos típicamente por la carga luminal rodeada por una bicapa lipídica. La carga luminal está constituida por péptidos, lípidos y material genético (ADN, ARN, ARNm, miARN) (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Deng, et al., 2013) como se observa en la Figura 12. Estos son secretados por la mayoría de las células eucariotas y tienen origen endocítico (Yoon et al., 2014).

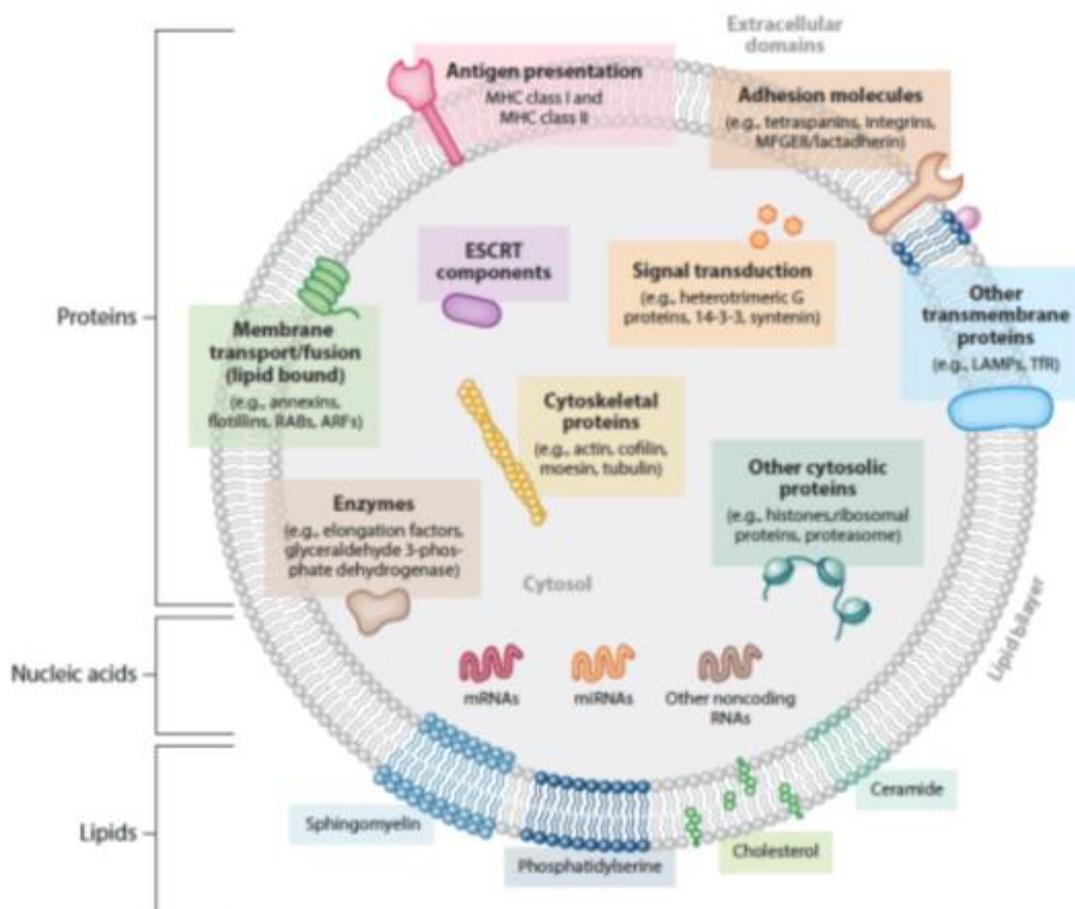


Figura 12 Composición de los exosomas.

Fuente: (Colombo, Raposo, & Théry, 2014).

2.3.1.1. Carga de proteínas

Las proteínas involucradas en la formación del complejo de transporte (MVB) son TSG101, Alix, anexinas y flotilinas, GTPasas RAB involucradas en el transporte y fusión de la membrana, tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) e integrinas para la adhesión, proteínas para la presentación de antígenos (moléculas de clase MHC), proteínas de choque térmico (Hsp60, Hsp70 y Hsp90), proteínas del citoesqueleto (actinas, cofilina-1, ezrin / radixina / moesina, profilina-1 y tubulinas), enzimas metabólicas y proteínas ribosómicas (Yoon et al., 2014).

2.3.1.2. Tetraspaninas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas transmembranas con cuatro dominios extracelulares, colas en los extremos C-terminal y N-terminal intracelulares, además de dos dominios extracelulares de diferentes tamaños definidos por aminoácidos conservados (Figura 13) (Théry, Zitvogel, & Amigorena, 2002) (Kalra, Drummen, & Mathivanan, 2016). Los dominios se denominan bucle extracelular pequeño (EC1) y bucle extracelular grande (EC2), este último bucle contiene un motivo de secuencia de aminoácidos cisteína- cisteína- glicina conservado (CCG) (Termini & Gillette, 2017).

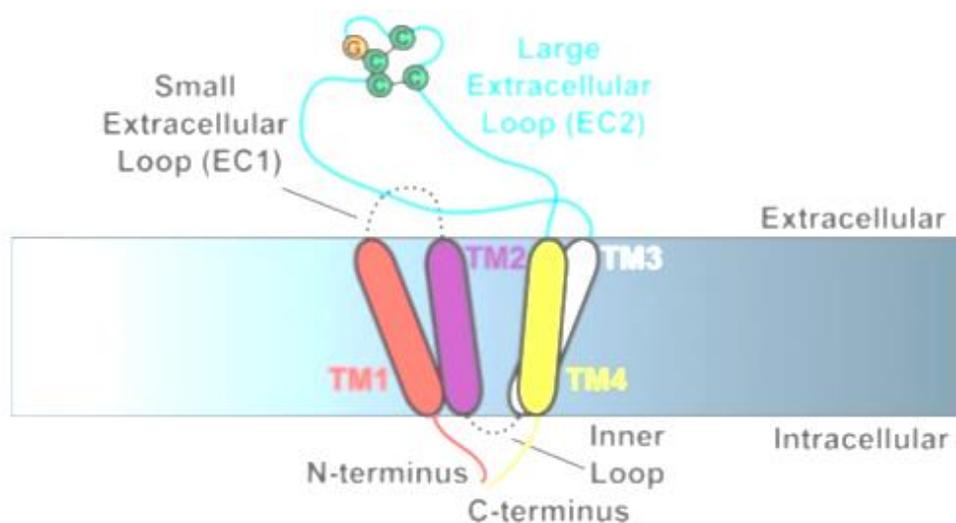


Figura 13 Esquema de la estructura molecular de la tetraspanina
Fuente: (Termini & Gillette, 2017)

Los exosomas derivados de células están altamente enriquecidos por tetraspaninas que corresponde a la familia más numerosa de proteínas. Los miembros de esta familia corresponden al grupo de diferenciación (CD, *cluster of differentiation*) CD9, CD63, CD81, CD82, y debido a su alta abundancia en los exosomas son usados como marcadores exosomales (Yoon et al., 2014).

2.3.1.3.Carga de lípidos

La composición lipídica que presentan los exosomas difiere de la composición de la membrana plasmática por su biogénesis (Marcilla et al., 2014).

Los exosomas están constituidos principalmente por ceramida, colesteol, PS y esfingolípidos, sin embargo, no cuentan con la presencia del ácido lisofosfatídico (Subra, Laulagnier, Perret, & Record, 2007). Esto podría deberse a que según Brouwers, y otros, (2013) el ácido lisofosfatídico podría desempeñar un papel exclusivo en la formación de MVB lisosomales y no de MVB generadores de exosomas. Además contienen en la membrana lipídica dominios denominados balsas lipídicas que son resistentes a detergentes que a más de estar constituida con los lípidos mencionados anteriormente cuentan con proteínas como flotilinas (Kalra et al., 2016).

En estudios realizados en las nanovesículas de tipo exosomas de uva se ha encontrado que su perfil proteico corresponde a un 98 % de fosfolípidos entre los cuales destaca un 50 % de ácido fosfatídico (PA), además de un 2% de lípidos vegetales como los galactolípidos (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Deng, et al., 2013), este perfil difiere al encontrado en las nanovesículas de tipo exosoma de toronja el mismo que se encontraba enriquecido en fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina (B. Wang et al., 2014).

2.3.1.4.Carga de RNA

Según Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Xiang, et al., (2013) se ha encontrado que los exosomas contienen miARN y ARNm. Los miARN son pequeños ARN reguladores no codificantes de 19 a 25 nucleótidos que se unen a secuencias complementarias en la región

3'UTR de los ARNm (Hu, Drescher, & Chen, 2012) desempeñando funciones en la regulación de genes postrascriptoriales de animales y plantas (X. Chen, 2012).

Los ARN exosomales son más estables que los ARN celulares ya que son más resistentes a la degradación durante el almacenamiento prolongado debido a que tras la biogénesis los exosomas presentan una membrana lipídica que protege al ARN de RNAsas endógenas (Hu et al., 2012).

En un estudio realizado en células a partir de exosomas de ratón se observó que el exosoma no presentaba ciertas proteínas, sin embargo estas se encontraban como ARNm, por lo que mencionan que el ARNm fue transferido a través de los exosomas logrando su traducción en las células receptoras (Colombo, Raposo, & Théry, 2014), este hallazgo ha llamado la atención de los exosomas como vectores de información genética puesto que tienen la capacidad de modificar los genes expresados en las células receptoras (Nolte' T Hoen et al., 2012).

Tras el estudio de perfil de expresión de los miRNA en los exosomas derivados de plantas, se evidenció ARN pequeños de 25 nt, con ausencia de ARN ribosómico 18S y 28S confirmando así la presencia de pequeños RNA en los exosomas de plantas. En total se identificó 418 miRNA, de los cuales 32 correspondieron a miRNA de exosomas de jengibre y 127 a exosomas de soja (Xiao et al., 2018).

La evidencia sobre que los miRNA derivados de plantas logran unirse a los miRNA de mamíferos e influir en sus procesos biológicos ha ido aumentando (Y. Zhang et al., 2012). Los miRNA derivados de plantas fueron sometidos a un análisis bioinformático para lograr entender si existía una relación con los genes diana, logrando evidenciar que estos miRNA se dirigen a genes que codifican factores inflamatorios (IL6, -IL2, -IL5, -IL1) y están enriquecidos en las vías de señalización relacionadas con el cáncer (Xiao et al., 2018).

2.3.2. Biogénesis de las nanovesículas

Para la formación de los exosomas están implicadas tres etapas importantes: en primer lugar se da la formación del endosoma temprano por la invaginación de la membrana plasmática, después la aparición del endosoma tardío por una acidificación del endosoma temprano, un brote a partir del endosoma tardío da lugar a los cuerpos multivesiculares (MVB) y por último se da la fusión de la membrana plasmática liberando su contenido al espacio extracelular como se observa en la Figura 14 (Suchorska & Lach, 2016).

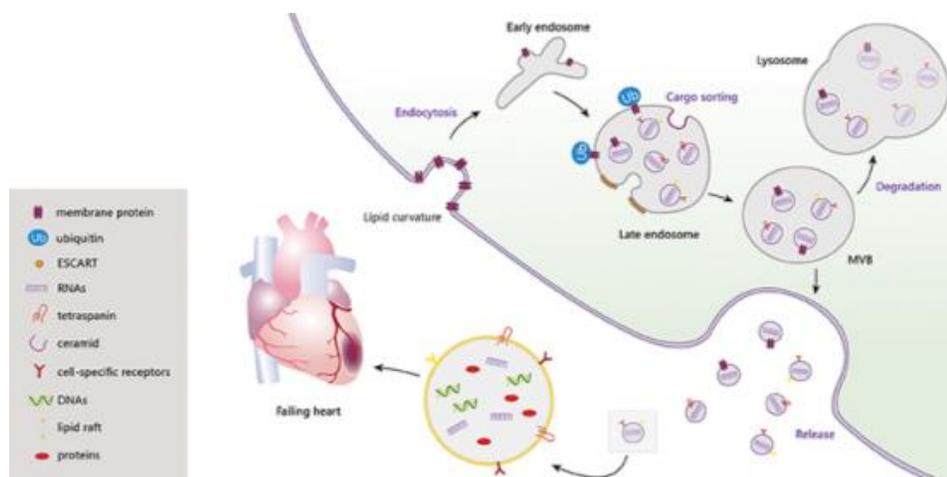


Figura 14 Biogénesis de los exosomas

Fuente: (Xu, Chen, & Yang, 2017)

En células vegetales la vía endocítica se da por la invaginación de proteínas a través de la membrana plasmática las mismas que son transportadas a la red *trans* Golgi (TGN) que funciona como endosoma temprano debido a que regula el tráfico de membranas hacia el reciclaje o la secreción. Un subdominio de esta membrana PVC / MVB es conocido como el endosoma tardío que posteriormente se fusiona con la vacuola, como se observa en la

2.3.2.1. Biogénesis mediante la vía dependiente de ESCRT en plantas

En plantas también se ha observado la presencia del complejo de Clasificación Exosomal Requerido para el Transporte (ESCRT) (Figura 16), sin embargo, se ha encontrado componentes únicos de ESCRT como son el Fyve Domain Protein Required For Endosomal Sorting 1 (FREE1) y Positive Regulator Of Skd1 (PROS) (Gao et al., 2014).

Según Winter & Hauser, (2006), en plantas no se ha evidenciado la presencia de subunidades canónicas de ESCRT-0 por ende tras el análisis del genoma de *Arabidopsis* se ha observado la presencia de nueve proteínas similares a TOM1 (TOL) con dominios VHS (VPS27, HRS, STAM) conservados, seguidos de los dominios GAT (GGA y TOM), capaces de unirse efectivamente a la ubiquitina y regular la internalización y clasificación vacuolar (Korbei et al., 2013). Además, se ha visto la presencia de tres subunidades del complejo ESCRT-I (VPS23, VPS28 y VPS37), pero sin la presencia de su cuarta subunidad MVB12, permitiendo la formación del complejo intacto ESCRT-0/ ESCRT-I, debido a que la subunidad VPS23 logra unirse a la ubiquitina y asociarse con VPS28 y VPS37 (Spitzer et al., 2006).

Con respecto al complejo ESCRT-II conserva las tres subunidades observadas en mamíferos (VPS22, VPS25 y VPS36), y en ciertos estudios realizados en *Arabidopsis* por H.-J. Wang et al., 2016 muestra que VPS36 tiene la capacidad de unión a la ubiquitina y regulación de la biogénesis.

El complejo ESCRT-III también es conservado en plantas, las proteínas CHMP1 (proteína 1 del cuerpo multivesicular) interactúa con el complejo VPS4/SKD1-LIP5 activando el complejo

mediante la contracción de la membrana y el corte de las yemas dando lugar a las vesículas intraluminales (IVL) y corte de las membranas (Spitzer et al., 2006).

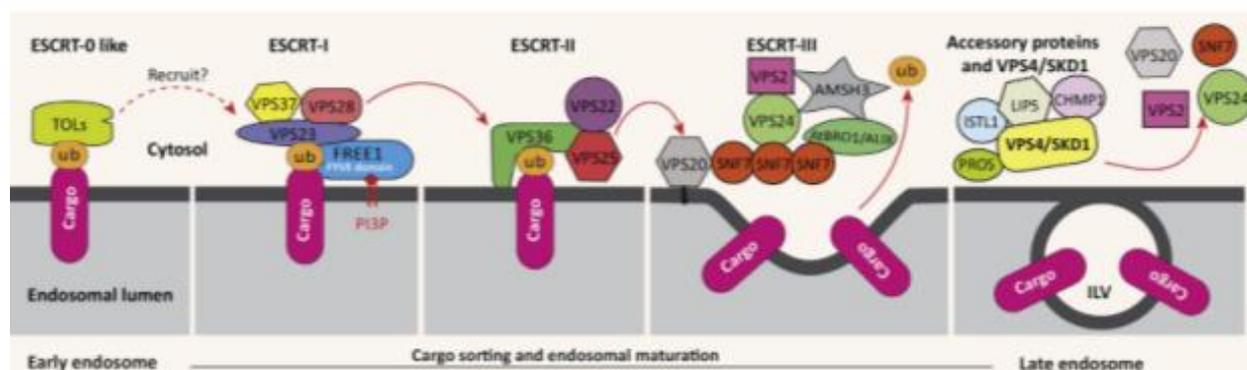


Figura 15 Modelo de ESCRT en plantas
Fuente: (Gao, Zhuang, Shen, & Jiang, 2017)

2.4. Técnicas de aislamiento de exosomas

Los exosomas se han logrado aislar de diferentes fluidos corporales como orina, saliva, plasma y el método de aislamiento óptimo depende de las aplicaciones posteriores, es decir, si es necesario exosomas de alta pureza o un gran volumen (Théry et al., 2006). Dentro de los métodos para el aislamiento de exosomas están la ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño y separación por inmunofinidad, entre otros (Figura 17) (Gardiner et al., 2017).

La ultracentrifugación es el método convencional para el aislamiento de exosomas, esta técnica se basa en la diferencia de tamaño entre células permitiendo la eliminación de lipoproteínas, complejos de proteínas extracelulares, agregados y otros componentes mediante altas centrifugaciones (Gurunathan, Kang, Jeyaraj, Qasim, & Kim, 2019). Sin embargo, estudios realizados por Van Deun et al., (2014) mencionan que las ultracentrifugaciones con gradiente de densidad proporcionan una población de nanovesículas más pura.

La cromatografía de exclusión permite una separación de los exosomas pero no de las microvesículas, macromoléculas o partículas. Esta técnica permite la elución secuencial de las fracciones de vesículas extracelulares de diferentes tamaños debido al material poroso de la columna, logrando primero el paso de partículas más pequeñas seguido de proteínas más grandes (Gurunathan et al., 2019).

Los métodos de inmunoafinidad permiten el aislamiento de los exosomas mediante las interacciones proteínas-anticuerpos e interacciones receptores-ligando, siendo útil para las proteínas expresadas en la superficie de los exosomas (Li, Kaslan, Lee, Yao, & Gao, 2017). Este método emplea perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina que se acopla a los anticuerpos como anti-CD63,-CD9,-CD81 resultando el aislamiento de exosomas específicos (Gurunathan et al., 2019).(Gurunathan et al., 2019)

La caracterización precisa de propiedades fisicoquímicas de los exosomas como tamaño, forma, carga superficial, densidad y porosidad han sido de gran interés ya que permiten el conocimiento de sus interacciones biológicas. Dentro de las técnicas que se utilizan esta microscopia electrónica, DLS, citometría de flujo (Figura 17) (Gurunathan et al., 2019).

La técnica utilizada ampliamente para la caracterización de estructura, morfología y tamaño es la microscopia electrónica específicamente TEM, su principio es la creación de imágenes a medida que un haz atraviesa la muestra generando electrones secundarios los mismos que son recolectados y magnificados usando lentes especiales (Mengdi Zhang et al., 2018) Las muestras antes de ser analizadas deben ser fijadas y deshidratadas logrando inducir posibles cambios en la morfología de las EV, por tal motivos se ha propuesto el uso de Cryo-TEM para mantener a las

células intactas sin cambios estructurales mediante el uso de nitrógeno líquido (Gurunathan et al., 2019).

La espectroscopia de correlación de fotones (DLS), es una técnica alternativa para medir el tamaño de los exosomas, su principio se basa en que un haz de láser coherente monocromático pasa a través de una suspensión de partículas generando fluctuaciones dependiente del tiempo en la intensidad de dispersión causada por la interferencia que resulta de los movimientos relativos de Brownian de las partículas en la muestra. Este equipo tiene la capacidad de medir partículas desde 1nm hasta 6nm (Gurunathan et al., 2019; Szatanek et al., 2017).

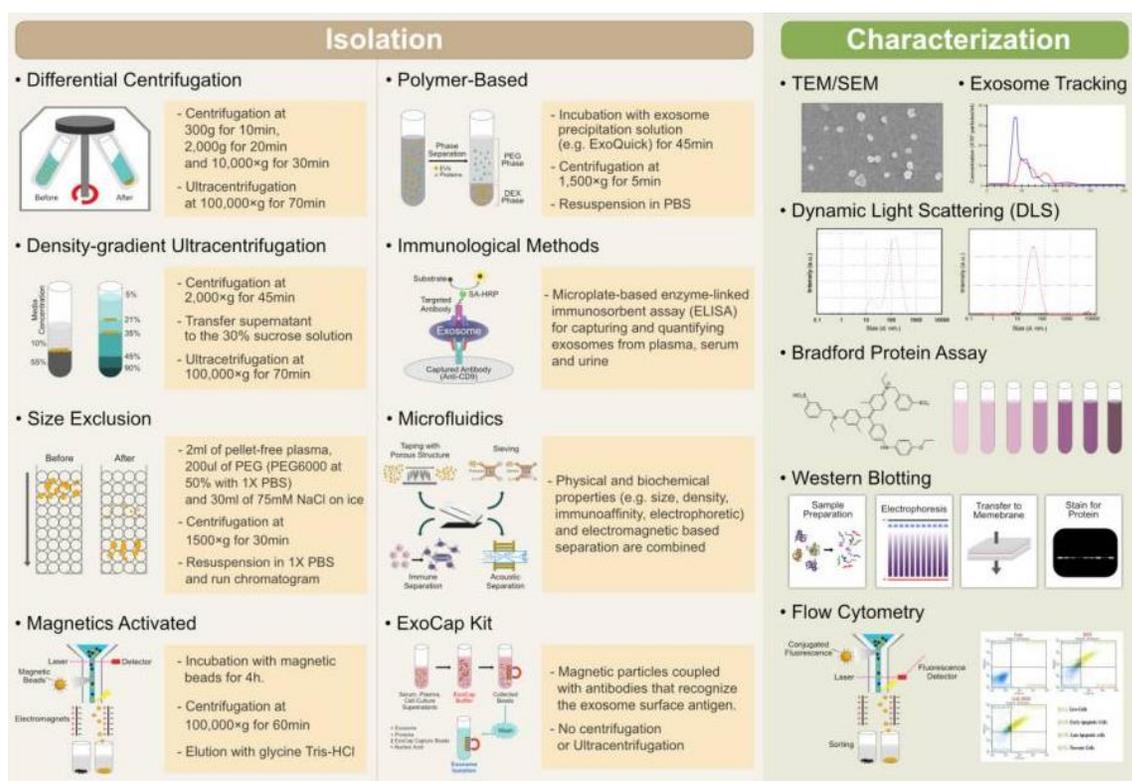


Figura 16 Técnicas utilizadas para el aislamiento, caracterización y análisis de las propiedades funcionales de los exosomas

Fuente : (Gurunathan et al., 2019; Szatanek et al., 2017).

2.5. Aplicaciones de los exosomas.

Los exosomas como mensajeros celulares poseen potenciales roles en el tratamiento clínico y la prevención de diferentes enfermedades (J. Wang et al., 2017). Los exosomas han sido evaluados como biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, como inmunomoduladores para suprimir o estimular la respuesta inmune, como vectores para la administración de fármacos y como agentes terapéuticos (De Toro, Herschlik, Waldner, & Mongini, 2015).

La presencia de los exosomas en los fluidos corporales permite que el análisis de estas vesículas constituya una estrategia no invasiva potencial para monitorear la respuesta a nuevos fármacos en modelos animales y una guía para caracterizar el estado de una infección, siendo los exosomas catalogados como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, en especial formas activas y latentes de infecciones intracelulares (De Toro et al., 2015; Twu & Johnson, 2014).

Desde el punto de vista terapéutico, varios estudios indican que los exosomas pueden entregar eficientemente proteínas y ácidos nucleicos a células blanco; por consiguiente ser utilizados como sistemas de administración de fármacos y genes (Charoenviriyakul et al., 2017; Maheshwari et al., 2017).

2.5.1. Aplicaciones de exosomas de plantas

Las aplicaciones de nanovesículas derivadas de plantas han incrementado debido a estar implicadas en la comunicación entre especies, por esta razón se ha postulado su papel contra enfermedades inflamatorias y cancerígenas (Mingzhen Zhang et al., 2016).

Se propuso tratar con nanovesículas derivadas de toronja enriquecidas con fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, ambos lípidos con propiedades antiinflamatorios, antioxidante y anticólltico, a ratones infectados con colitis para lo cual, el fármaco metotrexato fue encapsulado mostrando menos toxicidad en comparación con el fármaco libre y un aumento de los efectos terapéuticos contra la colitis (B. Wang et al., 2014).

Ensayos *in vivo* en ratones con colitis han demostrado que las nanovesículas de tipo exosoma de uva administradas de manera oral aumentan la proliferación de células madre intestinales, además de presentar resistencia a la degradación por la saliva, el ambiente ácido del estómago y las enzimas proteolíticas. Por lo tanto, podría catalogarse como un nuevo sistema de administración natural y no tóxica para tratar enfermedades del tracto intestinal (Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Deng, et al., 2013; Mingzhen Zhang et al., 2016).

Otra de las aplicaciones de las nanovesículas derivadas de plantas es su efecto en la progresión del cáncer, según Raimondo et al., (2015) las nanovesículas derivadas del jugo de *Citrus limon* inhiben la proliferación celular en diferentes líneas celulares cancerígenas mediante la vía de muerte celular apoptótica mediada por TRAIL, del mismo modo que en ensayos *in vivo*.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización geográfica

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología-Virología y el Laboratorio de Microscopia Electrónica, ambos pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ubicado en Sangolquí en la Av. El Progreso s/n, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador.

Adicionalmente, existió la colaboración por parte del Laboratorio de Biomedicina ubicado en la Escuela Superior Politécnica del Litoral - Campus Gustavo Galindo, provincia del Guayas – Ecuador, en el cual se realizó la ultracentrifugación de las nanovesículas del zumo de guanábana.

3.2. Aislamiento y purificación de nanovesículas de Guanábana (*Annona muricata*).

3.2.1. Preparación de la muestra de Guanábana (*Annona muricata*).

La preparación de la muestra de Guanábana se realizó en cámara de bioseguridad manejando las muestras con esterilidad. Se colocó en un tubo falcon de 50 mL, 25 mL de la pulpa de guanábana obtenida comercialmente con 25 mL de PBS 1X (Gibco) estéril en una dilución 1:1 con 1 % de azida de sodio. Posteriormente se procedió a mezclar bien para lograr una consistencia homogénea (Stanly, Fiume, Capasso, & Pocsfalvi, 2016.).

3.2.2. Aislamiento de nanovesículas mediante centrifugaciones seriadas.

Para el proceso de aislamiento se realizaron centrifugaciones seriadas (UNIVERSAL 320 R) a 400xg por 20 minutos a 4°C, para eliminar células y desechos de gran tamaño. Se recogió el sobrenadante y nuevamente fue centrifugado a 800xg por 20 minutos eliminando restos celulares. Este último sobrenadante se centrifugó a 7600xg por 40 minutos, el pellet se eliminó y el sobrenadante se almacenó a 4°C (Figura 18) (Stanly, Fiume, Capasso, & Pocsfalvi, 2016.).

3.2.3. Aislamiento de nanovesículas por ultracentrifugación

El sobrenadante obtenido del proceso anterior se transfirió a tubos de ultracentrífuga (Nalgene Centrifuge Ware) con 40 mL cada uno. Se centrifugó a 50 000xg a 4°C durante 30 min en la ultracentrífuga (WX Ultra 80, Thermo Fisher) para eliminar los restos celulares sobrantes. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se procedió a centrifugar a 100 000xg a 4°C durante 60 min en la ultracentrífuga (WX Ultra 80, Thermo Fisher). A partir de este paso el pellet es de gran importancia debido a que contienen las nanovesículas. Se descartó el sobrenadante y el pellet se disolvió en PBS 1X (Gibco) estéril, se centrifugó nuevamente a 100 000xg a 4°C durante 1 hora. Finalmente, se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS para su posterior purificación como se observa en la Figura 18. (Li et al., 2017; Théry, Amigorena, Raposo, & Clayton, 2006).

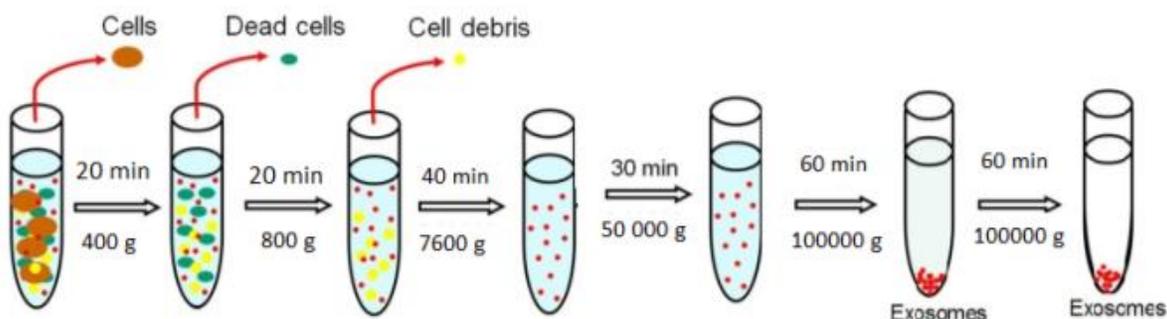


Figura 17 Proceso de aislamiento de nano-vesículas mediante centrifugaciones seriadas. Modificado

Fuente: (Théry et al., 2006)

3.2.4. Purificación de nanovesículas usando un gradiente de sucrosa-deuterio.

Se colocó 4 mL de una solución de Tris/sucrosa/agua con deuterio (marca Invitrogen, Sigma-Aldrich) en un tubo de ultracentrífuga formando un colchón. El pellet obtenido anteriormente se colocó sobre el colchón, y se centrifugó a 100 000xg por 60 min a 4°C con una desaceleración mínima del rotor para evitar que se mezcle esta solución. Se recolectó aproximadamente 3.5 mL de la parte superior de la solución amortiguadora de tris-sucrosa-deuterio que contenían las nanovesículas en un nuevo tubo de ultracentrífuga al cual se completó con PBS 1X estéril para ser centrifugado nuevamente a 100 000xg durante 1 hora a 4°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se diluyó el pellet en 500 μ L- 1000 μ L de los diferentes buffer según los procedimientos posteriores (Figura 19) (Théry et al., 2006)

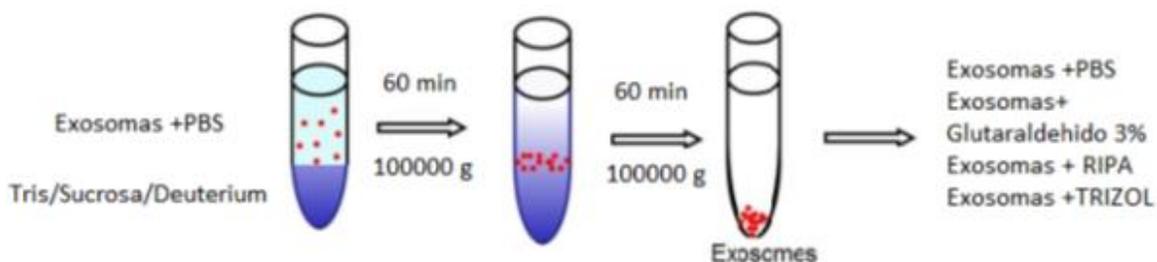


Figura 18 Purificación de nano-vesículas mediante colchón de sucrosa/tris/deuterio. Modificado.

Fuente: (Théry et al., 2006)

3.3. Aislamiento y purificación de nanovesículas a partir de células

Se realizó el cultivo de la línea celular U251 (cáncer de glioblastoma maligno), en medio EMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de penicilina-estreptomicina, y 1% de glutamina. Para obtener una mayor secreción de exosomas, las células se sometieron a condiciones de estrés (37 °C sin CO₂ por 3 días). Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 7600xg por 10 minutos para eliminar los restos celulares, finalmente se eliminó el pellet y el sobrenadante se almacenó a 4°C.

3.4. Caracterización de vesículas mediante Microscopia Electrónica

3.4.1. Caracterización de microvesículas mediante microscopía electrónica de Barrido Modo Transmisión (STEM)

Las muestras de microvesículas aisladas del zumo de guanábana tras las centrifugaciones seriadas (800xg) se fijaron con glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 3% en concentraciones 1:1.

3.4.2. Caracterización de nanovesículas mediante Microscopia Electrónica de Txransmision (TEM)

Las muestras de nanovesículas aisladas y purificadas del zumo de guanábana se fijaron con glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 3% en concentraciones 1:1. Posteriormente se colocaron 15 uL de la muestra sobre el mesh. Se dejó secar por un minuto y el exceso de la muestra fue retirado con un papel filtro, luego se lavó 10 veces con 10 uL de PBS 1X estéril y una posterior fijación con 10uL de acetato de uranilo (Sigma-Aldrich) al 2% tres veces, el exceso se absorbió con un

papel. Finalmente se dejó secar al aire libre antes de su observación por TEM (FEI, FP 5018/11 – Tecnai G2 spirit twin) cuya resolución fue de 0,2 nm

3.5. Caracterización de proteínas exosomales en nanovesículas mediante un análisis de western blot.

3.5.1. Obtención de extractos celulares.

Se preparó un lisado de células de HFF y U251, la cual expresa genes constitutivos de actina y GAPDH. Las células se propagaron en una incubadora humidificada a 37 °C y 5% CO₂. Las células U251 se mantuvieron en medio EMEM, suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de penicilina-estreptomicina la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos; el pellet obtenido se lavó con PBS 1X estéril y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µL de buffer RIPA (Santa Cruz Biotechnology,) Las muestra células fueron almacenadas en -20 °C para su posterior cuantificación.

3.5.2. Cuantificación de proteínas totales.

El ensayo de Bradford (Bradford, 1976) es una técnica de cuantificación basada en el cambio de absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 debido a la unión a los residuos de aminoácidos básicos (arginina) y aromáticos de la proteína (Botanical, Arboretum, Trust, & So-, 1985). La unión de la proteína al colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 estabiliza al colorante a su forma azul ($A_{max} = 595 \text{ nm}$) (Figura 20), por lo tanto, la cantidad de complejo presente en la solución es directamente proporcional a la concentración de proteína total (Ninfa, Ballou, & Benore, 2008).

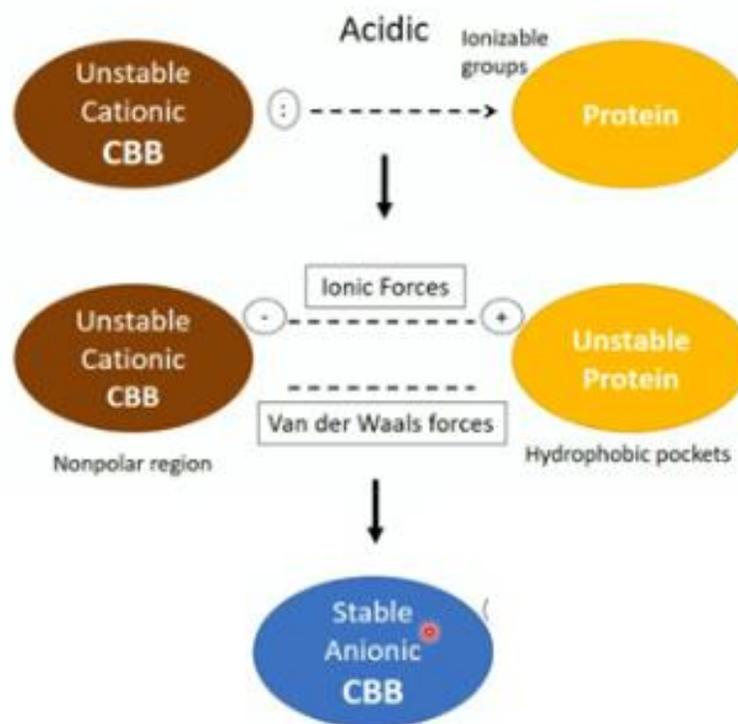


Figura 19 Principio del ensayo Bradford

Fuente: (Ninfa, Ballou, & Benore, 2008)

Las muestras de lisados de células HFF, U251, nanovesículas aisladas y purificadas del zumo de Guanábana (*Annona muricata*) y de las células de cáncer de glioblastoma maligno U251 fueron cuantificadas con el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich).

Se colocó en cada pocillo 5 μ L de cada muestra que consistieron en la gama de proteína estándar, el blanco y las preparaciones de nanovesículas (con un factor de dilución de 5). Seguido se añadió 250 μ L del reactivo de Bradford y se homogenizó por pipeteo. La placa fue incubada a temperatura ambiente con agitación lenta constante durante 30 minutos (Figura 21)..



Figura 20 Ensayo Bradford en placa de 96 pocillos

Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro de placas Multiskan GO (Thermo Scientific). Las lecturas fueron analizadas mediante el software SkanIt que permitió sustraer el blanco para determinar la absorbancia neta ($NET A_{595}$) (Ecuación 1), determinar la media de las absorbancias, generar la curva estándar $NET A_{595}$ vs concentración de proteína [*Bradford*] y determinar la concentración de proteínas de cada muestra en $\mu\text{g/mL}$ a partir de la ecuación de la curva estándar (Ecuación 2), considerando el factor de dilución (Ecuación 3).

$$NET A_{595} = A_{595_{muestra}} - A_{595_{blanco}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$NET A_{595} = a \times [Proteína] + b \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$[Proteína] = [Proteína]_{calculada} \times FD; \quad FD = \frac{V_{total}}{V_{muestra}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

3.5.3. Preparación de muestras para western blot.

Se tomó alícuotas de las muestras de nanovesículas aisladas de guanábana, nanovesículas de U251, y del lisado de células HFF, U251 (40 μg y 15 μg) respectivamente. El volumen de muestra de cada alícuota fue calculado considerando la concentración de proteínas de cada muestra determinado anteriormente según la ecuación 4.

$$V_{\text{muestra}} = \frac{\text{Cantidad proteína } (\mu\text{g})}{\text{Concentración } (\mu\text{g/mL})} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Las muestras de proteínas se prepararon en condiciones desnaturalizantes y reductoras, para lo cual se añadió el buffer de carga 2X (SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.07%, 2-mercaptoetanol 10%, Tris-HCl pH 6.8 125mM) hasta completar un volumen 25 μL por pocillo. La proteína total de las muestras fue desnaturalizada mediante una incubación de 10 minutos a 100 °C y enfriada a 4°C por 5 minutos.

3.5.4. Electroforesis vertical

Se elaboraron geles de poliacrilamida utilizando acrilamida/bisacrilamida líquida al 40% (Sigma-Aldrich). El gel de separación se preparó al 10% y un gel de concentración al 4% con una solución de Tris-HCl, ambos geles se polimerizaran con tetrametiletilendiamina (TEMED) (Invitrogen) al 0.1% para posteriormente ser ensamblados. Los geles fueron ensamblados utilizando el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) (Figura 22).



Figura 21 Preparación de geles de poliacrilamida en el soporte *gel casting* de Bio-Rad

Se añadió el buffer de electroforesis 1X (Tris base 25mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%). Se cargó 3 μ L del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein All Blue Standards, Broad Range* (10-250 kDa) (Bio-Rad) y las muestras de proteínas a analizar. La corrida electroforética se realizó a 120 V durante 120 minutos a 300 mA (Figura 23).



Figura 22 Electroforesis vertical mediante el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad

3.5.5. Verificación de presencia de proteínas en gel

El gel de separación se sumergió en una solución de tinción (azul de Coomassie R-250 0.5%, metanol 25%, ácido acético glacial 50%) y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. Posteriormente el exceso del colorante del gel fue removido

Para preservar los geles; se incubaron durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente en una solución de secado (metanol 30%, ácido acético glacial 6%, glicerol 3%), seguido el gel fue colocado entre papel celofán humedecido con agua sobre una superficie lisa y se dejó en reposo durante 24 horas.

3.5.6. Transferencia de proteínas a membrana en medio semi- seco

Se realizó la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PDVF) de 0.45 μ m mediante transferencia en medio semi-seco. La transferencia de proteínas en medio semi-seco se realizó utilizando el equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo para la transferencia. Se equilibró el gel de separación con el buffer de transferencia Towbin (Tris base 25mM, glicina 192 mM pH: 8.3, metanol 20%) durante 10 minutos.

La membrana se humedeció en metanol al 98 % durante 30 segundos para luego ser lavada con agua MiliQ durante 2 minutos. Posteriormente las seis piezas de papel Whatman de 0.8 mm y la membrana de PDVF fueron humedecidas en el buffer de transferencia. Se ensambló el sánduche de transferencia (Figura 24) y el sistema fue cerrado y colocado en el equipo programando la corrida con cuatro ciclos de 2.5 A y 25 V durante 7 minutos.

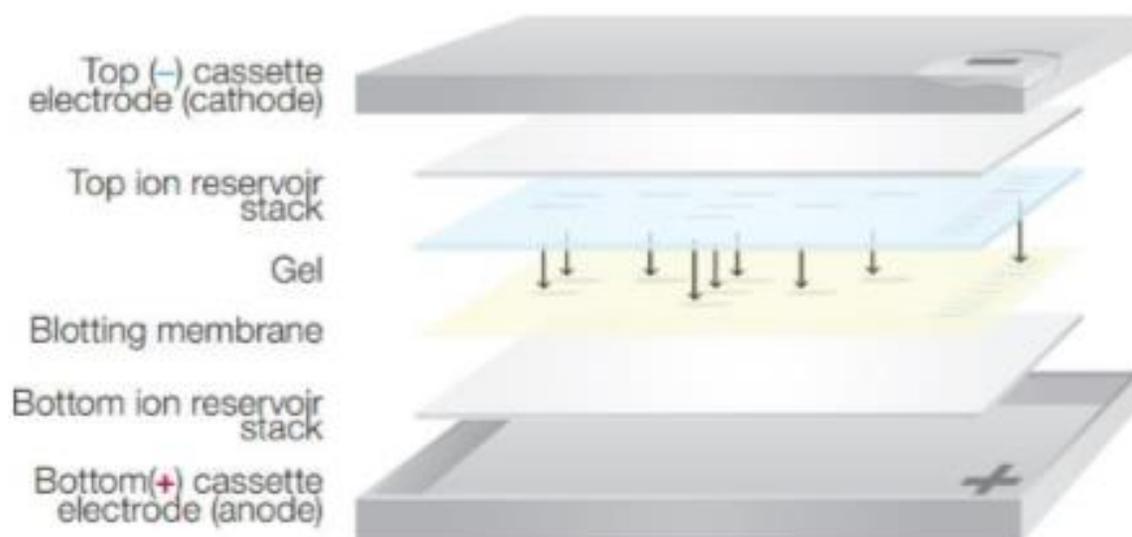


Figura 23 Sánduche de transferencia en Trans-Blot Turbo

3.5.7. Verificación de proteínas en membrana

Para verificar la transferencia de proteínas a la membrana se realizó una tinción con la solución de rojo Ponceau. Se documentó las proteínas totales de la membrana utilizando el sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad).

3.5.8. Inmunomarcaje de proteínas

La membrana de PVDF fue lavada con buffer tris salino (TBS, *tris-buffered saline*) 1X (tris base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) en agitación durante 10 minutos, se descartó la solución y se repitió el lavado.

El bloqueo se realizó incubando la membrana en solución de bloqueo, la cual fue preparada con BSA al 5% en buffer TTBS (buffer TBS + Tween 20 0.1%). La membrana se incubó a 4°C,

durante toda la noche, seguido de seis lavados de 10 minutos con buffer TTBS con agitación a 300 rpm,

Se realizó el marcaje con anticuerpo primario, el cual fue preparado diluyendo cada uno de los anticuerpos monoclonales en buffer TTBS. La membrana se incubó con la solución de anticuerpo primario durante dos horas a temperatura ambiente con agitación a 250 rpm, seguido de cinco lavados de 10 minutos con buffer TTBS y agitación de 300 rpm a temperatura ambiente.

Para la marcación con el anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) *Immun-Star Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP Conjugate* (Bio-Rad). El anticuerpo fue diluido 1:15 000 en buffer TTBS. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación constante de 250 rpm y protegido de la luz, seguido de seis lavados con buffer TTBS a 300 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos en cada lavado. La detección de la proteína de interés se realizó por quimioluminiscencia, utilizando el kit *Clarity ECL Western Substrate* (Bio-Rad), cuyos componentes incluyen una solución de peróxido y una solución de luminol. La solución del sustrato se preparó mezclando los componentes del kit en una proporción 1:1; el volumen preparado del sustrato fue 10 μL por cada cm^2 de membrana.

Sobre la membrana se añadió la solución del sustrato, considerando que el sustrato se encuentre en contacto con toda la membrana y verificando que no se formen burbujas. Finalmente el sustrato fue incubado durante 5 minutos para posteriormente realizarse la lectura de la membrana utilizando el escáner de membranas con el sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad).

3.5.9. Análisis de imágenes

3.5.9.1. Determinación del peso molecular de proteínas

Las imágenes de los geles y membranas obtenidas con el sistema de imagen ChemiDoc MP se analizaron en el programa del equipo Image Lab (versión 6.0). La herramienta permitió identificar los carriles y las bandas de forma automática o manual en caso de que el programa no detectara todos los carriles o bandas.

3.6. Determinación de la actividad proliferativa

3.6.1. Cultivo de celular

Se trabajó con tres líneas celulares, dos líneas celulares cancerígenas correspondientes a cáncer de pulmón A549 y cáncer de glioblastoma maligno U251 y como control la línea celular HFF. Las células se mantuvieron en medio DMEM y F12 con 10 % de suero bovino fetal y 1 % de penicilina-estreptomicina.

3.6.2. Ensayo MTT

El análisis de viabilidad celular se realizó utilizando el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-*H*-tetrazolio). Las células se colocaron en una placa P96 a una densidad de 3×10^3 cell/pocillo tratadas a diferentes concentraciones de nanovesículas del zumo de guanábana a 24 horas.. La citotoxicidad contra el cáncer y las células normales será medida a partir de la absorbancia de 560 nm utilizando el espectrofotómetro de placas Multiskan GO (Thermo Scientific). Los datos fueron procesados y el potencial proliferativo de las diferentes

concentraciones de nanovesículas del zumo de guanábana se expresó como % de viabilidad celular.

3.6.3. Ensayo de Apoptosis

Para determinar si la muerte celular es inducida por apoptosis, las células tras la exposición se lavó dos veces con 100 uL de PBS estéril y se procedió a observar en un microscopio de fluorescencia con el filtro BW a una longitud de onda de 460-495 nm.

3.6.4. Toma de Imágenes

Se utilizó el microscopio invertido Micros Austria Sundew MCXI600 siguiendo los siguientes parámetros: Exposición (600 ms). Continuos Auto Exposure, Gain:

Se utilizó el microscopio de fluorescencia Olympus ix53 siguiendo los siguiente parámetros: Exposición (37 ms), Sensibilidad: ISO 400, Resolución: 1600x1200, Calidad: Alta

3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos tras el ensayo de MTT se presentaron como medias \pm SD. El análisis estadístico con un análisis ANOVA de dos vías utilizando el paquete de software estadístico Prism (GraphPad Software, EE. UU.). Las diferencias se consideraron significativas a * $p < 0.05$.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Caracterización de vesículas mediante microscopía electrónica

4.1.1. Caracterización de microvesículas mediante microscopía electrónica de Barrido Modo Transmisión (STEM)

A partir de las centrifugaciones seriadas se logró el aislamiento de microvesículas de *A. muricata*. El análisis en el microscopio electrónico de barrido modo transmisión reveló una población de microvesículas aglomeradas con presencia de una bicapa lipídica íntegra como se observa en la Figura 25.

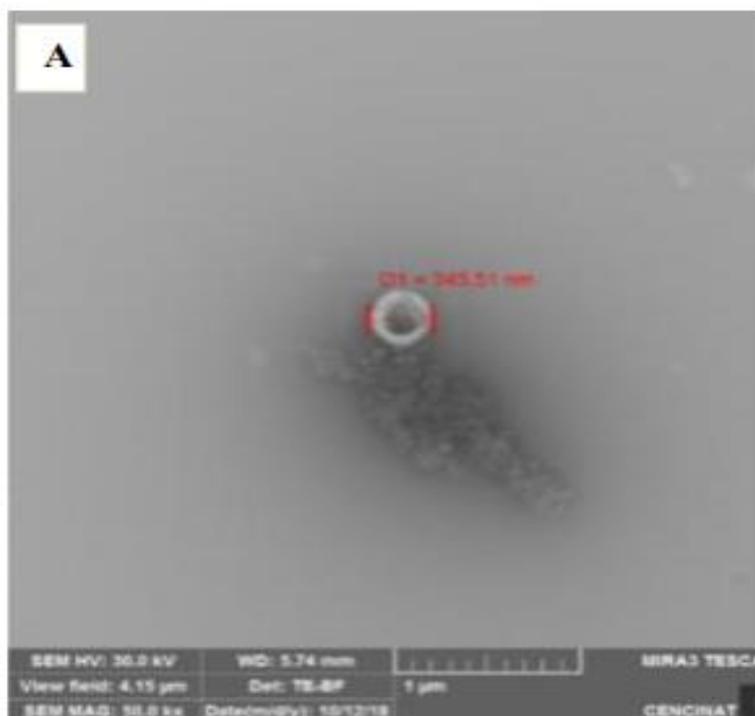


Figura 24 Microvesículas de *A. muricata* cuyos tamaños corresponden de 100 nm a 450 nm que han sido aisladas y observadas por STEM.

A) Muestra de microvesículas diluida

Tras la visualización de las microvesículas en el microscopio electrónico de barrido modo transmisión se observó una población heterogénea, que mediante el análisis estadístico nos reveló una población en un rango de 100 nm a 450 nm y una media de 240 nm.

4.1.2. Observación de nanovesículas mediante Microscopia Electrónica de Transmision (TEM)

Las nanovesículas de *A. muricata* se lograron aislar mediante una serie de pasos de centrifugaciones, ultra centrifugaciones y purificación de gradiente de sucrosa-deuterio. Las partículas fueron identificadas como nanovesículas de tipo exosomal basadas en el análisis de microscopia electrónica el cual reveló población de vesículas nanométricas en un rango de 40 nm a 60 nm, mismas que mantuvieron la integridad de su capa lipídica y una morfología esférica alargada a manera de un balón desinflado como se observa en la Figura 26.

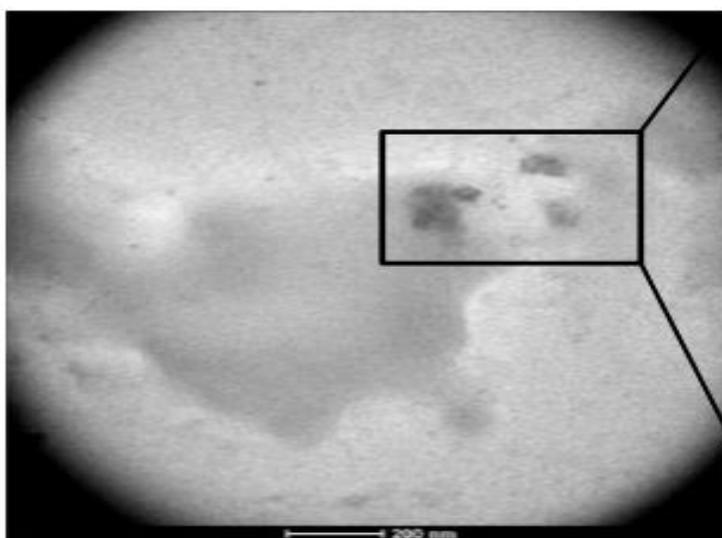


Figura 25 Nanovesículas aisladas y purificadas de *A. muricata* Nanovesículas cuyos tamaños oscilan entre 40- 60 nm observados por TEM con una resolución de 0,2um.

4.2. Caracterización de proteínas exosomales en nanovesículas

4.2.1. Perfil proteico de extractos de células y nanovesículas aislados del zumo de guanábana.

La composición proteica estructural de los extractos de células HFF, U251, microvesículas y nanovesículas de guanábana se analizó mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes y reductoras seguido de tinción de azul de Coomassie

Los resultados de SDS-PAGE mostraron que las proteínas estructurales de los dos tipos de células y los exosomas aislados de las células U251 muestran perfiles similares. Sin embargo, para las microvesículas y nanovesículas aisladas de Guanábana se observó una única banda de 76 KDa.

El perfil proteico de los extractos de células HFF, U251, microvesículas y nanovesículas aislados de guanábana observado en membrana de PVDF teñida con rojo Ponceau después de la transferencia de proteínas presentó el mismo patrón comparado con las proteínas observadas en gel de poliacrilamida (Figura 27).

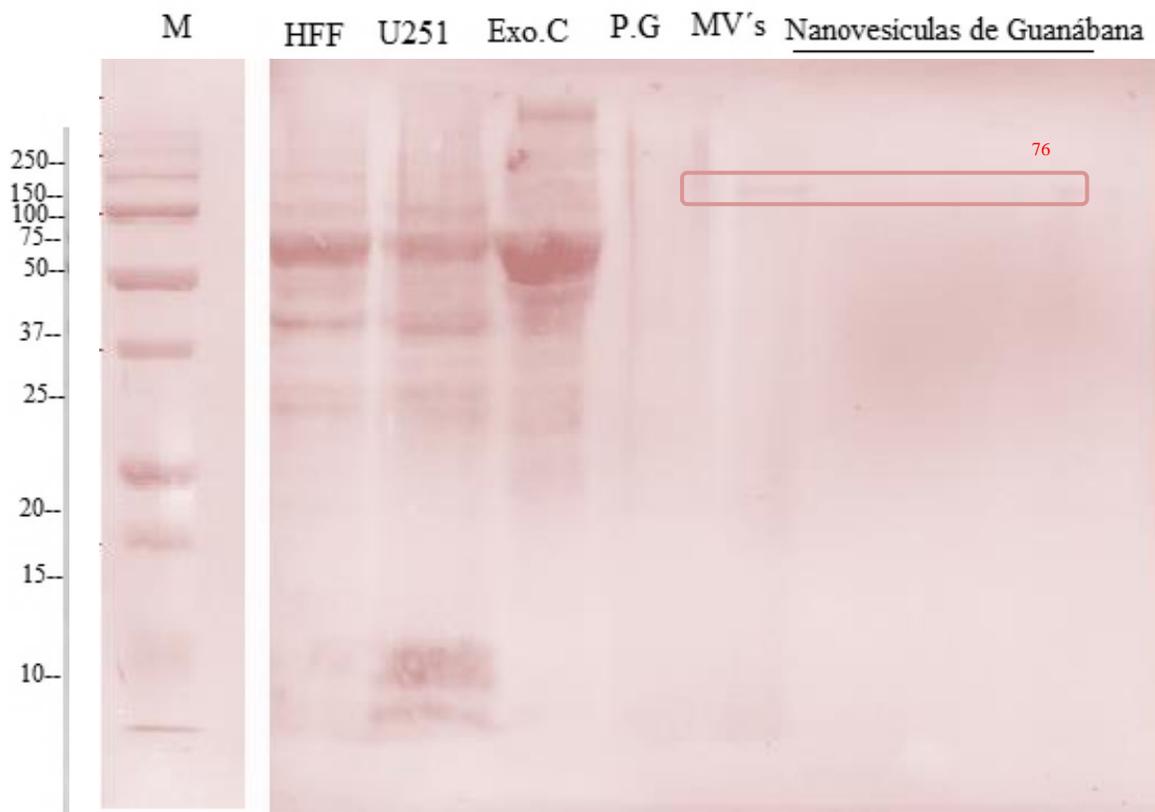


Figura 26 Perfil proteico de extractos de células y aislados de nanovesículas de guanábana en membrana de PVDF. M: *Precision Plus Protein WesternC Standards*, HFF: Extracto de células HFF, U251: Extracto de células U251, Exo C: Exosomas aislados de células U451, PG: Pellet de Guanabána, MV's: Microvesículas aisladas de guanábana, Nanovesículas aisladas de guanábana.

4.2.2. Detección de proteínas exosomales

Las muestras de células y nanovesículas aisladas del zumo de guanábana fueron analizadas mediante la inmunodetección de sus proteínas exosomales: TSPN12, ALIX así como de la proteína constitutiva GAPDH (Figura 28).

Se observó que la proteína constitutiva GAPDH fue detectada en las preparaciones de células HFF y U251 además del control de exosomas aislado de células presentando un peso estimado de 36,3 kDa; 36,7 kDa; 36,8 kDa respectivamente (Figura 28A).

Adicionalmente se probó para las muestras de células y nanovesículas aislados de guanábana la inmunodetección de la TSPAN12. Se observó que al igual que la proteína GAPDH, la TSPAN12 presentó detección contra las células HFF, U251 y exosomas aislados de células con un peso aproximado de 30.3 kDa , 30.3 kDa, 33.6 kDa respectivamente (Figura 28B).

Finalmente se detectó la proteína ALIX en las preparaciones, mostrando un patrón de tres bandas de tamaños promedios de 76 kDa, 48 kDa, 32 kDa que pueden constituir una variante de la proteína dado un *splicing* alternativo, siendo estas proteínas encargadas de la biogénesis de las nanovesículas aisladas del zumo de guanábana.

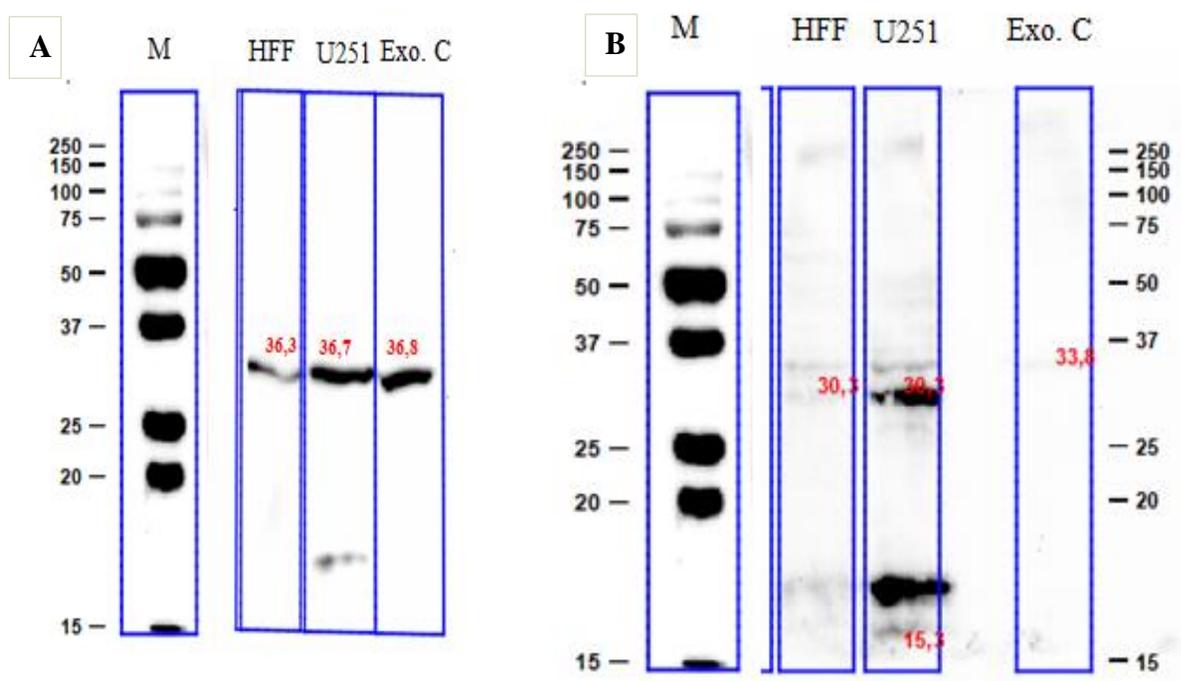


Figura 27 Western blot para detección de A) Inmunomarcaje para detección de GAPDH, (B) Inmunodetección de TSPAN12 en nanovesículas aisladas de guanábana revelado con el sistema de imagen *ChemiDoc*. M: Marcador *Precision Plus Protein WesternC Standards*; Celulas y Exo células: 15 μ g, ExoLM: 5 μ g; células: 10 μ g

4.3. Determinación de la actividad proliferativa en líneas celulares

4.3.1. Ensayo de MTT en líneas celulares

Para el ensayo de MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2- H -tetrazolio) se trabajó con tres líneas celulares, dos líneas celulares cancerígenas correspondientes a cáncer de pulmón A549 y cáncer de glioblastoma maligno U251 y una línea celular control fibroblastos HFF. Las cuatro líneas celulares se examinaron para determinar la viabilidad celular inducida por las nanovesículas y microvesículas aisladas del zumo de guanábana *A. muricata* (Figura 28-30).

La exposición a las vesículas aisladas del zumo de *A. muricata* a las 24 horas de tratamiento mostró que la viabilidad celular para la línea control HFF aumentó significativamente a 107%, 105% y 153 % para nanovesículas y a 107 %, 118 %, 184% para microvesículas a concentraciones de 2,5 ug/mL, 5 ug/mL, 10 ug/mL respectivamente.

Por otro lado para la línea celular cancerígena U251 se observó una disminución del 76%, 55%, 74% para nanovesículas y a 51 %, 50 %, 61% para microvesículas a concentraciones de 2,5 ug/mL, 5 ug/mL, 10 ug/mL respectivamente. Sin embargo, la disminución de la viabilidad celular para la línea celular A549 fue del 97%, 95%, 93% a la concentración de 2,5 ug/mL, 5 ug/mL, 10 ug/mL de nanovesículas.

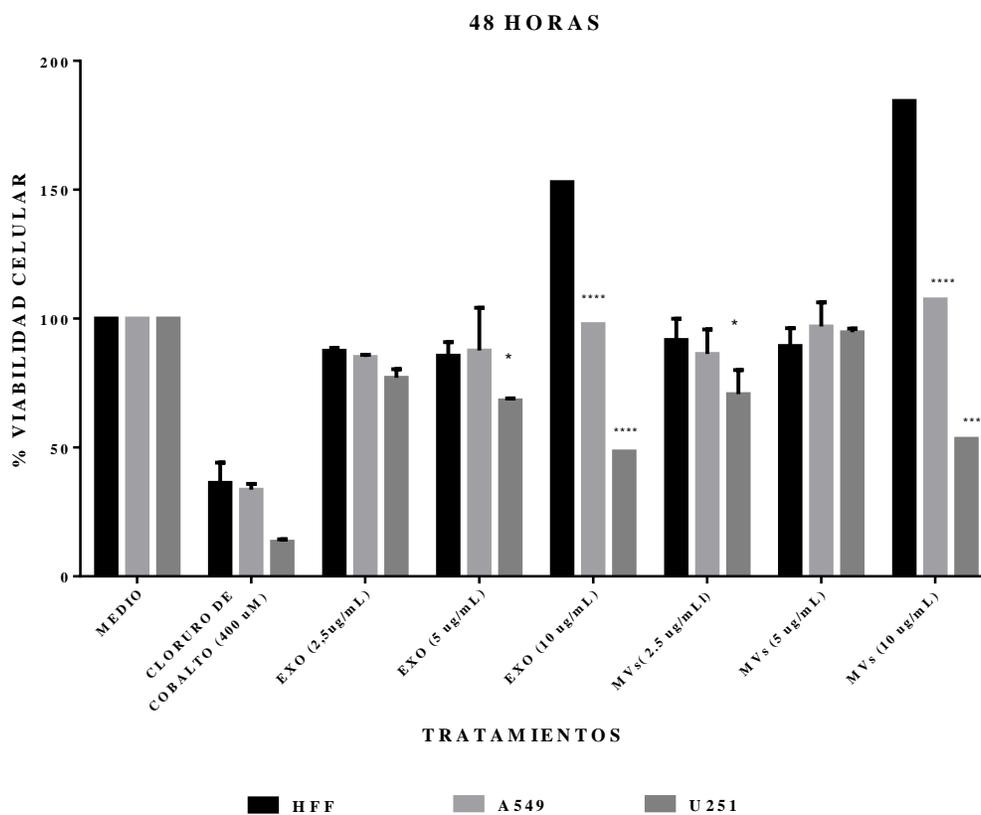


Figura 28 Ensayo de viabilidad celular MTT a las 48 horas tras la exposición a las nanovesículas y microvesículas aisladas del zumo de *A. muricata* para las diferentes líneas celulares

A las 48 horas tras el tratamiento no existió una diferencia significativa entre líneas celulares a las concentraciones de 2,5 y 5 ug/mL de nanovesículas y microvesículas aisladas de guanábana, sin embargo, para la concentración de 10 ug/mL de nanovesículas mostró una inhibición del 98%, 49% para las líneas celulares A549 y U251 respectivamente, de igual modo a la concentración de 10 ug/mL de microvesículas mostraron inhibición del 54% para la línea celular U251 (Figura 30).

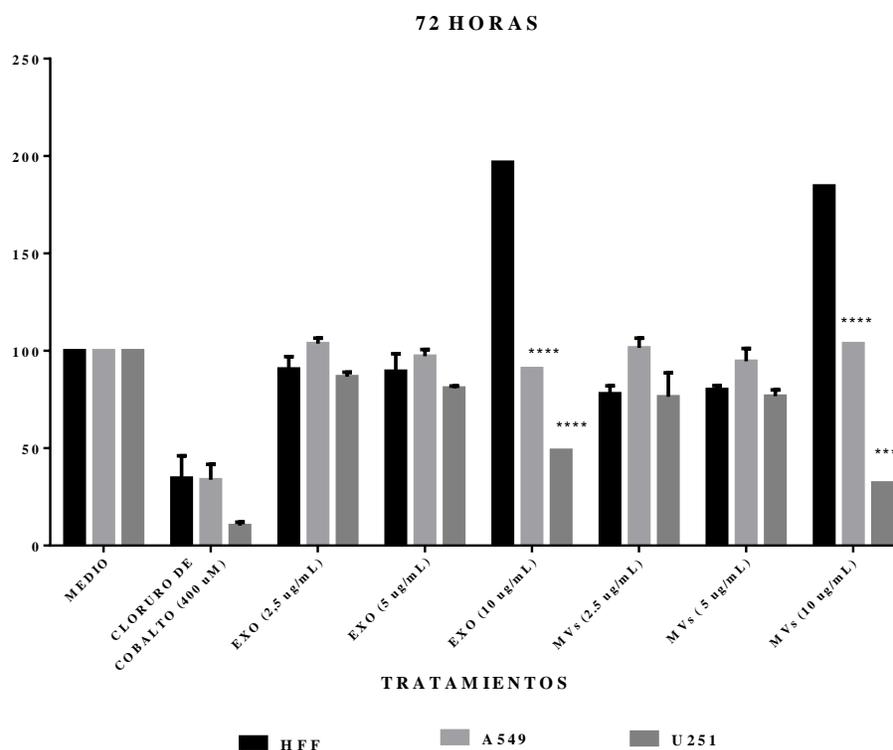


Figura 29 Ensayo de viabilidad celular MTT a las 72 horas tras la exposición a las nanovesículas y microvesículas aisladas del zumo de *A. muricata* para las diferentes líneas celulares

Las 72 horas después del tratamiento se observó que la línea celular HFF a una mayor concentración aumenta su viabilidad celular, sin embargo, las dos líneas restantes muestran una tendencia que disminuye dependiente de la concentración mostrando que la línea celular U251 presenta una disminución significativa del 86%, 80%, 49% para nanovesículas y del 76%, 76% y 32% para microvesículas a una concentración de 2,5 ug/mL, 5 ug/mL, 10 ug/mL respectivamente. Sin embargo, se observó que para la línea celular A549 existió una inhibición significativa solo con la mayor concentración de nanovesículas.

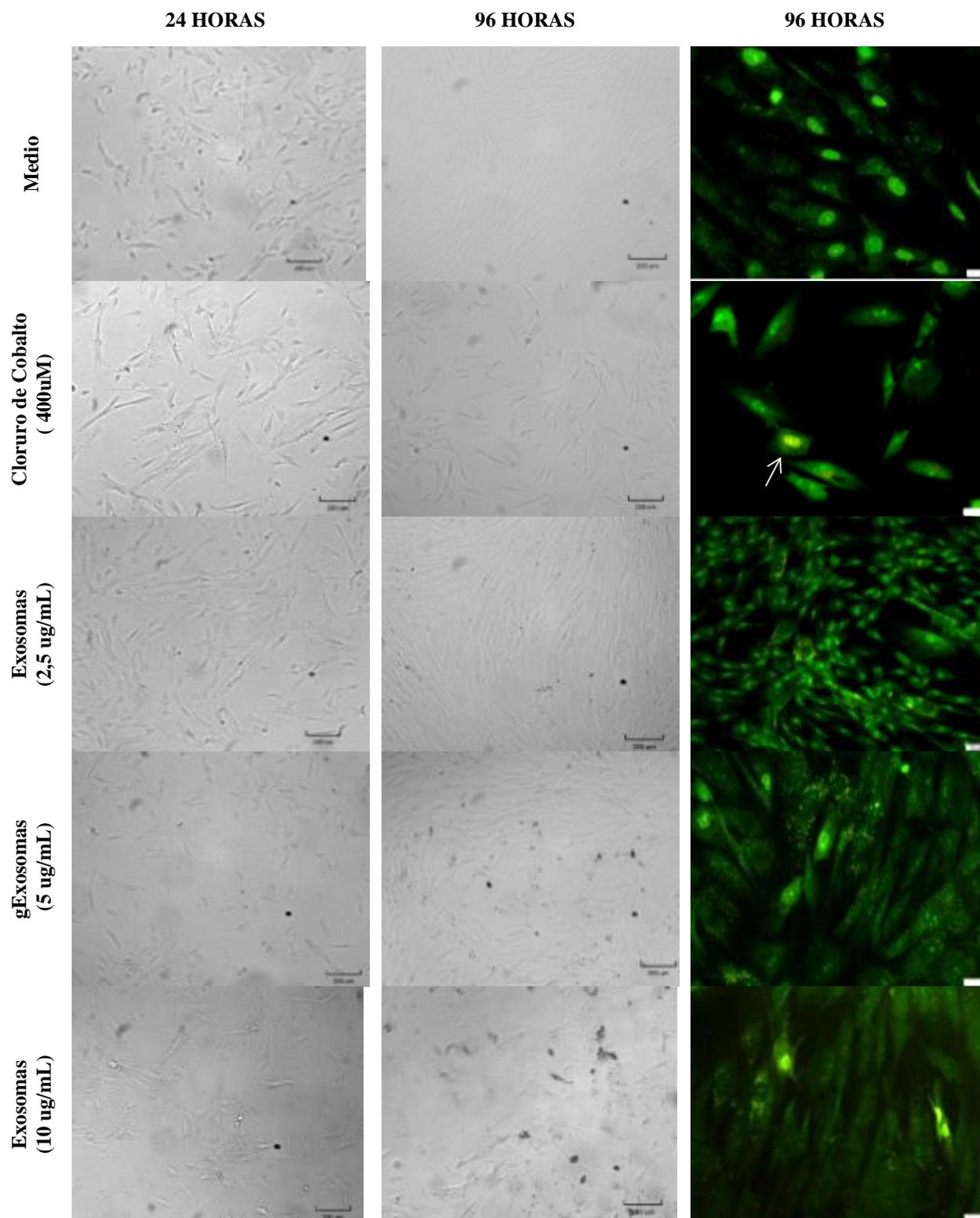
La viabilidad celular tras las 96 horas de exposición mantienen la misma tendencia observada tras las 24, 48, y 72 horas. Se observó una reducción en las dos líneas cancerígenas A549 y U251; dependiente de la dosis. Para la línea de cáncer de pulmón A549 mostró una disminución del 90% a una concentración de 10 ug/ml, mientras que la línea celular U251 del 48 %.

Estos resultados revelan que las células de fibroblastos HFF tras la exposición a nanovesículas y microvesículas aisladas del zumo de guanábana aumentan su viabilidad celular significativamente, sin embargo, las líneas celulares cancerígenas mostraron una disminución de la viabilidad celular a medida que la dosis aumentaba, observándose una diferencia significativa (**** $p < 0.001$), en la línea celular de glioblastoma maligno U251.

4.3.2. Ensayo de morfología y apoptosis en líneas celulares

La observación directa de las líneas celulares HFF, A549, U251 bajo un microscopio invertido reveló cambios en la proliferación celular después del tratamiento con las nanovesículas y microvesículas aisladas del zumo de guanábana a las 24 horas y 96 horas.

Las células HFF tras la exposición a las 96 horas mostró un aumento de viabilidad celular dependiente de la dosis para las diferentes concentraciones de nanovesículas y microvesículas mostrando la formación de una alta confluencia de células en monocapa (Figura 36), sin embargo, para las células A549, U251 mostraron células redondas, encogidas y con poco contacto con las células vecinas, y una reducción del volumen celular dependiente de la dosis (Figura 31).



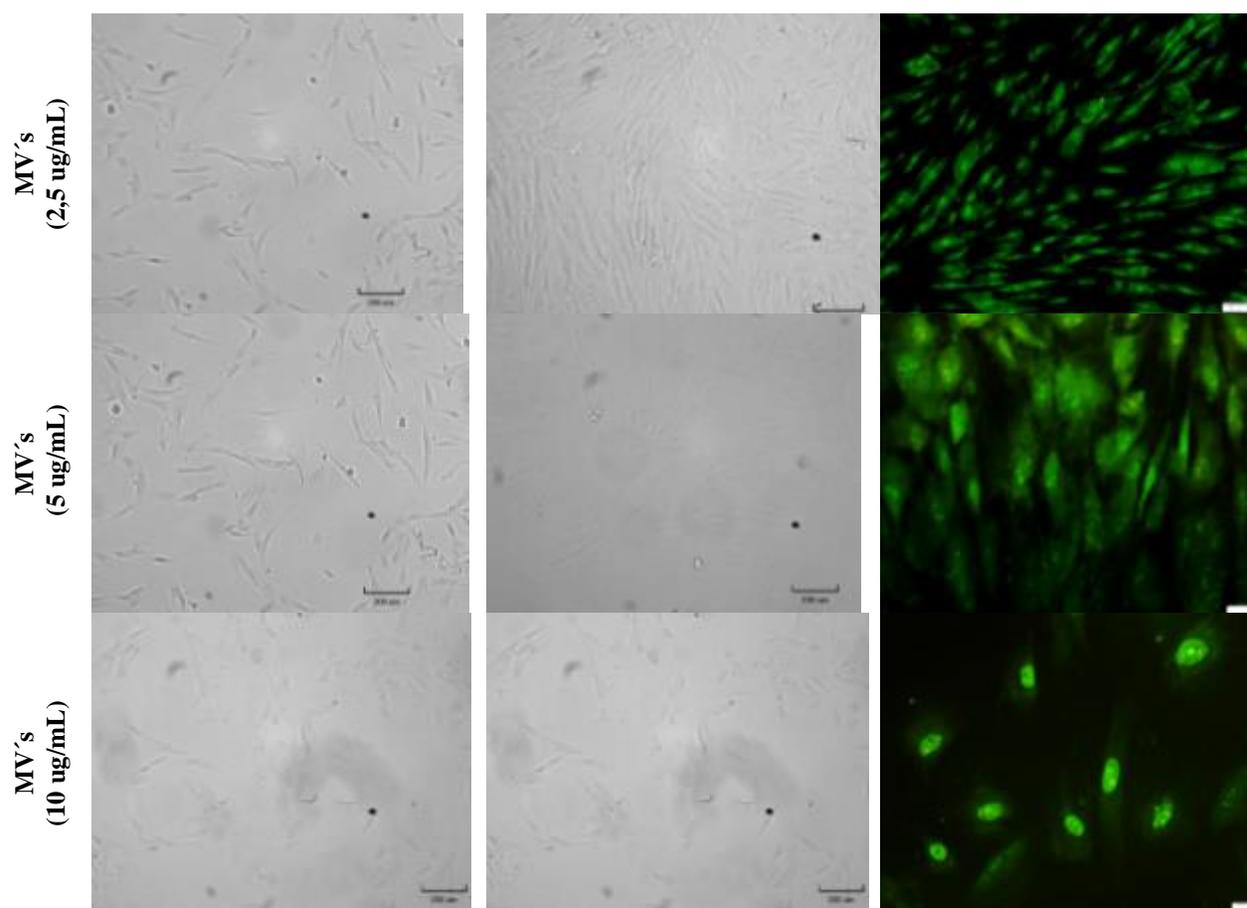


Figura 30 Ensayo de apoptosis en células HFF tras el tratamiento con las nanovesículas y microvesículas de guanábana.

Micrografías a campo claro de la línea celular HFF a las 24 horas, 96 horas post exposición.

Magnificación 100X. Micrografías en microscopio de fluorescencia a las 96 horas

Magnificación 200X. Flechas blancas representan a células apoptóticas tardías y flechas anaranjadas a células apoptóticas tempranas.

Para probar si la disminución de la muerte celular observada tras la exposición a los tratamientos es inducido por apoptosis, las células fueron teñidas con bromuro de etidio/ naranja de acridina (EB/AO) después de las exposiciones a las 96 horas. Como se muestra en las Figuras 36-38. La tinción EB/AO mostró un aumento de tinción de apoptosis para las líneas A549, U251 dependiente de la concentración de nanovesículas aisladas del zumo de guanábana en relación con el control negativo correspondientes a células sin exposición.

Las células con una tinción de color verde corresponden a células viables mientras que las células con el núcleo verde fragmentado representan a células en apoptosis inicial y las vesículas de color amarillo/verde de los núcleos condensados se definen como células apoptóticas tardías; observándose en su mayoría células apoptóticas tardías para la mayor concentración de nanovesículas y microvesículas.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las vesículas extracelulares producidas por células de mamíferos han sido aisladas exitosamente de varios fluidos corporales como sangre, semen, saliva, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, leche materna (Théry et al., 2006). El éxito del aislamiento depende del método utilizado, según Konoshenko, Lekchnov, Vlassov, & Laktionov, (2018) la ultracentrifugación con gradiente de densidad es considerada como el método óptimo debido a la pureza de los aislados.

En plantas el rol de las nanovesículas era incierto y para entender que aporte presentaban estas nanovesículas a las plantas era necesario su aislamiento y purificación por lo que estudios realizados por Regente et al., (2009) y años después por Rutter & Innes, (2017) proporcionan un protocolo de aislamiento de nanovesículas basada en el método de ultracentrifugación con gradiente de densidad en fluidos apoplásticos de *Arabidopsis* logrando visualizar estructuras en forma de copa y ahuecado a partir de 100 nm de diámetro, estos hallazgos concuerdan con los de este estudio el cual a partir de las centrifugaciones seriadas se logró el aislamiento de microvesículas de *A. muricata* visualizadas en el microscopio electrónico de barrido modo transmisión revelando una población de microvesículas con presencia de una bicapa lipídica (Figura 25) en un rango de 100 nm a 450 nm y una media de 240 nm.

Además, Ju, Mu, Dokland, Zhuang, Wang, Jiang, Xiang, et al., (2013) logró aislar nanovesículas tipo exosomal por primera vez en uva mostrando partículas nanométricas con un diámetro promedio de 380 nm, de igual manera Q. Wang, Zhuang, Mu, Deng, Jiang, Xiang, et al., (2013) logró aislar nanovesículas de pomelo con un diámetro de 50 a 300 nm, esto es congruente con los resultados obtenidos tras el aislamiento por ultracentrifugación y purificación

mostrando vesículas ahuecadas similares a los estudios anteriores en un rango de 40 a 60 nm (Figura 26).

Según Lötvald et al., (2014), el análisis de western blot constituye uno de los enfoques analíticos más confiables para identificar proteínas de interés en una mezcla compleja. Dentro de los parámetros para la realización de la técnica, por lo general se implementan anticuerpos con detección a proteínas constitutivas como GAPDH (Aldridge, Podrebarac, Greenough, & Weiler, 2008; Johnson, 2012). En este estudio se visualizó la detección de esta proteína constitutiva en células y exosomas aislados de células U251 correspondiente una enzima metabólica involucrada en la glucólisis, sin embargo, no se obtuvo una expresión en la detección en nanovesículas de guanábana (Figura 27)

Según Richardson et al., (2011), la mayoría de las proteínas ESCRT observadas en animales y levaduras son conservadas en plantas, como son los complejos ESCRT-I; ESCRT-II. ESCRT-III, sin embargo, se ha visto la presencia de proteínas exclusivas en plantas como es el caso de FREE1 y TOM1 con funciones similares a las presentadas por el complejo ESCRT-0. Estudios realizados por Cardona-López et al., (2015) y Kalinowska et al., (2015) hallaron la presencia de un homólogo de la proteína X que interactúa con el gen-2 ligado a la apoptosis en mamíferos y la levadura BRO1p denominado AtBRO1 que interviene en la biogénesis de exosomas mediante la interacción con algunas de las proteínas pertenecientes de la maquinaria ESCRT-III y el reclutamiento de las deubiquitinasa para eliminar la ubiquitina antes del secuestro de MVB. De acuerdo con esta información, la biogénesis de exosomas en plantas también es producida mediante la vía dependiente de la maquinaria complejo de Clasificación Exosomal Requerido para el Transporte (ESCRT) mostrando concordancia con los datos obtenidos en este estudio tras

darse la detección de la proteína ALIX para nanovesículas de guanábana (Richardson et al., 2011).

La presencia de tres bandas en la detección de la proteína ALIX según Trudel, & Weis-Garcia, (2005) puede deberse a la pérdida de la estructura del epítotope de la muestra por daños sufridos en la desnaturalización o la electroforesis presentando bandas adicionales.

Según Bicer & Reiser, (2013), la aparición de múltiples bandas tras la detección no necesariamente significa que el anticuerpo reconozca bandas no específicas, por el contrario, puede deberse a que algunas proteínas pueden sufrir alguna modificación después de la traducción o *splicing* alternativo dando lugar a reconocimientos de bandas a diferentes masas moleculares que contienen el mismo epítotope de reconocimiento al anticuerpo.

. La presencia de ruido de fondo mostrada tras la detección de la proteína ALIX según Mahmood & Yang, (2012), se debe a que la membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) tiene la capacidad de unir mayores cantidades de proteínas aproximadamente 150 ug/cm² con respecto a las membranas de nitrocelulosa, sin embargo, esta capacidad aumenta las interacciones membrana-anticuerpo.

Actualmente han surgido estrategias alternativas para la prevención y terapia del cáncer enfocándose en la implementación de compuestos naturales (Ouyang et al., 2014). En literatura se menciona que la *A. muricata* debido a su composición fitoquímica constituida por acetogeninas, alcaloides, compuestos fenólicos ha presentado actividad antiproliferativa contra diversos cáncer como mama, pulmón, hígado, páncreas y cerebro (Pieme et al., 2014).

Los compuestos denominados acetogeninas han demostrado ampliamente su actividad anticancerígena mediante mecanismos que suprimen la fosforilación de moléculas en la ruta quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) y la ruta del fosfatidilinositol 3 ' quinasa (PI3 K / Akt) cruciales en el desempeño de la proliferación y supervivencia de células de cáncer de páncreas (Torres et al., 2012). Además de la inhibición del complejo mitocondrial I, inhibición de la NADH oxidasa de las células cancerígenas causantes de apoptosis (Lannuzel, P.P. Michel,

Caparros-Lefebvre, Abaul, & Hocquemiller Ruberg, 2002), por ende según Cassé, 2018, una de las estrategias terapéuticas contra el cáncer es la inhibición del metabolismo de la glucosa, debido a que en las células cancerígenas la glucólisis es priorizada sobre la respiración siendo más selectivo contra células cancerígenas.

Nuestros estudios se correlacionan y demuestran que en mayor concentración de nanovesículas y microvesículas inhiben la proliferación en células cancerígenas, mostrando una mayor significancia ($p < 0.001$) para las células de cáncer de glioblastoma U251 correspondiente a una inhibición del 48 % , las mismas que a las 96 horas mostraron cambios morfológicos por indicios de la presencia de apoptosis.

Según Mootoosamy & Fawzi Mahomoodally, (2014) tras la exposición de *A. muricata* se ha observado el agotamiento del potencial de membrana mitocondrial provocando la apertura de los poros, esto se logró evidenciar en la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear mediante la detección con tinción de bromuro de etidio / naranja de acridina. La naranja de acridina impregna todas las células logrando que los núcleos presenten una tinción de color verde mientras que el bromuro de etidio solo es absorbido cuando la membrana citoplasmática pierde

su integridad logrando teñir el núcleo de rojo, esto se logró visualizar y tiene relación con el porcentaje de viabilidad, mostrando en células vivas un núcleo normal el cual se observa en células sanas HFF sin embargo, para células de cáncer de pulmón A549 existió la presencia de apoptosis temprana con núcleos verdes brillantes pero con cromatina condensada o fragmentada por el contrario para células cáncer de glioblastoma U251, se observó células apoptóticas tardías con cromatina naranja condensada y fragmentada.

Por lo tanto nuestros estudios mostraron una población de nanovesículas aisladas de *A. muricata* con morfología y tamaño similar a los exosomas secretados por células de mamíferos además se demostró que estas nanovesículas son estables y juegan un papel importante en la comunicación entre reinos mostrando un efecto antiproliferativo en células cancerígenas principalmente en células de cerebro.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Se logró aislar y purificar vesículas extracelulares correspondientes a microvesículas y nanovesículas mediante técnicas de centrifugación, ultracentrifugación y purificación con gradiente de sucrosa observadas en microscopia electrónica en un rango de 100-450 nm y 40-60 nm respectivamente.
- Mediante la caracterización de proteínas exosomales de las nanovesículas aisladas de guanábana se logró la detección de la proteína ALIX, misma que está implicada en la biogénesis dependiente de la maquinaria del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte ESCRT.
- Las nanovesículas aisladas del zumo de guanábana presentaron actividad antiproliferativa en las dos líneas celulares correspondientes a cáncer de pulmón A549 y cáncer de glioblastoma maligno U251, mostrando una disminución de la proliferación celular dependiente de la dosis.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Disponer de equipos especializados para la realización de técnicas de aislamiento y purificación de nanovesículas desarrolladas en esta investigación.
- Con el fin de conocer a detalle los componentes de las nanovesículas aisladas de guanábana se recomienda la implementación de técnicas como la proteómica y transcriptómica.
- Complementar con ensayos de actividad enzimática, permeabilidad de la membrana celular, adherencia celular, producción de ATP, producción de coenzimas y actividad de captación de nucleótidos y posteriormente estudiar las vías de muerte celular que están involucradas tras la exposición a las nanovesículas

BIBLIOGRAFÍA

- Adewole, S., & Caxton-Martins, E. (2011). Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* linn. (annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Biomedical Research*, 9(3), 173–187. <https://doi.org/10.4314/ajbr.v9i3.48903>
- Agu, K. C., Okolie, N. P., Falodun, A., & Engel-Lutz, N. (2017). In vitro anticancer assessments of *Annona muricata* fractions and in vitro antioxidant profile of fractions and isolated acetogenin (15-acetyl guanacone). *Journal of Cancer Research and Practice*, 5(2), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.12.001>
- Aldridge, G. M., Podrebarac, D. M., Greenough, W. T., & Weiler, I. J. (2008). The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.05.003>
- An, Q., Ehlers, K., Kogel, K. H., Van Bel, A. J. E., & Hüchelhoven, R. (2006). Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist*, 172(3), 563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01844.x>
- Arango, T. (1975). “La guanábana.” *Esso Agrícola*, 21.
- Baker, S. G. (2015). A cancer theory kerfuffle can lead to new lines of research. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(2), 1–8. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju405>

- Bicer, S., & Reiser, P. J. (2013). Complex tropomyosin and troponin T isoform expression patterns in orbital and global fibers of adult dog and rat extraocular muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 34(3–4), 211–231. <https://doi.org/10.1007/s10974-013-9346-9>
- Botanical, N. Y., Arboretum, F. C., Trust, C. C., & So-, T. A. P. (1985). Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay', 374, 369–374.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 254, 248–254.
- Cassé, C. (2018). Molecular mechanisms of *Annona muricata* anti-proliferative/anti-cancer properties. *Biomedical Genetics and Genomics*, 4(1), 1–4. <https://doi.org/10.15761/bgg.1000138>
- Chang, F., & Wu, Y. (2001). Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*, 925–931.
- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Morishita, M., Matsumoto, A., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2017). Cell type-specific and common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.009>
- Chen, X. (2012). Small RNAs in development - insights from plants. C. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(4), 361–367. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>
- Chen, Y., Tang, Y., Long, W., & Zhang, C. (2016). Stem Cell-Released Microvesicles and

Exosomes as Novel Biomarkers and Treatments of Diseases. *Stem Cells International*, 2016, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2016/2417268>

Cheng, F. Y., Zamski, E., Guo, W. W., Pharr, D. M., & Williamson, J. D. (2009). Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: A possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens. *Planta*, 230(6), 1093–1103. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1006-3>

Colditz, G. A., Sellers, T. A., & Trapido, E. (2006). Epidemiology - Identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 75–83. <https://doi.org/10.1038/nrc1784>

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>

Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662–691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>

Correa, J., Ortiz, D., Larrahondo, J., Sánchez, M., & Pachón, H. (2011). Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 11(2), 111–126. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>

- Cui, Y., Shen, J., Gao, C., Zhuang, X., Wang, J., & Jiang, L. (2016). Biogenesis of Plant Prevacuolar Multivesicular Bodies. *Molecular Plant*, 9(6), 774–786. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.011>
- Dai, Y., Hogan, S., Schmelz, E. M., Ju, Y. H., Canning, C., & Zhou, K. (2011). Selective growth inhibition of human breast cancer cells by graviola fruit extract in vitro and in vivo involving downregulation of EGFR expression. *Nutrition and Cancer*, 63(5), 795–801. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.563027>
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., & Mongini, C. (2015). Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications. *Frontiers in Immunology*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00203>
- Eggert, M., Feechan, A., Böhlenius, H., Ueda, T., & Thordal-christensen, H. (2012). mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1, 109(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1117596109>
- Gao, C., Luo, M., Zhao, Q., Yang, R., Cui, Y., Zeng, Y., ... Jiang, L. (2014). A Unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Current Biology*, 24(21), 2556–2563. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.014>
- Gao, C., Zhuang, X., Shen, J., & Jiang, L. (2017). Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. *Trends in Plant Science*, 22(11), 986–998. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.003>
- Gardiner, C., Vizio, D. Di, Sahoo, S., Théry, C., Kenneth, W., Wauben, M., ... Théry, C. (2017).

Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3078(March). <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>

González B., Contreras A. C., Lipcovich J. Q., Centeno D. M., C. J. (2004). Caracterización numérica de germoplasma de Guanabana (*Annona muricata* L.) Muestreado in situ en el pacífico y norte de Nicaragua.

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*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>

Hanelt, P. (2001). Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops: Except Ornamentals. *Springer Berlin Heidelberg*.

Hu, G., Drescher, K. M., & Chen, X.-M. (2012). Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Frontiers in Genetics*, 3, 56. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00056>

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias EC. (2014). Programas de Fruticultura. Guanábana.

ITIS. (2014). Integrated Taxonomic Information System. Retrieved from <http://www.itis.gov>

Johnson, M. (2012). Loading Controls for Western Blots. *Mater Methods*, 2, 114. <https://doi.org/10.13070/mm.en.2.114>

Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., ... Zhang, H. (2013). Grape

Exosome-like Nanoparticles Induce Intestinal Stem Cells and Protect Mice From DSS-Induced Colitis, *21*(7), 1345–1357. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.64>

Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., ... Zhang, H. G. (2013). Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Molecular Therapy*, *21*(7), 1345–1357. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.64>

Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>

Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, *2018*, 1–27. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>

Korbei, B., Moulinier-Anzola, J., De-Araujo, L., Lucyshyn, D., Retzer, K., Khan, M. A., & Luschnig, C. (2013). Arabidopsis TOL proteins act as gatekeepers for vacuolar sorting of PIN2 plasma membrane protein. *Current Biology*, *23*(24), 2500–2505. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.036>

Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, *29*(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>

Lannuzel, A., P.P. Michel, D., Caparros-Lefebvre, J., Abaul, R., & Hocquemiller Ruberg, M. (2002). No Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical Parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord.*, *17*, 87–90.

- Leatemala, J. A., & Isman, M. B. (2004). Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasitica*, 32(1), 30–37. <https://doi.org/10.1007/BF02980856>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953833>
- Magaña, Alberto, M., Gama, L. M., & Mariaca, R. (2010). El Uso De Plantas Medicinales En Las Comunidades Mayas Chontales De Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*, (29), 213–262. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62112471011>
- Maheshwari, R., Tekade, M., Gondaliya, P., Kalia, K., D’Emanuele, A., & Tekade, R. K. (2017). Recent advances in exosome-based nanovehicles as RNA interference therapeutic carriers. *Nanomedicine (Lond)*. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0210>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mallocci, M., Perdomo, L., Veerasamy, M., Andriantsitohaina, R., Simard, G., & Martínez, M. C. (2019). Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxidants &*

Redox Signaling, 30(6), 813–856. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7265>

Marchant, R., & Robards, A. W. (1968). Membrane Systems Associated with the Plasmalemma of Plant Cells.

Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., Menezes-Neto, A. De, Osuna, A., Bernal, D., ... Portillo, H. A. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 25040.

Mariam, S., Wahab, A., Jantan, I., Haque, A., & Arshad, L. (2018). Exploring the Leaves of *Annona muricata* L . as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents, 9(June), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00661>

Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2010.06.006>

Moghadamtousi, S. ;, Fadaeinasab, M., Nikzad, S., & Mohan, G. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses , Isolated Acetogenins and Biological Activities, 15625–15658. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>

Moghadamtousi, S. ;, Kadir, H. ;, Paydar, M., Rouhollahi, E., & Karimian, H. (2014). *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- κ B. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-299>

Mohanty, S., Hollinshead, J., Jones, L., Jones, P. W., Thomas, D., Watson, A. A., ... Nash, R. J.

- (2008). *Annona muricata* (Graviola): toxic or therapeutic. *Nat. Prod. Commun*, 2, 31–33.
- Molendijk, A. J., Ruperti, B., & Palme, K. (2004). Small GTPases in vesicle trafficking. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.09.014>
- Monigatti, M., Bussmann, R. W., & Weckerle, C. S. (2013). Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.066>
- Mootosamy, A., & Fawzi Mahomoodally, M. (2014). Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 413–444. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.069>
- Morre, D. J., Cabo, R. De, Farley, C., Oberlies, N. H., & Mclaughlin, J. L. (1995). Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: Inhibition of NADH oxidase activity of HELA and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sciences*, 56(5), 343–348.
- Morton, J. F. (1980). Caribbean and latin american folk medicine and its influence in the United states. *Pharmaceutical Biology*, 18(2), 57–75. <https://doi.org/10.3109/13880208009065179>
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z.-B., Wang, B., ... Zhang, H.-G. (2014). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(7), 1561–1573. <https://doi.org/doi:10.1002/mnfr.201300729>
- Nawwar, M., Ayoub, N., Hussein, S., Hashim, A., El-Sharawy, R., Wende, K., ... Lindequist, U. (2012). A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating

activities of *Annona muricata* Linn. *Archives of Pharmacal Research*, 35(5), 761–767.
<https://doi.org/10.1007/s12272-012-0501-4>

New, T., & Acetogenins, A. A. (2014). Three New Anti-Proliferative Annonaceous Acetogenins with Mono-tetrahydrofuran Ring from Graviola Fruit (*Annona muricata*). *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.099>

Nolte 'T Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 'T Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, 40(18), 9272–9285.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks658>

Ouyang, L., Luo, Y., Tian, M., Zhang, S. Y., Lu, R., Wang, J. H., ... Li, X. (2014). Plant natural products: From traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell Proliferation*, 47(6), 506–515. <https://doi.org/10.1111/cpr.12143>

Pieme, A. A., Kumar, G. G., Dongmo, S. S., Moukette, M. M., Boyoum, F. F., Ngogang, Y. Y., & Saxena, K. K. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-516>

Pinedo, M., Regente, M., Elizalde, M., Quiroga, I. Y., Pagnussat, L. A., Jorrín-novo, J., ... Canal, L. De. (2012). Extracellular Sunflower Proteins : Evidence on Non-classical Secretion of a Jacalin-related Lectin. *Protein & Peptide Letters*, 19(3), 270–276.

- Pinto, A., Cordeiro, M., De Andrade, S., Ferreira, F., & Filgueiras, H. (2005). *Annona species*.
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Dico, A. Lo, Saieva, L., ... Alessandro, R. (2015). *Citrus limon*-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4004>
- Regente, M., Corti-Monzón, G., Maldonado, A. M., Pinedo, M., Jorrín, J., & de la Canal, L. (2009). Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins. *FEBS Letters*, 583(20), 3363–3366. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.041>
- Regente, M., Pinedo, M., Clemente, H. S., Balliau, T., & Jamet, E. (2017). Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth, 68(20), 5485–5495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx355>
- Regente, M., Pinedo, M., Elizalde, M., & De la Canal, L. (2012). Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants?. *Plant Signaling & Behavior*, 7(5), 544–546. <https://doi.org/10.4161/psb.19675>
- Richardson, L. G. L., Howard, A. S. M., Khuu, N., Gidda, S. K., McCartney, A., Morphy, B. J., & Mullen, R. T. (2011). Protein–Protein Interaction Network and Subcellular Localization of the Arabidopsis Thaliana ESCRT Machinery. *Frontiers in Plant Science*, 2(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00020>
- Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast

Carry Stress-Response Proteins1, 173(January), 728–741.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>

Schultes, R., & Raffauf, A. (1990). *The Healing Forest: Medicinal and toxic plants of the Northwest Amazonia*. Portland: Dioscorides Press.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>

Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 575–581.
<https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.03.007>

SOLCA, (2018). Informe de labores 2016-2108 de la Sociedad de Lucha contra el Cancer del Ecuador.

Spitzer, C., Schellmann, S., Sabovljevic, A., Shahriari, M., Keshavaiah, C., Bechtold, N., ... Hulskamp, M. (2006). The Arabidopsis elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development*, 133(23), 4679–4689.
<https://doi.org/10.1242/dev.02654>

Stanly, C., Fiume, I., Capasso, G., & Pocsfalvi, G. (2016). Isolation of Exosome-Like Vesicles from Plants by Ultracentrifugation on Sucrose/Deuterium Oxide (D2O) Density Cushions. *Methods in Molecular Biology*, 259–269. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9>

Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., & Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205–212.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.014>

Suchorska, W. M., & Lach, M. S. (2016). The role of exosomes in tumor progression and metastasis (Review). *Oncology Reports*, 35(3), 1237–1244.

<https://doi.org/10.3892/or.2015.4507>

Sun, S., Liu, J., Zhou, N., Zhu, W., Dou, Q. P., & Zhou, K. (2016). Isolation of three new annonaceous acetogenins from Graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(17), 4382–4385. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.038>

Sundarrao, K., Burrows, I., Kuduk, M., Yi, Y. D., Chung, M. H., Suh, N. J., & Chang, I. (1993). Preliminary Screening of Antibacterial and Antitumor Activities of Papua New Guinean Native Medicinal Plants Papua New Guinea is a tropical country with a variety of infectious diseases such Antibacterial activity Results of antibacterial tests are compil, 31(1), 3–6.

Syed Najmuddin, S. U. F., Romli, M. F., Hamid, M., Alitheen, N. B., & Abd Rahman, N. M. A. N. (2016). Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1290-y>

Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>

Termini, C. M., & Gillette, J. M. (2017). Tetraspanins Function as Regulators of Cellular

Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(April), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00034>

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. In J. S. Bonifacino, J. B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, & K. M. Yamada (Eds.), *Current protocols in cell biology* (pp. 3.22.1–3.22.29). Hoboken, NJ, USA: JohnWiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2019). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7309–7318.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>

Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>

Torres, M. P., Rachagani, S., Purohit, V., Pandey, P., Joshi, S., Moore, E. D., ... Batra, S. K. (2012). Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. *Cancer Letters*, 323(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.031>

Twu, O., & Johnson, P. J. (2014). Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication. *PLoS Pathogens*, 10(8), e1004289.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004289>

USDA-NRCS. (2014). Germplasm Resources Information Network (GRIN). Retrieved from

<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>

- Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., ... Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24858>
- Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z. Bin, Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., ... Zhang, H. G. (2014). Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Molecular Therapy*, 22(3), 522–534. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.190>
- Wang, H.-J., Hsu, Y.-W., Guo, C.-L., Jane, W.-N., Wang, H., Jiang, L., & Jauh, G.-Y. (2016). VPS36-Dependent Multivesicular Bodies Are Critical for Plasmamembrane Protein Turnover and Vacuolar Biogenesis. *Plant Physiology*, 173(1), 566–581. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01356>
- Wang, J., Sun, X., Zhao, J., Yang, Y., Cai, X., Xu, J., & Cao, P. (2017). Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00300>
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. Bin, Jiang, H., Xiang, X., ... Zhang, H. G. (2013). Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4(May), 1811–1867. <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z., Jiang, H., Zhang, L., ... Zhang, H. (2013). made of grapefruit-derived lipids, (May). <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>

- Winter, V., & Hauser, M. T. (2006). Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends in Plant Science*, *11*(3), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.008>
- Wolvetang, E. J., Johnson, K. L., Krauer, K., Ralph, S. J., & Linnane, A. W. (1994). Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett*, *339*, 40–44. Retrieved from <http://www.mensetmanus.net/windpower/no-green-giant2.shtml>
- Xiao, J., Feng, S., Wang, X., Long, K., Luo, Y., Wang, Y., ... Li, M. (2018). Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ*, *6*, e5186. <https://doi.org/10.7717/peerj.5186>
- Xu, J. Y., Chen, G. H., & Yang, Y. J. (2017). Exosomes: A rising star in falling hearts. *Frontiers in Physiology*, *8*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00494>
- Yajid, A. I., Ab Rahman, H. S., Wong, M. P. K., & Wan Zain, Z. W. (2018). Potential Benefits of *Annona muricata* in Combating Cancer : A Review, *25*(1), 5–15.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(2015), 1–60. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yoon, Y. J., Kim, O. Y., & Gho, Y. S. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Reports*, *47*(10), 531–539. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.10.164>
- Zafra, M. C., Figadèrea, B., Gallardo, T., Tormo, J. R., & Cortes, D. (1998). Natural acetogenins

from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Elsevier*, 48(7), 1087–1117.
Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00917-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00917-5)

Zhang, Mengdi, Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*, 2(9), 1800021.
<https://doi.org/10.1002/smtd.201800021>

Zhang, Mingzhen, Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D. (2016). Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases. *Tissue Barriers*, 4(2), 1–9.
<https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1134415>

Zhang, Y., Wiggins, B. E., Lawrence, C., Petrick, J., Ivashuta, S., & Heck, G. (2012). Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics*, 13(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-381>

Zumaquero Martínez, E. C. (2010). *Mecanismos de acción de cd38 en señalización, migración celular y patologías humanas autoinmunes*. Universidad de Granada. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=63125>