



**Obtención de exosomas a partir de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae).**

Vera Cadena, Milenka Andreina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Torres Arias, Marbel Ph.D.

02 de Septiembre del 2022



## VERA\_MILENKA\_copyleaks.pdf

Scanned on: 13:3 August 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	158
Words with Minor Changes	7
Paraphrased Words	504
Omitted Words	0



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: “Obtención de exosomas a partir de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae)” fue realizado por la señorita Vera Cadena, Milenka Andreina; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de agosto de 2022

Firma:

.....

Torres Arias, Marbel Ph.D

C. C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Vera Cadena, Milenka Andreina**, con cédula de ciudadanía n° 1311544645, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Obtención de exosomas a partir de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae)"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 30 de agosto de 2022

Vera Cadena, Milenka Andreina

C. C. 1311544645



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Vera Cadena, Milenka Andreina**, con cédula de ciudadanía n° 1311544645 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Obtención de exosomas a partir de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 30 de agosto de 2022

Vera Cadena, Milenka Andreina.

C. C. 1311544645

## Dedicatoria

A mi familia, mis padres Helquin Vera y Karina Cadena, mis hermanos Elkin Vera y María Belén Vera, quienes me enseñaron que la perseverancia y la voluntad son la clave para alcanzar las metas en la vida y que todo es posible solo si tú lo crees.

A todas las próximas generaciones ...

*Milenka Andreina Vera Cadena*

## Agradecimientos

A mi familia que con su apoyo y amor incondicional me alentaron a seguir adelante, a nunca darme por vencida y a enseñarme que mientras estés vivo y con buena actitud se puede afrontar cualquier problema.

A la Dra. Marbel Torres del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por ser una excelente docente, darme la oportunidad de realizar mi proyecto y guiarme con sus apreciados conocimientos.

A la Ing. Andrea Aluisa y la Ing. Fernanda Toscana del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por la paciencia, disposición brindada y compartir sus valiosos conocimientos durante el desarrollo de mi investigación.

Al Dr. Alexis Debut del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por su cooperación en la obtención de las imágenes de mi investigación.

A mis amigos y en especial a mi amiga María del Carmen Mendoza por ser una persona incondicional, sacarme una sonrisa y darme ánimos en los momentos más difíciles.

Al equipo de iGEM Biotech EC donde encontré personas con la misma pasión que yo por la biología sintética y la superación profesional.

***Milenka Andreina Vera Cadena***

## Índice de Contenidos

<b>Resumen</b>	<b>14</b>
<b>Abstract</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo I: Introducción</b>	<b>16</b>
<i>Formulación del problema</i>	16
<i>Justificación del problema</i>	19
<i>Objetivos</i>	21
<i>Objetivo General</i>	21
<i>Objetivos específicos</i>	21
<i>Hipótesis</i>	21
<b>Capitulo II: Marco teórico</b>	<b>21</b>
<i>Exosomas</i>	21
<i>Biogénesis y secreción</i>	23
<i>Zingiber officinale Roscoe.</i>	26
<i>Generalidades</i>	26
<i>Taxonomía</i>	26
<i>Origen y distribución</i>	28
<i>Importancia y composición.</i>	28
<i>Vías activadas por los componentes del jengibre</i>	33
<i>Cúrcuma longa L.</i>	36
<i>Generalidades</i>	36
<i>Taxonomía</i>	36
<i>Origen y distribución</i>	37
<i>Importancia y composición</i>	38
<i>Vías activadas por los componentes de la cúrcuma</i>	40
<i>Composición de los exosomas</i>	41
<i>Composición de exosomas de jengibre y cúrcuma</i>	42
<i>Funciones biológicas de los exosomas</i>	48
<i>Métodos de aislamiento y purificación</i>	49
<i>Ultra centrifugación</i>	49
<i>Ultrafiltración</i>	50
<i>Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)</i>	51
<i>Inmunoadfinidad</i>	52
<i>Precipitación</i>	52

<i>Métodos de caracterización de exosomas</i>	53
<i>Microscopía electrónica</i>	53
<i>Ensayo NTA</i>	53
<i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i>	53
<i>Citometría de flujo</i>	54
<i>Cuantificación de proteínas mediante Bradford/Ácido bicinconínico (BCA)</i>	54
<i>Western blot</i>	55
<i>Aplicaciones de los exosomas derivados de plantas</i>	56
<b>Capítulo III: Materiales y Métodos</b>	<b>57</b>
<i>Localización geográfica</i>	57
<i>Preparación de la muestra</i>	58
<i>Aislamiento y purificación de exosomas</i>	58
<i>Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Bradford</i>	61
<i>Western Blot</i>	63
<i>Electroforesis vertical</i>	63
<i>Transferencia de proteínas a membrana en medio semi-seco</i>	64
<i>Inmunomarcaje de proteínas</i>	65
<i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	66
<i>Citotoxicidad celular</i>	67
<i>Ensayo MTT</i>	68
<i>Análisis estadístico</i>	70
<i>Análisis de imágenes</i>	71
<b>Capítulo IV: Resultados</b>	<b>71</b>
<i>Aislamiento de exosomas derivados de Jengibre y Cúrcuma mediante Cromatografía de exclusión por tamaño con columna qEV Original seguido de ultrafiltración</i>	71
<i>Caracterización de exosomas derivados de Jengibre y Cúrcuma mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	72
<i>Caracterización de proteínas exosomales mediante electroforesis vertical y Western Blot</i>	76
<i>Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT</i>	81
<b>Capítulo V: Discusión</b>	<b>87</b>
<b>Capítulo VI: Conclusiones</b>	<b>103</b>
<b>Capítulo VII: Recomendaciones</b>	<b>104</b>
<b>Capítulo VIII: Referencias</b>	<b>105</b>



**Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> <i>Características de los vehículos eléctricos</i>	22
<b>Tabla 2.</b> <i>Taxonomía de Zingiber officinale Roscoe</i>	27
<b>Tabla 3.</b> <i>Valor nutricional del jengibre</i>	29
<b>Tabla 4.</b> <i>Componentes del aceite esencial del jengibre</i>	31
<b>Tabla 5.</b> <i>Compuestos fenólicos presentes en el jengibre</i>	32
<b>Tabla 6.</b> <i>Taxonomía de Curcuma longa L.</i>	36
<b>Tabla 7.</b> <i>Valor nutricional de la cúrcuma</i>	38
<b>Tabla 8.</b> <i>Componentes del aceite esencial de cúrcuma y los Curcuminoides</i>	39
<b>Tabla 9.</b> <i>46Análisis lipídico, proteómico, secuenciación y de composición de las nanovesículas derivadas de jengibre y cúrcuma</i>	46
<b>Tabla 10.</b> <i>Ventajas y desventajas de los ensayos de BCA y Bradford</i>	55

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Esquemas de las vesículas extracelulares</i>	23
<b>Figura 2.</b> <i>Biogénesis de exosomas derivados de plantas</i>	25
<b>Figura 3.</b> <i>Zingiber officinale Roscoe.</i>	27
<b>Figura 4.</b> <i>Estructura química de los principales compuestos fenólicos del jengibre</i>	32
<b>Figura 5.</b> <i>Mecanismo antioxidante de 6-Shogaol</i>	34
<b>Figura 6.</b> <i>Mecanismo antioxidante de 6-gingerol</i>	35
<b>Figura 7.</b> <i>Mecanismos citotóxicos de acción de shogaol y gingerol</i>	35
<b>Figura 8.</b> <i>Curcuma longa L.</i>	37
<b>Figura 9.</b> <i>Estructura química de la Curcumina</i>	40
<b>Figura 10.</b> <i>Vías de transducción de señales reguladas por la Curcumina en células cancerosas</i>	41
<b>Figura 11.</b> <i>Caracterización morfológica de exosomas derivados de cúrcuma (TDNP, izquierda) y de jengibre (GDNP, derecha) mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	48
<b>Figura 12.</b> <i>Propiedades biológicas de los exosomas derivados de plantas</i>	49
<b>Figura 13.</b> <i>Aplicaciones actuales de los exosomas derivados de plantas</i>	57
<b>Figura 14.</b> <i>Centrifugaciones seriadas de la muestra de cúrcuma y jengibre y purificación de los exosomas mediante columna qEV Original</i>	60
<b>Figura 15.</b> <i>Procedimiento de aislamiento y purificación de exosomas de muestras de jengibre y Cúrcuma</i>	61
<b>Figura 16.</b> <i>Procedimiento de concentración de exosomas y cuantificación de proteínas</i>	63
<b>Figura 17.</b> <i>Procedimiento Western blot</i>	66
<b>Figura 18.</b> <i>Procedimiento de microscopía electrónica de transmisión</i>	67
<b>Figura 19.</b> <i>Procedimiento para evaluar la citotoxicidad celular</i>	70
<b>Figura 20.</b> <i>Purificación de exosomas de Jengibre y Cúrcuma mediante cromatografía de exclusión por tamaño con columna qEV Original (70 nm)</i>	72
<b>Figura 21.</b> <i>Frecuencia de distribución de tamaño de los exosomas de 1) Jengibre y de 2) Cúrcuma</i>	73
<b>Figura 22.</b> <i>Visualización de exosomas de Cúrcuma mediante TEM</i>	75
<b>Figura 23.</b> <i>Visualización de exosomas de Jengibre mediante TEM</i>	76
<b>Figura 24.</b> <i>Resultados de la Electroforesis SDS-PAGE 1 con gel de concentración al 4% y gel de separación al 12%</i>	78
<b>Figura 25.</b> <i>Resultados de la Electroforesis SDS-PAGE 2 con gel de concentración al 4% y gel de separación al 12%</i>	79
<b>Figura 26.</b> <i>Resultados del Western Blot</i>	81
<b>Figura 27.</b> <i>Resultados de Ensayo de Viabilidad celular MTT en la línea celular HeLa</i>	83
<b>Figura 28.</b> <i>Resultados de Ensayo de Viabilidad celular MTT en la línea celular HEK293</i>	85
<b>Figura 29.</b> <i>Resultados de Ensayo de Viabilidad celular MTT en la línea celular HFF</i>	86

### Listado de abreviaturas

**ESCRT:** Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte

**miRNA:** micro Ácido ribonucleico no codificante

**DMEM:** medio Eagle modificado de Dulbecco

**EMEM:** medio esencial mínimo de Eagle

**HeLa:** carcinoma cervical humano de Henrietta Lacks

**HEK293:** células tumorales de riñón embrionario humano

**HFF:** células de fibroblasto humano, human foreskin fibroblasts

## Resumen

En los últimos años se ha demostrado que los exosomas derivados de plantas median la comunicación intercelular y entre reinos y presentan compuestos bioactivos en su carga convirtiéndose en potenciales agentes terapéuticos para la nanomedicina. Los exosomas de plantas son un tipo de vesículas extracelulares que se originan por endocitosis de la membrana plasmática, aunque su biogénesis no está totalmente dilucidada. Se conoce que los rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe. (Jengibre), y *Curcuma longa* L. (Cúrcuma), posee compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Por lo tanto, se decidió estudiar los exosomas de estas plantas, para ello se aisló y purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño con columna qEV Original y se los caracterizó con microscopía electrónica de transmisión (TEM), electroforesis vertical y Western Blot. Se evaluó su efecto en la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT) en líneas celulares HeLa, HEK293 y HFF. Los exosomas derivados de Cúrcuma (EDC) presentaron una morfología semiesférica ovalada y un rango de diámetro entre 30 a 71 nm y expresión de biomarcadores con homología a las tetraspaninas de mamíferos CD81+, CD9+ y CD63-. Los exosomas derivados de Jengibre (EDJ) mostraron una morfología esférica y un rango de diámetro entre 31 a 156 nm y la expresión de los mismos biomarcadores de EDC con diferente intensidad de banda. El perfil proteico de los exosomas de Cúrcuma y Jengibre de acuerdo al análisis mediante SDS-PAGE estuvo en un rango entre 40-12 KDa y 40-10 kDa respectivamente. Se descubrió que los EDC y EDJ poseían una actividad celular antiproliferativa en las líneas celulares HeLa y HEK293 dependiente del tiempo de exposición y la concentración para el primer caso y en el caso de EDJ la citotoxicidad solo dependió del tiempo.

*Palabras clave:* exosomas, *Zingiber officinale* Roscoe, *Curcuma longa* L, viabilidad celular

## Abstract

In recent years, it has been demonstrated that plant-derived exosomes mediate intercellular and interkingdom communication and present bioactive compounds in their cargo, making them potential therapeutic agents for nanomedicine. Plant exosomes are a type of extracellular vesicles that originate by endocytosis from the plasma membrane, although their biogenesis is not fully elucidated. It is known that rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe. (Ginger), and *Curcuma longa* L. (Turmeric), possess bioactive compounds with antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties. Therefore, it was decided to study the exosomes of these plants, for which they were isolated and purified by size exclusion chromatography with Original qEV column and characterized by transmission electron microscopy (TEM), vertical electrophoresis and Western Blot. Their effect on cell viability was evaluated by colorimetric assay with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) in HeLa, HEK293 and HFF cell lines. Turmeric-derived exosomes (EDC) presented an oval hemispherical morphology and a diameter range between 30 to 71 nm and biomarker expression with homology to mammalian CD81+, CD9+ and CD63- tetraspanins. Ginger-derived exosomes (EDJ) showed a spherical morphology and a diameter range between 31 to 156 nm and expression of the same EDC biomarkers with different band intensity. The protein profile of Turmeric and Ginger exosomes according to SDS-PAGE analysis ranged between 40-12 kDa and 40-10 kDa respectively. EDC and EDJ were found to possess antiproliferative cellular activity in HeLa and HEK293 cell lines dependent on exposure time and concentration for the former and in the case of EDJ the cytotoxicity was only time dependent.

*Keywords:* exosomes, *Zingiber officinale* Roscoe, *Curcuma longa* L, cell viability.

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

Las vesículas extracelulares (EV) son un grupo de vesículas membranosas liberadas por las células que tienen un rol en la comunicación intercelular, defensa contra patógenos y transducción de señales (L. Zhang et al., 2021). Existen tres subpoblaciones como las microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas que se diferencian en tamaño, biogénesis y principalmente en los marcadores de superficie (Lu & Huang, 2020). En los últimos años, los exosomas derivados de células de mamíferos han tomado importancia en la biomedicina tanto como agentes terapéuticos para la entrega de compuestos activos (vehículos de entrega, es decir administrador de fármacos), en el diagnóstico de ciertas enfermedades como el cáncer y como biomarcadores para vigilar el progreso de las enfermedades (Gioia & Conese, 2020). De la misma manera, se ha confirmado que las células vegetales liberan exosomas en respuesta al estrés biótico y abiótico y participan en procesos fisiológicos como la defensa de la planta y proliferación celular. Sin embargo, existen pocos estudios de exosomas derivados de plantas y sus aplicaciones en la biomedicina a diferencia de los exosomas de células de mamíferos. Además, los exosomas derivados de plantas ofrecen ciertas ventajas frente a los exosomas derivados de células de mamíferos como una baja toxicidad e inmunogenicidad, alta biocompatibilidad y estabilidad y una eficiente absorción en la célula receptora (J. Kim et al., 2022). La estructura manométrica de los exosomas de plantas y su carga les permite actuar en diferentes procesos como en la comunicación intercelular y entre reinos, regulación génica, señalización celular y en la defensa y el estrés biótico y abiótico que puede estar sometida la planta. Cuando comemos, los exosomas derivados de plantas entran al organismo e interactúan con las células del huésped regulando una serie de vías. En el estudio realizado por Teng et al., (2021) demostraron que los miRNAs de los exosomas derivados del jengibre rlcV-miR-rL1-28-3p y aly-miR396a-5p disminuyeron la expresión de los genes virales S (spike) y Nsp12 en

células Vero E6 infectadas con SARS-CoV-2, reduciendo la respuesta inflamatoria y la apoptosis que desencadena la enfermedad viral.

Actualmente no existen vehículos ideales para la entrega de los principios activos o fármacos para un tratamiento más eficiente de las enfermedades. La nanotecnología ofrece un enfoque innovador y atractivo para el desarrollo de fármacos basados en exosomas derivados de plantas en el tratamiento de cánceres y enfermedades autoinmunitarias. Los exosomas derivados de plantas tienen un alto potencial como agentes terapéuticos debido a los compuestos bioactivos que cargan y se ha demostrado su actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, regulación de la homeostasis intestinal y renovación celular tanto *in vivo* como *in vitro* (J. Kim et al., 2022). En la actualidad existen pocos ensayos clínicos y preclínicos de los exosomas derivados de plantas y no se han podido realizar por completo (ClinicalTrials.gov, cáncer de colon: NCT01294072, mucositis oral: NCT01668849 y resistencia a la insulina y la inflamación crónica en pacientes diagnosticados con síndrome de ovario poliquístico: NCT03493984). Los exosomas derivados de plantas se han aplicado como nanotransportadores para agentes terapéuticos y la administración dirigida de fármacos debido a que se dirigen a tejidos y órganos con gran precisión y especificidad, ofrecen mayor biodisponibilidad del fármaco, alta biocompatibilidad y biodistribución mejorando las propiedades farmacocinéticas del medicamento. Se han modificado los exosomas derivados de plantas para incorporar ligandos e incrementar la especificidad y se ha demostrado que son superiores a los exosomas derivados de mamíferos y nanopartículas artificiales en bioseguridad y toxicidad (Karamanidou & Tsouknidas, 2022). Además, se ha evaluado como futuros nutraceuticos y suplementos alimenticios para combatir el estrés oxidativo (Logozzi et al., 2021; Perut et al., 2021).

*Zingiber officinale* Roscoe y *Curcuma longa* L., conocidas como Jengibre y Cúrcuma respectivamente son originarias del sudeste asiático y tradicionalmente se han utilizado como especia y medicina (J. Kim et al., 2022). Los rizomas de estas plantas son apetecidos globalmente debido a sus

propiedades nutricionales y terapéuticas otorgados por los compuestos bioactivos presentes (Bhawan Verma et al., 2018; Mahomoodally et al., 2021). En el Jengibre está presente los compuestos fenólicos como los gingeroles y los sesquiterpenos en el aceite esencial y la Cúrcuma se encuentra principalmente los Curcuminoides como la Curcumina, compuesto más abundante (Bhawan Verma et al., 2018; Chen et al., 2019; Tung et al., 2019). Estos componentes poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Bhawan Verma et al., 2018; Mahomoodally et al., 2021; Memarzia et al., 2021). Ansari et al (2016) establecen que el extracto metanólico del Jengibre disminuye la peroxidación inducida por radicales libres de biomoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además, se demostró la actividad antiproliferativa celular *in vitro* en células cancerosas de cuello uterino (HeLa) y de cáncer de mama humano MDA-MB-231 a través de la inducción de la apoptosis (Ansari et al., 2016). El extracto de Cúrcuma mostró un efecto antiinflamatorio al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en un modelo de rata Sprague-Dawley con artritis inducida por colágeno (Memarzia et al., 2021).

Se ha demostrado que las microvesículas derivadas del Jengibre participan en la renovación del tejido al proteger contra el daño hepático inducido por el alcohol activando la expresión génica de enzimas crioprotectoras y disminuyendo las especies reactivas de oxígeno (Zhuang et al, 2015). Los exosomas derivados del rizoma de Jengibre (GELN) inhibieron la activación del inflammasoma NLRP3 ya que se obtuvo niveles bajos de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 en el medio de cultivo de macrófagos derivados de médula ósea durante 16 horas de incubación (Chen et al., 2019). En el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2016) demostraron que la subpoblación de microvesículas derivadas del Jengibre (GNDP 2) que contenían los niveles más altos de 6-gingerol y 6-shogaol impiden la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y aumentó la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-22, por lo tanto, disminuye la inflamación contra la colitis inducida por DSS (sulfato sódico de dextrano) mientras aumenta los factores que curan el intestino en modelos de

ratón con colitis inducida (DSS) . Teng et al., (2018) evidenciaron que las microvesículas derivadas de Jengibre (GELN) y Cúrcuma administrada en ratones incrementó el número de *Lactobacillaceae* y GELN promovió el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) durante 8 horas de incubación en los cultivos *in vitro*. El ARN de Jengibre encapsulado en liposomas de Jengibre fue absorbido por LGG y hubo una disminución de citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  y un aumento de IL-22 en ratones con colitis inducida por DSS (Teng et al., 2018). Este estudio analiza la relación del microbioma y las microvesículas derivadas de plantas y como el contenido de estas microvesículas influyen en la expresión génica de las bacterias del huésped. Existen pocos o nada de estudios de exosomas derivados de la Cúrcuma, por lo que falta investigaciones que se centre en su aislamiento, caracterización y efecto biológico *in vitro*. C. Liu et al., (2022) reveló que en ratones con colitis ulcerosa inducida por DSS, los niveles de citocinas proinflamatorias y de hemooxigenasa (HO-1) disminuyeron e incrementó de forma significativa respectivamente cuando se administró oralmente exosomas derivados de Cúrcuma (TDNP2) en comparación con el grupo control (no se le administró TDNP2). Estos resultados se tradujeron en una reducción de los signos de inflamación a nivel histológico. Por lo tanto, los exosomas derivados de plantas especialmente del Jengibre y Cúrcuma tienen efecto antiinflamatorio tanto *in vivo* como *in vitro* en modelos de colitis lo que demuestra su aplicación como potenciales agentes terapéuticos.

### **Justificación del problema**

Los tratamientos más comunes contra el cáncer son la quimioterapia, radioterapia y cirugía, sin embargo, estas estrategias no son siempre eficientes y puede generar reacciones adversas o secundarias con complicaciones a largo plazo (Xu et al., 2020). Por lo tanto, se vuelve necesario el desarrollo de estrategias novedosas que permitan dirigirse a las células madres cancerosas de forma específica con vehículos de administración eficientes. En este contexto, los exosomas se han destacado como portadores para estimular la respuesta inmunitaria y para administrar fármacos contra el cáncer debido

a sus características intrínsecas como biocompatibilidad, no citotóxicidad, facilidad en su producción, baja inmunogenicidad, alta capacidad de carga, larga vida útil y alta especificidad sobre el tejido receptor para atacar el cáncer (J. Kim et al., 2022).

Se han aislado exosomas derivados de diversas plantas comestibles como toronja (Q. Wang et al., 2015), uva (Ju et al., 2013), limón (Raimondo et al., 2015), zanahoria (Mu et al., 2014), manzana (Fujita et al., 2018), jengibre (Chen et al., 2019), coco (Z. Zhao et al., 2018), brócoli (Deng et al., 2017) que contienen fitoquímicos procedentes de las plantas de origen con efectos terapéuticos beneficiosos. Debido a su tamaño nanométrico y su origen vegetal se consideran más seguros, menos inmunogénicos y tóxicos que los exosomas derivados de células de mamíferos y los nanovectores artificiales por lo tanto son un tratamiento potencial para el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (J. Kim et al., 2022).

Numerosos estudios han establecido que la cúrcuma y el jengibre ambas pertenecientes a la misma familia poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas debido a su contenido presente en el aceite esencial y polifenoles (Braga et al., 2003; Zhuang et al., 2015; Ansari et al., 2016; M. Wang et al., 2019; Mahomoodally et al., 2021; C. Liu et al., 2022). Por lo tanto, este estudio es de gran interés ya que se enfoca en obtener los exosomas derivados *Zingiber officinale* Roscoe, y *Curcuma longa* L y caracterizarlos mediante microscopía electrónica de transmisión y electroforesis vertical para posteriormente evaluar su efecto antiproliferativo sobre varias líneas celulares como adenocarcinoma de Henrietta Lacks (HELA), células de riñón embrionario humano (HEK) y human foreskin fibroblasts (HFF).

## Objetivos

### **Objetivo General**

Obtener exosomas a partir de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae).

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar exosomas a partir de extracto de plantas.
- Analizar el perfil proteico de exosomas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) mediante electroforesis vertical.
- Determinar la citotoxicidad de exosomas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe., Zingiberaceae) y cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT).

## Hipótesis

Las plantas de Jengibre y Cúrcuma liberan exosomas con un efecto antiproliferativo significativo dependiente de la concentración en las líneas celulares de HeLa y HEK293.

## Capítulo II: Marco teórico

### Exosomas

Los exosomas son vesículas intraluminales derivadas de los cuerpos multivesiculares durante la exocitosis de células tanto vegetales como animales y poseen un diámetro de 40-100 nm (Suharta et al., 2021). Se desconocía la función de los exosomas durante varios años, ya que se pensaba que solo

servían para cargar productos de desechos de la célula ya sea por el daño celular o por la homeostasis (Rashed et al., 2017). Sin embargo, los estudios actuales confirman que tienen diversas funciones fisiológicas celulares (J. Kim et al., 2022). Los exosomas se diferencian de otras vesículas extracelulares como las microvesículas y cuerpos apoptóticos por su diámetro, marcadores de superficie, funciones y biogénesis (Kalra et al., 2016; International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), <https://www.isev.org/>). Las microvesículas tienen un diámetro entre 100-1000 nm y se liberan de la membrana plasmática a través de gemación o por brotación directa hacia afuera. Los cuerpos apoptóticos tienen un diámetro entre 1000-5000 nm y se originan de células que desarrollan apoptosis (Gioia & Conese, 2020). Los exosomas derivados de mamíferos están mejor estudiados que los obtenidos a partir de plantas, sin embargo, las investigaciones recientes demuestran que son vectores potenciales para la administración de fármacos en el campo de la nanomedicina, ya que no presentan reacciones inmunogénicas cuando se administra *in vivo* en modelos animales comparados con los exosomas de mamíferos. Los exosomas derivados de plantas poseen una mejor administración de agentes terapéuticos y más alto rendimiento de extracción que en cultivos animales (Dad et al., 2021). Las ventajas que poseen los exosomas derivados de plantas que otros nanotransportadores es su facilidad de escalado, baja toxicidad e inmunogenicidad, absorción celular, biocompatibilidad y estabilidad alta, por lo que poseen características atractivas para ser excelentes vehículos de administración de fármacos (J. Kim et al., 2022; Cai et al., 2022).

**Tabla 1.**

*Características de los vehículos eléctricos*

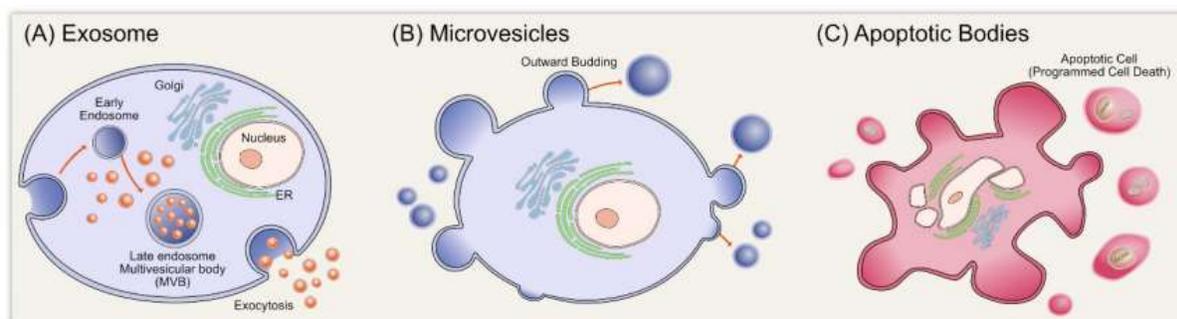
Características	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	30-150 nm	150-1000 nm	1000-5000 nm
Marcadores exosomales	CD63, CD9, VPS23, Alix, flotilina	Integrina, anexina, selectina, flotilina-2	Annexina V, DNA, histonas

Contenido	RNA, miRNA, lípidos y proteínas	Proteína, lípidos, DNA, RNA y miRNA	Organelos celulares, proteínas, DNA, RNA, miRNA
Origen	Vía dependiente del complejo ESCRT, vía vacuolar y vía independiente del complejo ESCRT.	Liberación directa de la membrana plasmática o formación de ampollas.	Cuerpos apoptóticos
Métodos de aislamiento	Ultracentrifugación (100 000–200 000 × <i>g</i> ), ultrafiltración, precipitación y cromatografía de exclusión por tamaño.	10 000 - 100 000 × <i>g</i>	Ultracentrifugación (10 000–20 000 × <i>g</i> )

*Nota.* Obtenido de Gao et al., 2017; Caiza, 2019; Yuan Zhang et al., 2019

## Figura 1

### *Esquemas de las vesículas extracelulares*



*Nota.* Obtenido de Gurunathan et al., 2019.

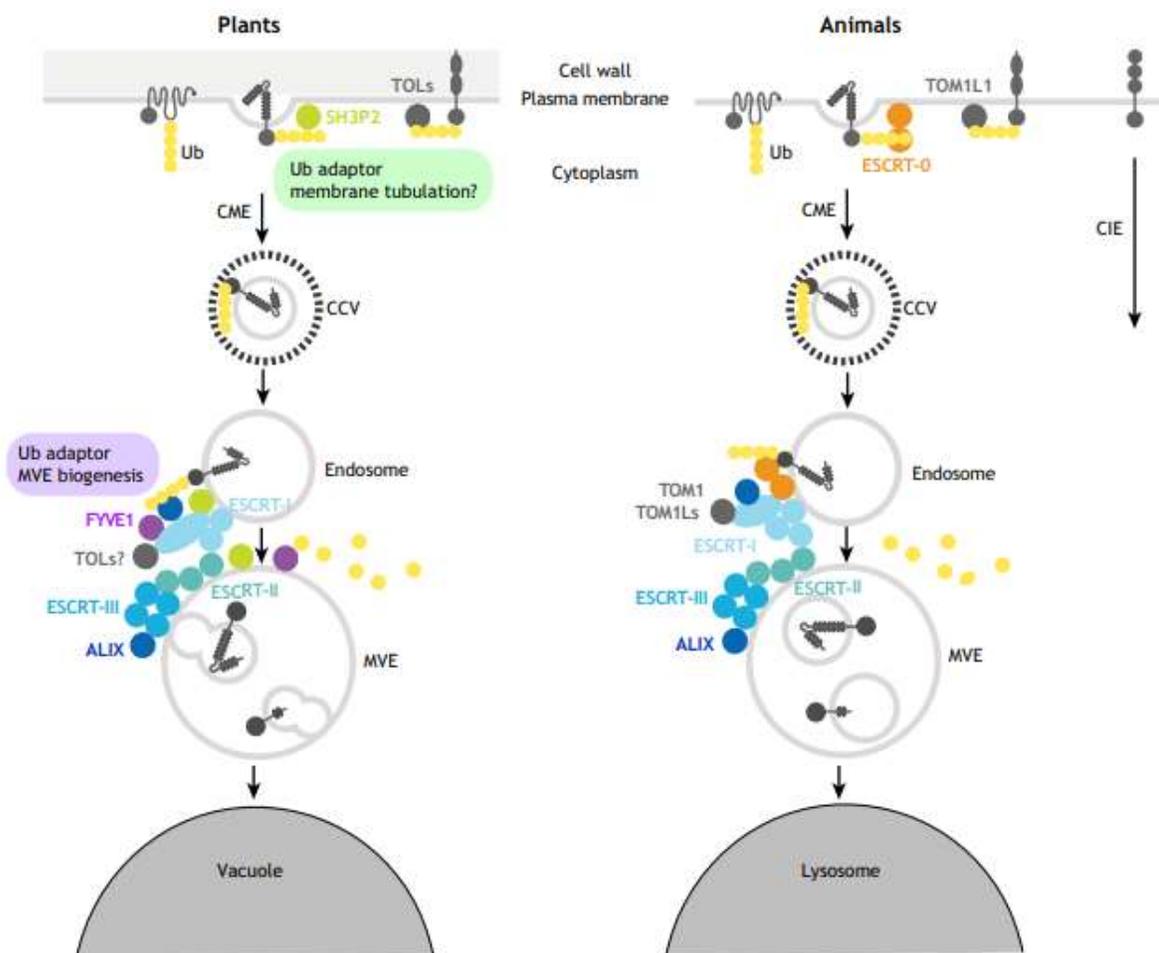
## Biogénesis y secreción

Se ha planteado que el origen de los exosomas derivados de plantas es similar a los exosomas de mamíferos, sin embargo, su biogénesis está menos estudiada y comprendida. La generación de los exosomas derivados de plantas comienza con la invaginación de la membrana celular que forma vesículas endocíticas que luego se fusionan y dan lugar al endosoma temprano (Lefebvre et al., 2018). El

endosoma temprano se mueve a través de los microtúbulos de la célula con lo que va madurando adquiriendo proteínas de superficie, lípidos y biomoléculas que son clasificadas y encapsuladas por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) formando el endosoma tardío (Gao et al., 2017). El endosoma tardío se convierte en un cuerpo multivesicular (MVB) por la acción de ESCRT y sufre invaginación formando múltiples vesículas llamadas vesículas intraluminales (ILV). Una proporción de los cuerpos multivesiculares se fusiona con el lisosoma, mientras que otra parte se une con la membrana plasmática liberando los cuerpos intraluminales en el espacio paramural, denominados exosomas (Dad et al., 2021; Zhang et al., 2019; Regente et al., 2009; Tanchak & Fowke, 1987). Se ha descrito la existencia de exosomas en el compartimento apoplástico, ya que observaron fosfolípidos en los fluidos extracelulares de las semillas de girasol (Regente et al., 2009).

En la clasificación de las proteínas para formar los ILV actúa el complejo de clasificación endosomal ESCRT (Zhang et al., 2019). El complejo está formado por un conjunto de proteínas de múltiples subunidades que trabajan en conjunto ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y proteínas análogas a ESCRT-0 (este complejo se ha identificado en células de mamíferos, hongos y metazoos pero no en plantas) como nueve proteínas TOL, ALIX, FYVE1 y SH3P (SH3P1, SEH3P2 y SH3P3) para formar los MVB, ILV y encapsular la carga de los ILV (Mosesso et al., 2019; Isono, 2021). Existe otra vía que no utiliza el complejo ESCRT en la biogénesis de los exosomas que es la vacuolar. El estudio de Cui et al. (2019) en células corticales de *Arabidopsis* sobre la biogénesis de la vacuola establece que esta proviene de la maduración y unión de MVB específicos. Ante una infección bacteriana, la vacuola central de la célula vegetal puede unirse a la membrana plasmática y liberar ILVs, es decir los exosomas que contienen enzimas hidrolíticas y proteínas antibacterianas como defensa ante patógenos (Hatsugai et al., 2009). Existen mecanismos de clasificación independientes de la vía del complejo ESCRT y dependen de lípidos, tetraspaninas (CD63 y CD81) y proteínas de choque térmico (Liang et al., 2021; Zhang et al., 2019).

Figura 2

*Biogénesis de exosomas derivados de plantas*

Nota. Obtenido de Mosesso et al., 2019

Se ha reportado exosomas derivados de pomelo, limón, manzana, brocoli, pepino, col, jengibre, entre otras (J. Kim et al., 2022). El estudio realizado por Raimondo et al., (2015) reportó que los exosomas purificados por ultra centrifugación en gradiente de sacarosa tuvieron tamaños entre 50-70 nm inhibieron la proliferación de tres líneas celulares de cáncer (A549, SW480 y LAMA84) con un valor de 50% en la viabilidad celular tras 48 horas de exposición en las tres líneas. Los nano vectores de pomelo con un

diámetro entre 50-200 nm obtenidos de los lípidos de los exosomas de pomelo fueron recubiertos con membranas que poseían receptores involucrados en la inflamación de leucocitos activados demostraron un mayor reclutamiento a los lugares del tumor y al tejido de colón inflamado, es decir tuvieron una entrega específica (Q. Wang et al., 2015).

### ***Zingiber officinale* Roscoe.**

#### ***Generalidades***

Es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia Zingiberaceae. Mide de 0,5 -1,0 m de altura, contiene pseudotallos, hojas lanceoladas de hasta 20 cm de longitud y estrechas (4cm), flores amarillas con inflorescencia y genera rizomas tuberosos (Ansari et al., 2016). La superficie del rizoma es de color marrón y su interior es de color amarillo con un aroma picante (Royal Botanic Gardens, s.f, <https://www.kew.org/>). La parte más apetecida es el rizoma debido a sus beneficios medicinales, uso como especia en la cocina y suplemento dietético (Mahomoodally et al., 2021b). Para su cultivo necesita un clima cálido-húmedo (temperatura de 18-25 °C), sombreado, humedad relativa de 70-90% con un suelo fértil ya que requiere altas cantidades de nutrientes (Royal Botanic Gardens, s.f, <https://www.kew.org/>).

#### ***Taxonomía***

*Zingiber officinale* Roscoe es conocida como Jengibre en castellano, ginger en inglés, Gingembre en francés y Ingwer en alemán dependiendo el país donde se cultiva. En la Tabla 2 se muestra la taxonomía del jengibre.

**Tabla 2***Taxonomía de Zingiber officinale Roscoe*

---

Reino	Plantae
-------	---------

---

Filo	Magnoliophyta
------	---------------

---

Clase	Liliopsida (= Monocotyledoneae)
-------	---------------------------------

---

Orden	Zingiberales
-------	--------------

---

Familia	Zingiberaceae
---------	---------------

---

Género	Zingiber
--------	----------

---

Especie	<i>Zingiber officinale</i>
---------	----------------------------

---

*Nota.* Obtenido de darwinfoundation.org

**Figura 3**

*Zingiber officinale Roscoe.*



*Nota.* De izquierda a derecha, rizoma y planta de Jengibre.

### **Origen y distribución**

Es una planta posiblemente originaria de Asia, India. Se encuentra distribuida comercialmente en África tropical (Sierra Leona y Nigeria), sur y sureste de Asia, América Latina y el Caribe (Jamaica) y Australia (Royal Botanic Gardens, Kew Living Collection, s.f, <https://www.kew.org/>). La planta crece en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo con sus principales productores India, China y Nigeria (Mengmeng Zhang et al., 2021). Crece en lugares que se encuentran desde el nivel del mar hasta los 1.900 m de altitud en los trópicos, sin embargo, puede cultivarse en lugares más elevados. Se puede colocar humus para un mejor desarrollo del cultivo. Necesita una precipitación anual de 1500 mm o más. Se desarrolla mejor donde hay una estación seca corta y una buena temperatura cálida (Food Plants International, s.f). En Ecuador, el jengibre se cultiva en Sucumbíos, Napo y Morona Santiago (BioWiki, s.f).

### **Importancia y composición.**

*Zingiber officinale* Roscoe. Históricamente se la ha conocido como medicina tradicional utilizada para la preparación de brebajes para la cura de enfermedades como el resfriado común (Mahomoodally et al., 2021b). Destaca por poseer uno de los rizomas comestibles medicinales más cultivados a nivel mundial (Mengmeng Zhang et al., 2021). El rizoma contiene una serie de compuestos bioactivos que otorgan las actividades farmacológicas y el valor nutraceútico del jengibre como principalmente los

compuestos fenólicos (componentes no volátiles como gingeroles (6-gingerol es el más abundante y se utiliza como indicador de calidad, shogaoles, y zingerona), y los componentes sesquiterpénicos que conforman el aceite esencial (1-4%) como Zingibereno (más abundante: 17-35%),  $\beta$ -Bisaboleno, farneseno, sesquifelandreno, curcumeno y fitoesteroles, vitaminas y minerales, además de proteínas, lípidos y carbohidratos como se muestra en la Tabla 3 y 4 (Gupta & Sharma, 2014; Yeh et al., 2014; Sharma et al., 2016; Liu et al., 2019; ). El olor aromático y sabor picante es debido al 6-gingerol, 6-shogaol y zingerona que poseen propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y antialérgicas (Mao et al., 2019).

### **Tabla 3**

*Valor nutricional del jengibre*

<b>Componentes</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor por 100 g de rizoma fresco</b>	<b>Referencia</b>
Humedad	g	78,89	Negrete & Secaira, 2016
Carbohidratos	g	17,77-38,35	Negrete & Secaira, 2016
Lípidos	g	0,75-3,72	Gupta & Sharma, 2014
Proteínas	g	1,82-5,08	Gupta & Sharma, 2014
<b>Vitaminas</b>			
Thiamina (B1)	mg	0,025	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Riboflavina (B2)	mg	0,034	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Niacina (B3)	mg	0,750	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Ácido pantoténico (B5)	mg	0,203	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Folato (B9)	ug	11,000	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Vitamina (B6)	mg	0,160	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Vitamina C	mg	5,000	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
Vitamina E	mg	0,260	Negrete & Secaira, 2016; Gupta & Sharma, 2014
<b>Ácidos orgánicos</b>			
Ácido cítrico	mg	0,040	Yeh et al., 2014
Ácido málico	mg	0,020	Yeh et al., 2014
Ácido oxálico	mg	14,130	Yeh et al., 2014
Ácido succínico	mg	0,060	Yeh et al., 2014

Ácido tartárico	mg	23,080	Yeh et al., 2014
<b>Minerales</b>			
Calcio	mg	16,000	Negrete & Secaira, 2016
Hierro	mg	0,600	Negrete & Secaira, 2017
Magnesio	mg	43,000	Negrete & Secaira, 2018
Fósforo	mg	34,000	Negrete & Secaira, 2019
Potasio	mg	415,000	Negrete & Secaira, 2020
Sodio	mg	1,000	Negrete & Secaira, 2021
Zinc	mg	0,340	Negrete & Secaira, 2022

*Nota.* Algunos datos fueron obtenidos de U.S Department of Agriculture (USDA)

**Tabla 4**

*Componentes del aceite esencial del jengibre*

<b>Aceite esencial</b>		
<b>Componentes</b>	<b>% Composición</b>	<b>Referencia</b>
Canfeno	6,27-9,14	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
Sabineno	8,16-10,67	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
$\alpha$ -Curcumeno	8,42-6,66	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
Zingibereno	17,55-20,85	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
$\alpha$ -Farneseno	4,77-7,42	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
$\beta$ -Sesquifelandreno	7,32-8,13	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014

Neral	6,74-8,00	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
Geranial	7,20-8,70	Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014
$\beta$ -Bisaboleno	11,4	Negrete & Secaira, 2016

**Tabla 5**

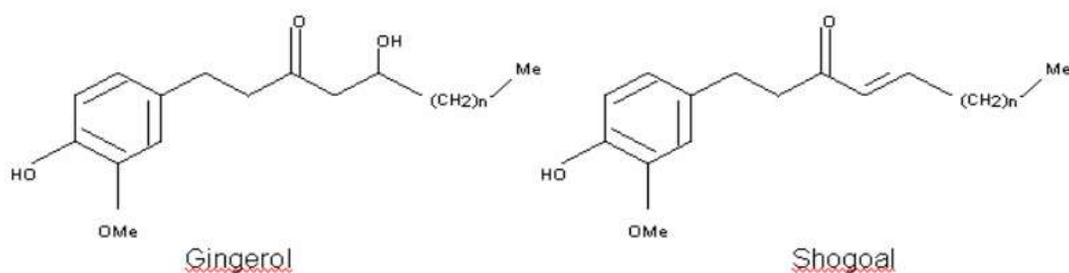
*Compuestos fenólicos presentes en el jengibre*

<b>Compuestos fenólicos</b>		
<b>Componentes</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor por 100 g de peso seco</b>
6-Shogaol	mg	1,41
6-Gingerol	mg	5,59
8-Gingerol	mg	0,34
10-Gingerol	mg	0,18
Curcumina	mg	2,32

*Nota.* Obtenido de Liu et al., 2019; Sharma et al., 2016; Yeh et al., 2014

**Figura 4**

*Estructura química de los principales compuestos fenólicos del jengibre*



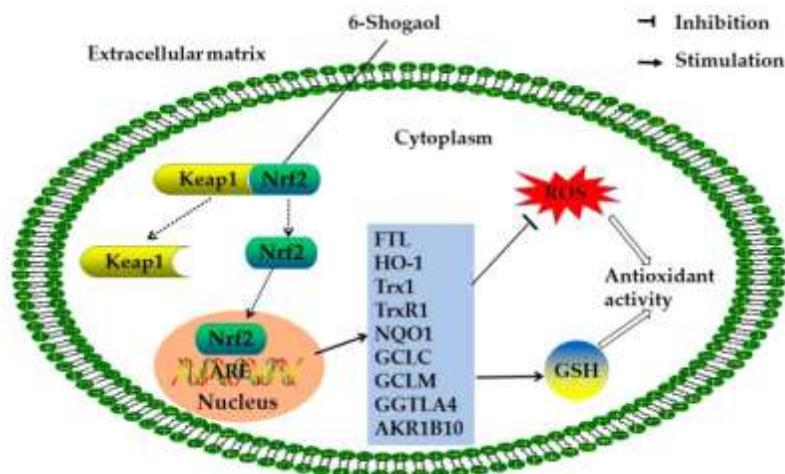
*Nota.* Obtenido de Gupta & Sharma, 2014.

### ***Vías activadas por los componentes del jengibre***

El 6-Shogaol activa la vía del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), que es un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes citoprotectores como se observa en la Figura 5. Keap1 actúa como una proteína adaptadora que se une a un complejo de ubiquitina ligasa para mediar la ubiquitinación y degradación de Nrf2, el 6-Shogaol modifica covalentemente los residuos de cisteína altamente reactivos mediante alquilación de Keap1 afectando la actividad del complejo de ubiquitina ligasa y aumentando la acumulación nuclear de Nrf2. Nrf2 regula la activación de genes como HO-1 (hemoxygenasa-1) y una serie de enzimas antioxidantes que incrementan el nivel de glutatión intracelular reduciendo los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Mao et al., 2019).

Figura 5

## Mecanismo antioxidante de 6-Shogaol

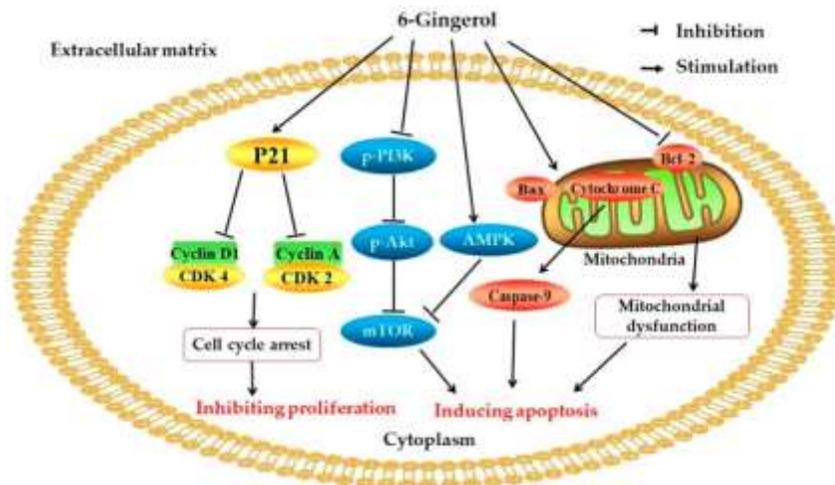


Nota. Obtenido de Mao et al., 2019

El 6-gingerol inhibe el crecimiento de las células de adenocarcinoma cervical humano (HELa) deteniendo el ciclo celular al activar el sensor y efector antiproliferativo p21. El gen p21 regula la proliferación celular al interrumpir el ciclo celular a través de la vía de la ciclina quinasa. p21 reduce los niveles de las ciclinas A y D1 al codificar un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina. Estas ciclinas son subunidades reguladoras de las holoenzimas CDK4 y CDK2 (quinasas dependientes de ciclinas) que promueven la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular, por lo tanto 6-gingerol detiene la proliferación celular como se muestra en la Figura 6. La proteína Bcl-2 impide la destrucción de la célula por la vía apoptótica pero el 6-gingerol inhibe a Bcl-2, aumenta la expresión de la caspasa 9 e inhibe la señalización de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR, sobreactivada en tumores) induciendo la apoptosis de las células cancerígenas (Mao et al., 2019).

Figura 6

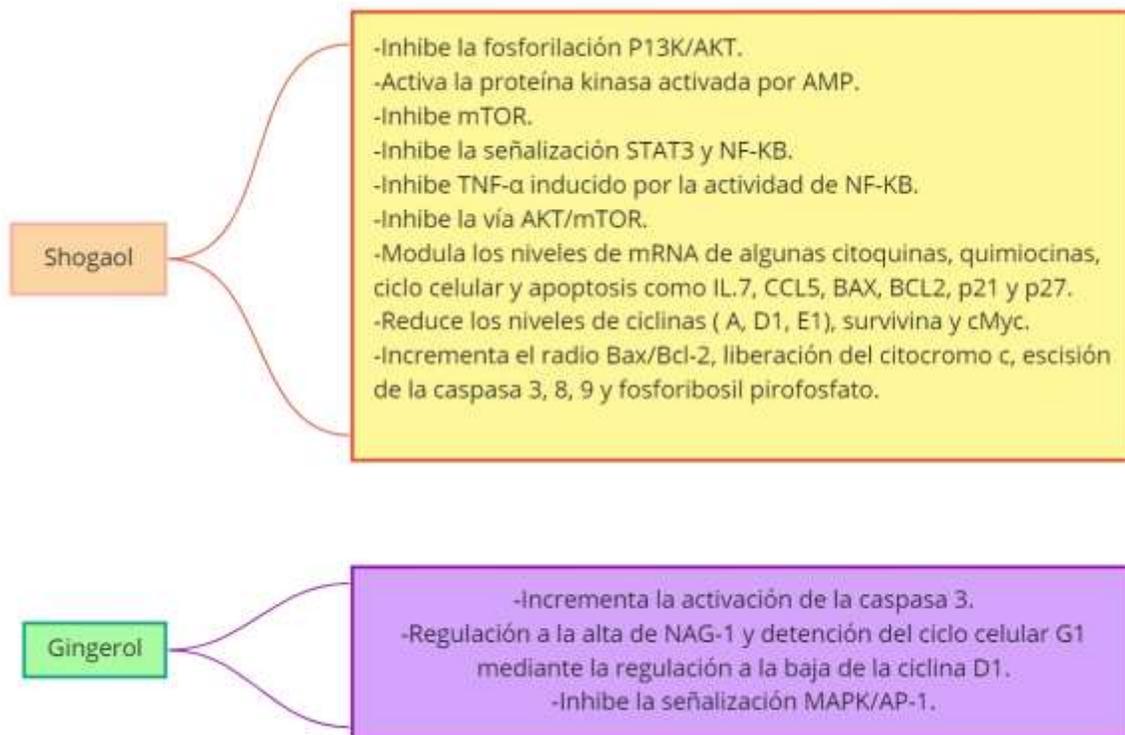
Mecanismo antioxidante de 6-gingerol



Nota. Obtenido de Mao et al., 2019

Figura 7

Mecanismos citotóxicos de acción de shogaol y gingerol



miro

Nota. Obtenido de Mahomoodally et al., 2021.

## ***Curcuma longa* L.**

### **Generalidades**

Es una planta herbácea perenne con rizomas oblongopalmeados, con una superficie rugosa y de color marrón pero internamente posee un color naranja. Tiene una altura de 3-5 pies, presenta hojas verdes largas, lanceoladas y pecioladas (Saiz de Cos, 2014). No produce semillas, por lo tanto, la planta se reproduce de forma vegetativa por esquejes a partir del rizoma. Sus flores son de color amarillo y la inflorescencia de color rosado. La temperatura y pH de crecimiento óptimo es de 27 °C y de 5-6 respectivamente en suelos franco fértil con textura bien drenada (Unidad Técnica de la Dirección de Agricultura – MIDA, 2021). El cultivo tiene una duración de 7-10 meses y se cultiva en campo abierto debido al alto requerimiento de luz para su desarrollo. La planta crece en regiones tropicales en zonas cálida-húmedas con elevaciones de 400 hasta 900 msnm con una precipitación de 2000 mm anuales (Unidad Técnica de la Dirección de Agricultura – MIDA, 2021) y al igual que el jengibre el rizoma es la parte más codiciada debido a sus propiedades farmacológicas y culinarias (Memarzia et al., 2021).

### **Taxonomía**

*Curcuma longa* L. es conocida como Turmeric (Inglés), cúrcuma (italiano y francés), Yuquilla, camotillo en Costa Rica, batatilla, camotillo en El Salvador, Zibru en Panamá y Cúrcuma en castellano y múltiples nombres de acuerdo al país donde se cultiva (García, 2019). Según el Sistema de Clasificación APG III del año 2009, se define como una planta monocotiledónea del Orden Zingiberales de la Familia Zingiberaceae al igual que el jengibre.

### **Tabla 6**

*Taxonomía de Curcuma longa* L.

---

Reino	Plantae
-------	---------

---

Filo	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida (= Monocotyledoneae)
Orden	Zingiberales
Familia	Zingiberaceae
Género	Curcuma
Especie	<i>Curcuma longa</i>

*Nota.* Obtenido de ipni.org

### Figura 8

*Curcuma longa* L.



*Nota.* De izquierda a derecha, rizoma y planta de Cúrcuma.

### **Origen y distribución**

La cúrcuma es originaria de Asia (India y Vietnam) (Bhawan Verma et al., 2018), se halla desde Polinesia y Micronesia hasta el sudeste asiático, creciendo en zonas de selva alta y selva baja (García,

2019). Se encuentra distribuida por América del sur y Centro América y el Caribe. El principal exportador de cúrcuma a nivel mundial es India con un 90% de las exportaciones (PROCOMER, s.f).

### ***Importancia y composición***

El rizoma tiene propiedades medicinales debido a los componentes bioquímicos que disponen de actividad farmacológica como el aceite esencial (2,4 %) con su principal componente  $\alpha$ -Turmerona, monoterpenos y Curcuminoides (2-5%) como la curcumina (más abundante), antocianinas, fenoles, taninos, proteínas y carbohidratos (Braga et al., 2003;S. Li, 2011). La curcumina es un polifenol amarillo con potente actividad antioxidante, anticancerígena y antimicrobiana ya que se ha demostrado que reduce las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentando la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, además provoca apoptosis y ralentiza la proliferación de líneas celulares cancerosas (M. Wang et al., 2019).

**Tabla 7**

*Valor nutricional de la cúrcuma*

<b>Componentes</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor por 100 g de rizoma fresco</b>
Agua	g	12,850
Proteínas	g	9,680
Lípidos	g	3,250
Carbohidratos	g	67,140
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina C	mg	0,700
Thiamina	mg	0,058
Riboflavina	mg	0,150
Niacina	mg	1,350

Vitamina B6	mg	0,107
Folato	mg	20,000
Vitamina E	mg	4,430
Vitamina K	mg	13,400
<b>Minerales</b>		
Calcio	mg	168,000
Hierro	mg	55,000
Magnesio	mg	208,000
Fósforo	mg	299,000
Potasio	mg	2080,000
Sodio	mg	27,000
Zinc	mg	4,500

*Nota.* Obtenido de Braga et al., 2003; Saiz de Cos, 2014; Negrete & Secaira, 2016

### **Tabla 8**

*Componentes del aceite esencial de cúrcuma y los Curcuminoides*

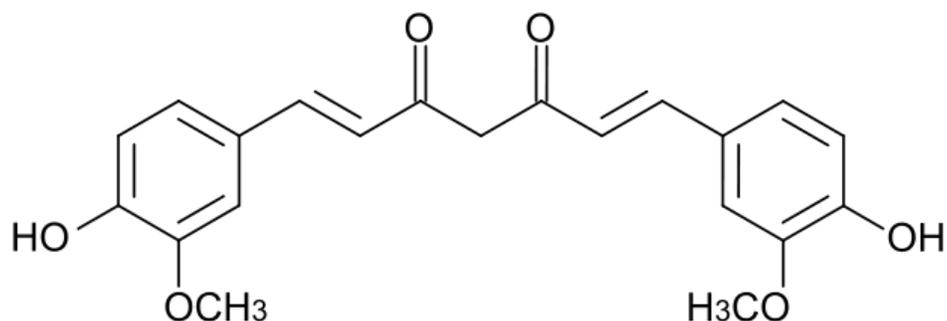
<b>Aceite esencial</b>		
<b>Componentes</b>	<b>% Composición</b>	<b>Referencia</b>
Curlona	13,82	Li, 2011
2-Careno	4,78	Li, 2011
Zingibereno	4,7-5,3	Li, 2011
$\beta$ -Sesquifelandreno	5,57	Li, 2011
ar-Turmerona	45,5	Pino et al., 2018
$\alpha$ -Turmerona	13,4	Pino et al., 2018
<b>Curcuminoides</b>		

Componentes	% peso seco
Curcumina	2,86
Demetoxicurcumina	1,47
Bidemetoxicurcumina	1,46
Total de Curcuminoides	5,69

*Nota.* Obtenido de Li, 2011

### Figura 9

*Estructura química de la Curcumina*



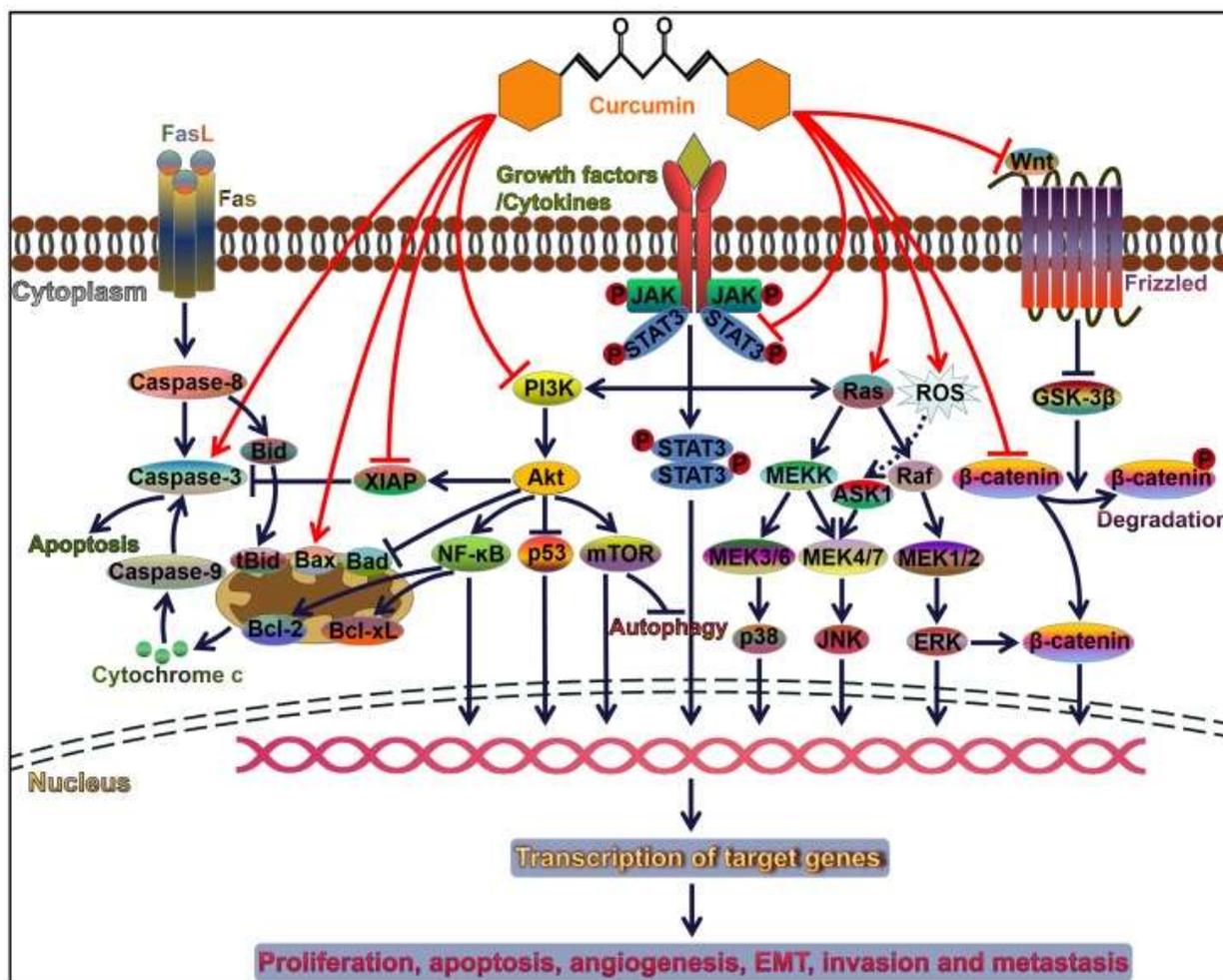
### ***Vías activadas por los componentes de la cúrcuma***

La Curcumina es uno de los componentes principales de la cúrcuma regula las vías de transducción de señales en el cáncer. Inhibe la vía PI3K/Akt por lo tanto aumenta la señalización de p53 y activa la vía apoptótica por BAD estimulando la apoptosis de las células cancerosas. Al detener Akt también se interrumpe la vía NF-kB que permite aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, por lo tanto, la Curcumina facilita la apoptosis al inhibir NF-kB y activar las caspasas. Cuando wnt se une al receptor Frizzled inhibe la activación de GSK-3  $\beta$  por lo que no fosforila a la  $\beta$ -catequina y no se degrada, por tanto, se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo estimulando la expresión de múltiples oncogenes y factores de transcripción que inducen EMT (transición epitelial-

mesenquimal). La curcumina impide que wnt se una al receptor Frizzled y GSK-3  $\beta$  fosforila a la  $\beta$ -catequina dando lugar a su degradación, evitando el proceso EMT en las células (M. Wang et al., 2019).

**Figura 10**

*Vías de transducción de señales reguladas por la Curcumina en células cancerosas*



*Nota.* Obtenido de Wang et al., 2019.

### Composición de los exosomas

Los exosomas derivados de plantas contienen lípidos, proteínas y material genético como mRNA y miRNA (Dad et al., 2021). A diferencia de los exosomas de mamíferos que están ampliamente

caracterizados, no existe base de datos que informen la carga exosomal proveniente de las distintas plantas, ya que variará de acuerdo a la planta en particular. Los marcadores universales de superficie exosomal de plantas no se han establecido. Las proteínas dentro de los exosomas y marcadores de superficie dependerán del tipo de célula del que se originan los exosomas. ExoCarta es una base de datos que contiene información de la composición de diferentes tipos de exosomas y Vesiclepedia posee anotaciones de las vesículas extracelulares, sin embargo, no existe una base de datos que recopile información sobre exosomas derivados de plantas. De forma general, la carga está compuesta de lípidos como ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y diacilglicerol. El primero es el que domina en la mediación de la absorción por parte de las células, fisión y fusión de membrana (Suharta et al., 2021). El ácido fosfatídico tiene la capacidad para dirigirse y estimular el receptor objetivo de la rapamicina en los mamíferos (mTOR). La vía mTOR es responsable del crecimiento, la proliferación, motilidad celular, síntesis de proteínas y transcripción (Gioia & Conese, 2020). Además, los lípidos de membrana cumplen el rol de entregar estabilidad a los exosomas. En el caso de las proteínas, aún no se establecen marcadores exosomales de plantas, pero se han encontrado proteínas como actina (actina 1, 7 y 101), anexina (anexina D1, D2 y A7/11), acuaporinas (PIP), cadena pesada de clatrina, proteínas de choque térmico, subunidades de las proteínas del complejo ESCRT-I como VPS28 y VPS38, tetraspaninas como (8, 9 y 18) y lectina II (proteína de unión a manosa) (Woith et al., 2019). En cambio, los miRNAs modifican la expresión génica de las células que absorben los exosomas y median la transferencia horizontal de genes.

### ***Composición de exosomas de jengibre y cúrcuma***

Los lípidos cumplen un papel clave en la absorción celular y una de las moléculas más frecuentes encontradas en las nano y microvesículas de jengibre y cúrcuma es el ácido fosfatídico (PA). Se ha demostrado en varios estudios que PA controla la fisión y fusión de la membrana por su grupo cargado

negativamente próximo a la cadena de acilo de la bicapa lipídica lo que le permite crear puentes de hidrógeno y su afinidad por los cationes divalentes (Mingzhen Zhang et al., 2016). Sundaram et al. (2019) demostró que PA es la principal molécula biológicamente activa que impide el desarrollo de *Porphyromonas gingivalis*. Se observó que PA es esencial en la captación de nanovesículas por *P. gingivalis* ya que PA interactúa con el dominio C terminal de los aminoácidos Arg y Lys de gingipaína, también con la proteína de unión a hemina (HBP35), flavoproteína de transferencia de electrones, esterasa y una lipoproteína de la bacteria oral patógena (Sundaram et al., 2019). Teng et al. (2018) evidenció que el PA de los exosomas derivados de jengibre (GELN) media la captación celular preferencial por *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) y una vez que absorbe los exosomas, se establece una interacción entre el RNA de GELN con los genes de LGG modificando la composición de la microbiota intestinal. Los glicolípidos como digalactosildiacilglicerol (DGDG) y monogalactosil monoacilglicerol (MGMG) que contienen los exosomas derivados de jengibre y cúrcuma cumplen una función estabilizadora durante los ciclos de congelamiento -descongelamiento en los liposomas que encapsulan fármacos (Mingzhen Zhang et al., 2016). En el estudio realizado por Chen et al. (2019), los lípidos fueron las biomoléculas responsables de inhibir la actividad del inflammasoma NLRP3 al ser extraídos de los exosomas de jengibre y ensamblados en liposomas, no fueron las proteínas ni los RNAs de las nanovesículas. Por lo tanto, los diversos estudios confirman que la composición lipídica determina la absorción por bacterias específicas y cumplen diversas funciones biológicas en la patogenicidad. La composición lipídica se determina en la mayoría de estudios utilizando espectrómetro de masas triple cuadrupolo.

La composición proteica se puede determinar mediante espectrometría de masas y cromatografía líquida (Karamanidou & Tsouknidas, 2022). Analizar el perfil proteómico permite demostrar la existencia de exosomas y determinar su capacidad terapéutica. El estudio realizado por Zhang y colaboradores, (2016) encontró en los exosomas derivados del jengibre mediante UPLC-MS un

bajo contenido de proteínas, en su mayoría destacan las proteínas citosólicas como actina y enzimas proteolíticas y pocas proteínas de membrana como transportadores o canales de membrana (acuaporinas y canales de cloruro). Chen et al. (2019) comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE que las proteínas de los exosomas derivados de jengibre tenían un rango de 10-70 KDa. C. Liu et al. (2022) aisló microvesículas derivadas de la cúrcuma mediante ultracentrifugación diferencial y en gradiente de sacarosa discontinuo que dio como resultado dos bandas con dos subpoblaciones TDNP1 y TDNP2, en el primero no se encontró ninguna proteína y en el segundo hubo proteínas citosólicas y de membrana como se muestra en la Tabla 9.

Los exosomas derivados del jengibre tienen un alto contenido de RNA siendo el componente principal de todo el ácido nucleico como los confirma en su estudio. Según Zhang y colaboradores (2016) encontraron 125 miRNAs en los exosomas derivados de jengibre con una longitud de 15-27 nts. De todos ellos, 124 están implicados en la regulación de la expresión de los genes humanos uniéndose a regiones 3' UTRs. Teng et al. (2018) hallaron 109 miRNA mediante un análisis de secuenciación de próxima generación de los exosomas derivados del jengibre que se dirigen a varios genes en *Lactobacillus rhamnosus*(LGG) alterando la microbiota intestinal y la fisiología del huésped entre esos el represor de transcripción LexA que disminuyó a nivel transcripcional y traduccional cuando se administró GELN-RNA. Mediante BLAST se identificó que el objetivo de gma-miR396e procedente de GELN era el ARNm de LGG LexA. LexA es un represor de los genes de respuesta SOS y su inhibición promovió el crecimiento de LGG (Teng et al., 2018). Xiao et al., (2018) estableció una biblioteca de miRNAs de frutas y verduras comestibles mediante secuenciación Illumina e identificó 418 miRNAs de todas las especies. Entre las plantas analizadas estaba el jengibre con un contenido de 32 miRNAs de 20-22 nts, se encontró un miR-1070 que tenía la capacidad de silenciar al gen de la IL-6 (citocina proinflamatoria).

Dentro de los compuestos bioactivos se encontró en GDNPS2 mayor contenido de 6-shogaol (2.95 ug/mg) y 6-gingerol (5.68 ug/mg) a diferencia con GDNPS1 (0.22 ug/mg y 0.56 ug/mg respectivamente) utilizando HPLC/MS. Este resultado demuestra que cada subpoblación exosomal tiene sus propias características bioquímicas. Este contenido se le ha atribuido la actividad antioxidante y antiinflamatoria (Zhang et al., 2016). En el estudio de C. Liu et al. (2022) se utilizó lipopolisacáridos (LPS) para inducir inflamación en macrófagos mediante la activación de la vía de señalización TLR4/MyD88 para averiguar el efecto *in vitro* de los exosomas derivados de cúrcuma (TDNP). Se evaluó la producción de citocinas proinflamatorias y de la hemooxigenasa (HO-1) con qPCR. Se encontró que ambas subpoblaciones TDNP1 y TDNP2 disminuían las citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  y aumentaban la expresión de HO-1, pero una mayor regulación de estos genes por TDNP2 atribuido por su mayor contenido de curcumina (TDNP1: curcumina 8.6+/-0.5 ug/mg y TDNP2: curcumina 16.8 +/-3.4 ug/mg). Por lo tanto, la curcumina presente en los TDNP tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio.

Los rizomas de cúrcuma y jengibre están disponibles en el mercado y en los supermercados del Ecuador. Debido a sus características medicinales y actividades antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria son atractivas para la investigación de exosomas como nanotransportadores en la administración de fármacos y como agentes terapéuticos enfocados en la diabetes. En Ecuador, 1 de cada 10 ecuatorianos entre los 50 y 59 años posee diabetes y se ha vuelto un problema de salud pública. Los tratamientos actuales de la diabetes tipo I en el país se basan en administrar por vía intravenosa la insulina recombinante humana o análogos de la insulina de acción lenta, intermedia y rápida, en consecuencia, el paciente tiene que recurrir a varios pinchazos por día y por lo tanto exista poca adherencia al tratamiento (L. Li et al., 2017; Bahman et al., 2019). Se ha vuelto una necesidad el desarrollo de nanotransportadores que mejoren las propiedades farmacocinéticas de la insulina, mejoren su biodistribución y biodisponibilidad por una vía de administración no invasiva como la oral o la sublingual. Por consiguiente, estudiar los exosomas de estas plantas, caracterizarlos y evaluar su

efecto citotóxico en líneas celulares permitirá investigar su posible aplicación como terapias dirigidas en la diabetes.

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería, el jengibre en el Ecuador es un cultivo en crecimiento. En el 2020 con la pandemia, el producto registró un ingreso por las exportaciones de \$ 3,82 millones (Zambrano, 2022). Según Roboan Gavilánez del Ministerio de Agricultura, el jengibre se cultiva en un área mayor a 100 hectáreas repartidas en las zonas de Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas (Quininde, La concordia, San Lorenzo), Guayas (El Triunfo), Pichincha y Los Ríos (Buena Fe, Valencia y Quevedo). Cada hectárea de cultivo produce mínimo alrededor 400-600 quintales de rizoma (40000-60000 kg). En el caso de la Cúrcuma, actualmente no se dispone de datos de su producción. Los valores mencionados permiten establecer una idea de la alta producción de jengibre que se genera en el país, lo cual permite destinar una parte de la producción a la obtención de exosomas derivados de este rizoma para su aplicación como agente terapéutico o vehículo de administración de fármacos. Los exosomas derivados de plantas tienen una alta producibilidad a gran escala debido a los altos rendimientos obtenidos (J. Kim et al., 2022).

**Tabla 9**

*Análisis lipídómico, proteómico, secuenciación y de composición de las nanovesículas derivadas de jengibre y cúrcuma*

Planta	Proteínas	Lípidos	RNA	Compuestos bioactivos	Referencias
<b>Jengibre</b>	Proteínas citosólicas (actina, actina-2, enzimas proteolíticas como cisteína proteasa gp3a, cisteína proteasa gp3b, ferritina, subunidades del	GDN1 (37.03% PA, 339,93% DGDG, 16.92% MGMG, 1.05% PS, 1.16% PI, 2.59% PC, 0.37% PG, 0.05% LisoPC, 0.06% LisoPG, 0.19% LisoPE) GDEN2 (40.41% PA, 32.88% GDGD, 19.65%	125 miRNAs (15-27 nts) <sup>3</sup>  Aly-miR-159a-3p, gma-miR166u, gma-miR166p <sup>5</sup>  109 miRNA <sup>6</sup>	GDNPS2 : 6-shogaol (2.95 ug/mg), 6-gingerol (5.68 ug/mg) <sup>3</sup>	<sup>1</sup> (Zhuang et al., 2015a) <sup>2</sup> (Mingzhen Zhang et al., 2016) <sup>3</sup> (Zhang M, Viennois E, Prasad M, Zhang Y,

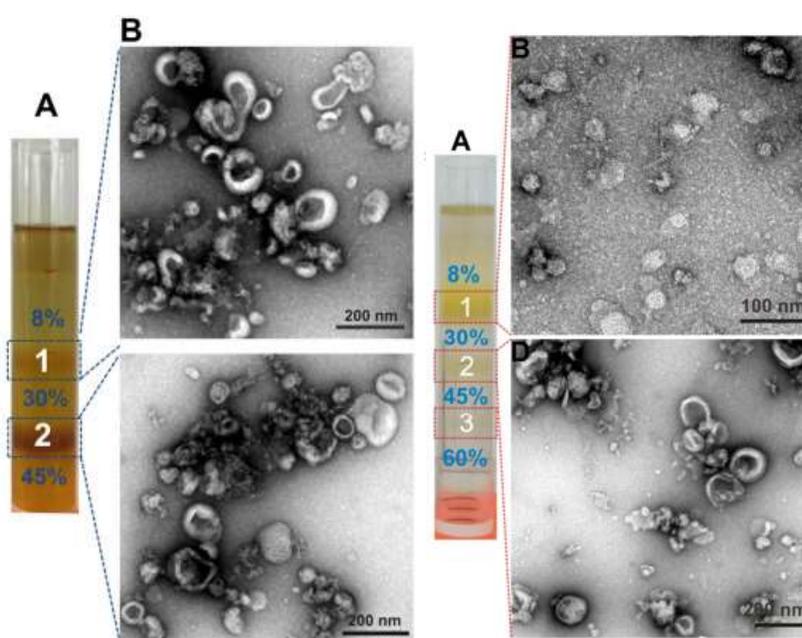
	<p>proteosoma, piruvato kinasa, tripsina, calmodulina, glutamina sintetasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, histonas, zingipaína 1 y 2) abundantes y pocas de membrana (acuaporinas PIP2, subunidades de ATP sintasa, canales de cloruro)<sup>3</sup></p> <p>Proteínas rango (10-70 kDa)<sup>7</sup></p>	<p>MGMG, 1.84% PS, 1.80% PI, 1.52% PC, 0.55% PG, 0.87% PE, 0.24% LisoPG, 0.04% LisoPC, 0.20% LisoPE)<sup>1</sup></p> <p>47% PA, 15% DGDG, 27% MGMG<sup>2</sup></p> <p>25-40% PA, 25-40% DGDG, 20-30% MGMG<sup>3</sup></p> <p>GDPN2: 41.9% PA, 27.4% DGDG, 18.9% MGMG, 6.5% PC, 3.5% PI, 0.7% LipoPC, 0.4% LipoPG, 0.1% LipoPE, 0.3% PG, 0.2% PS<sup>4</sup></p> <p>3% PI, 5% PA, 9% TAG, 3% DGDG, 5% MGMG, 7% PG, 15% PE, 48% PC, 3% LisoPG, 1% LisoPE, 1% LisoPC<sup>5</sup></p> <p>35.2% PA (828.73 nmol/mg)<sup>6</sup></p>	<p>miR-5054, miR-2916, miR-6300, miR-1078, miR-5072, miR-19d<sup>9</sup></p> <p>rlcv-miR-rL1-28-3p se une potencialmente a dos sitios del gen S y aly-miR396a-5p se une al Gen Nsp12<sup>10</sup></p>	<p>Wang L, Zhang Z, Han MK, Xiao B, Xu C, Srinivasan S, 2016)</p> <p><sup>4</sup>(Mingzhen Zhang et al., 2017)</p> <p><sup>5</sup>(Sundaram et al., 2019)</p> <p><sup>6</sup>(Teng et al., 2018)</p> <p><sup>7</sup>(Chen et al., 2019)</p> <p><sup>9</sup>(Xiao et al., 2018)</p> <p><sup>10</sup>(Teng et al., 2021)</p>
<b>Cúrcuma</b>	<p>TDNP2: Proteínas citosólicas y de membrana (calmodulina, maturasasa K, transportador de potasio, zingipaína-2, factor de elongación tu, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, aldosa-1-epimerasa, subunidad beta de ATP sintasa)<sup>8</sup></p>	<p>34.4% PA (506,54 nmol/mg)<sup>6</sup></p> <p>TDNP1: 51.2% DGDG, 12.6% MGMG, 10.7% PC, 12.7% PA, 11.1% PI, 0.1% PS, 0.7% PG, 0.3% LisoPG, 0.3% LisoPC, 0.1% LisoPE, 0.3% PE</p> <p>TDNP2: 41.6% DGDG, 12.3% MGMG, 15.5% PC, 19.7% PA, 8.5% PI, 0.3% PS, 0.7% PG, 0.0% LisoPG, 0.2% LisoPC, 0.2% LisoPE, 0.7% PE<sup>8</sup></p>	<p>TDNP1: curcumina (8.6+/-0.5 ug/mg)</p> <p>TDNP2: curcumina (16.8 +/-3.4 ug/mg)<sup>8</sup></p>	<p><sup>6</sup>(Teng et al., 2018)</p> <p><sup>8</sup>(C. Liu et al., 2022)</p>

*Nota.* Nomenclatura: PA (ácido fosfatídico), DGDG (digalactosildiacilglicerol), MGMG (Monogalactosil Monoacilglicerol), PG (fosfatidilglicerol), PC (fosfatidilcolina), PI (fosfatidilinositol), PS (fosfatidilserina), PE

(fosfatidiletanolamina), LisoPG (Lisofofatidilglicerol), LisoPC (Lisofosfatidilcolina), LisoPE (Lisofosfatidiletanolamina), TAG (triacilglicerol). Porcentaje de lípidos con respecto a los lípidos totales.

**Figura 11**

*Caracterización morfológica de exosomas derivados de cúrcuma (TDNP, izquierda) y de jengibre (GDNP, derecha) mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM)*



*Nota.* Bandas formadas de la purificación mediante ultra centrifugación en gradiente de sacarosa. Tinción utilizada para los exosomas derivados de jengibre acetato de uranilo al 1%. Obtenido de Zhang et al., 2016 y C. Liu et al., 2022

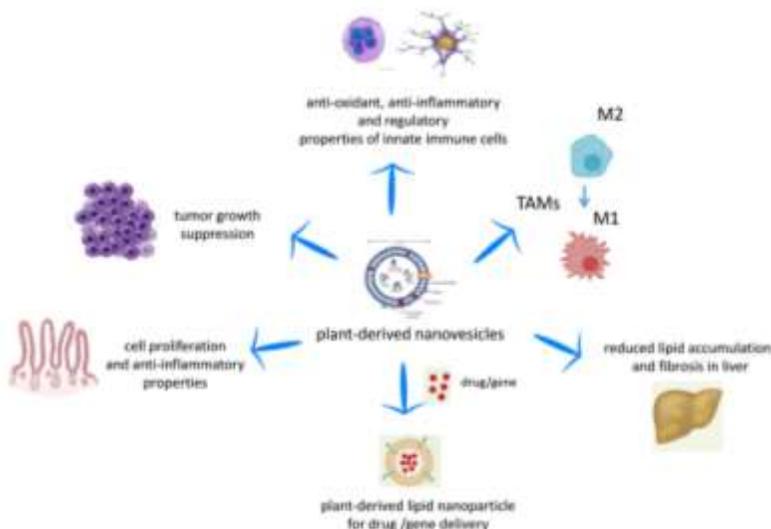
### **Funciones biológicas de los exosomas**

Los exosomas derivados de plantas realizan la comunicación celular, procesos fisiológicos normales, la respuesta inmune y la defensa. Los exosomas liberados por las células madres inducen la regeneración y proliferación celular. Regulan la homeostasis entre la inmunidad y el microbiota

intestinal mediante la comunicación entre reinos (Dad et al., 2021). Son capaces de liberar su carga como miRNAs regulando la expresión génica de las células receptoras (Kalarikkal & Sundaram, 2021).

**Figura 12**

*Propiedades biológicas de los exosomas derivados de plantas*



*Nota.* Obtenido de Gioia & Conese, 2020.

## Métodos de aislamiento y purificación

### *Ultra centrifugación*

La ultra centrifugación (diferencial y en gradiente de densidad) es la técnica gold standard en aislamiento y purificación de exosomas debido a que se obtiene un alto grado de pureza de la muestra (Alzhrani et al., 2021). La ultra centrifugación diferencial se basa en la separación de partículas en base a su densidad, tamaño y forma. Primero se eliminan las células grandes mediante centrifugaciones seriadas de baja velocidad y luego se incrementa la velocidad y duración hasta llegar a la ronda final con una

velocidad de 100 000 g durante 1 hora para recuperar el sedimento que contiene los exosomas (Akuma et al., 2019). (Suharta et al., 2021).

La ultracentrifugación en gradiente de densidad utiliza una solución de sacarosa en diferentes concentraciones o cloruro de cesio u otro material para separar los exosomas según su distribución de tamaño, masa y densidad. Las partículas alcanzan la capa de soluto que es igual en densidad donde dejan de moverse (separación isopícnica) (Suharta et al., 2021). El material se distribuye de forma desigual organizándose en diferentes capas: la capa superior tiene menor concentración (menor densidad), y la capa inferior posee una mayor densidad, por lo tanto, se retienen las partículas más densas. Se ha reportado que la densidad exosomal reportada se encuentra entre 1,10-1,21 g/ml (Yi Zhang et al., 2020). Una de las desventajas de esta técnica es que se requiere un equipo costoso, se obtiene baja eficiencia y rendimiento, pero una alta pureza. Todas las centrifugaciones se deben realizar a 4 °C.

### ***Ultrafiltración***

Esta técnica se utiliza para la purificación de exosomas, como un paso posterior a una ultracentrifugación o precipitación. Este método se basa en el uso de filtros con tamaños de poro de 0,8; 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  y nanomembranas ultrafinas que poseen un límite de peso molecular de 10 hasta 100 kDa, por lo tanto, la separación se fundamenta en el tamaño o peso molecular (Ayala-Mar et al., 2019). Además, la presión aplicada durante la técnica hace que las vesículas más grandes se descompongan en vesículas con tamaños similares a los exosomas causando contaminación. La ultrafiltración es más rápida que la ultracentrifugación y no requiere tener un equipo especializado (Suharta et al., 2021).

Se puede realizar una ultrafiltración secuencial que empieza utilizando un filtro de membrana de 100 nm para eliminar los restos celulares. Existen componentes grandes y maleables que pueden atravesar el filtro incluso si su diámetro es mayor a 100 nm (P. Li et al., 2017). Luego el filtrado se

somete a una ultrafiltración tangencial con un corte de peso molecular 500 kDa y pasa por una diafiltración para reducir los contaminantes. Finalmente se realiza una ronda final de ultrafiltración con un tamaño de poro de 100 nm para eliminar vesículas extracelulares mayores a ese tamaño (P. Li et al., 2017). Se lavan los filtros de membrana al final de cada paso para maximizar la recuperación de los exosomas.

### ***Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)***

Las columnas SEC contienen un recubrimiento que actúa como fase estacionaria con un tamaño de poro que permite clasificar las partículas en base al tamaño utilizando únicamente la fuerza de gravedad. Cuando el radio hidrodinámico del exosoma es más grande que el tamaño de poro, el exosoma no puede ingresar por el poro y por lo tanto se eluye más rápido que las partículas o vesículas con radio hidrodinámico más pequeño que ingresa en el poro y tienen una elución tardía (Suharta et al., 2021). Una ventaja de esta técnica es que permite conservar la bioactividad y la estructura del exosoma sin alterar el tamaño vesicular.

Se suele utilizar en combinación con la ultra centrifugación para purificar en mayor medida los exosomas. Se han elaborado kits comerciales como qEV (Izon) y PURE-EVs (Hansa Biomed) basados en cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas (Alzhrani et al., 2021). Una de las desventajas del método es el volumen de muestra a utilizar que depende del volumen de la columna y el rendimiento es menor que otras técnicas cuando se utiliza sola. Además, no permite separar exosomas que tengan el mismo tamaño que otras vesículas como microvesículas, agregados de proteínas, lipoproteínas, partículas o macromoléculas de la muestra (Gurunathan et al., 2019).

### ***Inmunoadfinidad***

Este método se basa en el uso de la interacción antígeno-anticuerpo. La proteína objetivo debe estar presente en la membrana del exosoma y no en otras vesículas y debe estar ausente como proteína soluble en el medio (Suharta et al., 2021). Sin embargo, este método tiene la desventaja que para su funcionamiento correcto se necesita conocer sobre la composición de la superficie es decir sobre los marcadores exosomales de plantas que actualmente no existe una amplia información. Además, la alta especificidad del método no permitiría aislar exosomas en una población exosomal heterogénea (Akuma et al., 2019).

Se utilizan perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina que se enlazan con anticuerpos de captura biotinilados que se dirigen a los marcadores de superficie de los exosomas. Por lo general, se utiliza anticuerpos anti-CD63, anti-CD81 y anti-CD9 para extraer los exosomas (Gurunathan et al., 2019). La desventaja de este proceso es que luego se debe separar los anticuerpos de los exosomas lo que involucra pasos de purificación.

### ***Precipitación***

Se utiliza un polímero para atrapar a los exosomas y posteriormente precipitarlos de la muestra. Generalmente se utiliza polietilenglicol (PEG, peso molecular 8000 Da) que retiene el agua y precipita partículas menos solubles (P. Li et al., 2017). Las muestras se incuban con una solución que posee PEG y luego se dejan a 4 °C durante la noche, posteriormente se realiza una centrifugación de baja velocidad o filtración para aislar el precipitado que contiene los exosomas (Li et al., 2017). Una limitante del método es que puede coprecipitar también junto con los exosomas otras partículas como vesículas y agregados o complejos de proteínas. Este problema de contaminación se puede superar utilizando pasos posteriores de ultracentrifugación o filtración. Existe un kit disponible en el mercado para aislar exosomas basado en precipitación como ExoQuick™ (System Biosciences) (Suharta et al., 2021).

## **Métodos de caracterización de exosomas**

### ***Microscopía electrónica***

El microscopio electrónico permite observar la estructura morfológica del exosoma (Yi Zhang et al., 2020). La microscopía electrónica de transmisión (TEM) entrega la estructura interna del exosoma y la distribución de tamaño del mismo mediante el paso de un haz de electrones a través de la muestra que produce electrones secundarios (Gurunathan et al., 2019). Además, TEM permite validar la existencia de exosomas en la muestra. La microscopía electrónica de barrido (SEM) escanea la muestra con un haz de electrones fino entregando información de la superficie (Zhou et al., 2020). SEM genera una imagen tridimensional de los exosomas, en cambio TEM produce una imagen bidimensional. A diferencia del SEM, la preparación de la muestra en el TEM es más compleja e involucra varios pasos. Este método proporciona información solo de tipo cualitativa.

### ***Ensayo NTA***

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) por el equipo NanoSight permite obtener la distribución de tamaño de los exosomas y su concentración en tampones acuosos. Incluso permite caracterizar subpoblaciones de exosomas mediante el uso de fluorescencia. Analiza el tamaño de nanopartículas entre 10-1000 nm, con un rango de concentración de  $10^6$ - $10^9$  partículas por mL y mide 1000 partículas en 60 segundos (Malvern Panalytical, s.f).

### ***Dispersión de luz dinámica (DLS)***

También denominada espectroscopía de correlación de fotones, es una técnica alterna para medir el tamaño de los exosomas dentro de un rango de diámetro desde 1 nm hasta 6  $\mu$ m (Gurunathan et al., 2019). Este método es altamente sensible y de alto rendimiento de exosomas. No permite visualizar las partículas, no entrega información bioquímica y morfológica de los exosomas. Esta técnica

es eficiente para soluciones homogéneas de exosomas, ya que la heterogeneidad hace que las partículas pequeñas sean imperceptibles, ya que las vesículas grandes dispersan más la luz (Alzhrani et al., 2021).

### ***Citometría de flujo***

Permite realizar una caracterización molecular cuantitativa mediante la detección de los biomarcadores exosomales. Se basa en el paso de un láser sobre la solución de exosomas y estos a su vez dispersan la luz que es localizada por múltiples detectores. La luz dispersada hacia adelante da información sobre el tamaño de los exosomas, mientras que la luz dispersada hacia los lados muestra información sobre su composición y granularidad (Alzhrani et al., 2021). El límite de detección es de 400 nm, sin embargo, se han desarrollado citómetros de flujo con una mayor sensibilidad, amplificación fluorescente e imágenes de alta resolución (Khatun et al., 2016). Para el análisis de expresión de proteínas exosomales específicas se utilizan anticuerpos marcados con fluoróforos.

### ***Cuantificación de proteínas mediante Bradford/Ácido bicinonínico (BCA)***

Los ensayos colorimétricos que permiten medir la concentración de proteínas totales son BCA y Bradford. El ensayo de BCA se basa en el principio de reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por acción de las proteínas presentes en la muestra. El ácido bicinonínico (BCA) es un agente quelante que compleja al ion  $\text{Cu}^{+1}$  formado produciendo un color púrpura que es medido a 562 nm (Walker, 1994).

El ensayo de Bradford se basa en la unión de las proteínas al reactivo azul de Coomassie en condiciones ácidas produciendo un cambio de color de marrón a azul que se mide a 595 nm. Mide la presencia de residuos de aminoácidos como histidina, arginina y lisina. Para la cuantificación con este reactivo la masa de la proteína debe ser mínimo de 3 KDa (Thermo Fisher Scientific – US, s.f).

Tabla 10

*Ventajas y desventajas de los ensayos de BCA y Bradford*

<b>Tipo de ensayo</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
BCA	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Menos sensible a los detergentes o tensioactivos iónicos y no iónicos.</li> <li>-Alta sensibilidad.</li> <li>-No se ve afectado por la composición de las proteínas, por tanto, una mayor uniformidad de los resultados de proteína a proteína.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Los agentes reductores (DTT, BME) y quelantes interfieren con los resultados ya que se unen al cobre reducido.</li> <li>-Requiere tiempo de incubación.</li> </ul>
Bradford	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rápido, no requiere de tiempo de incubación.</li> <li>-No es sensible a los agentes reductores y quelantes.</li> <li>-Mide la absorbancia con la luz visible, por tanto, no es necesario un espectrofotómetro UV.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sensible a los detergentes iónicos, ya que se unen al colorante Coomassie.</li> <li>-Azul de coomassie es ácido por tanto no es adecuado para proteínas que no resisten un medio ácido o tienen poca solubilidad.</li> </ul>

### **Western blot**

El objetivo del western blot es detectar las proteínas marcadoras exosomales. Permite detectar proteínas internas como de superficie de los exosomas. Hace una detección cualitativa y cuantitativa de los exosomas. Una de las desventajas de esta técnica es la complejidad de operación y el tiempo que requiere. Con la inmunotransferencia se puede confirmar la identidad de los exosomas aislados (Alzhrani et al., 2021).

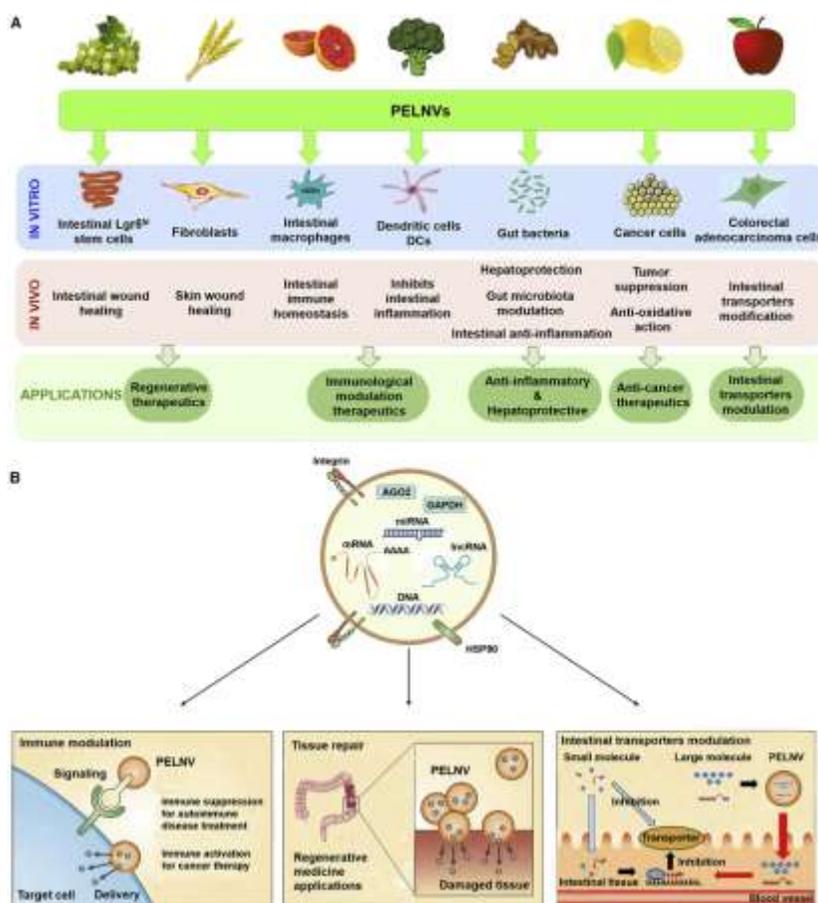
En este estudio, para caracterizar los exosomas derivados de jengibre y cúrcuma se utilizó las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para visualizar su morfología, electroforesis vertical para analizar el perfil proteico, ensayo de Bradford para obtener una concentración aproximada de exosomas y western blot para garantizar la existencia de exosomas después de la etapa de aislamiento y purificación.

## Aplicaciones de los exosomas derivados de plantas

Las aplicaciones de los exosomas derivados de plantas se describen en la Figura 13. Las principales aplicaciones de los exosomas en la nano medicina son como potenciales agentes terapéuticos, vehículos de administración de fármacos y la administración dirigida de agentes terapéuticos (J. Kim et al., 2022). Los exosomas vegetales han demostrado tener un efecto terapéutico beneficioso asociado a su carga y por su orientación natural específica al tejido dado por las proteínas y lípidos que se encuentran en la membrana. En un modelo de colitis *in vivo* de ratón inducido por dextrano sulfato de sodio se demostró que los exosomas de uva con un tamaño entre 50-300 nm se transportan dentro del intestino y son absorbidas por las células madres intestinales promoviendo la proliferación de las mismas (Ju et al., 2013). Los exosomas derivados de jengibre con un tamaño de 102-998 nm demostraron proteger al hígado del daño causado por el alcohol debido a la activación del factor nuclear Nrf2 que disminuye las vías de inflamación. Los exosomas se acumularon en el hígado y viajaban por el sistema vascular, lo que indica la capacidad natural inherente de los exosomas para trasladarse a los tejidos objetivos con una orientación específica de sitio (Zhuang et al., 2015). Además, los exosomas vegetales poseen una alta estabilidad en la circulación sanguínea. Los exosomas derivados de la toronja administrados por vía oral demostraron dirigirse al intestino delgado y grueso y atacaron a los macrófagos intestinales en mayor medida que los liposomas disponibles comercialmente, por lo que hubo una reducción de los signos de inflamación (Q. Wang et al., 2013). La membrana exosomal se puede modificar para incorporar ligandos y mejorar la especificidad hacia el tejido y aumentar el efecto de direccionamiento que se comprueba mediante estudios de biodistribución y absorción celular *in vitro* como *in vivo* (J. Kim et al., 2022).

Figura 13

## Aplicaciones actuales de los exosomas derivados de plantas



Nota. Obtenido de Dad et al., 2021.

### Capítulo III: Materiales y Métodos

#### Localización geográfica

El trabajo de integración curricular se ejecutó en el Laboratorio de Inmunología perteneciente al departamento de Ciencias de la Vida y de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Investigación de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ubicado en la Av. El Progreso s/n en Sangolquí, cantón Rumiñahui, Pichincha, Ecuador.

### **Preparación de la muestra**

Se adquirió las raíces de jengibre y cúrcuma frescos de un mercado local ubicado en Sangolquí. Se lavaron tres veces, se extrajo la cáscara y se molió 461 g y 700 g de raíces de cúrcuma y de jengibre respectivamente en un extractor. Se obtuvo alrededor de 300 ml de extracto que se almacenó a 4 °C previo a la centrifugación seriada.

### **Aislamiento y purificación de exosomas**

Se diluyó la muestra en proporción (1:1) colocando 7.5 ml de PBS 1X y 7.5 ml de muestra de extracto de jengibre y cúrcuma en tubos de 15 ml. Se homogeneizó mediante vortex. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron secuencialmente a 4 °C (UNIVERSAL 320 R) a 400g durante 20 min para eliminar células y desechos de gran tamaño, se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 800g durante 20 min descartando los restos celulares. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó a 10000g durante 40 min. El pellet obtenido que corresponde a las microvesículas se resuspendió en 500 uL de PBS 1X y se almacenó a -20 °C. El sobrenadante obtenido de la última centrifugación se almacenó a 4 °C para su posterior purificación. Se mantuvo las muestras durante la centrifugación seriada a 4 °C para evitar la degradación de proteínas. Antes de la purificación por columna se pasó los sobrenadantes obtenidos de las centrifugaciones seriadas por filtros secuenciales de 1.1, 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ .

Se purificó los exosomas derivados de los rizomas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) utilizando las columnas qEVOoriginal Izon Science ( $\leq 1 \text{ ml}/70 \text{ nm}$ ). Se equilibró la columna con 10 mL de PBS 1X (filtrado con 0,22  $\mu\text{m}$ ) antes de su uso. Se registró el caudal inicial utilizando PBS 1X para saber cuándo se debe limpiar la columna. Luego, se pipeteó 500 uL de sobrenadante de las muestras obtenidas de la centrifugación seriada de jengibre y cúrcuma sobre la columna y se recogieron 30 fracciones de 500uL c/u en tubos de 2mL. Durante la elución se añadió buffer PBS 1X. Una vez que se

recolectó todas las fracciones deseadas se lavó la columna con 20 mL de PBS 1X antes de cargar la próxima muestra. La concentración de proteína de las fracciones recolectadas se cuantificó mediante espectrofotometría en *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™ J999)*. Se descubrió en la muestra de jengibre y de cúrcuma que los primeros 3 mL y 6 mL son el volumen vacío que contiene partículas grandes que no ingresan a la matriz porosa de la columna (> 1µm). Los exosomas eluyen en los primeros 1-3 mL después del volumen vacío, es decir se encuentran en las fracciones (F7-F11) para jengibre y (F12-F16) para cúrcuma. Se realizó el mismo procedimiento cinco veces para la muestra de jengibre y cuatro veces para la de cúrcuma. Se cuantificó por espectrofotometría en *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™ J999)*

Se concentró los exosomas con tubos Amicon<sup>R</sup> Ultra-4 (≤ 4 ml, Millipore Sigma) 100K (100 000 MWCO) presentes en las fracciones (F7-F11) para jengibre, (F12-F16) para cúrcuma y (F17-F25) en ambas muestras. Se centrifugó a 5000g durante 10 minutos a 4 °C. A partir de 4 ml de muestra se obtuvo concentrados de 40-60 µL. Se recuperó el concentrado y el filtrado y se cuantificó mediante espectrofotometría en *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™ J999)* y ensayo de Bradford. Las muestras con mayor contenido proteico se almacenaron a -20 °C.

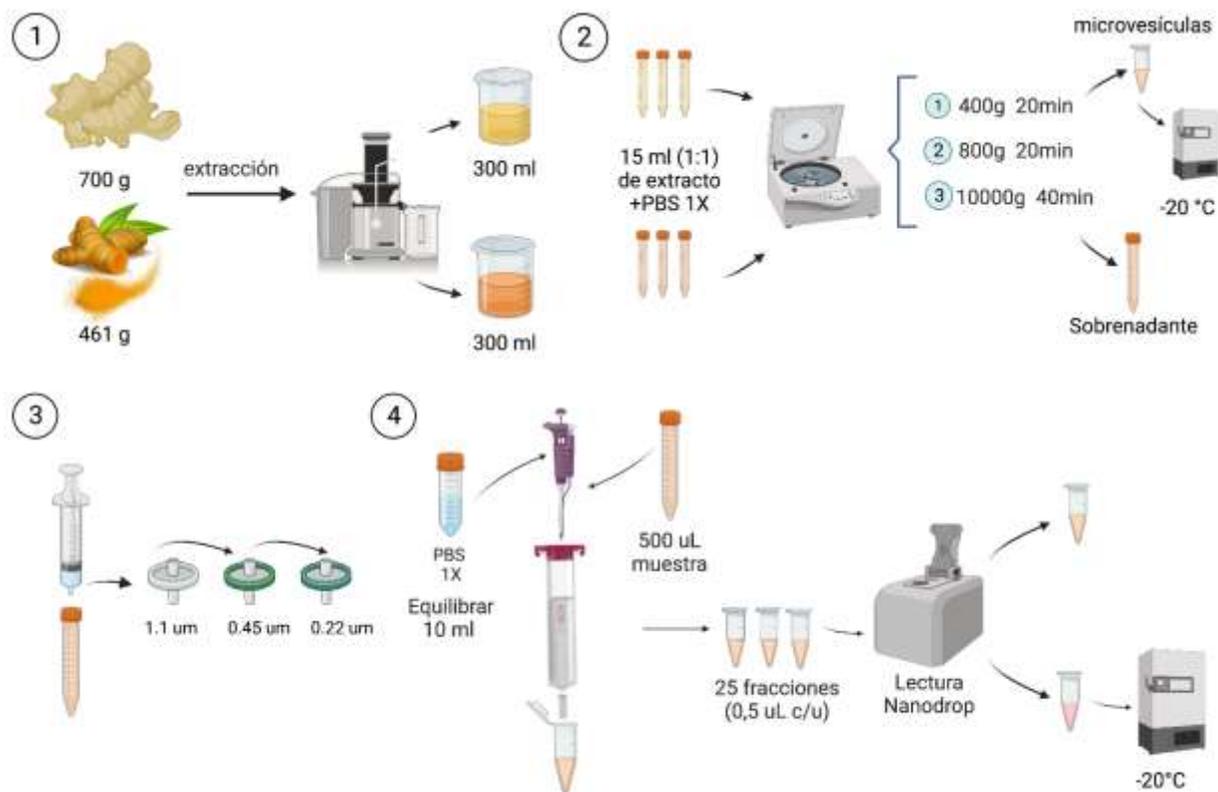
**Figura 14**

*Centrifugaciones seriadas de la muestra de cúrcuma y jengibre y purificación de los exosomas mediante columna qEV Original*



Figura 15

*Procedimiento de aislamiento y purificación de exosomas de muestras de jengibre y Cúrcuma*



*Nota.* Obtenido de Biorender.com

### Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Bradford

La concentración de proteínas de las muestras obtenidas de la concentración se determinó mediante el ensayo de Bradford (Thermo Scientific Coomassie Bradford Protein Assay Kit N°23200). Se elaboró el plan de placa de 96 pocillos utilizando duplicados de los concentrados, filtrados y proteína estándar. Se utilizó para el ensayo como proteína estándar albumina de suero bovino (BSA) (concentración inicial 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y de blanco PBS 1X. Primero se cargó 5  $\mu\text{L}$  de las muestras (concentrados y filtrados) y de PBS 1X en los pocillos según el plan de placa. Luego se preparó la gamma de proteína estándar BSA en un rango de concentraciones de 0-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluyendo en PBS 1X y se

colocó un volumen final de 5uL en los pocillos. Se añadió 250 uL de la solución de trabajo a toda la placa (incluido muestras, blanco y proteína estándar), homogenizando por pipeteo. Se cubrió la placa con parafilm y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas (Thermo Scientific). Se realizó los cálculos para obtener la concentración de proteínas.

Se obtuvo el promedio del blanco ( $A_{\text{blanco prom 595}}$ ) y para el cálculo de la absorbancia neta (NET Abs<sub>595</sub>) se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{NET Abs}_{595} = A_{595 \text{ muestra}} - A_{\text{blanco prom 595}}$$

Se generó una curva de calibración de NET Abs<sub>595</sub> vs [Proteína estándar] para determinar la ecuación de la curva y calcular la concentración de proteína en las muestras en ug/mL. La ecuación generada para el cálculo final de la proteína es de tipo:

$$y = mx + b$$

Siendo:

y= absorbancia neta medida a 595 nm (NET Abs<sub>595</sub>);

x= concentración de proteína en ug/ml

Despejando x se obtiene la ecuación para el cálculo de la concentración de proteína:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

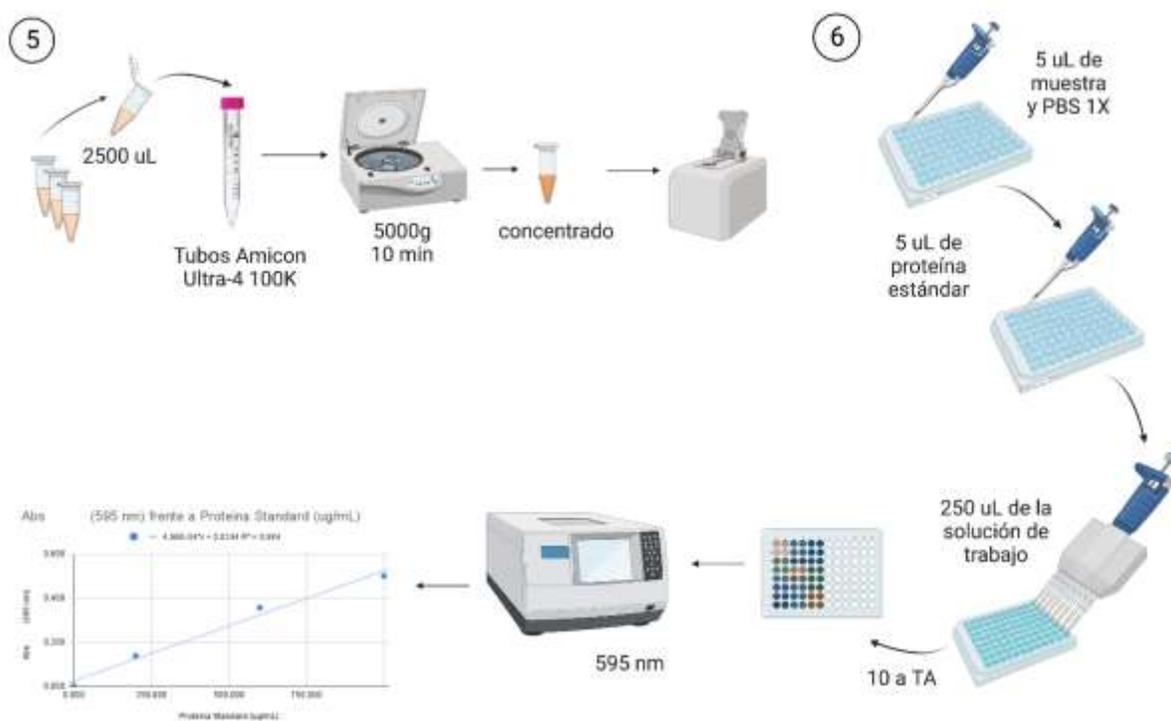
Para las muestras diluidas se aplica la ecuación final:

$$[\text{Proteína}] = x * FD$$

Donde FD es el factor de dilución.

Figura 16

Procedimiento de concentración de exosomas y cuantificación de proteínas



Nota. Obtenido de Biorender.com

## Western Blot

### Electroforesis vertical

Se preparó alícuotas de las muestras de los concentrados de exosomas, microvesículas y sobrenadante de cúrcuma y jengibre para obtener 2ug de proteína total con un volumen calculado mediante la ecuación:

$$V = \frac{\text{Cantidad de proteína (ug)}}{\text{Concentración } \left(\frac{\text{ug}}{\text{mL}}\right)} * \frac{1000 \text{ uL}}{1 \text{ mL}}$$

Las muestras se prepararon bajo condiciones desnaturizantes (SDS + calor). El volumen calculado para 2ug de proteína se diluyó con buffer RIPA (Santa Cruz Biotechnology) en proporción 1:5.

Se homogeneizó la solución durante 10 minutos en vortex. Se colocó buffer de carga 4x (SDS 0.8g, glicerol 4 ml, azul de bromofenol 40 mg, 2-mercaptoetanol 800 uL, Tris- HCl 0,5M, pH 6.8 5ml y dH<sub>2</sub>O) en proporción (1:2). Se realizó un spin de las muestras y se incubaron durante 5 min a 95 °C, verificando que los tubos estén bien cerrados. Se enfrió la muestra a 4 °C durante 5 min y se volvió a realizar spin. Se armó el sistema de electroforesis (Sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad Ref.:1658004) y una vez preparado el gel de poliacrilamida al 12% se colocó el buffer de electroforesis 1X (Tris base 25mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%). Se procedió a cargar las muestras y el marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (3uL, rango: 10-250 kDa, Bio-Rad, N° catalogo:161-0373) en los pocillos. La corrida electroforética se realizó a 120V, 300 mA durante 90 min.

#### ***Transferencia de proteínas a membrana en medio semi-seco***

Para la transferencia de proteínas en medio semi-seco se utilizó el equipo *Trans-Blot Turbo* (Bio-Rad). Primero se prehumedeció el papel Whatman en buffer de transferencia *Towbin* (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH: 8,3) a 4 °C. A continuación, se equilibró el gel en buffer de transferencia durante 15 min. Al mismo tiempo, se cortó la membrana PDVF (0,45 um, GE Healthcare Life science N° Catálogo 10600023) del mismo tamaño que el gel. Se humedeció la membrana durante 30s en metanol al 98% y luego durante 2 min en agua destilada. Posteriormente, se colocó la membrana en buffer de transferencia durante 5 min. Se ensambló el sánduche de transferencia sobre la base del cassette (polo positivo), colocando una pieza de papel Whatman de 0,8 mm (previamente humedecida en buffer de transferencia), la membrana de PDVF, el gel y nuevamente una pieza de papel Whatman. Se eliminó las burbujas del sánduche con un rodillo y se cerró el cassette colocando la tapa (polo negativo). Se colocó el cassette en el *Trans Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Ref.: 1704155) y se programó 3 ciclos de 7 minutos a 2,5 A y 25 V.

### ***Inmunomarcaje de proteínas***

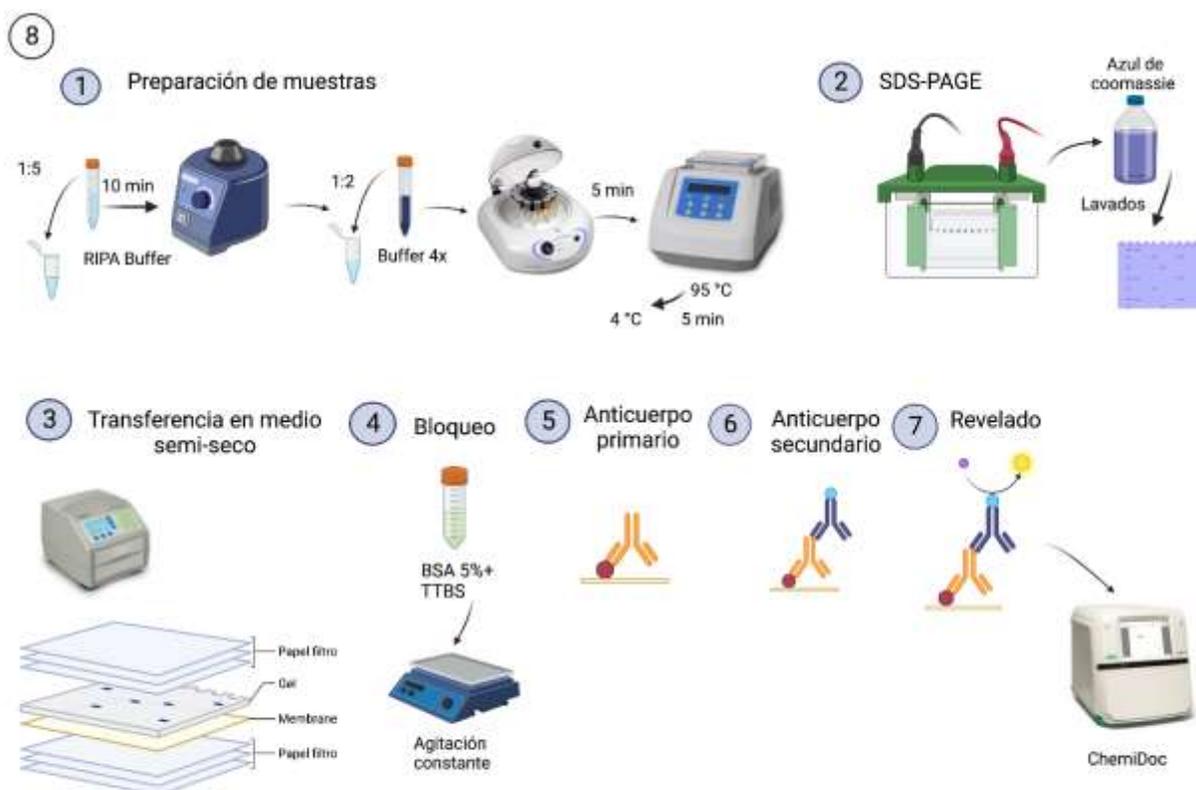
Se incubó la membrana dentro de un tubo de 50 mL en 3 mL de solución de bloqueo (BSA 5%, buffer TTBS (buffer TBS + Tween 20 al 0,1%)) durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente, se realizaron seis lavados de 5 minutos c/u con buffer TTBS en agitación constante.

Se incubó la membrana con cada uno de los anticuerpos primarios CD81 (Ig de ratón), CD9 (Ig de conejo) y CD63 (Ig de ratón) a una concentración de 1:1000 para todos, cada uno se preparó diluyéndolo en buffer TTBS y 3% de BSA. La membrana se incubó en 3mL de solución de anticuerpo primario en un tubo falcon de 50 mL durante dos horas a temperatura ambiente con agitación constante. Por último, se realizaron seis lavados consecutivos de 5 minutos cada uno en agitación constante. Se preparó el anticuerpo secundario (GAM-HRP *Inmuno-Star Goat Anti-Mouse*, 1:15000) diluyéndolo en buffer TTBS y 3% de BSA en oscuridad, este se utilizó para los anticuerpos primarios CD81 y CD63. Para el CD9 se utilizó el anticuerpo secundario InmunoStar Ap goat Antirabbit IgG kit de detección 170-5011 (1:3000). Se incubó la membrana durante 90 min en oscuridad. Se lavó seis veces con buffer TTBS durante 5 minutos cada uno en agitación constante.

Se reveló la membrana por quimioluminiscencia y se la colocó en un protector de plástico (dimensiones: 6 x 9) con 750 uL de sustrato previamente preparado (*Kit Clarity ECL Western Substrate Ref.: 1705060*) en proporción 1:1. Se incubó durante 4 minutos en oscuridad y se realizó la lectura de la membrana utilizando el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Ref.:12003154)*.

Figura 17

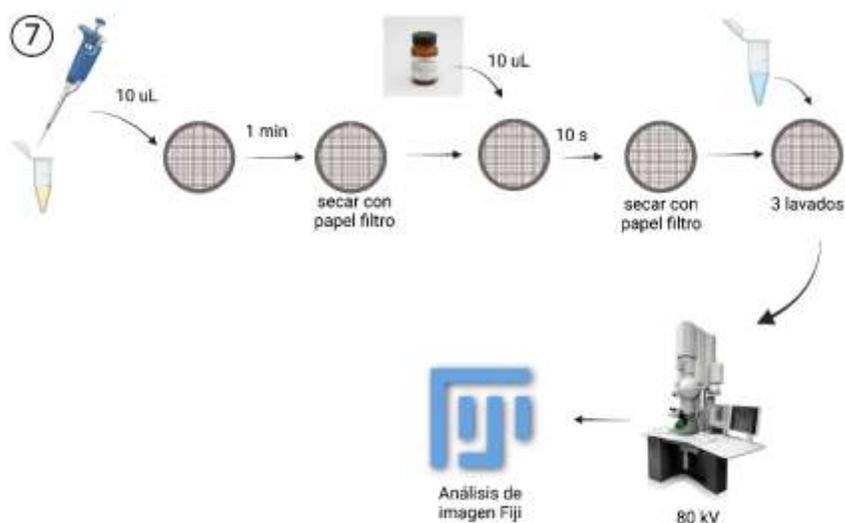
## Procedimiento Western blot



Nota. Obtenido de Biorender.com

## Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se aplicó 10 uL de muestra sobre el lado oscuro del mesh de cobre TED PELLA INC (Prod. N° 01753-F), se absorbió sobre la rejilla durante 1 minuto y se retiró el exceso con papel filtro. Para la tinción negativa se añadió 10 uL de acetato de uranilo al 2% durante 10 segundos y se secó con papel filtro. Por último, se lavó tres veces con agua destilada la superficie del mesh. Las muestras de exosomas se visualizaron en FEI Tecnai G2 spirit twin con un voltaje de 80 kV. El diámetro de los exosomas se midió mediante el software Fiji.

**Figura 18***Procedimiento de microscopía electrónica de transmisión*

*Nota.* Obtenido de Biorender.com

**Citotoxicidad celular**

Se descongelaron tres líneas celulares (Henrietta Lacks (HELA), células de riñón embrionario humano (HEK) y human foreskin fibroblasts (HFF)) mediante el siguiente procedimiento. Se preparó medio fresco DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) (*Gibco*, Ref.: A14430-01) para células HFF (ATCC, SCRC-1041) y EMEM (Medio esencial mínimo de Eagle) para HEK (ATCC, CRL-1573) y HELA (ATCC, CRM-CCL-2) suplementado con 10 y 15% de suero bovino fetal respectivamente y 1% de penicilina/estreptomicina. Se retiró el vial del tanque de nitrógeno líquido y se colocó a 37 °C en baño María. Una vez descongelado el vial, en la cámara de flujo laminar se colocó las células del vial en un tubo de 15 ml con medio de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante sin perturbar el sedimento celular. Se añadió 3 mL de medio fresco (DMEM en caso de HFF y EMEM para HELA y HEK con 10-15% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomicina) en

un tubo de 15ml. Se colocó 1 mL de medio para resuspender el sedimento celular, y se colocó en el tubo de 15 mL, se homogenizó y se ubicó en el flask F25 (25 mL). Se incubó a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando el cultivo llegó a una confluencia del 80-90% se levantaron las células. Para el levantamiento celular, se eliminó el medio del flask, se lavó con PBS a temperatura ambiente y se colocó 2 mL de una solución de tripsina 1% y se incubó a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 5 min para HEK y HELA y 20 min para HFF. Se neutralizó la reacción con 1 mL de medio, se recolectó las células en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 mL de medio. Una vez homogenizado se agregó 3 mL de medio. Se contó el número de células utilizando la cámara de Neubauer con la fórmula a continuación:

$$\text{Total de células} = \frac{\text{número de células} * 10^4 * FD * V_f}{\text{número de cuadrados contados}}$$

El factor de dilución fue 10 uL de medio celular en 90 uL de azul de tripán (las células muertas absorben el azul de tripán) (10:100),  $V_f$  es el volumen final de resuspensión (4 ml) y se observó en el microscopio. Se calculó el volumen de medio celular a tomar para plaquear 10 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se diluyó el volumen calculado considerando que se debe añadir 100 uL de medio en cada pocillo. Con una pipeta multicanal se plaqueó las células y se incubó durante 24 horas, 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Ensayo MTT**

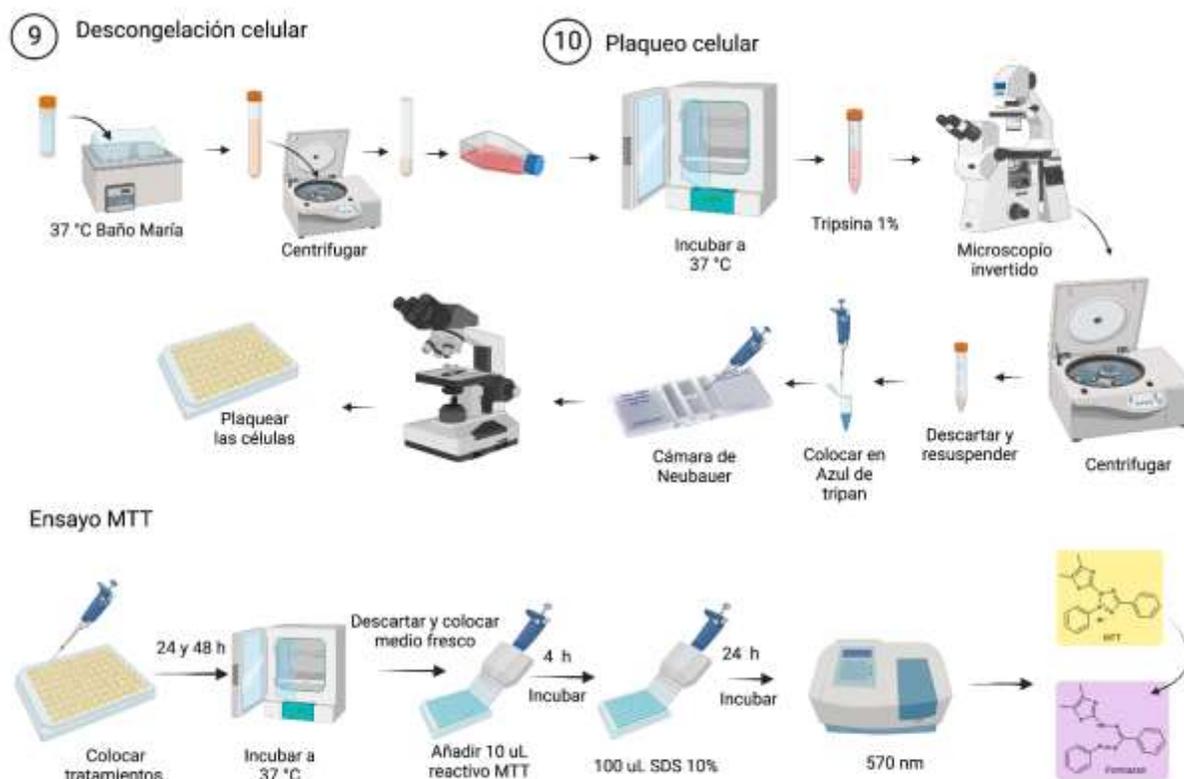
La viabilidad celular de las muestras de exosomas se evaluó en tres líneas celulares (Henrietta Lacks (HELA), células de riñón embrionario humano (HEK) y human foreskin fibroblasts (HFF)) mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-H-tetrazolio). Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $1 * 10^4$  células/pocillo (100 uL/pocillo) en medio y se incubaron durante 24 horas a 37 °C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Se eliminó el medio (para descartar restos

celulares y células muertas) y se añadió medio fresco y los diferentes tratamientos: medio sin células como blanco, medio con células como control, DMSO puro, exosomas cúrcuma 5 ug, exosomas cúrcuma 10 ug, exosomas de jengibre 5ug y exosomas de jengibre 10 ug según el plan de placa y se incubó durante 24 horas y 48 horas. Se colocó 10 uL de MTT (5mg/mL) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas. Para disolver el producto de formazán obtenido se añadió 100 uL de SDS al 10% y HCl al 1% y se dejó incubar durante 24 horas. Se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) y se calculó el porcentaje de viabilidad celular.

Para calcular el % de viabilidad celular, se calculó la absorbancia promedio del blanco (medio sin células) y luego se restó a todas las muestras menos al DMSO (este no contiene medio) y se obtuvo la absorbancia neta. El medio con células represento el control por lo tanto este obtuvo un valor de 100% y mediante regla de tres se obtuvo el porcentaje de viabilidad de los demás componentes.

Figura 19

## Procedimiento para evaluar la citotoxicidad celular



Nota. Obtenido de Biorender.com

## Análisis estadístico

Se aplicó un diseño factorial de dos factores y los datos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías en el programa estadístico GraphPad Prism8. Todos los valores se expresaron mediante la media  $\pm$  SEM (\* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , NS: not significant;  $n = 2$ )

## **Análisis de imágenes**

Las imágenes del Western blot y de la electroforesis obtenida por el sistema ChemiDoc MP se analizaron en el programa Image Lab versión 6.1. Este programa permitió obtener el peso molecular de las bandas.

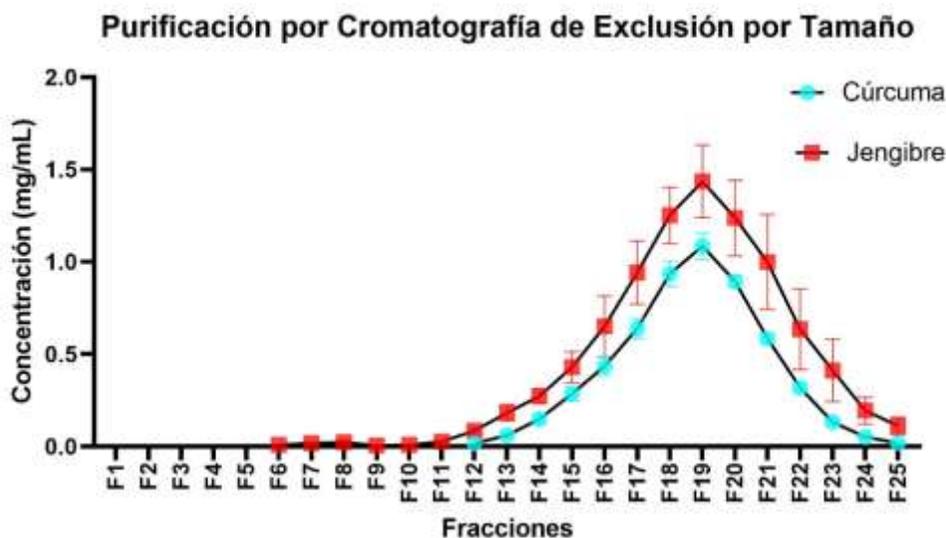
## **Capítulo IV: Resultados**

### **Aislamiento de exosomas derivados de Jengibre y Cúrcuma mediante Cromatografía de exclusión por tamaño con columna qEV Original seguido de ultrafiltración**

En la figura 20, se observa la concentración de proteína (mg/ml) obtenida mediante la medición de la absorbancia a 280 nm con espectrofotometría en *NanoDrop 2000* y el número de fracciones recolectadas. En ambas muestras se encontró un mayor contenido de proteína soluble, es decir impurezas proteicas en las fracciones 17-25 (F17-F25), a diferencia de las fracciones (F7-F11) para jengibre y (F12-F16) para cúrcuma tenían un bajo contenido de proteína lo que supone que en este rango de fracciones se encuentran los exosomas con un diámetro de 70 -1000 nm, ya que los exosomas eluyen 1 +/- 0,5 ml después del volumen vacío según las condiciones del fabricante y bibliografía (Izon Science, s.f; Lane et al., 2017). Además, se halló que el volumen vacío para la muestra de jengibre correspondía a 3 mL y de la muestra de cúrcuma 6 mL. Se recolectaron las fracciones (F7-F11) para jengibre, (F12-F16) para cúrcuma y (F17-F25) en ambas para su posterior caracterización.

Figura 20

Purificación de exosomas de Jengibre y Cúrcuma mediante cromatografía de exclusión por tamaño con columna qEV Original (70 nm)



*Nota.* Se midió la concentración de proteína de las fracciones con espectrofotometría *Nanodrop 2000* (A280 nm). Los datos obtenidos se representaron como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media (SEM) en GraphPad Prism 8.

### Caracterización de exosomas derivados de Jengibre y Cúrcuma mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

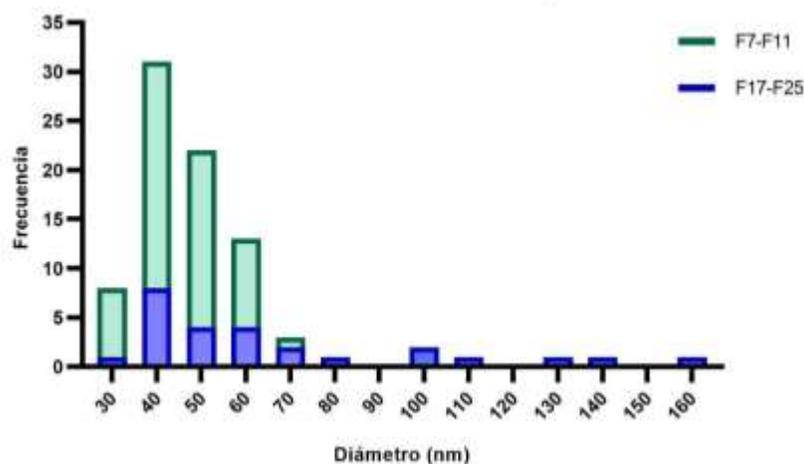
La integridad y distribución de tamaño fue analizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los exosomas de Cúrcuma tenían un rango de diámetro de partícula de 30 a 71 nm, tamaño promedio de 48 nm y una morfología semiesférica ovalada que se visualiza en la figura 19. Los exosomas de Jengibre mostraron una morfología esférica y un rango de diámetro de partícula de 31 a 156 nm, con un tamaño promedio de partícula de 52 nm como se observa en la figura 21. Se caracterizó las fracciones F17-F25 de ambas muestras con mayor contenido de proteínas solubles y se confirmó

mediante TEM que existe un alto nivel de agregados proteicos (impurezas). En la figura 21 se visualiza la frecuencia vs el diámetro de partícula de los exosomas de Jengibre y Cúrcuma. Las fracciones F7-F11 (en verde) mostraron un mayor contenido de exosomas de Jengibre con un rango de diámetro de 31-71 nm, en cambio las fracciones F17-F25 (en azul) contenían mayor cantidad de impurezas proteicas y los pocos exosomas encontrados tenían un rango de diámetro de partícula de 34-156 nm. En las fracciones F12-F16 (en naranja) se observó un mayor contenido de exosomas de Cúrcuma en relación a las impurezas proteicas con un rango de diámetro de 37 a 71 nm, a diferencia de las fracciones F17-F25 (en verde) que tenían más agregados proteicos sin embargo se halló bajo contenido de exosomas con un rango de diámetro de 30 a 61 nm.

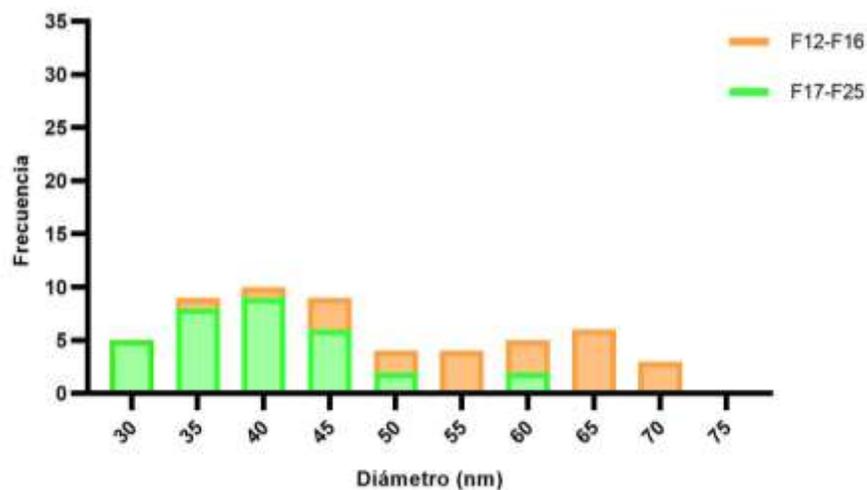
**Figura 21**

*Frecuencia de distribución de tamaño de los exosomas de 1) Jengibre y de 2) Cúrcuma*

1



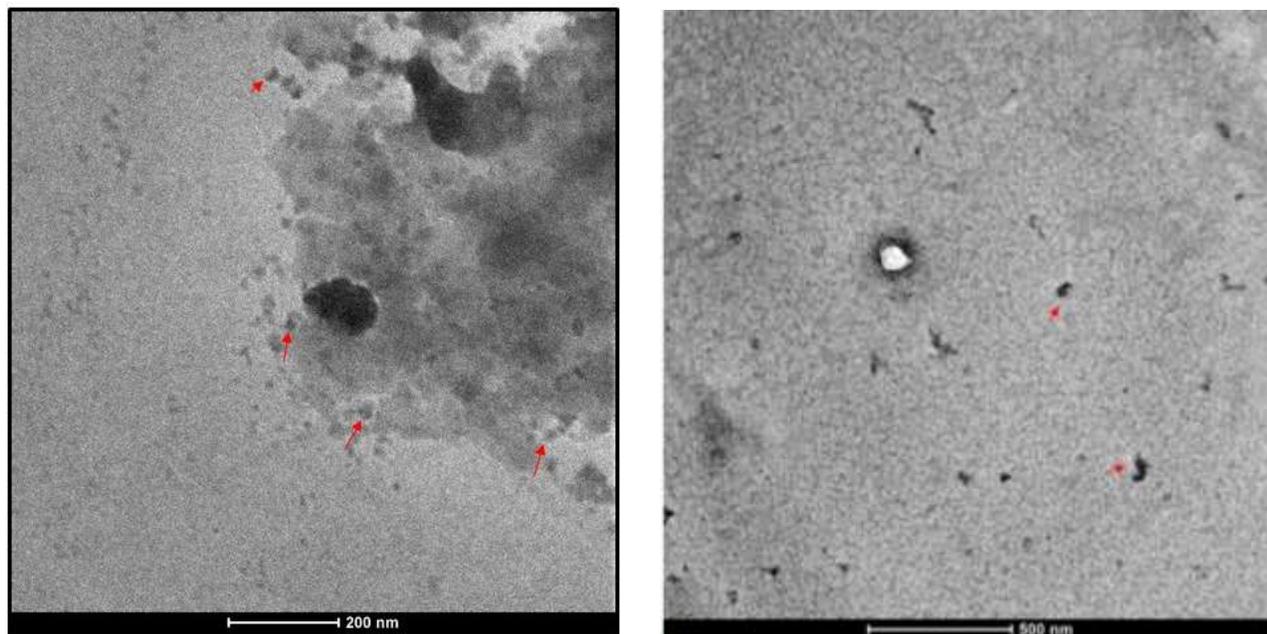
2



*Nota.* 1) En verde se muestra el diámetro de los exosomas de Jengibre obtenidos de las fracciones F7-F11 y en azul las fracciones F17-F25 de la purificación por columna qEV Original. 2) En naranja se muestra el diámetro de los exosomas de Cúrcuma obtenidos de las fracciones F12-F16 y en verde las fracciones F17-F25 de la purificación por columna qEV Original. El análisis de imagen se realizó en el software Fiji y el diagrama se obtuvo en GraphPad Prism 8.

**Figura 22**

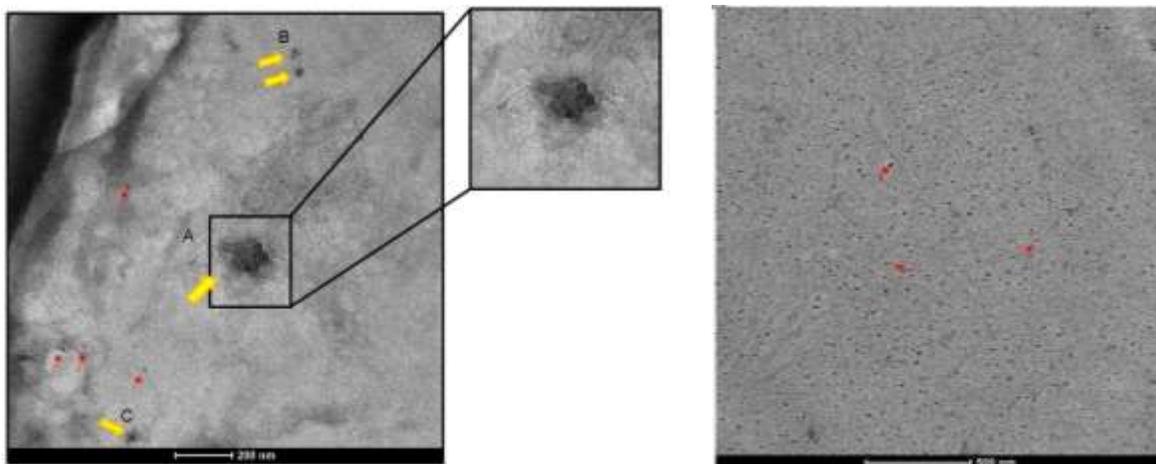
*Visualización de exosomas de Cúrcuma mediante TEM*



*Nota.* A la izquierda se encuentran los exosomas de Cúrcuma aislados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) q EV Original, se aplicó tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y se visualizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM), 80kV, resolución 200 nm. Diámetro promedio 37 nm. A la derecha se muestra las fracciones F17-F25 con alto contenido de agregados proteicos, resolución 500 nm. El análisis de imagen se realizó en el software Fiji.

**Figura 23**

*Visualización de exosomas de Jengibre mediante TEM*



*Nota.* A la izquierda se encuentran los exosomas de Jengibre aislados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) qEV Original, se aplicó tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y se visualizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM), 80kV, resolución 200 nm. A) 156 nm, B) 37 nm, C) 44 nm. A la derecha se muestra las fracciones F17-F25 con alto contenido de agregados proteicos, resolución 500 nm. El análisis de imagen se realizó en el software Fiji.

### **Caracterización de proteínas exosomales mediante electroforesis vertical y Western Blot**

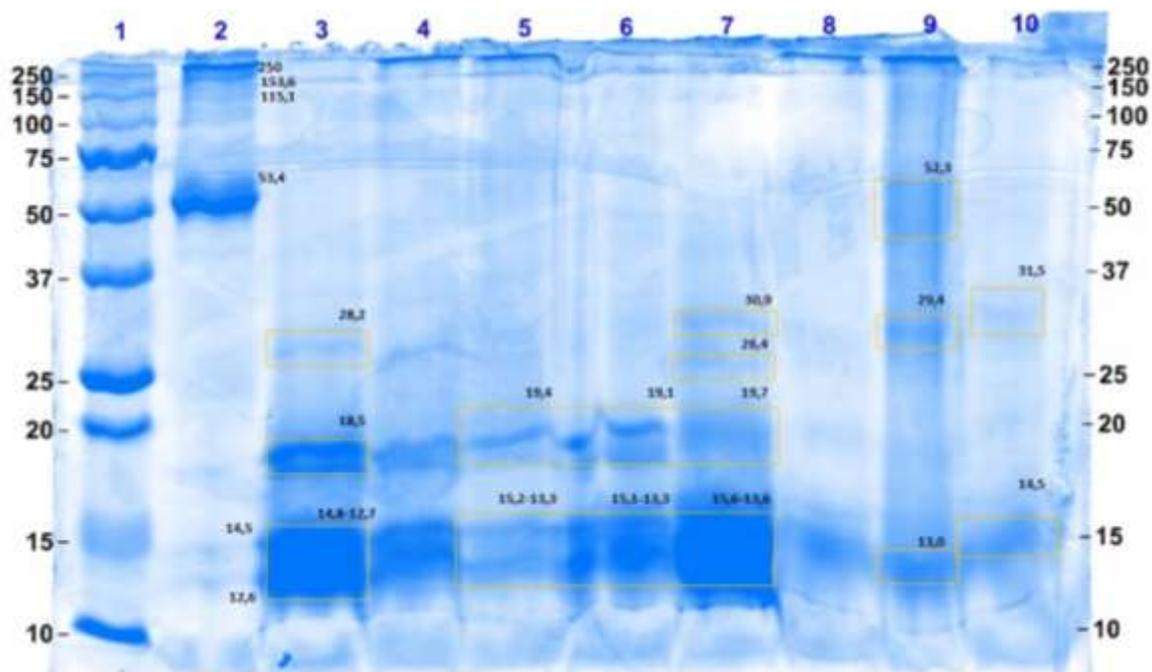
El perfil proteico de los exosomas de Jengibre y Cúrcuma se analizó mediante la técnica de SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% de separación y 4% de concentración en condiciones desnaturalizantes y no reductoras con tinción de azul de Coomassie R-250 como se muestra en las figuras 24 y 25. Se cargó 2 $\mu$ g de proteína en cada pocillo. Se observó que las proteínas exosomales de jengibre estuvieron en un rango entre 40-10 kDa tanto para las fracciones concentradas F7-F11 como F18-F22, con similar intensidad de las bandas. Las microvesículas de jengibre mostraron un rango proteico entre 70-13 kDa y el sobrenadante obtenido de la última centrifugación (10000 g, 40 min) tuvo un rango entre 30-13 kDa. Para la muestra de Cúrcuma, el perfil proteico se halló en un rango entre 40-

12 KDa (tanto para F12-F16 y F19-F22 con una intensidad de bandas similar), las microvesículas y el sobrenadante entre 20-13 KDa. Los exosomas de HELA (Henrietta Lacks) aislados mediante Kit de precipitación (Total Exosome Isolation Invitrogen) tuvieron un rango proteico entre 250-12 KDa.

Las posibles proteínas encontradas en las bandas de los exosomas de jengibre (F7-F11 y F18-F22) y cúrcuma (F12-F16 y F19-F22) según un análisis exhaustivo de la literatura y los estudios de Chen et al. (2019) y C. Liu et al. (2022) son Zingipaína 1 y 2 (27,29 KDa), glucosa-6-fosfato (13,2 KDa) y acuaporina PIP2 (30,5 KDa). En los exosomas de jengibre y cúrcuma de las fracciones F18-F22 y F19-F22 respectivamente se halló una banda adicional que puede corresponder a las proteínas glutamina sintetasa (40 KDa), gliceraldehído-3-fosfato (37 KDa) y aldosa-1-epimerasa (37,6 KDa). En las microvesículas de jengibre se encontró una banda en 52,3 KDa que puede competir a la subunidad beta de la ATP sintasa.

Figura 24

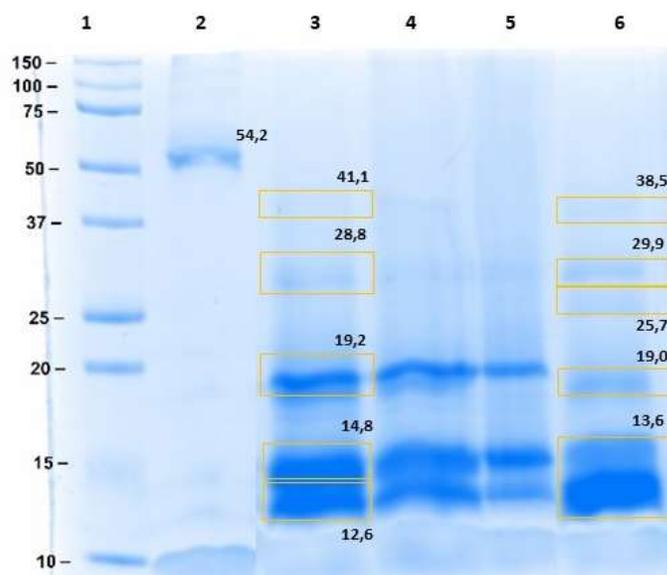
Resultados de la Electroforesis SDS-PAGE 1 con gel de concentración al 4% y gel de separación al 12%



*Nota.* Se cargó 2ug de proteína en el gel y se tiño con azul de Coomassie R-250. Nomenclatura de pocillos, 1: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Marcador), 2: Exosomas de HELA aislados mediante Kit Total Exosome Isolation Invitrogen, 3: Exosomas de Cúrcuma aislados mediante columna qEV Original fracciones 12-16, 4: Exosomas de Cúrcuma aislados mediante kit Total Exosome Isolation Invitrogen, 5: Microvesículas de Cúrcuma, 6: Sobrenadante de Cúrcuma, 7: Exosomas de Jengibre aislados mediante columna qEV Original fracciones 7 a 11, 8: Exosomas de Jengibre aislados por kit Total Exosome Isolation Invitrogen, 9: Microvesículas de Jengibre y 10: sobrenadante de Jengibre).

Figura 25

Resultados de la Electroforesis SDS-PAGE 2 con gel de concentración al 4% y gel de separación al 12%



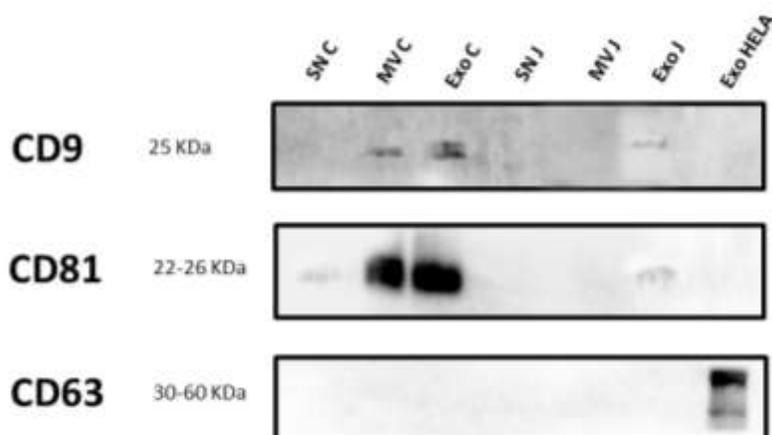
*Nota.* Se cargó 2ug de proteína en el gel y se tiñó con azul de Coomassie R-250. Nomenclatura de pocillos, 1: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Marcador), 2: Exosomas de HELA aislados mediante Kit Total Exosome Isolation Invitrogen, 3: Exosomas de Cúrcuma aislados mediante columna qEV Original fracciones F19-F22, 4: Exosomas de Cúrcuma aislados mediante precipitación con acetato de sodio, 5: Exosomas de Cúrcuma aislados mediante precipitación con polietilenglicol (PEG20000), 6: Exosomas de Jengibre aislados mediante columna qEV Original fracciones F18-F22).

El análisis de transferencia Western Blot, mostró que las microvesículas y los exosomas purificados de la muestra de cúrcuma expresan con una alta intensidad de banda el marcador exosomal de mamífero CD81 con un tamaño de banda entre 21-22 KDa que se encuentra dentro del rango de 22-26 KDa reportado para esta proteína que se observa en la Figura 26. El sobrenadante obtenido de la última centrifugación (10000g, 40 min) de la muestra de Cúrcuma así como las fracciones concentradas

F7-F11 de la muestra de jengibre mostraron una ligera banda con una intensidad muy baja pero que detectó picos en el programa de análisis de imagen Image Lab. Sin embargo, el tamaño de la banda en el sobrenadante de cúrcuma como en las fracciones F7-F11 de los exosomas de jengibre estuvo entre 16,5 y 18,3 KDa respectivamente, por debajo del peso molecular esperado. Lo que sugiere que la proteína objetivo puede haber sido digerida o existe una variante de *splicing* que contiene la región conservada del epítipo que detecta el anticuerpo (90-210 aa de CD81 de origen humano). La baja intensidad de la banda en el sobrenadante de cúrcuma y una mayor intensidad de las mismas en los pasos posteriores al aislamiento sugiere un adecuado enriquecimiento y purificación de los exosomas. Por el contrario, en ninguna de las muestras se encontró expresión del marcador exosomal de mamífero CD63, solo en los exosomas purificados del sobrenadante de la muestra de HELA que se utilizó como control positivo. En el caso del marcador CD9, solo se observó una baja expresión en las microvesículas de Cúrcuma, fracciones concentradas F12-F16 y en las fracciones exosomales F7-F11 de Jengibre. El peso molecular estimado reportado según el programa de análisis de imagen ImageLab fue menor al esperado (25 KDa): 16, 16-14,6 KDa y 12,6 KDa respectivamente, lo que indica que puede estar sucediendo una situación similar al del marcador CD81.

Figura 26

Resultados del Western Blot



*Nota.* Western blot (2 ug de proteína cargado) que muestra la expresión de proteínas exosomales (CD9: 1:1000, CD81: 1:1000, CD63: 1:1000). Se utilizó membrana PVDF 0,45 um para la transferencia. Nomenclatura: Sobrenadante de Cúrcuma (SN C), microvesículas de Cúrcuma (MV C), exosomas de cúrcuma (Exo C), sobrenadante de Jengibre (SN J), microvesículas de Jengibre (MV J), exosomas de Jengibre (Exo J) y exosomas de HELA (Exo HELA).

#### Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT

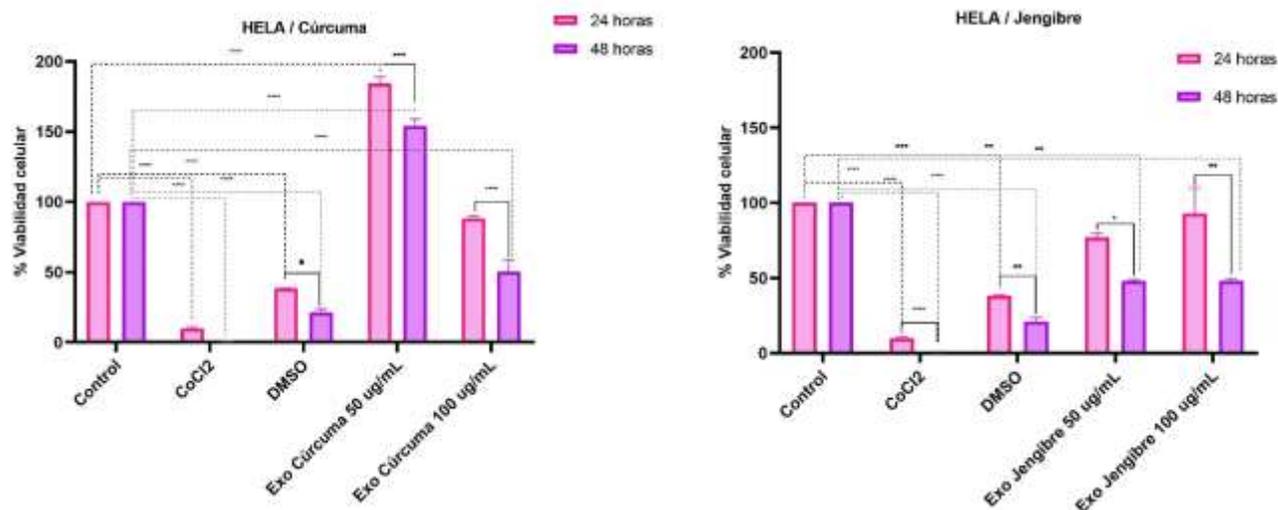
Para evaluar la viabilidad celular de los exosomas derivados de Jengibre y Cúrcuma se ejecutó el ensayo MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2- H -tetrazolio) en tres líneas celulares, células de carcinoma cervical humano (HeLa), células de riñon embrionario humano (HEK293) y fibroblastos humanos como control (HFF) durante dos tiempos 24 y 48 horas y dos concentraciones 50 ug/mL y 100 ug/mL (Figura 27-29). Se utilizó como control las células más el medio (DMEM para HeLa y HEK293, EMEM para HFF) y como control negativo de la viabilidad celular cloruro de cobalto (400 uM) y

DMSO puro. Se observó un aumento significativo de la viabilidad celular en la línea HeLa de los exosomas de cúrcuma con una concentración de 50 ug/mL a 184,2% (\*\*\*\*p <0,0001) y 154,1% (\*\*\*\*p <0,0001) con respecto al control a las 24 y 48 horas respectivamente. Sin embargo, a una concentración de 100 ug/mL hubo una disminución de la viabilidad a 88,39% (ns) y a 50,29% (\*\*\*\*p <0,0001) con respecto al control a las 24 y 48 horas de exposición (Figura 27-A). Se pudo observar una disminución significativa de la viabilidad celular al aumentar el tiempo de exposición (de 24 a 48 horas) a las dos concentraciones de exosomas de 50 (\*\*\*p= 0,0007) y 100 ug/ml (\*\*\*\*p <0,0001). Además, al aumentar la concentración de exosomas de cúrcuma hubo disminución significativa en la viabilidad celular tanto a las 24 (\*\*\*\*p <0,0001) como a las 48 horas (\*\*\*\*p <0,0001).

En el caso de los exosomas de Jengibre a una concentración de 50 ug/mL se obtuvo una disminución significativa de la viabilidad en las células HeLa con un valor de 48,07% (\*\*p = 0,0015) con respecto al control a las 48 horas y no se observó diferencia significativa a las 24 horas (Figura 27-B). A una concentración de 100 ug/mL de exosomas de Jengibre existió una reducción significativa de la viabilidad (48,22 %) a las 48 horas de exposición con respecto al control y no existió diferencia significativa a las 24 horas. Se observó una disminución significativa de la viabilidad a mediada que aumentó el tiempo de exposición para las dos concentraciones de exosomas aplicadas (50 ug/mL: \* p= 0,0392 y 100 ug/mL: \*\* p= 0,0055). Se contempló que no hubo diferencia significativa en la viabilidad cuando incrementó la concentración de exosomas, lo que indica que no existe una mayor captación de los exosomas a altas concentraciones, ya que la viabilidad celular no disminuyó.

Figura 27

Resultados de Ensayo de Viabilidad celular MTT en la línea celular HeLa



*Nota.* Ensayo de viabilidad celular MTT en las líneas celulares HeLa utilizando diferentes concentraciones de exosomas (50 y 100 ug/mL) de muestras de Cúrcuma (A) y Jengibre (B) a las 24 y 48 horas de exposición. Todos los valores se expresaron mediante la media  $\pm$  SEM (\* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , NS: not significant) utilizando el programa Graphpad Prism8 bajo un análisis ANOVA de dos vías.

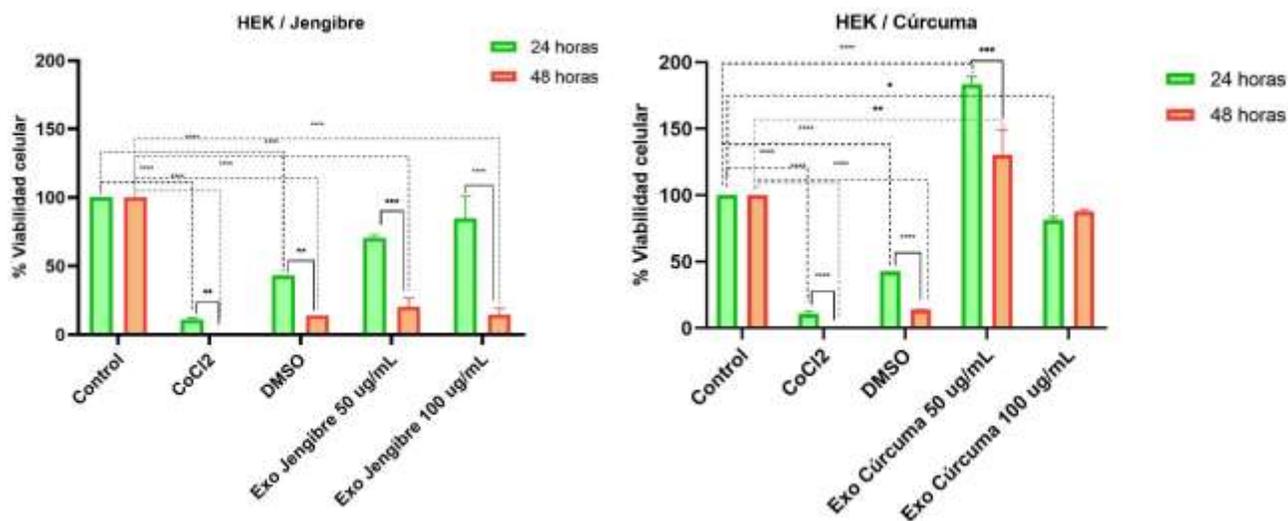
Para la línea celular HEK293 se observó un aumento significativo de la viabilidad con respecto al control de 183,4% (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) y 130,4% (\*\* $p = 0,0025$ ) a las 24 y 48 horas de exposición respectivamente para una concentración de 50 ug/mL de exosomas de Cúrcuma (Figura 28-A). Una concentración de 100 ug/mL de exosomas generó una disminución significativa de la viabilidad con un valor de 81,4% (\* $p = 0,0240$ ) a las 24 horas, a diferencia de las 48 horas que no hubo diferencia significativa con el control. A medida que aumentó el tiempo de exposición, disminuyó de forma

significativa la viabilidad celular a una concentración de 50 ug/mL (\*\*p= 0,0001), sin embargo, este hecho no sucedió a una concentración de 100 ug/mL donde no existió diferencia significativa. Esto significa que un mayor tiempo de exposición a altas concentraciones de exosomas no aumentó la captación de los exosomas por parte de las células ya que no hubo una disminución de la viabilidad celular. Igualmente, el incremento de la concentración de exosomas generó una reducción significativa de 183,4% a 81,4% y de 130,4% a 87,9% en la viabilidad celular tanto a 24 (\*\*\*\*p<0,0001) como a 48 horas (\*\*p = 0,0003) de exposición respectivamente.

Los exosomas de Jengibre mostraron una disminución de la viabilidad con respecto al control a las 24 horas de exposición con un valor de 70,64% a una concentración de 50 ug/mL, sin embargo, se observó una reducción significativa de la viabilidad (\*\*\*\*p<0,0001) a las 48 horas con respecto al control con un valor de 20,35% (Figura 28-B). De igual manera, para una concentración de 100 ug/mL hubo una disminución significativa de la viabilidad a las 48 horas con respecto al control con un valor de 14,65% (\*\*\*\*p<0,0001), no obstante, no existió diferencia significativa a las 24 horas. El incremento del tiempo de exposición significó un decrecimiento significativo en la viabilidad celular de 70,64% a 20,35% (\*\*p = 0,0002) y de 84,81% a 14,65% (\*\*\*\*p<0,0001) para 50 y 100 ug/mL respectivamente. No existió diferencia significativa en la medida en que se incrementó la concentración de exosomas tanto a 24 como a 48 horas, lo que sugiere que al aumentar la concentración las células no ampliaron la captación de los exosomas, representando la concentración de 50 ug/mL su nivel máximo de captación para reducir la viabilidad celular.

Figura 28

Resultados de Ensayo de Viabilidad celular MTT en la línea celular HEK293



*Nota.* Ensayo de viabilidad celular MTT en las líneas celulares HEK293 utilizando diferentes concentraciones de exosomas (50 y 100 ug/mL) de muestras de Cúrcuma (A) y Jengibre (B) a las 24 y 48 horas de exposición. Todos los valores se expresaron mediante la media  $\pm$  SEM (\* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , NS: not significant) utilizando el programa Graphpad Prism8 bajo un análisis ANOVA de dos vías.

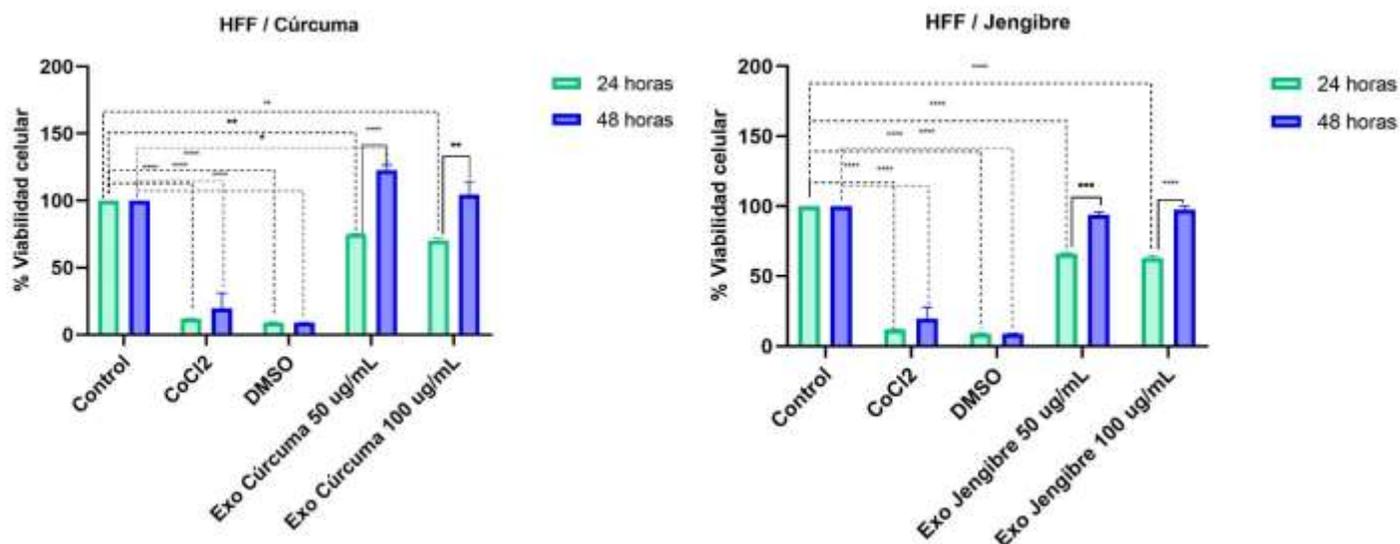
Por otro lado, en la línea celular HFF se percibió una disminución significativa de la viabilidad celular con respecto al control a las 24 horas de exposición a concentraciones de exosomas de Cúrcuma de 50 y 100 ug/mL obteniéndose valores de 75,11% (\*\* $p = 0,0026$ ) y 70,5% (\*\*  $p = 0,0020$ ) respectivamente (Figura 29-A). Se encontró diferencia significativa a las 48 horas a una concentración de 50 ug/mL pero no a 100 ug/mL con respecto al control. En la medida en que el tiempo de exposición aumentó también incrementó significativamente la viabilidad celular a valores de 75,11% a 122,79% (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) y de 70,5% a 104,59% (\*\* $p = 0,0013$ ) a correspondencia de las concentraciones de 50 y

100 ug/mL de exosomas de Cúrcuma. No se encontró diferencia significativa a medida que incrementó la concentración de exosomas de 50 a 100 ug/mL en la viabilidad celular tanto a 24 como 48 horas.

Al igual que los exosomas de Cúrcuma, los exosomas de Jengibre exhibieron una reducción significativa de la viabilidad celular con respecto al control a las 24 de tratamiento con valores de 66,13% (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) y de 63,08% (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) respecto a concentraciones de 50 y 100 ug/mL. Asimismo, no existió diferencia significativa con respecto al control en la viabilidad celular a 48 horas. Cuando el tiempo de tratamiento aumentó también incrementó de forma significativa la viabilidad celular de 66,13% a 93,87% (\*\* $p = 0,0001$ ) y de 63,08% a 97,66% (\*\* $p < 0,0001$ ) a concentraciones de exosomas de 50 y 100 ug/mL respectivamente. El incremento de la concentración de exosomas de 50 a 100 ug/mL no representó una diferencia significativa en la viabilidad celular tanto a 24 como 48 horas de tratamiento.

## **Figura 29**

*Resultados de Ensayo de Viabilidad celular MTT en la línea celular HFF*



*Nota.* Ensayo de viabilidad celular MTT en las líneas celulares HFF utilizando diferentes concentraciones de exosomas (50 y 100 ug/mL) de muestras de Cúrcuma (A) y Jengibre (B) a las 24 y 48 horas de exposición. Todos los valores se expresaron mediante la media  $\pm$  SEM (\* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , NS: not significant) utilizando el programa Graphpad Prism8 bajo un análisis ANOVA de dos vías.

## Capítulo V: Discusión

Actualmente los exosomas derivados de plantas están en continua investigación por su aplicación como nanotransportadores para la administración dirigida de fármacos y como agentes terapéuticos, ya que han impresionado a la comunidad científica por su destacado papel en la patogénesis, comunicación interespecie y en la inmunidad. Debido a que han demostrado ser superiores a los exosomas derivados de células de mamíferos y exosomas artificiales, se ha estudiado diversas formas para aislarlos, purificarlos e investigar su actividad biológica. Existen diferentes tipos de métodos que permiten aislar y purificar los exosomas derivados de plantas. La ultracentrifugación diferencial combinada en gradiente de densidad se ha convertido en la técnica gold standard para el aislamiento de

exosomas derivados de células de mamíferos y los pocos estudios realizados en plantas lo reportan como el más utilizado. Sin embargo, tiene varias desventajas como el sedimento final puede estar contaminado con partículas de tamaño y densidad similar como las lipoproteínas de alta densidad (HDL), puede existir agregación de exosomas y disrupción de los mismos debido a la fuerza cortante ejercida lo que puede afectar la funcionalidad de los exosomas (Liangsupree et al., 2021; Abhange et al., 2021). Por lo tanto, últimamente muchos estudios se han enfocado en el uso de técnicas combinadas de aislamiento para lograr la máxima recuperación y pureza. En este contexto, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) ha tomado gran relevancia ya que es una técnica no invasiva para los exosomas, ya que usa solo la gravedad no la fuerza por lo que se obtienen exosomas íntegros útiles para posteriores aplicaciones como estudios de actividad biológica y secuenciación de RNA (Yang et al., 2021). SEC se fundamenta en separar las partículas de la fase móvil que pasan a través de la fase estacionaria (una resina porosa) en función de su tamaño, por tanto, cada partícula tiene un tiempo de elución y las más grandes eluirán primero y las más pequeñas se encontrarán en las fracciones finales. Con SEC se logra una mayor pureza de los aislados exosómicos pero existe poca recuperación de la muestra (Sidhom et al., 2020).

En este estudio, se aplicó para el aislamiento de los exosomas derivados de Jengibre y Cúrcuma centrifugaciones seriadas para eliminar los desechos celulares, cuerpos apoptóticos y microvesículas grandes, luego una filtración secuencial con filtros de diámetro de poro de 1.1  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  seguido de cromatografía de exclusión por tamaño en columna qEV Original (< 1ml, 70nm) y una concentración de las fracciones en tubos Amicon Ultra-4 100 KDa. Por la literatura se conoce que los exosomas eluyen después del volumen vacío (se eliminan partículas más grandes), es decir su pico de elución es (1 +/- 0.5 ml) seguido del volumen vacío. Por lo tanto, la mayor recuperación de exosomas se encuentran en las fracciones 7 a la 11 con menor concentración de proteínas solubles para jengibre (volumen vacío 3ml) y para Cúrcuma de la 12 a la 16 (volumen vacío 6 ml). Las fracciones > 16 contienen

una mayor cantidad de impurezas proteicas y agregados, sin embargo, también se concentró fracciones altas 17-25 para analizar su contenido exosomal. El tipo de columna y resina que se utilice para la separación por SEC es fundamental para obtener el diámetro de partícula deseado en el aislamiento. En este caso, se utilizó columna qEV Original con un límite de poro de 70 nm, lo que permite una recuperación de partículas objetivas entre 70-1000 nm con un diámetro óptimo > 110 nm (Izon Science, s.f). Las partículas menores a 70 nm eluyen por lo regular más tarde de la zona donde se recuperan los exosomas en la columna qEV 70 nm, en cambio las partículas mayores a 35 nm se capturan en esta zona en una columna qEV 35 nm. Se obtiene una mayor recuperación en la zona exosomal de partículas mayores de 70 nm en las columnas de la serie qEV-70 en relación con qEV/35nm (Izon Science, s.f). Por ende, se supuso que exosomas menores a 70 nm de diámetro podrían encontrarse en las últimas fracciones donde existe una mayor elución de proteínas.

Se obtuvo una mayor concentración de proteína en las fracciones F17-F21 para Jengibre y para Cúrcuma lo que concuerda con la literatura y el funcionamiento de una columna de exclusion por tamaño. En el estudio de You et al., (2021) aplicó para el aislamiento de exosomas derivados de repollo ultrafiltración en tubos Amicon Ultra-15 seguido de SEC con columna qEV (Izon) y reportó una mayor concentración de impurezas proteicas en las fracciones 13 a la 30 y las fracciones 7 a 10 contenían mayor número de exosomas con menos proteínas solubles.

La distribución de tamaño y morfología de los exosomas aislados se analizó mediante TEM utilizando como agente fijador y de tinción el acetato de uranilo al 2%. La tinción es clave para poder observar una clara morfología de los exosomas, por ende, se debe realizar una adecuada preparación del agente de tinción. El acetato de uranilo es catiónico y el pH de la preparación debe estar por debajo del punto isoeléctrico de la proteína de membrana de la muestra para evitar la tinción positiva, de esta manera los grupos de las proteínas están cargados positivamente y al interaccionar con los iones uranilos con carga positiva existirá repulsión entre grupos y se producirá una tinción negativa. El acetato

de uranilo estabiliza las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos uniéndose mediante interacciones iónicas y preserva estos enlaces y la estructura molecular, por lo tanto, en varios estudios no utilizan un agente fijador en la preparación de muestra, incluso existe una mejor conservación de la estructura cuando no hay una fijación previa con glutaraldehído (F. Q. Zhao & Craig, 2003). El acetato de uranilo fija las estructuras en cuestión de milisegundos y durante el proceso de tinción la fase acuosa de la muestra se evapora generando una mayor fuerza iónica, el acetato de uranilo estabiliza esas interacciones iónicas evitando que el gran aumento de la fuerza iónica dañe las estructuras macromoleculares durante el secado (F. Q. Zhao & Craig, 2003). Mingzhen Zhang et al., (2017) utilizó como agente fijador y de tinción acetato de uranilo al 1% y las nanovesículas derivadas de Jengibre se visualizaron mediante TEM en forma ovalada con un tamaño promedio de 237,2 nm. Se observó la membrana claramente definida de las nanovesículas formándose un halo de tinción alrededor de la partícula debido a la repulsión de los grupos cargados del tinte y las proteínas y lípidos así como al desplazamiento de las moléculas de tinción por las regiones hidrofóbicas de la proteína (Scarff et al., 2018). Igualmente, Mingzhen Zhang et al., (2016) aislaron exosomas derivados de Jengibre mediante en gradiente de sacarosa y los caracterizaron mediante TEM utilizando acetato de uranilo al 1% como agente fijador y de tinción y obtuvieron partículas con una morfología ovalada con membranas bien definidas. En este estudio, se logró visualizar exosomas derivados de Jengibre en forma esférica con un rango de tamaño de 31 a 156 nm mediante TEM. Sin embargo, en varias ocasiones la membrana de los exosomas tanto de Jengibre como de Cúrcuma no se observó de forma definida y clara, esto puede deberse a la preparación inadecuada del acetato de uranilo, debe estar fresco al realizar la tinción (recién preparado), no precipitado (puede precipitar a pH fisiológico y a por la exposición a la luz). Además, se observó artefactos de tinción en las muestras exosomales que puede deberse al uso de PBS 1X como tampón de suspensión, ya que los iones fosfato reaccionan con los iones uranilo provocando un fino precipitado que oscurece la muestra

(Pandithage, 2021). Los residuos de sal en el mesh deben ser lavados después de la tinción generando una pérdida de contraste de los exosomas.

En el estudio realizado por Zhuang et al., (2015) aislaron exosomas derivados de Jengibre mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y mostró un rango de tamaño de 102.3 a 998.3 nm, la banda 1 de 8%/30% con tamaño promedio de 386.6 nm y la banda 2 de 30%/45% de 294.1 nm. Zhang et al, (2016) aplicaron así mismo ultracentrifugación en gradiente de sacarosa para aislar las nanovesículas de Jengibre hallando tres poblaciones de nanovesículas: 8/30% (banda 1 con un tamaño de 292.5 nm), 30/45% (banda 2 con un tamaño de 231.6 nm) y 45/60% (banda 3 con un tamaño de 219.6 nm). C. Liu et al., (2022) aislaron exosomas derivados de Cúrcuma mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y caracterizaron mediante TEM obteniendo dos poblaciones de exosomas con tamaños promedio de 204.6 nm ( 8/30% ) y 177.9 nm (30/45%) con una morfología en forma de platillo semiesférica parecida a la estructura de los exosomas de las células de mamífero.

En este estudio, los exosomas derivados de Cúrcuma tuvieron un rango de diámetro de partícula de 30 a 71 nm con una forma semiesférica ovalada de acuerdo con la literatura (C. Liu et al., 2022). Los tamaños reportados para los exosomas derivados de Jengibre como de Cúrcuma no concuerdan con los obtenidos en esta investigación, debido a la diferente técnica de aislamiento aplicada. El sobrenadante obtenido de las centrifugaciones seriadas paso por filtros secuenciales (1.1, 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ ) lo que dejó un filtrado enriquecido de nanovesículas < 220 nm. El filtrado paso por columna qEV Original (70 nm) y luego se concentraron las fracciones en Tubos Amicon Ultra-4 con límite de peso molecular de 100 KDa, por lo tanto, al concentrar las fracciones puede producirse daño y ruptura de exosomas de mayor tamaño (220 nm) debido a la presión y contacto con la membrana de filtro. Como resultado del proceso de purificación se obtienen exosomas < 160 nm. Además, se ha reportado en diversos estudios que SEC genera exosomas de diámetro más pequeño que la ultracentrifugación (Liangsupree et al., 2021). No se

ha reportado estudios que aíslan exosomas de Jengibre y Cúrcuma mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Se analizó la distribución de tamaño de los exosomas de las fracciones F7-F11 y F17-F25 para jengibre, F12-F16 y F17-F25 para Cúrcuma. Se comprobó mediante TEM que en las fracciones F7-F11 para jengibre y F12-F16 para Cúrcuma existe una mayor recuperación de exosomas y menor contenido de proteínas contaminantes. En las fracciones F17-F25 en ambas muestras se eluyeron pocos exosomas y se visualizó por microscopía mayor cantidad de impurezas proteicas. Este resultado confirma la suposición de que la columna qEV Original (70 nm) permite la elución de exosomas < 70 nm en las fracciones finales con mayor contenido proteico que no corresponde a la zona regular de elución de los exosomas. Una de las limitantes de SEC es que aísla lipoproteínas como quilomicrones, LDL, VLDL, microvesículas que comparten el mismo rango de tamaño que los exosomas, por lo tanto, en los concentrados de las fracciones se observan impurezas que no corresponden a los exosomas (Liangsupree et al., 2021).

El análisis de SDS-PAGE reveló que los exosomas de jengibre de las fracciones F7-F11 y F18-F22 tienen un perfil proteico (40-10 KDa) y una intensidad de bandas similar, lo que comprueba que en ambos concentrados de fracciones existen exosomas pero de diferente diámetro. Estos datos discrepan con los obtenidos por Chen et al., (2019) que reportaron un rango proteico de 10-70 KDa para las exosomas derivados del Jengibre. Esto puede deberse a las diferentes condiciones de purificación de los exosomas lo que conlleva a obtener diferentes poblaciones exosomales, que en el caso del estudio de Chen et al., (2019) utilizan ultracentrifugación y obtienen nanovesículas con un rango de diámetro de 120-150 nm, en esta investigación se aplicó SEC y se obtuvo exosomas con un tamaño promedio de 52 nm. Por lo tanto, diferentes poblaciones de exosomas poseen diferente carga de proteína, lípidos y ARN y se comprueba en el estudio de C. Liu et al. (2022), donde aislaron dos poblaciones de exosomas de Cúrcuma a partir de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y comprobaron con un análisis

proteómico que ambas poblaciones tienen diferentes cantidades y contenido de proteínas. En el estudio de (Zhang M et al., 2016) realizaron un análisis proteómico de los exosomas derivados del Jengibre y encontraron que existe mayor contenido de proteínas citosólicas (actina, actina-2, enzimas proteolíticas como cisteína proteasa gp3a, cisteína proteasa gp3b, ferritina, subunidades del proteosoma, piruvato quinasa, tripsina, calmodulina, glutamina sintetasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, histonas, zingipaina 1 y 2 y pocas proteínas de membrana (acuaporinas PIP2, subunidades de ATP sintasa, canales de cloruro). Algunas proteínas reportadas del estudio de Zhang M et al. (2016) según el análisis de bandas está presente en el perfil proteico informado en este estudio.

El perfil proteico de los exosomas de Cúrcuma se encontró en un rango de 40-12 KDa tanto para F12-F16 y F19-F22 con una intensidad de bandas similar a la de los exosomas de Jengibre. No existen estudios que evalúen el perfil proteico de los exosomas derivados de la Cúrcuma. Algunas proteínas descritas por C. Liu et al., (2022) están en el perfil proteico de esta investigación. C. Liu et al., (2022) mediante un análisis proteómico encontró que los exosomas derivados de la Cúrcuma poseen proteínas citosólicas y de membrana (calmodulina, matorasa K, transportador de potasio, zingipaina-2, factor de elongación tu, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, aldosa-1-epimerasa, subunidad beta de ATP sintasa) y muchas proteínas no caracterizadas, lo que señala las funciones desconocidas de los exosomas de Cúrcuma.

Las tetraspaninas CD9 (Tspan29), CD81(Tspan28) y CD63 (Tspan30) se han considerado marcadores exosomales de las células de mamífero (F. Wang et al., 2012; He et al., 2021). Estas proteínas cumplen una serie de funciones biológicas básicas como su participación en la motilidad celular, fusión, tráfico de vesículas y procesos fisiológicos (Jimenez-Jimenez et al., 2019). Se consideran organizadores dinámicos de las membranas, ya que forman microdominios enriquecidos con tetraspaninas (TEM) que son redes de interacciones entre las tetraspaninas con proteínas de membrana (integrinas, receptores de las inmunoglobulinas, metaloproteinasas) y lípidos (Jankovičová et

al., 2020). Se encuentran en la membrana plasmática, endosomas y retículo endoplasmático de células animales y vegetales. Por lo tanto, participan como miembros de las membranas exosomales durante la biogénesis de los cuerpos multivesiculares por endocitosis de la membrana plasmática. Por lo tanto, como componentes transmembrana de los exosomas median el transporte de los mismos y la comunicación intercelular y entre reinos (Jimenez-Jimenez et al., 2019). Sin embargo, las tetraspaninas vegetales están poco caracterizadas, se conoce que existen 17 miembros codificados en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. En este estudio se comprobó mediante western blot, que los exosomas de Cúrcuma y Jengibre expresan una proteína homóloga al marcador exosomal de mamífero CD81 y que probablemente cumple funciones similares a CD81 de células animales. Las tetraspaninas contienen cuatro dominios transmembrana, dos dominios citoplasmáticos (amino y carboxilo terminal), un bucle intracelular (SEL) y un bucle extracelular (LEL) (Bassani & Cingolani, 2012). La región clave que media las interacciones entre la tetraspaninas y otras proteínas es el bucle extracelular conformado por un subdominio constante y uno variable. El subdominio variable tiene un motivo constante en plantas (GCCK/RP) diferente a animales (CCG) y dentro de este bucle existe nueve residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro entre ellos a diferencia de cuatro a seis residuos de cisteína presente en células animales (F. Wang et al., 2012). El bucle extracelular determina la especificidad funcional y los anticuerpos anti-tetraspaninas se unen a esta región, por lo tanto, se demuestra en este estudio como existe semejanza estructural de esta región de la proteína tanto de origen animal como vegetal.

Las microvesículas derivadas de la muestra de Cúrcuma también mostraron la expresión de una proteína homóloga al marcador CD81 de mamífero, pero con una intensidad de banda menor a la de los exosomas. Este hecho se debe a que las tetraspaninas no son exclusivas de los exosomas sino que están presentes en otras clases de vehículos eléctricos como las microvesículas debido a su origen por gemación de la membrana plasmática (Sedgwick & D'Souza-Schorey, 2018; Clancy et al., 2021). Tal es el caso de Sun et al. (2018) que reportó la expresión de marcadores TSG101 y CD9 en exosomas como en

microvesículas derivadas de la saliva humana siendo CD81 el marcador que permitió diferenciar microvesículas de exosomas. El sobrenadante de la muestra de Cúrcuma también mostró una ligera expresión del marcador, lo que nos indica que los pasos posteriores de la purificación se realizaron de forma adecuada ya que la intensidad de banda fue mayor en los exosomas. Sin embargo, el peso molecular obtenido en el sobrenadante de cúrcuma como en los exosomas de jengibre fue menor al peso esperado. En el caso de los exosomas de jengibre puede deberse a que la proteína homóloga a CD81 de origen humano tiene una variante debido al splicing alternativo durante la maduración del ARNm que no afecta la región del bucle extracelular de la tetraspanina que reconoce el anticuerpo. Como reportó Hochheimer et al., (2019) pueden existir isoformas no convencionales de las tetraspaninas humanas que se derivan del splicing alternativo. En este estudio, el splicing alternativo dio como resultado variantes con dominios transmembrana faltantes (TMS) generando isoformas mono, di, tetraspaninas. Se señaló que CD9 como CD81 pueden tener una variante de splicing (isoforma 2) que produce una dispanina (solo tiene dos dominios transmembrana). Por lo tanto, un hecho similar puede ocurrir en las tetraspaninas vegetales, puede existir una variante con peso molecular menor como una dispanina en el retículo endoplasmático. Luego el contacto entre el retículo endoplásmico y los endosomas durante la formación de los cuerpos multivesiculares permiten el transporte de carga del RE al endosoma, por ende, las vesículas intraluminales podrían contener las dispaninas en su membrana por contacto con RE (Kanemoto et al., 2016). En el caso del sobrenadante de cúrcuma, es probable que exista degradación proteica debido a los ciclos de congelamiento-descongelamiento durante el procedimiento (Mitchell et al., 2005; Mingcheng Zhang et al., 2017; K. Kim et al., 2022).

Debido a que las tetraspaninas no son exclusivos de los exosomas, se vio la necesidad de probar diferentes marcadores exosomales para caracterizar el origen endocítico de los mismos y asegurarse que los vehículos eléctricos purificados son exosomas. Por ello se marcó con anti-CD63 y anti-CD9. Con el primer marcador no se obtuvo resultados positivos de expresión solo en el control positivo de

exosomas aislados del sobrenadante de HeLa. Se observó expresión de una proteína homologa a CD9 de origen humano en la muestra de Cúrcuma tanto en exosomas como en microvesículas pero la intensidad de expresión varió. La intensidad de bandas fue mayor en exosomas y menor en microvesículas lo que indica un mayor enriquecimiento de la proteína a medida que aumentan los pasos de purificación. El peso molecular reportado para la proteína homologa a CD9 fue menor al esperado, lo que indica que ocurre un hecho similar a CD81 (variante de splicing como dispanina).

Para evaluar el efecto en la viabilidad y proliferación celular de los exosomas de Jengibre y Cúrcuma se aplicó el ensayo MTT en tres líneas celulares: carcinoma cervical humano (HeLa), células de riñón embrionario humano (HEK293) y fibroblastos humanos como control (HFF). Se escogió las células HeLa, ya que al ser la primera línea cancerígena humana utilizada *in vitro* se han generado avances en la fisiopatología del cáncer de cuello uterino y su relación con el virus del papiloma humano (VPH) (National Institute of Health, s.f). Debido a aquello se puede evaluar si los exosomas de Cúrcuma y Jengibre presentan potencial citotóxico sobre las células del cáncer y establecer su aplicación como agente terapéutico o como nanotransportador para la administración de fármacos. El compuesto MTT al tener carga positiva dada por el nitrógeno cuaternario que se encuentra en el anillo de tetrazolio tiene la capacidad de atravesar la membrana celular y mitocondrial y reducirse por las enzimas mitocondriales como la succinato deshidrogenasa obteniéndose como producto cristales de formazán de color púrpura insoluble en agua. Es decir, indica una medida del metabolismo general de la célula (M. Ghasemi et al., 2021). En este estudio, se pudo observar que los exosomas de Cúrcuma no exhibieron una actividad antiproliferativa en la línea de HeLa, usando una concentración de 50 ug/mL a las 24 y 48 horas de exposición, incluso la viabilidad celular aumento en un 84,2% a las 24 horas y 54,1% a las 48 horas con respecto al control. Se conoce que el ensayo de viabilidad celular puede estar limitado debido a las interferencias óptica, química y biológica que pueden surgir con los compuestos a evaluar (M. Ghasemi et al., 2021). Se ha demostrado que los polifenoles y flavonoles pueden reducir el MTT (Peng et al.,

2005; P. Wang et al., 2010; Karakaş et al., 2017). La cúrcuma se caracteriza por tener una gran variedad de polifenoles como los Curcuminoides que producen el color amarillo-anaranjado y tienen propiedades antioxidantes actuando como agentes reductores (Bhawan Verma et al., 2018). Estos Curcuminoides como su principal compuesto la Curcumina pueden reducir el MTT a formazán en ausencia de células, lo que puede explicar los altos valores de viabilidad celular obtenidos. Se cree que el contenido de proteínas solubles con propiedad antioxidante como la turmerina y fitoquímicos que no son los exosomas pueden ejercer una interferencia química al reducir el MTT en el medio extracelular. Además, la Curcumina tiene una longitud de onda larga de absorción que va desde 420-580 nm (Sofyan et al., 2018), lo que sugiere que puede existir interferencia óptica aumentando la medición de la DO a 570 nm. A una concentración de 100 mg/mL de exosomas disminuyó la viabilidad celular en un 11,61% a las 24 horas y en un 49,71% a las 48 horas con respecto al control. Este hecho se debe a que los lípidos como el ácido fosfátidico (media la absorción y fusión celular) y proteínas de membrana de los exosomas están interactuando con las células HeLa ejerciendo su actividad antiproliferativa a través de su carga. Se ha estudiado que los exosomas derivados de la Cúrcuma contienen como carga curcumina, proteínas citosólicas y de membrana (calmodulina, matorasa K, transportador de potasio, zingipaina-2, factor de elongación tu, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, aldosa-1-epimerasa, subunidad beta de ATP sintasa) (C. Liu et al., 2022). Se ha establecido que la Curcumina disminuye la viabilidad en líneas celulares HeLa al inhibir las vías NF-Kb y wnt, aumentar la apoptosis y activar las caspasas (F. Ghasemi et al., 2019). La Curcumina aumenta la cantidad de proteínas supresoras de tumores como p53, proteína de retinoblastoma (Rb) y proteína tirosina fosfatasa en líneas celulares de cáncer de cuello uterino HeLa, SiHa, C33a y CaSki (Ahlemann et al., 2006) y las altas concentraciones de 50-100 uM incrementaron la apoptosis por regulación negativa de Bcl2 y Bcl-xL, activación de caspasa-3 y caspasa-9 y regulación positiva de AIF y Bax (Singh & Singh, 2009). Se ha demostrado que concentraciones bajas de Curcumina (10uM) puede ejercer una reducción de la viabilidad celular hasta del 70%, generar apoptosis y

augmentar los niveles de superóxido a concentraciones > 1 $\mu$ M de Curcumina (Lewinska et al., 2014). Esto puede explicar la disminución de la viabilidad en esta línea celular dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

No se observó diferencia significativa de los exosomas de Jengibre a concentraciones de 50 y 100  $\mu$ g/mL a 24 horas de exposición con respecto al control. La viabilidad celular no fue dependiente de la dosis, pero si del tiempo de exposición en esta línea celular. Esto sugiere una cierta biocompatibilidad con las células al no mostrar citotoxicidad a diferentes concentraciones durante 24 horas. Estos resultados concuerdan con los publicados por que prueban el efecto de la viabilidad en células epiteliales de colon-26 de los nanovectores a base de lípidos extraídos de exosomas de Jengibre, mostrando que a 24 horas no hubo diferencia significativa en la viabilidad celular con respecto al control en concentraciones de 0-200  $\mu$ M, pero a las 48 horas de exposición a partir de 100  $\mu$ M de concentración se obtuvo un 50% en la viabilidad celular (X. Wang et al., 2019). La disminución de la viabilidad fue menor en esta línea celular que cuando se aplicó los liposomas catiónicos DC-Chol/DOPE usados como control. En otro estudio también extraen los lípidos de los exosomas de Jengibre y evalúan su efecto citotóxico en células RAW 264.7 y de colón-26 a 24 horas. Se observó que no hubo cambios en la viabilidad de forma significativa con respecto al control a una concentración  $\leq$  100  $\mu$ M, mayor a esa concentración disminuyó la viabilidad en 40 y 30% en células RAW 264.7 y Colón-26 (Mingzhen Zhang et al., 2017). Estos resultados indican que la biocompatibilidad y no toxicidad de los exosomas dependen de la concentración y el tiempo de exposición en la línea celular.

También, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que no existe una mayor captación de los exosomas a altas concentraciones, ya que no hubo un efecto antiproliferativo asociado a la carga. Además, puede deberse a la falta de sensibilidad que posee el ensayo MTT para detectar el número de células viables que puede resultar en una subestimación del efecto antiproliferativo de los exosomas de Jengibre. Sin embargo, un mayor tiempo de exposición resultó en una disminución

significativa de la viabilidad celular. Se ha demostrado por espectrometría de masas que los exosomas contienen como carga 6-shogaol (2.95 ug/mg), 6-gingerol (5.68 ug/mg), miRNAs, lípidos y proteínas citosólicas (actina, actina-2, enzimas proteolíticas como cisteína proteasa gp3a, cisteína proteasa gp3b, ferritina, subunidades del proteosoma, piruvato kinasa, tripsina, calmodulina, glutamina sintetasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, histonas, zingipaína 1 y 2) abundantes y pocas de membrana (acuaporinas PIP2, subunidades de ATP sintasa, canales de cloruro) (Zhang M, Viennois E, Prasad M, Zhang Y, Wang L, Zhang Z, Han MK, Xiao B, Xu C, Srinivasan S, 2016). El estudio reportado por Q. Liu et al., (2012), encontró que el 6-shogaol del Jengibre inhibió de forma significativa la viabilidad celular de HeLa de una manera dependiente de la dosis, llegando a un 20% de viabilidad a una concentración de 11,056 ug/mL del compuesto. El efecto antiproliferativo estuvo mediado por la activación de Bax, pro-caspasa 3 y degradación de PARP, deteniendo el ciclo celular en la fase G2/M provocando la muerte por apoptosis (Q. Liu et al., 2012). Pei et al., (2021) demostraron que el 6-shogaol inhibía la proliferación de las células HeLa y esta inhibición era dependiente del tiempo y la dosis. La IC50 fue de 7,09 ug/ML A 24 horas de exposición. Se comprobó que induce la detención del ciclo celular en G2/M, aumenta la expresión de proteínas apoptóticas como citocromo C, PARP escindida y Bax y disminuyó el contenido de proteínas antiapoptóticas como BCL-2. Disminuyó la expresión de la vía PI3K/Akt/mTOR lo que produjo un aumento de la apoptosis, ROS y la autofagia (Pei et al., 2021). El 6-gingerol otro fenol abundante en los rizomas de jengibre produce disminución de la viabilidad celular en HeLa, induciendo apoptosis, incremento de las células en la fase G1 y detención en la fase G2 y aumento de la actividad de las caspasas 3 y 7 (Kapoor et al., 2016). En otro estudio, Rastogi et al., (2015) el 6-gingerol inhibió la proliferación celular de líneas HeLa y con una concentración de 58,88 ug/mL se obtuvo una disminución en la viabilidad del 75%. Se descubrió que este fenol aumenta la expresión de p53 y p21 mediada por la inhibición del proteosoma, provoca daño en el ADN y detiene el ciclo celular en las fases G2/M. Estos

ayudan a comprender la disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo cuando las células HeLa se trataron con diferentes concentraciones de exosomas.

La línea celular HEK293 posee un genotipo aberrante por la inserción de genes Ad5 E1A y E1B (adenovirus tipo 5) en el cromosoma 19 con la finalidad de disminuir la apoptosis e inmortalizar la línea, desregulando las vías pRB/p53 (Thomas & Smart, 2005; Stepanenko & Dmitrenko, 2015; Tan et al., 2021). La presencia de estos genes ha permitido la producción en altos niveles de proteínas recombinantes (transfección), se utiliza frecuentemente para producir vectores virales terapéuticos como adenoasociados y expresión de receptores de membrana y canales iónicos. Estas células no se consideran normales, la incorporación de estos genes ha permitido la formación de tumores y como sus mecanismos apoptóticos están desregulados se utilizan ampliamente en la transfección. Se ha demostrado que el aumento del número de pases celulares incrementa de forma significativa la tumorigenicidad de esta línea (Stepanenko & Dmitrenko, 2015). Por lo tanto, se escogió esta línea para evaluar la biocompatibilidad o el efecto antitumoral de los exosomas de Jengibre y Cúrcuma.

El tratamiento de las células de HEK293 con los exosomas de cúrcuma a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostraron un aumento significativo de la viabilidad con respecto al control a las 24 y 48 horas de exposición, al igual que ocurrió con la línea celular HeLa. Estos resultados al ser similares con la línea de HeLa puede deberse a la misma causa, una interferencia química causada por la reducción no enzimática (polifenoles como la Curcumina) del MTT y una posible interferencia óptica producida por la Curcumina. A una mayor concentración de exosomas (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) si hubo una disminución significativa de la proliferación celular, lo que indica que la viabilidad fue dependiente de la concentración de exosomas. Se pudo observar que a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la viabilidad no cambió a 24 y 48 horas, lo que sugiere la falta de sensibilidad del MTT y que puede resultar en una subestimación de la actividad antiproliferativa de los exosomas de Cúrcuma. El estudio realizado por Siddiqui et al., (2018) demostró que las células HEK293 utilizadas como control de cuatro líneas cancerígenas (H1299, MCF-7,

HeLa y PC3), exhibían una disminución de la viabilidad celular en un 20% cuando se añadió 7,37ug/mL de Curcumina con un tiempo de exposición de 72 horas, no se observó diferencia significativa a las 24 y 48 horas. Por lo tanto, la carga de los exosomas de cúrcuma puede mediar un rol antiproliferativo en las células HEK293 dependiente de la concentración y un posible efecto antitumoral. El efecto de la disminución de la viabilidad celular en la línea HEK293 por parte de los exosomas de Jengibre fue dependiente del tiempo de exposición, mas no de la concentración de exosomas resultados similares a los obtenidos en la línea celular HeLa, lo que indica la biocompatibilidad de los exosomas con estas líneas celulares. Los resultados obtenidos pueden deberse a una falta de sensibilidad del ensayo MTT a concentraciones más altas, subestimando el posible efecto antiproliferativo de los exosomas en esta línea celular o en su defecto las células ya no son capaces de captar mayor contenido de exosomas siendo su límite máximo de captación 50ug/mL. Los posibles componentes de los exosomas que pueden disminuir la viabilidad celular se puede atribuir a los fenoles 6-gingerol y 6-shogaol. El estudio realizado por Ray et al., (2015) utilizan la línea celular HEK293 como control de células cancerosas para observar el efecto de la viabilidad a diferentes concentraciones del 6-shogaol. Obtuvieron un valor de IC50 de 19,34 ug/mL en esta línea celular lo que indica que existe un efecto citotóxico del 6-shogaol en HEK293. Rastogi et al., (2015) demostraron que a una concentración de 58,87 ug/mL de 6-gingerol se obtuvo una disminución en un 25% de la viabilidad celular a 72 horas de exposición. Además, los exosomas contienen miRNAs que podrían ejercer efectos antiproliferativos Estos resultados explican el efecto anti proliferativo de la carga de los exosomas de Jengibre en las células HEK293.

Además, los exosomas de jengibre contienen miRNAs que podrían ejercer efectos antiproliferativos en las líneas de HeLa y HEK293. Se ha demostrado que las nanovesículas aisladas de Jengibre contienen 124 miRNAs que pueden unirse y regular la expresión de genes humanos mediante la unión a las regiones 3' no traducidas (Zhang M, Viennois E, Prasad M, Zhang Y, Wang L, Zhang Z, Han MK, Xiao B, Xu C, Srinivasan S, 2016). El análisis bioinformático y de secuenciación reveló que las

nanovesículas derivadas jengibre contienen miR-1078, un micro RNA que silencia al gen que produce la interleucina IL-6 (citocina inflamatoria) (Xiao et al., 2018). Se conoce que la IL-6 induce la transición epitelial mesenquimatosa (EMT) a través de la activación de Stat3 lo que conlleva a la progresión del cáncer en línea celulares de cancer de cuello uterino como HeLa (Miao et al., 2014).

La línea de fibroblasto (HFF) son células normales que se utilizan en múltiples aplicaciones como sistemas de control en nanotoxicología para evaluar la biocompatibilidad de los nanocompuestos. Los exosomas de cúrcuma y jengibre a ambas concentraciones 50 y 100 ug/mL disminuyeron la viabilidad celular con respecto al control a las 24 horas de exposición. Se conoce que uno de los mayores fitoquímicos de los rizomas de cúrcuma es la Curcumina, de jengibre el 6-gingerol y 6-shogaol y se ha corroborado su presencia en las nanovesículas (Zhang et al., 2016; C. Liu et al., 2022). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Jermy et al., (2021) donde también se obtuvo una disminución mínima de la viabilidad celular con un valor de 85% a una concentración de 100 ug/mL de curcumina a las 48 horas de exposición. Las nanoemulsiones a partir del rizoma de jengibre a concentraciones de 50 y 100 ug/mL han demostrado disminuir la viabilidad celular de forma significativa con el control, a una concentración de 100 ug/mL se obtuvo un 80% de viabilidad a las 24 horas de exposición (Tayarani et al., 2022). Sin embargo, se está evaluando el efecto de los exosomas y estos poseen otros componentes que pueden presentar sinergismo o antagonismo entre ellos generando un efecto diferente en la viabilidad celular. Se presume que la disminución en la viabilidad celular a ambas concentraciones a las 24 horas de exposición con respecto al control puede deberse a una subestimación de la viabilidad más que a un efecto antiproliferativo. La reducción del MTT se produce en toda la célula y muchos factores pueden afectar esta medición como el metabolismo adaptativo de la célula, por lo tanto se sugiere complementar el ensayo con otro métodos de medición de la viabilidad no metabólicos (Stepanenko & Dmitrenko, 2015b). Se presume en la viabilidad celular a las 48 horas de exposición en ambas concentraciones a un posible artefacto del ensayo más que una atribución a un efecto proliferativo, ya

que los fenoles presentes en los exosomas pueden reducir directamente el MTT sobreestimando el efecto proliferativo.

El estudio de Zhang et al., (2016) ha comprobado la biocompatibilidad de las nanovesículas derivadas de Jengibre en líneas celulares epiteliales de colon-26 y de macrófagos RAW 264.7 durante 24 horas de exposición a concentraciones de 1 a 100 ug/mL, no hubo cambios significativos en la viabilidad. Igualmente, las nanovesículas derivadas de Cúrcuma no generaron cambios significativos en la viabilidad a concentraciones entre 1 a 100 ug/mL en líneas celulares RAW 264.7 y colon-26 (C. Liu et al., 2022). Sin embargo, estos estudios no se comparan con la presente investigación ya que se evalúa el efecto de la viabilidad en líneas celulares diferentes y se obtienen poblaciones de exosomas con tamaños diferentes a los reportados. Cabe destacar que no se han realizado estudios de evaluación de la viabilidad celular de los exosomas derivados de Cúrcuma y Jengibre en líneas celulares HeLa, HEK293 y HFF. En este estudio se explicó los resultados basándose en la carga caracterizada de las nanovesículas de cúrcuma y Jengibre.

Estos hallazgos preliminares, abren la posibilidad de utilizar los exosomas derivados del Jengibre y Cúrcuma como posibles agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer en combinación con la quimioterapia. Además, se podrían aplicar como vehículos para administrar fármacos conjugados con moléculas específicas que se dirijan a las células madres cancerígenas como una terapia dirigida.

## **Capítulo VI: Conclusiones**

Se caracterizó los exosomas derivados de cúrcuma mediante microscopía electrónica de transmisión y Western blot obteniéndose exosomas con una morfología semiesférica ovalada y rango de diámetro entre 30 a 71 nm y expresión de biomarcadores con homología a las tetraspaninas de

mamíferos CD81+ (alta intensidad de banda), CD9+ (intensidad intermedia) y CD63-. Los marcadores positivos también se expresaron en las microvesículas de cúrcuma con una menor intensidad de banda.

Se caracterizó los exosomas derivados de jengibre mediante microscopía electrónica de transmisión y Western blot obteniéndose exosomas con una morfología esférica y rango de diámetro entre 31 a 156 nm y biomarcadores con homología a las tetraspaninas de mamíferos CD81+ (baja intensidad de banda), CD9+ (baja intensidad) y CD63-.

El perfil proteico de los exosomas de cúrcuma y jengibre de acuerdo al análisis mediante SDS-PAGE estuvo en un rango entre 40-12 KDa y 40-10 kDa respectivamente.

Se determinó la citotoxicidad de los exosomas derivados de Cúrcuma mediante el ensayo MTT mostrando una disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo de exposición y la concentración en la línea celular HeLa y HEK293. En el caso de los exosomas derivados de Jengibre demostró una disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo de exposición en células HeLa y HEK293.

## Capítulo VII: Recomendaciones

- Para una caracterización adecuada de los exosomas se propone utilizar la técnica de inmunomarcaje con oro para CD81 y CD9 por microscopía electrónica de transmisión para asegurarse de la observación de los exosomas bajo TEM.
- Disponer de equipos de caracterización de exosomas como el Nanosight (Análisis de seguimiento de nanopartículas: NTA) para obtener el número de partículas y una estimación de la pureza (partículas/ug de proteína).
- En este estudio solo se corroboró la presencia de proteínas transmembrana exosomales, sin embargo, para una mayor caracterización se propone demostrar la presencia de proteínas

citosólicas exosomales como VPS23A/VPS23B (TSG101 en mamíferos) que pertenecen al complejo ESCRT-I.

- Calcular la dosis-respuesta IC50 para poder establecer las concentraciones de exosomas que son biocompatibles con las células.
- Aplicar microscopía de fluorescencia para observar muerte celular y apoptosis.

### Capítulo VIII: Referencias

Abhange, K., Makler, A., Wen, Y., Ramnauth, N., Mao, W., Asghar, W., & Wan, Y. (2021). Small extracellular vesicles in cancer. *Bioactive Materials*, 6(11), 3705–3743.

<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.015>

Ahlemann, M., Zeidler, R., Lang, S., Mack, B., Gires, O., & Mu, M. (2006). Overexpression Facilitates mTOR-dependent Growth Transformation. *Molecular Carcinogenesis*, 967(May), 957–967.

<https://doi.org/10.1002/mc>

Akuma, P., Okagu, O. D., & Udenigwe, C. C. (2019). Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3(April), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00023>

Alzhrani, G. N., Alanazi, S. T., Alsharif, S. Y., Albalawi, A. M., Alsharif, A. A., Abdel-Maksoud, M. S., & Elsherbiny, N. (2021). Exosomes: Isolation, characterization, and biomedical applications. *Cell Biology International*, 45(9), 1807–1831. <https://doi.org/10.1002/cbin.11620>

Ansari, J. A., Ahmad, M. K., Khan, A. R., Fatima, N., Khan, H. J., Rastogi, N., Mishra, D. P., & Mahdi, A. A. (2016). Anticancer and antioxidant activity of Zingiber officinale roscoe rhizome. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(11), 767–773.

- Ayala-Mar, S., Donoso-Quezada, J., Gallo-Villanueva, R. C., Perez-Gonzalez, V. H., & González-Valdez, J. (2019). Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes. *Electrophoresis*, *40*(23–24), 3036–3049. <https://doi.org/10.1002/elps.201800526>
- Bahman, F., Greish, K., & Taurin, S. (2019). Nanotechnology in Insulin Delivery for Management of Diabetes. *Pharmaceutical Nanotechnology*, *7*(2), 113–128. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190321110721>
- Bassani, S., & Cingolani, L. A. (2012). Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *44*(5), 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.01.020>
- BioWiki. (s.f). *Zingiber officinale*. Retrieved August 13, 2022, from <https://biowiki-ecuador.bio/tiki-index.php?page=HomePage>
- Bhawan Verma, R., Vigyan Kendra, K., Preeti Kumari, I., Kumar Maurya Scholar, R., Kumar, V., Kumar Verma, R., Kumari, P., Kumar Maurya, R., Verma, R., & Kumar Singh, R. (2018). Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review Related papers Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review. *International Journal of Chemical Studies*, *6*(4), 1354–1357.
- Braga, M. E. M., Leal, P. F., Carvalho, J. E., & Meireles, M. A. A. (2003). Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(22), 6604–6611. <https://doi.org/10.1021/jf0345550>
- Cai, Y., Zhang, L., Zhang, Y., & Lu, R. (2022). Plant-Derived Exosomes as A Drug-Delivery Approach for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Cancer. *Pharmaceutics*, *14*(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040822>

- Caiza, K. (2019). *Determinación de la actividad proliferativa de nanovesículas aisladas del zumo de guanábana (Annona muricata) en líneas celulares cancerígenas* [tesis de pregrado]. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Chen, X., Zhou, Y., & Yu, J. (2019). Exosome-like Nanoparticles from Ginger Rhizomes Inhibited NLRP3 Inflammasome Activation. *Molecular Pharmaceutics*, *16*(6), 2690–2699.  
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00246>
- Clancy, J. W., Schmidtman, M., & D'Souza-Schorey, C. (2021). The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances*, *3*(6), 399–406. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00127>
- Cui, Y., Cao, W., He, Y., Zhao, Q., Wakazaki, M., Zhuang, X., Gao, J., Zeng, Y., Gao, C., Ding, Y., Wong, H. Y., Wong, W. S., Lam, H. K., Wang, P., Ueda, T., Rojas-Pierce, M., Toyooka, K., Kang, B. H., & Jiang, L. (2019). A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in Arabidopsis root cells. *Nature Plants*, *5*(1), 95–105. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0328-1>
- Dad, H. A., Gu, T. W., Zhu, A. Q., Huang, L. Q., & Peng, L. H. (2021). Plant Exosome-like Nanovesicles: Emerging Therapeutics and Drug Delivery Nanoplatforms. *Molecular Therapy*, *29*(1), 13–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.030>
- Deng, Z., Rong, Y., Teng, Y., Mu, J., Zhuang, X., Tseng, M., Samykutty, A., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Suttles, J., & Zhang, H. G. (2017). Broccoli-Derived Nanoparticle Inhibits Mouse Colitis by Activating Dendritic Cell AMP-Activated Protein Kinase. *Molecular Therapy*, *25*(7), 1641–1654.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.025>
- Ecuador - International Agency for Research on Cancer*. (n.d.). Retrieved June 29, 2022, from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/218-ecuador-fact-sheets.pdf>

- Food Plants International. (2019, October 3). Retrieved August 13, 2022, from <https://foodplantsinternational.com/>
- Fujita, D., Arai, T., Komori, H., Shirasaki, Y., Wakayama, T., Nakanishi, T., & Tamai, I. (2018). Apple-Derived Nanoparticles Modulate Expression of Organic-Anion-Transporting Polypeptide (OATP) 2B1 in Caco-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 15(12), 5772–5780. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00921>
- 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>
- García, E. (2019). *Extractos hidroalcohólicos de Curcuma longa L. (cúrcuma) de tres regiones del Ecuador y su posible uso como antioxidante* [tesis de pregrado]. Universidad Central del Ecuador.
- Ghasemi, F., Shafiee, M., Banikazemi, Z., Pourhanifeh, M. H., Khanbabaee, H., Shamshirian, A., Amiri Moghadam, S., ArefNezhad, R., Sahebkar, A., Avan, A., & Mirzaei, H. (2019). Curcumin inhibits NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathology Research and Practice*, 215(10), 152556. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152556>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gioia, S. Di, & Conese, M. (2020). *Biological properties and therapeutic effects of plant - derived nanovesicles*. 1096–1122.
- Gupta, S. kumar, & Sharma, A. (2014). Medicinal properties of Zingiber officinale Roscoe - A Review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(5), 124–129. <https://doi.org/10.9790/3008-0955124129>

- 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). <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes and Development*, 23(21), 2496–2506. <https://doi.org/10.1101/gad.1825209>
- He, B., Hamby, R., & Jin, H. (2021). Plant extracellular vesicles: Trojan horses of cross-kingdom warfare. *FASEB BioAdvances*, 3(9), 657–664. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00040>
- Hochheimer, N., Sies, R., Aschenbrenner, A. C., Schneider, D., & Lang, T. (2019). Classes of non-conventional tetraspanins defined by alternative splicing. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50267-0>
- Isono, E. (2021). ESCRT Is a Great Sealer: Non-Endosomal Function of the ESCRT Machinery in Membrane Repair and Autophagy. *Plant and Cell Physiology*, 62(5), 766–774. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab045>
- Izon. (s.f). *qEVOriginal User Manual*. Retrieved August 14, 2022, from [https://www.schaefer-tec.it/sites/default/files/qEVoriginal\\_Technical\\_Note.pdf](https://www.schaefer-tec.it/sites/default/files/qEVoriginal_Technical_Note.pdf)
- Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., & Antalíková, J. (2020). Tetraspanins, more than markers of extracellular vesicles in reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms21207568>
- Jermy, B. R., Almohazey, D., Alamoudi, W. A., Palanivel, R. M., AlSudairi, N., Dafalla, H., Almofleh, A. A., Alfareed, T. M., & Ravinayagam, V. (2021). Synergistic action of curcumin and cisplatin on spinel ferrite/hierarchical MCM-41 nanocomposite against MCF-7, HeLa and HCT 116 cancer cell line.

*Cancer Nanotechnology*, 12(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12645-021-00106-7>

Jimenez-Jimenez, S., Hashimoto, K., Santana, O., Aguirre, J., Kuchitsu, K., & Cárdenas, L. (2019). Emerging roles of tetraspanins in plant inter-cellular and inter-kingdom communication. *Plant Signaling and Behavior*, 14(4), 1–11. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1581559>

Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z. Bin, Wang, B., Zhang, L., Roth, M., Welti, R., Mobley, J., Jun, Y., Miller, D., & 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>

Kalarikkal, S. P., & Sundaram, G. M. (2021). Edible plant-derived exosomal microRNAs: Exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 414(January), 115425. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115425>

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). <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>

Kanemoto, S., Nitani, R., Murakami, T., Kaneko, M., Asada, R., Matsuhisa, K., Saito, A., & Imaizumi, K. (2016). Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.019>

Kapoor, V., Aggarwal, S., & Das, S. N. (2016). 6-Gingerol Mediates its Anti Tumor Activities in Human Oral and Cervical Cancer Cell Lines through Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Phytotherapy Research*, 30(4), 588–595. <https://doi.org/10.1002/ptr.5561>

Karakaş, D., Ari, F., & Ulukaya, E. (2017). The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities

although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 41(6), 919–925.

<https://doi.org/10.3906/biy-1703-104>

Karamanidou, T., & Tsouknidas, A. (2022). Plant-derived extracellular vesicles as therapeutic nanocarriers. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 1–14.

<https://doi.org/10.3390/ijms23010191>

Khatun, Z., Bhat, A., Sharma, S., & Sharma, A. (2016). Elucidating diversity of exosomes: Biophysical and molecular characterization methods. *Nanomedicine*, 11(17), 2359–2377.

<https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0192>

Kim, J., Li, S., Zhang, S., & Wang, J. (2022). Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 53–69.

<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.006>

Kim, K., Park, J., Sohn, Y., Oh, C. E., Park, J. H., Yuk, J. M., & Yeon, J. H. (2022). Stability of Plant Leaf-Derived Extracellular Vesicles According to Preservative and Storage Temperature. *Pharmaceutics*, 14(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020457>

Lane, R. E., Korbie, D., Trau, M., & Hill, M. M. (2017). Purification Protocols for Extracellular Vesicles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1660, 111–130. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_10)

Lefebvre, C., Legouis, R., & Culetto, E. (2018). ESCRT and autophagies: Endosomal functions and beyond. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 74, 21–28.

<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.014>

Lewinska, A., Adamczyk, J., Pajak, J., Stoklosa, S., Kubis, B., Pastuszek, P., Słota, E., & Wnuk, M. (2014). Curcumin-mediated decrease in the expression of nucleolar organizer regions in cervical cancer

- (HeLa) cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 771, 43–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.07.001>
- Li, L., Jiang, G., Yu, W., Liu, D., Chen, H., Liu, Y., Tong, Z., Kong, X., & Yao, J. (2017). Preparation of chitosan-based multifunctional nanocarriers overcoming multiple barriers for oral delivery of insulin. *Materials Science and Engineering C*, 70(Part 2), 278–286.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.083>
- 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>
- Li, S. (2011). Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*, 5(1), 28–54. <https://doi.org/10.2174/2210290601102010028>
- Liang, Y., Duan, L., Lu, J., & Xia, J. (2021). Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, 11(7), 3183–3195. <https://doi.org/10.7150/THNO.52570>
- Liangsupree, T., Multia, E., & Riekkola, M. L. (2021). Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *Journal of Chromatography A*, 1636, 461773.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461773>
- Liu, C., Yan, X., Zhang, Y., Yang, M., Ma, Y., Zhang, Y., Xu, Q., Tu, K., & Zhang, M. (2022). Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1–17.  
<https://doi.org/10.1186/s12951-022-01421-w>
- Liu, Q., Peng, Y. B., Qi, L. W., Cheng, X. L., Xu, X. J., Liu, L. Le, Liu, E. H., & Li, P. (2012). The cytotoxicity mechanism of 6-shogaol-treated HeLa human cervical cancer cells revealed by label-free shotgun proteomics and bioinformatics analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,

2012. <https://doi.org/10.1155/2012/278652>

Liu, Y., Liu, J., & Zhang, Y. (2019). Research Progress on Chemical Constituents of *Zingiber officinale* Roscoe. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5370823>

Logozzi, M., Di Raimo, R., Mizzoni, D., & Fais, S. (2021). Nanovesicles from organic agriculture-derived fruits and vegetables: Characterization and functional antioxidant content. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158170>

Lu, M., & Huang, Y. (2020). Bioinspired exosome-like therapeutics and delivery nanoplatfoms. *Biomaterials*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119925>

Mahomoodally, M. F., Aumeeruddy, M. Z., Rengasamy, K. R. R., Roshan, S., Hammad, S., Pandohee, J., Hu, X., & Zengin, G. (2021a). Ginger and its active compounds in cancer therapy: From folk uses to nano-therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology*, 69, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.009>

Mahomoodally, M. F., Aumeeruddy, M. Z., Rengasamy, K. R. R., Roshan, S., Hammad, S., Pandohee, J., Hu, X., & Zengin, G. (2021b). Ginger and its active compounds in cancer therapy: From folk uses to nano-therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology*, 69(August), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.009>

Mao, Q. Q., Xu, X. Y., Cao, S. Y., Gan, R. Y., Corke, H., Beta, T., & Li, H. Bin. (2019). Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*zingiber officinale roscoe*). *Foods*, 8(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods8060185>

Malvern Panalytical. (s.f). *Análisis de Seguimiento de nanopartículas*. Retrieved August 13, 2022, from <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis>

- Memarzia, A., Khazdair, M. R., Behrouz, S., Gholamnezhad, Z., Jafarnejhad, M., Saadat, S., & Boskabady, M. H. (2021). Experimental and clinical reports on anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Curcuma longa* and curcumin, an updated and comprehensive review. In *BioFactors* (Vol. 47, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/biof.1716>
- Miao, J. W., Liu, L. J., & Huang, J. (2014). Interleukin-6-induced epithelial-mesenchymal transition through signal transducer and activator of transcription 3 in human cervical carcinoma. *International Journal of Oncology*, *45*(1), 165–176. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2422>
- Mitchell, B. L., Yasui, Y., Li, C. I., Fitzpatrick, A. L., & Lampe, P. D. (2005). Impact of Freeze-thaw Cycles and Storage Time on Plasma Samples Used in Mass Spectrometry Based Biomarker Discovery Projects. *Cancer Informatics*, *1*, 98–104. <https://doi.org/10.1177/117693510500100110>
- Mosesso, N., Nagel, M. K., & Isono, E. (2019). Ubiquitin recognition in endocytic trafficking - With or without ESCRT-0. *Journal of Cell Science*, *132*(16). <https://doi.org/10.1242/JCS.232868>
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. Bin, Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition and Food Research*, *58*(7), 1561–1573. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300729>
- Pandithage, R. (2021, November 24). *Brief introduction to contrasting for EM sample preparation*. Science Lab | Leica Microsystems. Retrieved August 12, 2022, from <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-contrasting-for-em-sample-preparation/>
- Pei, X. D., He, Z. L., Yao, H. L., Xiao, J. S., Li, L., Gu, J. Z., Shi, P. Z., Wang, J. H., & Jiang, L. H. (2021). 6-Shogaol from ginger shows anti-tumor effect in cervical carcinoma via PI3K/Akt/mTOR pathway. *European Journal of Nutrition*, *60*(5), 2781–2793. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02440-9>

- Peng, L., Wang, B., & Ren, P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(2), 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.014>
- Perut, F., Roncuzzi, L., Avnet, S., Massa, A., Zini, N., Sabbadini, S., Giampieri, F., Mezzetti, B., & Baldini, N. (2021). Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells. *Biomolecules*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom11010087>
- PROCOMER Costa Rica exporta. (s.f). *Manual Técnico Siembra de - Procomer*. Retrieved August 14, 2022, from <https://www.procomer.com/wp-content/uploads/Manual-de-siembra-curcuma.pdf>
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., & 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), 19514–19527. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4004>
- Rashed, M. H., Bayraktar, E., Helal, G. K., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., & Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030538>
- Rastogi, N., Duggal, S., Singh, S. K., Porwal, K., Srivastava, V. K., Maurya, R., Bhatt, M. L. B., & Mishra, D. P. (2015). Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anticancer activity of 6-Gingerol in cervical cancer cells. *Oncotarget*, 6(41), 43310–43325. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6383>
- Ray, A., Vasudevan, S., & Sengupta, S. (2015). 6-Shogaol Inhibits Breast Cancer Cells and Stem Cell-Like Spheroids By Modulation of Notch Signaling Pathway and Induction of Autophagic Cell Death. *PLoS ONE*, 10(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137614>
- Regente, M., Corti-Monzón, G., Maldonado, A. M., Pinedo, M., Jorrín, J., & de la Canal, L. (2009). Vesicular fractions of sunflower apoplastical fluids are associated with potential exosome marker

proteins. *FEBS Letters*, 583(20), 3363–3366. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.041>

Royal Botanic Garden KEW. (s.f). *Living collections*. Retrieved August 13, 2022, from <https://www.kew.org/kew-gardens/plants/living-collection>

Saiz de Cos, P. (2014). Cúrcuma I (*Curcuma longa* L.). *REDUCA (Biología)*, 7(2), 84–99.

Scarff, C. A., Fuller, M. J. G., Thompson, R. F., & Iadaza, M. G. (2018). Variations on negative stain electron microscopy methods: Tools for tackling challenging systems. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(132), 1–8. <https://doi.org/10.3791/57199>

Sedgwick, A. E., & D'Souza-Schorey, C. (2018). The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*, 19(5), 319–327. <https://doi.org/10.1111/tra.12558>

Sharma, P. K., Singh, V., & Ali, M. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of zingiber officinale roscoe. *Pharmacognosy Journal*, 8(3), 185–190. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.3.3>

Siddiqui, F. A., Prakasam, G., Chattopadhyay, S., Rehman, A. U., Padder, R. A., Ansari, M. A., Irshad, R., Mangalhari, K., Bamezai, R. N. K., Husain, M., Ali, S. M., & Iqbal, M. A. (2018). Curcumin decreases Warburg effect in cancer cells by down-regulating pyruvate kinase M2 via mTOR-HIF1 $\alpha$  inhibition. *Scientific Reports*, 8(1), 2–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25524-3>

Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>

Singh, M., & Singh, N. (2009). Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 325(1–2), 107–119. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0025-5>

- Sofyan, N., Situmorang, F. W., Ridhova, A., Yuwono, A. H., & Udhiarto, A. (2018). Visible light absorption and photosensitizing characteristics of natural yellow 3 extracted from *Curcuma Longa* L. for Dye-Sensitized solar cell. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *105*(1).  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/105/1/012073>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015a). HEK293 in cell biology and cancer research: Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, *569*(2), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015b). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, *574*(2), 193–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>
- Suharta, S., Barlian, A., Hidajah, A. C., Notobroto, H. B., Ana, I. D., Indariani, S., Wungu, T. D. K., & Wijaya, C. H. (2021). Plant-derived exosome-like nanoparticles: A concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. *Journal of Food Science*, *86*(7), 2838–2850. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15787>
- Sun, Y., Huo, C., Qiao, Z., Shang, Z., Uzzaman, A., Liu, S., Jiang, X., Fan, L. Y., Ji, L., Guan, X., Cao, C. X., & Xiao, H. (2018). Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *Journal of Proteome Research*, *17*(3), 1101–1107.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00770>
- Sundaram, K., Miller, D. P., Kumar, A., Teng, Y., Sayed, M., Mu, J., Lei, C., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Jun, Y., Merchant, M. L., He, L., Fang, Y., Zhang, S., Zhang, X., Park, J. W., Lamont, R. J., & Zhang, H. G. (2019). Plant-Derived Exosomal Nanoparticles Inhibit Pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*. *IScience*, *21*, 308–327. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.032>

- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
- Tanchak, M. A., & Fowke, L. C. (1987). The morphology of multivesicular bodies in soybean protoplasts and their role in endocytosis. *Protoplasma*, 138(2–3), 173–182. <https://doi.org/10.1007/BF01281026>
- Tayarani, S. sadat, Khayatzadeh, J., Es-haghi, A., & Behnaz Shadan. (2022). *Anti-cancer effects of nanoemulsion prepared using Zingiber Officinale L . tincture against PC3 prostate cancer cells*. 9(3), 241–251.
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A., Hutchins, E., Mu, J., Deng, Z., Luo, C., Sundaram, K., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Hsieh, M., Reiman, R., Haribabu, B., Yan, J., Jala, V. R., Miller, D. M., ... Zhang, H. G. (2018). Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota. *Cell Host and Microbe*, 24(5), 637-652.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.001>
- Teng, Y., Xu, F., Zhang, X., Mu, J., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Sriwastva, M., Kumar, A., Sundaram, K., Zhang, L., Park, J. W., Chen, S. yu, Zhang, S., Yan, J., Merchant, M. L., Zhang, X., McClain, C. J., Wolfe, J. K., ... Zhang, H. G. (2021). Plant-derived exosomal microRNAs inhibit lung inflammation induced by exosomes SARS-CoV-2 Nsp12. *Molecular Therapy*, 29(8), 2424–2440. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.005>
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3 SPEC. ISS.), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Tung, B. T., Nham, D. T., Hai, N. T., & Thu, D. K. (2019). Curcuma longa, the Polyphenolic Curcumin

Compound and Pharmacological Effects on Liver. In *Dietary Interventions in Liver Disease: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814466-4.00010-0>

USDA. (s.f). Retrieved August 13, 2022, from <https://www.usda.gov/>

U.S. Department of Health and Human Services. (n.d.). *Significant research advances enabled by HeLa Cells*. National Institutes of Health. Retrieved August 24, 2022, from <https://osp.od.nih.gov/scientific-sharing/hela-cells-timeline/>

Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 5–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:5>

Wang, F., Vandepoele, K., & Van Lijsebettens, M. (2012). Tetraspanin genes in plants. *Plant Science*, 190, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.03.005>

Wang, M., Jiang, S., Zhou, L., Yu, F., Ding, H., Li, P., Zhou, M., & Wang, K. (2019). Potential Mechanisms of Action of Curcumin for Cancer Prevention: Focus on Cellular Signaling Pathways and miRNAs. *International Journal of Biological Sciences*, 15(6), 1200–1214. <https://doi.org/10.7150/ijbs.33710>

Wang, P., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202>

Wang, Q., Ren, Y., Mu, J., Egilmez, N. K., Zhuang, X., Deng, Z., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2015). Grapefruit-derived nanovectors use an activated leukocyte trafficking pathway to deliver therapeutic agents to inflammatory tumor sites. *Cancer Research*, 75(12), 2520–2529. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3095>

Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. Bin, Jiang, H., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G.

- (2013). Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>
- Wang, X., Zhang, M., Flores, S. R. L., Woloshun, R. R., Yang, C., Yin, L., Xiang, P., Xu, X., Garrick, M. D., Vidyasagar, S., Merlin, D., & Collins, J. F. (2019). Oral Gavage of Ginger Nanoparticle-Derived Lipid Vectors Carrying Dmt1 siRNA Blunts Iron Loading in Murine Hereditary Hemochromatosis. *Molecular Therapy*, 27(3), 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.003>
- Woith, E., Fuhrmann, G., & Melzig, M. F. (2019). Extracellular Vesicles-Connecting Kingdoms. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 5695.
- Xiao, J., Feng, S., Wang, X., Long, K., Luo, Y., Wang, Y., Ma, J., Tang, Q., Jin, L., Li, X., & Li, M. (2018). Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ*, 2018(7). <https://doi.org/10.7717/peerj.5186>
- Xu, Z., Zeng, S., Gong, Z., & Yan, Y. (2020). Exosome-based immunotherapy: a promising approach for cancer treatment. *Molecular Cancer*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01278-3>
- Yang, Y., Wang, Y., Wei, S., Zhou, C., Yu, J., Wang, G., Wang, W., & Zhao, L. (2021). Extracellular vesicles isolated by size-exclusion chromatography present suitability for RNomics analysis in plasma. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02775-9>
- Yeh, H. yu, Chuang, C. hung, Chen, H. chun, Wan, C. jen, Chen, T. liang, & Lin, L. yun. (2014). Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.003>
- You, J. Y., Kang, S. J., & Rhee, W. J. (2021). Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive Materials*, 6(12), 4321–4332.

<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.023>

Zambrano, L. (2022, March 20). *El Jengibre Busca recuperarse de Mala Racha*. [www.expreso.ec](http://www.expreso.ec).

Retrieved August 29, 2022, from <https://www.expreso.ec/actualidad/economia/jengibre-busca-recuperarse-mala-racha-123867.html>

Zhang, L., He, F., Gao, L., Cong, M., Sun, J., Xu, J., Wang, Y., Hu, Y., Asghar, S., Hu, L., & Qiao, H. (2021).

Engineering exosome-like nanovesicles derived from *Asparagus cochinchinensis* can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 1575–1586. <https://doi.org/10.2147/IJN.S293067>

Zhang M, Viennois E, Prasad M, Zhang Y, Wang L, Zhang Z, Han MK, Xiao B, Xu C, Srinivasan S, M. D.

(2016). Edible Ginger-Derived Nanoparticles: A Novel Therapeutic Approach for the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Cancer. *Biomaterials*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.018>. Edible

Zhang, Mengmeng, Zhao, R., Wang, D., Wang, L., Zhang, Q., Wei, S., Lu, F., Peng, W., & Wu, C. (2021).

Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents. *Phytotherapy Research*, *35*(2), 711–742. <https://doi.org/10.1002/ptr.6858>

Zhang, Mingcheng, Li, F., Diao, X., Kong, B., & Xia, X. (2017). Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles. *Meat Science*, *133*(May), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.05.019>

Zhang, Mingzhen, Wang, X., Han, M. K., Collins, J. F., & Merlin, D. (2017). Oral administration of ginger-derived nanolipids loaded with siRNA as a novel approach for efficient siRNA drug delivery to treat ulcerative colitis. *Nanomedicine*, *12*(16), 1927–1943. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0196>

Zhang, Mingzhen, Xiao, B., Wang, H., Han, M. K., Zhang, Z., Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D. (2016).

Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy. *Molecular Therapy*, 24(10), 1783–1796.

<https://doi.org/10.1038/mt.2016.159>

Zhang, Yi, Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917–6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

Zhang, Yuan, Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>

Zhao, F. Q., & Craig, R. (2003). Capturing time-resolved changes in molecular structure by negative staining. *Journal of Structural Biology*, 141(1), 43–52. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00546-4](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00546-4)

Zhao, Z., Yu, S., Li, M., Gui, X., & Li, P. (2018). Isolation of Exosome-Like Nanoparticles and Analysis of MicroRNAs Derived from Coconut Water Based on Small RNA High-Throughput Sequencing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2749–2757. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05614>

Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H., & Sundstrom, J. M. (2020). Methods for exosome isolation and characterization. In *Exosomes*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816053-4.00002-x>

Zhuang, X., Deng, Z. Bin, Mu, J., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Feng, W., McClain, C. J., & Zhang, H. G. (2015a). Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 1–18. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28713>

Zhuang, X., Deng, Z. Bin, Mu, J., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Feng, W., McClain, C. J., & Zhang, H. G.

(2015b). Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28713>