



**Evaluación del efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas Naranjilla
(*Solanum quitoense* Lam.) y Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.), a nivel In vitro en células HaCaT**

Erazo Muñoz, Jatari Kashi

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga

Torres Arias, Marbel, Ph.D.

04 de septiembre de 2023



Plagiarism report

Erazo Jatari_Avance tesis.pdf

Scan details

Scan time:
August 28th, 2023 at 19:49 UTC

Total Pages:
63

Total Words:
15673

Plagiarism Detection



Types of plagiarism	Percentage	Words
Identical	0.3%	48
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	0.7%	107
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Plagiarism Results: (10)

Estudio in vitro de las respuestas celulares asociad... 0.5%

[https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/660496/...](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/660496/)

Ana Peropadre López

TESIS DOCTORAL Estudio in vitro de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes Memoria presentada p...

Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, R... 0.2%

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5546313/>

Back to Top Skip to main content ...

Juega y Aprende - Programas - Bambu Day Care 0.1%

<https://bambudaycare.do/programas/juega-aprende>

× Blog...



MARBEL TORRES ARIAS

Torres Arias, Marbel, Ph.D.

Directora

Certified by

About this report
help.copyleaks.com

copyleaks.com



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Evaluación del efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.) a nivel In vitro en células HaCaT"** fue realizado por la señorita Erazo Muñoz Jatari Kashi, 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, 18 de septiembre de 2023



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

C.C. 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Erazo Muñoz Jatari Kashi**, con cédula de ciudadanía n° 1758209413, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Evaluación del efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas Naranja (*Solanum quitoense* Lam.) y Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.), a nivel In vitro en células HaCaT"** 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.

Sangolqui, 18 de septiembre de 2023

Erazo Muñoz Jatari Kashi

C.C.: 1758209413



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Erazo Muñoz Jatari Kashi**, con cédula de ciudadanía n° 1758209413, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Evaluación del efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swart.), a nivel In vitro en células HaCaT"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 18 de septiembre de 2023

Erazo Muñoz Jatari Kashi

C.C.: 1758209413

Dedicatoria

A mi madre cuya resiliencia y amor han sido mi constante inspiración para seguir sus pasos.

A mi padre quien desde pequeña me metió el bichito de la ciencia y la curiosidad en la cabeza y
de ahí no salió nunca más.

Y a esos ángeles que se han aparecido en mi camino, para salvarme cuando estoy a punto de
renderme.

Jatari Kashi

Agradecimientos

A mi mentora de tesis Marbel, cuya fe en mí desde el inicio, su constante motivación y apoyo incondicional me rescataron en un momento de incertidumbre. Expresar mi gratitud y reconocer su contribución nunca será suficiente para devolverle lo que ha hecho por mí.

A Andrea y Fernanda, cuya paciencia infinita, dirección y valiosos consejos fueron fundamentales para la realización de este proyecto de tesis.

A mi mejor amiga Eilyn quien, a pesar de los 1,580 km de distancia, no dudó en realizar la llamada que me salvó la vida aquella noche, cuando el mundo se me venía abajo.

A mis amigos y compañeros de carrera, en especial a Marie, Karolay y Jesús, quienes han llenado esta experiencia con momentos cálidos y amenos, haciéndola aún más memorable.

A Fausto, quien me brindó valiosas enseñanzas y merece un lugar especial en los logros alcanzados aquí.

Jatari Kashi

Índice de contenidos

Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
<i>Objetivo general</i>	18
<i>Objetivos específicos</i>	18
HIPÓTESIS	18
Capítulo II: Revisión de la literatura	18
VESÍCULAS EXTRACELULARES	18
EXOSOMAS	20
<i>Composición de los exosomas</i>	20
<i>Biogénesis y secreción</i>	21
<i>Funciones biológicas de los exosomas</i>	23
MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE EXOSOMAS	24
<i>Ultracentrifugación</i>	24
<i>Ultrafiltración</i>	25
<i>Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)</i>	26
<i>Inmunoadfinidad</i>	26
<i>Precipitación</i>	27
CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	27
RNAs EXOSOMALES	28
<i>Rol del RNA exosomal en la comunicación célula a célula</i>	29
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS	30
<i>Hemostasia</i>	30
<i>Inflamación</i>	31
<i>Proliferación</i>	31
<i>Remodelación dérmica</i>	32
ANGIOGÉNESIS	33
<i>Efecto angiogénico de los exosomas</i>	34
ENSAYO DE SCRATCH	35
VACCINIUM MERIDIONALE SWARTZ (MORTIÑO)	36
<i>Generalidades</i>	36
<i>Taxonomía</i>	37
<i>Distribución</i>	38
<i>Composición</i>	39
<i>Compuestos bioactivos del mortiño</i>	41
SOLANUM QUITOENSE LAMARCK (NARANJILLA)	42

<i>Generalidades</i>	42
<i>Taxonomía</i>	43
<i>Distribución</i>	44
<i>Composición</i>	45
<i>Compuestos bioactivos de la naranjilla</i>	47
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	48
AISLAMIENTO DE EXOSOMAS	48
<i>Preparación de extractos</i>	48
<i>Centrifugaciones seriadas</i>	48
<i>Purificación mediante kit Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen™, Ref.: 4484449)</i>	49
<i>Purificación mediante Cromatografía por Exclusión de Tamaño (SEC)</i>	50
<i>Cuantificación de exosomas mediante BCA (Sigma-Aldrich, Ref.: B9643-1L)</i>	51
CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS MEDIANTE TEM	52
VIABILIDAD CELULAR	53
<i>Determinación de la curva de crecimiento celular para HaCaT</i>	54
<i>Determinación de la viabilidad celular mediante MTT</i>	55
<i>Estimación del efecto cicatrizante mediante ensayo de scratch</i>	56
EXTRACCIÓN DE RNAS	57
<i>Extracción de RNAs mediante Kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Ref.: Z3100)</i>	57
<i>Extracción de RNAs mediante TriReagent (Cat. #TR 118)</i>	58
<i>Determinación de la cantidad y calidad del RNA extraído</i>	59
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
Capítulo IV: Resultados y discusión	60
AISLAMIENTO DE EXOSOMAS	60
<i>Purificación mediante kit Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen™ 4484449)</i>	60
<i>Purificación mediante SEC</i>	61
CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS MEDIANTE TEM	64
VIABILIDAD CELULAR	69
<i>Determinación de curva de crecimiento celular para HaCaT</i>	69
<i>Determinación de la viabilidad celular mediante MTT</i>	71
<i>Estimación del efecto cicatrizante mediante ensayo de scratch</i>	78
EXTRACCIÓN DE RNAS	83
<i>Determinación de la cantidad y calidad del RNA extraído</i>	83
Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones	88
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	89
Referencias	90

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Taxonomía del mortiño</i>	38
Tabla 2. <i>Composición del fruto de mortiño</i>	40
Tabla 3. <i>Taxonomía de la naranjilla</i>	43
Tabla 4. <i>Composición del fruto de naranjilla</i>	46
Tabla 5. <i>Ecuación de la curva de crecimiento celular para hacat</i>	71

Índice de figuras

Figura 1. <i>Formación de vesículas extracelulares (EV) de células madre mesenquimales (MSC) y comunicación</i>	19
Figura 2. <i>Marcadores y biomoléculas empaquetadas (carga) en los exosomas</i>	21
Figura 3. <i>Biogénesis de las nanovesículas similares a exosomas de plantas (Plant Exosome-Like Nanovesicles, PELNVS) y sus funciones en la fisiología de las plantas</i>	23
Figura 4. <i>Proceso de cicatrización en adultos multicelulares</i>	33
Figura 5. <i>Flor, fruto y esquema del mortiño</i>	37
Figura 6. <i>Distribución del mortiño en Ecuador</i>	39
Figura 7. <i>Compuestos de mortiño</i>	42
Figura 8. <i>Flor, fruto y esquema de la naranjilla</i>	43
Figura 9. <i>Distribución de la naranjilla en Ecuador</i>	45
Figura 10. <i>Compuestos de naranjilla</i>	47
Figura 11. <i>Preparación de extractos y extracción de exosomas a partir de mortiño y naranjilla</i>	49
Figura 12. <i>Purificación de exosomas mediante kit</i>	50
Figura 13. <i>Purificación de exosomas mediante SEC</i>	51
Figura 14. <i>Caracterización de exosomas mediante TEM</i>	53
Figura 15. <i>Ensayo de curva de crecimiento celular para HaCaT</i>	54
Figura 16. <i>Ensayo MTT</i>	56
Figura 17. <i>Ensayo de scratch</i>	57
Figura 18. <i>Extracción de sRNA mediante kit</i>	58
Figura 19. <i>Extracción de sRNA mediante TRIzol</i>	59
Figura 20. <i>Distribución de la concentración de EM y EN mediante kit exosome spin columns (mw3000) (invitrogen™ 4484449)</i>	61
Figura 21. <i>Distribución de la concentración de exosomas derivados de 1 mL de muestra de mortiño y naranjilla mediante SEC</i>	62
Figura 22. <i>Distribución de la concentración de exosomas derivados de 2 mL de muestra de mortiño y naranjilla mediante SEC</i>	63
Figura 23. <i>Análisis de integridad y distribución de tamaño de EM mediante TEM</i>	65
Figura 24. <i>Análisis de integridad y distribución de tamaño de EN mediante TEM</i>	67
Figura 25. <i>Curva de crecimiento de la línea celular HaCaT</i>	69
Figura 26. <i>Viabilidad celular en la línea celular HaCaT evaluada con RNA de exosomas y EM</i>	73
Figura 27. <i>Viabilidad celular en la línea celular HaCaT evaluada con RNA de exosomas y EN</i>	75
Figura 28. <i>Efecto angiogénico en la línea celular HaCaT evaluado con EN y EM</i>	80
Figura 29. <i>Cantidad y calidad de RNA de EM</i>	85

Figura 30. *Cantidad y calidad de RNA de exosomas obtenido a partir de naranjilla*

Listado de abreviaturas

- BCA:** Ácido Bicinconínico
- BSA:** Albúmina de Suero Bovino
- CoCl₂:** Cloruro de Cobalto
- DLS:** Tecnología de Dispersión Dinámica de Luz
- DMEM:** Medio Eagle Modificado de Dulbecco
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EGFR:** Factor de Crecimiento Epidérmico
- EM:** Exosoma de Mortiño
- EMEM:** Medio Esencial Mínimo de Eagle
- EN:** Exosoma de Naranjilla
- ESCRT:** Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte
- HaCaT:** Línea celular de queratinocitos epidérmicos humanos
- HE:** Tinción con Hematoxicilina y Eosina
- ILV:** Vesículas Intraluminales
- miRNA:** micro Ácido ribonucleico no codificante
- MMPs:** Metaloproteinasas de Matriz
- MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- MVB:** Cuerpo Multivesicular
- NET Abs₅₆₂:** Absorbancia neta a 562 nm
- NET Abs₅₇₀:** Absorbancia neta a 570 nm
- PBS:** Solución tampón isotónica
- RISC:** Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- SEC:** Cromatografía por Exclusión de Tamaño
- TEM:** Microscopía Electrónica de Transmisión
- VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Resumen

La regeneración tisular es un proceso vital y representa un área de interés en la búsqueda de terapias alternativas. Los exosomas derivados de plantas, similares a los de mamíferos, han demostrado ciertas propiedades angiogénicas. Se conoce que los extractos de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz), desempeñan un papel clave en la regulación de la proliferación celular y poseen compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Este estudio se centró en la evaluación del potencial angiogénico de los exosomas obtenidos de mortiño (EM) y naranjilla (EN) en células HaCaT (Human epidermal keratinocyte cell line) a nivel *in vitro*. Por tanto, se procedió al aislamiento y purificación de los exosomas mediante cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna qEV Original, y se realizó una caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Posteriormente, se evaluó su influencia en la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico utilizando el Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y un ensayo de scratch. Asimismo, se realizó la extracción del sRNA de los exosomas de ambas frutas. Los EM presentaron una morfología semiesférica ovalada con un diámetro en el rango de 18 a 56 nm, mientras que los EN exhibieron un diámetro variante entre 30 a 70 nm. Se descubrió que los EM y EN poseían una actividad celular antiproliferativa en las líneas celulares HaCaT dependiente del tiempo de exposición y la concentración para el primer caso y dependiente solo de la concentración para el segundo. Los resultados revelaron efectos angiogénicos similares en la proliferación celular, con un aumento del 97,5% para EN y un incremento del 92,7% para EM. Además, el análisis del RNA extraído señaló diferencias en la calidad y pureza entre las muestras de EM y EN. En conjunto, estos hallazgos establecen una base para futuros ensayos *in vitro* que evalúen la migración y proliferación celular, destacando la relevancia del método de obtención de exosomas y su potencial aplicación en el ámbito de la cicatrización de heridas cutáneas.

Palabras clave: vesículas extracelulares, frutas andinas, células epiteliales, miRNA exosomal

Abstract

Tissue regeneration is a vital process and represents an area of interest in the search for alternative therapies. Plant-derived exosomes, similar to those of mammals, have demonstrated certain angiogenic properties. It is known that extracts from naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) and mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) play a key role in the regulation of cell proliferation and possess bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties. This study focused on evaluating the angiogenic potential of exosomes obtained from mortiño (EM) and naranjilla (EN) in HaCaT cells (Human epidermal keratinocyte cell line) *in vitro*. Therefore, exosomes were isolated and purified using size-exclusion chromatography with a qEV Original column, and morphological characterization was performed using transmission electron microscopy (TEM). Subsequently, their influence on cell viability was assessed through a colorimetric assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and a scratch assay. Additionally, sRNA was extracted from exosomes of both fruits. EM exhibited a semi-spherical oval morphology with a diameter ranging from 18 to 56 nm, while EN showed a variable diameter ranging from 30 to 70 nm. It was discovered that EM and EN had a time-dependent and concentration-dependent antiproliferative activity on HaCaT cell lines, respectively. The results revealed similar angiogenic effects on cell proliferation, with an increase of 97.5% for EN and an increment of 92.7% for EM. Furthermore, the analysis of extracted RNA indicated differences in quality and purity between EM and EN samples. In conclusion, these findings establish a foundation for future *in vitro* assays evaluating cell migration and proliferation, underscoring the relevance of exosome isolation methods and their potential application in the field of cutaneous wound healing.

Keywords: extracellular vesicles, Andean fruits, epithelial cells, exosomal miRNA

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Los exosomas son pequeñas vesículas a la escala nanométrica de origen membranosas (30-100 nm) secretadas por diversas células mamíferas, ricas en ARNm y microARN, que pueden transferirse a células vecinas o distantes y desempeñar un papel importante en la comunicación intercelular (Xiao et al., 2018). En la actualidad, se han caracterizado y demostrado estructuras similares a los exosomas mamíferos en nanopartículas derivadas de plantas (Zhang et al., 2016).

Ahora bien, el proceso de cicatrización de heridas en la piel es complejo y se compone de varias etapas superpuestas, incluyendo la hemostasia/coagulación, la inflamación, la proliferación y la remodelación. Para esto, es crucial la comunicación entre las células residentes y las células del sistema inmunológico (Bray et al., 2021; Wilkinson & Hardman, 2020).

Se ha evidenciado que los miARN desempeñan un papel crucial en la regulación de la función de las células epiteliales y tienen un impacto significativo como moduladores de la angiogénesis. En particular, se ha reportado que la familia de miARN-30 tiene la capacidad de dirigirse a estas células promoviendo la transición epitelial a mesenquimal, influyendo así en el proceso de angiogénesis (Bridge et al., 2012; Gong et al., 2017).

Por su parte, los metabolitos secundarios, como los flavonoides, desempeñan un papel defensivo importante y poseen un potencial antioxidante en el tejido vegetal (Amid et al., 2011; Fazal et al., 2016). Asimismo, las antocianinas presentan un gran potencial antioxidante, contribuyendo a la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zapata et al., 2019). En este sentido, se ha demostrado que los extractos no etanólicos de *Vaccinium meridionale* y *Solanum quitoense*, son ricos en antocianinas, tienen efectos neuroprotectores, reducen la neuroinflamación y promueven la supervivencia de las células nerviosas, lo que las hace beneficiosas en una amplia gama de trastornos neurológicos (Lopera et al., 2013; Nile & Park, 2014).

Justificación

La cicatrización de heridas es un proceso fisiológico que sufre hemostasia, inflamación, angiogénesis, proliferación de fibroblastos, depósito de colágeno y remodelación tisular (Leoni et al., 2015; Yates et al., 2012). En consecuencia, dentro de la ingeniería de tejidos, se desarrollan nuevos enfoques terapéuticos de compuestos derivados a partir de plantas con cualidades que permitan suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias, la reducción de factores oxidativos, el aumento de las enzimas antioxidantes, la promoción de la neovascularización y las vías angiogénicas (Hajialyani et al., 2018).

En este marco, los exosomas derivados de plantas, con un tamaño entre los 30 nm hasta los 100 nm, que han sido aislados y caracterizados física y biológicamente en el tejido vegetal de varias especies (Trentini et al., 2022), poseen características similares a los exosomas de mamíferos, con propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y anticancerígenas (Fazal et al., 2016).

Las heridas crónicas tienen consecuencias negativas para los pacientes, como el sufrimiento de dolor, la disminución de la capacidad productiva, un impacto significativo en la calidad de vida y un incremento en el riesgo de mortalidad (Olsson et al., 2019). En Ecuador, existe una escasa información sobre la epidemiología de las lesiones de piel y su impacto en los pacientes, cuidadores, instituciones de salud y el sistema sanitario en general. Esto genera una alta demanda de cuidados relacionados con la prevención y tratamiento de estas lesiones (Camacho, 2017).

El presente proyecto de integración curricular tiene como objetivo evaluar el efecto angiogénico de los exosomas derivados de dos frutas andinas, la naranjilla y el mortiño, en células HaCaT en un entorno *in vitro*. Se espera que los resultados de esta investigación contribuyan al desarrollo de terapias para mejorar la cicatrización de heridas cutáneas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto angiogénico de exosomas derivados de dos frutas andinas Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y Mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) a nivel *in vitro* en células HaCaT.

Objetivos específicos

1. Obtener exosomas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) por medio de cromatografía por exclusión de tamaño para su cuantificación y observación.
2. Determinar el efecto angiogénico a partir de la exposición de los exosomas de las frutas naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) en la línea celular HaCaT mediante ensayo de scratch, para determinar si promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos en un entorno celular controlado.
3. Extraer RNAs de exosomas de las frutas naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) con fenol e isotiocianato de guanidina para su posterior análisis y cuantificación.

Hipótesis

Los exosomas derivados de las frutas naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) tienen un mayor potencial terapéutico que los exosomas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz, Ericaceae) en procesos de cicatrización de heridas cutáneas a nivel *in vitro*.

Capítulo II: Revisión de la literatura

Vesículas extracelulares

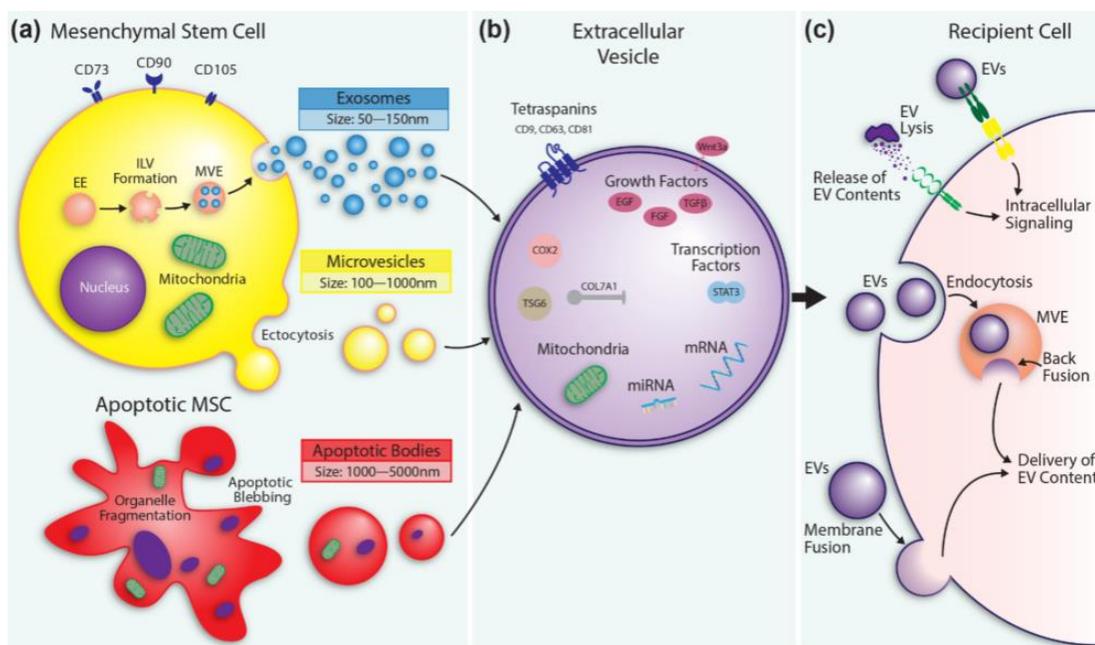
Las vesículas extracelulares son un conjunto diverso de vesículas generadas por células que están rodeadas por una capa doble de lípidos (Théry et al., 2009). Estas vesículas contienen una variedad

de proteínas, ácidos nucleicos, sustancias químicas y moléculas estructurales que se originan en la célula madre (Joshi et al., 2020).

Los exosomas son vesículas intraluminales generadas por invaginación inversa de los cuerpos multivesiculares (MVBs) dentro de las células antes de su secreción mediante la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (ver fig. 1) (Harding et al., 2013). Mientras que, las micropartículas (MPs) o microvesículas, también conocidas como vesículas liberadas o ectosomas, se desprenden directamente de la membrana plasmática de las células (Burger et al., 2013). Por su parte, las vesículas extracelulares llamadas cuerpos apoptóticos (ABs) son liberadas por células apoptóticas y rápidamente fagocitadas por células fagocíticas (El Andaloussi et al., 2013a; Théry et al., 2009).

Figura 1

Formación de vesículas extracelulares (EV) de células madre mesenquimales (MSC) y comunicación



Nota. (a) La formación de exosomas comienza con la endocitosis del endosoma temprano (EE) para formar vesículas intraluminales (ILV) dentro del endosoma multivesicular (MVE). Los exosomas se

liberan mediante la fusión del MVE con la membrana plasmática. Las microvesículas se liberan por ectocitosis/brotación desde la membrana plasmática. Los cuerpos apoptóticos contienen orgánulos fragmentados de células en apoptosis. (b) Algunos de los contenidos seleccionados de los EV que contribuyen a la cicatrización de heridas. (c) Una vez liberados, los EV interactúan con una célula receptora mediante receptores de membrana, desencadenando señalización intracelular. Además, los EV pueden entregar su carga mediante endocitosis y fusión en un MVE o fusión directa con la membrana plasmática. Cuando los EV se lisan en el espacio extracelular, los contenidos liberados actúan sobre las células receptoras. Obtenido de Bray et al. (2021).

Exosomas

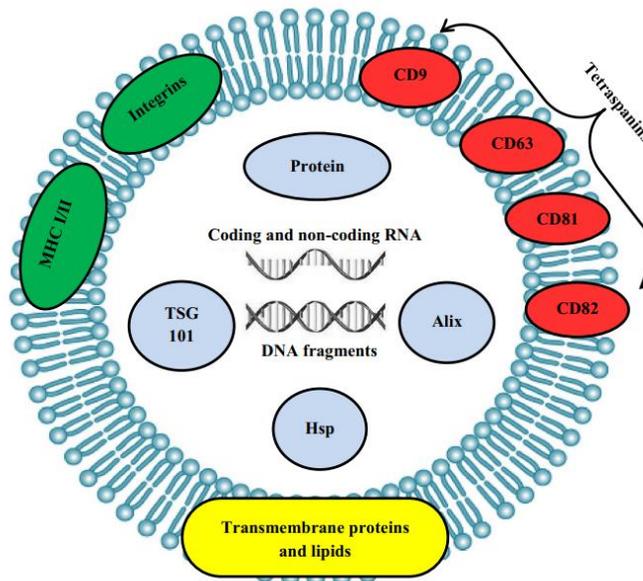
Composición de los exosomas

Los exosomas derivados de diferentes tipos de células contienen un conjunto central de proteínas idénticas, que incluyen miembros de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), miembros del complejo ESCRT [proteína de susceptibilidad a tumores 101 (TSG101), proteína interactora de ALG-2 (Alix)] y proteínas de choque térmico (Hsp60, Hsp70, Hsp90) (ver fig. 2) (McAndrews & Kalluri, 2019).

Se ha observado que el material genético ARN (incluyendo ARNm, microARN [miARN] y otros ARN no codificantes), el ADN y los lípidos se incorporan activamente y de forma selectiva en las vesículas intraluminales (ILVs), que se encuentran dentro de los endosomas multivesiculares (MVEs) y son los precursores de los exosomas (van Niel et al., 2018). Además de explicar la presencia de proteínas de membrana en los exosomas, se postula que el proceso de formación de las ILVs mediante la invaginación de las membranas endosomales permite la captura de proteínas citosólicas y otros componentes en el interior de las vesículas (Jeppesen et al., 2019; Mathieu et al., 2019; van Niel et al., 2018).

Figura 2

Marcadores y biomoléculas empaquetadas (carga) en los exosomas



Nota. Obtenido de Elewaily & Elsergany (2021).

Biogénesis y secreción

Los exosomas son membranas lipídicas con un diámetro de 40 a 150 nm, generados constitutivamente debido a la gemación interna de la membrana plasmática para formar endosomas tempranos (Doyle & Wang, 2019; Villa et al., 2019), los cuales integran la lámina circundante para generar vesículas intraluminales (ILV), que encapsulan exosomas dentro de MVBs (Kim et al., 2022).

Los MVBs son orgánulos endosomales esféricos presentes dentro de las células que contienen varias vesículas pequeñas formadas por un proceso de invaginación de la membrana que rodea al endosoma (ver fig. 3). Su función principal es transportar cargas endocitadas hacia compartimentos lisosomales/vacuolares para su degradación. Además, los MVBs también tienen la capacidad de incorporar

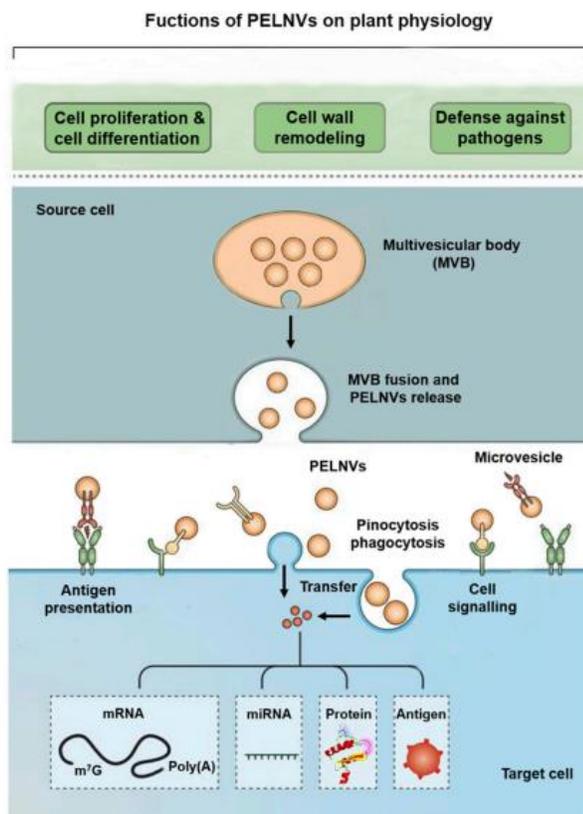
proteínas recién sintetizadas que están destinadas a los mismos compartimentos lisosomales/vacuolares (Dad et al., 2021).

La posterior fusión de MVB con la membrana plasmática conduce a la secreción de exosomas hacia el espacio extracelular (Hessvik & Llorente, 2018). Al poseer igual topología que las células de origen, los exosomas pueden transportar cargas químicas con características inocuas al entorno (Farooqi et al., 2018) y realizar varias funciones, como transmitir señales a las células receptoras y reconocer moléculas de presentación de antígenos en la comunicación de célula a célula (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018).

En este sentido, la salida de los exosomas del confinamiento endosómico es un requisito para acceder a objetivos citoplásmicos en la célula huésped, como la maquinaria del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) para los microARN (miARN) (Joshi et al., 2020).

Figura 3

Biogénesis de las nanovesículas similares a exosomas de plantas (Plant Exosome-like Nanovesicles, PELNVs) y sus funciones en la fisiología de las plantas



Nota. Los PELNVs se forman mediante el brote interno de los MVBs con el contenido en una orientación similar a la de la plasmalema, y la fusión de los MVBs con la plasmalema permite la liberación de los PELNVs. Obtenido de Dad et al. 2021.

Funciones biológicas de los exosomas

Investigaciones sugieren que las vesículas extracelulares, ejercen una influencia significativa al interactuar con receptores celulares mediante ligandos proteicos y lípidos bioactivos, lo que posibilita la fusión de su contenido de membrana con la membrana plasmática de las células receptoras (El Andaloussi et al., 2013b; Y. Lee et al., 2012).

Al llevar efectores esenciales como factores de transcripción, oncogenes, ARN reguladores no codificantes (como microARNs o miARNs), ARN mensajeros e incluso partículas infecciosas a las células receptoras, estas vesículas cumplen una función vital en la regulación celular. De esta manera, su papel abarca funciones cruciales para el funcionamiento normal del organismo, como la preservación de células madre, la reparación de tejidos, la vigilancia inmunitaria y la coagulación sanguínea.

Diversos estudios han relacionado a las vesículas extracelulares con el mantenimiento y plasticidad de las células madre, lo que sugiere que las vesículas extracelulares provenientes de células madre juegan un papel fundamental en los procesos de regeneración de tejidos después de una lesión (Giovanni et al., 2011; Lai et al., 2011; Ratajczak et al., 2012).

En este contexto, los exosomas, como una clase de vesículas extracelulares, desempeñan un papel esencial en la comunicación entre células, el mantenimiento celular y el avance de procesos tumorales (Doyle & Wang, 2019). Estas evidencias subrayan la relevancia fundamental de las vesículas extracelulares en diversos procesos biológicos y su potencial en el ámbito de la comunicación celular y la medicina regenerativa.

Métodos de aislamiento y purificación de exosomas

Ultracentrifugación

El proceso de separación de exosomas y otras EVs de la matriz extracelular se basa en su densidad, tamaño y forma, donde las partículas de mayor tamaño y densidad son las primeras en sedimentar (Livshits et al., 2015). En este sentido, la matriz se purifica aún más mediante los pasos de filtración de 0.22 μm y centrifugación a 10,000 \times g, lo cual permite la eliminación de EVs más grandes y cuerpos apoptóticos. No obstante, este método es lento y requiere grandes volúmenes iniciales de muestra (>100 mL), lo que dificulta procesar varias muestras biológicas en poco tiempo (Sidhom et al., 2020).

Es posible aumentar el rendimiento de los exosomas utilizando tiempos de centrifugación más prolongados durante las rotaciones a 100,000× g. Sin embargo, si se excede las 4 horas de centrifugación, se provoca un daño mecánico significativo en los exosomas y se aumenta la contaminación de proteínas solubles en la preparación final (Cvjetkovic et al., 2014; Zeringer et al., 2015).

Ultrafiltración

El principio fundamental de la filtración por ultrafiltración (UF) implica el uso de una membrana con un diámetro de poro específico o un corte de peso molecular (MWCO) para separar partículas dentro de un rango de tamaño predeterminado. Por lo tanto, se trata de una tecnología de aislamiento basada en el tamaño (Xu et al., 2017). A partir de este principio, se han desarrollado dos tipos de dispositivos de ultrafiltración: la ultrafiltración en configuración en tándem y la ultrafiltración secuencial. La recuperación de exosomas depende del tipo de filtro utilizado. La UF puede reducir drásticamente el tiempo de procesamiento y no requiere equipo especializado (W. zhao Liu et al., 2022; Vergauwen et al., 2017).

En el proceso es posible implementar una secuencia de ultrafiltración que comienza con el empleo de un filtro de membrana de 100 nm con el propósito de eliminar los residuos celulares (P. Li et al., 2017). Posteriormente, el líquido filtrado se somete a una ultrafiltración tangencial con un límite de peso molecular de 500 kDa, seguida de una diafiltración para reducir la presencia de contaminantes. Al finalizar cada paso, se procede al lavado de los filtros de membrana para optimizar la recuperación de los exosomas (Xu et al., 2017).

Sin embargo, un problema evidente es la obstrucción de las membranas, lo cual disminuye la vida útil de las membranas costosas y resulta en una eficiencia baja. Las técnicas de filtración de flujo tangencial (TFF) ofrecen una solución ideal. La TFF adopta la forma de filtración de flujo cruzado. La

componente de flujo tangencial evita la formación de la capa de polarización de concentración, lo cual puede reducir de manera significativa el flujo de permeación (Ghosh, 2006).

Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)

En el SEC, el fluido biológico inicial actúa como fase móvil, mientras que un polímero de gel con filtración porosa desempeña el papel de fase estacionaria (Böing et al., 2014). Gracias a la naturaleza de esta fase estacionaria, se logra una elución diferencial, permitiendo que las partículas de mayor tamaño sean las primeras en eluir, seguidas por las vesículas más pequeñas y, finalmente, las proteínas no unidas a membranas.

Esta selectividad se debe a que las partículas más grandes tienen menos poros que atravesar, lo que les permite recorrer un trayecto más corto hacia el extremo de la columna y, como resultado, eluir de manera más rápida en comparación con sus contrapartes de menor tamaño (Sidhom et al., 2020).

Inmunoadfinidad

El fundamento de esta metodología se basa en la interacción dinámica entre antígenos y anticuerpos. Es crucial que la proteína de interés se encuentre en la membrana del exosoma y que no esté disuelta en el entorno circundante (F. Yang et al., 2017). No obstante, la alta especificidad inherente a este método puede dificultar el aislamiento de exosomas en una población exosomal heterogénea (Santana et al., 2014). Para llevar a cabo esta técnica, se utilizan perlas magnéticas que han sido revestidas con estreptavidina. Estas microesferas se unen a anticuerpos de captura biotinilados específicos que se dirigen a los marcadores superficiales de los exosomas. Otras metodologías convencionales emplean microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos para enriquecer exosomas, dirigidos a proteínas marcadoras de exosomas como CD9, CD63 y CD81 (K. O'Brien et al., 2022).

Precipitación

Se emplea un polímero con el fin de capturar los exosomas, los cuales son luego precipitados a partir de la muestra. El polietilenglicol (PEG), es el polímero más frecuentemente empleado en el aislamiento de exosomas, efectivamente fomenta la concentración y aumenta significativamente el rendimiento de exosomas (Weng et al., 2016), tiene la propiedad de retener agua y provocar la precipitación de partículas de menor solubilidad (P. Li et al., 2017). En este enfoque, las muestras se incuban junto con una solución de PEG a una temperatura de 4 °C durante la noche. Después de esta incubación, se pueden llevar a cabo una serie de pasos de separación, como la filtración y la centrifugación, para continuar procesando el precipitado que contiene los exosomas (Helwa et al., 2017; L. Zhu et al., 2020).

No obstante, la considerable contaminación con proteínas plasmáticas limita la utilidad de las técnicas de precipitación para el análisis proteómico de los exosomas provenientes del plasma humano. Además, los exosomas aislados mediante métodos de precipitación podrían contener biopolímeros que pueden complicar el análisis posterior de las muestras, incluyendo la espectrometría de masas, el análisis proteómico y las pruebas de ARN. Sin embargo, la incorporación de un paso de prefiltración eficiente a través de un filtro de 0.22 µm o un paso de purificación posterior a la precipitación, que incluya centrifugación, filtración o filtración en gel, puede limitar la contaminación con impurezas no exosomales presentes en las muestras (Lobb et al., 2015).

Caracterización de exosomas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las estructuras a nivel nanométrico resultan difíciles de resolver mediante la microscopía de luz convencional. Por ende, la TEM se presenta como una poderosa alternativa para examinar con detalle características delicadas cuyas dimensiones características son inferiores a 100 nm (Zhang et al., 2008). La TEM ha sido ampliamente utilizada en campos como la ciencia biológica y la ingeniería de materiales (C. Y. Tang & Yang, 2017).

El fundamento primordial de esta técnica radica en la utilización de electrones con el propósito de adquirir representaciones visuales minuciosas de muestras de naturaleza ultrafina. En el contexto de la TEM, una corriente de electrones atraviesa la muestra, interactuando con sus elementos constituyentes y posteriormente es captada con el fin de plasmar una imagen en una pantalla o detector especializado (Zhang et al., 2008).

Dentro de sus beneficios más destacados se encuentra su capacidad de alcanzar una resolución sumamente elevada, su amplio espectro de magnificación (que habilita la caracterización de microestructuras desde la escala micro hasta la nanométrica en una sola sesión) y la generación de señales resultantes de la interacción de los electrones (empleadas para la obtención de imágenes tanto estructurales como químicas). Por otro lado, es pertinente mencionar ciertas limitaciones, como la necesidad de mantener condiciones de vacío óptimas para evitar la dispersión durante el trayecto hacia la muestra, y la consideración de la alta energía electrónica (cuya interacción con los materiales está intrínsecamente ligada a su energía cinética) (Inkson, 2016).

RNAs exosomales

Los ARN no codificantes son transcritos de ARN producidos internamente que no tienen la capacidad de codificar proteínas. Dentro de esta categoría, se encuentran los miARN, pequeñas moléculas de ARN (de 18 a 24 nucleótidos) que regulan la expresión de genes específicos al modular los procesos de transcripción y traducción de proteínas (Shi et al., 2015).

En la actualidad, se han encontrado exosomas que contienen proteínas y ARNs en plantas como el jengibre, la zanahoria, la sandía, las uvas, las aceitunas y las semillas de melón (Z. Zhao et al., 2018). En este sentido, los miARN de las plantas pueden resistir la actividad de las enzimas digestivas y el pH bajo a lo largo del tracto gastrointestinal debido a su metilación y alto contenido de GC (Bellato et al., 2019; Zhou et al., 2015). En consecuencia, algunos estudios respaldan la idea de que los miARNs de

plantas derivados de la dieta están presentes en la sangre y tejidos, regulando la expresión génica endógena en animales (Luo et al., 2017; K. Zhu et al., 2017).

Los miARN interactúan con el ARNm objetivo a través de una complementariedad secuencial, lo que puede resultar en la degradación del ARNm o en la represión de la traducción. En el caso de las plantas, los ARNm objetivo presentan sitios de unión altamente complementarios a los miARN y presencia de una metilación en el grupo 2'-O del último nucleótido en el extremo 3' del miARN maduro, características que no se encuentran en los miARN animales (Kalarikkal & Sundaram, 2021; J. O'Brien et al., 2018). Asimismo, los microARN de plantas se sintetizan en el núcleo y luego se trasladan al citoplasma, donde los pri-microARN se someten a un clivaje inicial por la enzima Dicer-like (DCL) (Bellato et al., 2019).

Rol del RNA exosomal en la comunicación célula a célula

Se ha planteado que los miARN de plantas son liberados por células dañadas durante la masticación, y posteriormente, son transportados a las células epiteliales intestinales. En estas células, existe la posibilidad de que se integren en vesículas como exosomas o microvesículas, para finalmente acceder al sistema circulatorio con el propósito de ser entregados a las células objetivo, lo cual podría tener implicaciones significativas en la regulación génica (Bellato et al., 2019).

La primera indicación directa de la transferencia de miARN de plantas a humanos a través de los alimentos fue presentada por Zhang et al. (2012) donde se demostró que el miARN del arroz (osa-miR168a) se mantiene estable en sueros y tejidos de animales y humanos, dirigiéndose específicamente al receptor adaptador de lipoproteínas de baja densidad (LDLRAP1) en el hígado, lo que disminuye la eliminación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) del plasma.

Asimismo, un descubrimiento realizado por Chin et al. (2016) reveló que el miR159 de origen vegetal podría ser absorbido desde ciertos tipos de fuentes alimenticias por los sueros humanos en

sujetos occidentales, a niveles que guardaban una correlación inversa con la incidencia y progresión del cáncer de mama en pacientes. Este equipo de investigación también identificó un imitador sintético del miR159 vegetal, capaz de inhibir la proliferación celular en un modelo *in vitro* al dirigirse a TCF7, que codifica un factor de transcripción asociado a la vía de señalización de la integración del sitio relacionado con Wingless (Wnt), lo que conlleva una disminución en los niveles de proteína del factor de transcripción MYC en las células de cáncer de mama. Además, la administración oral del imitador de miR159 suprimió significativamente el crecimiento de tumores de mama en ratones utilizando modelos *in vivo* (Wang et al., 2018).

Cicatrización de heridas

La piel actúa como una barrera de defensa primaria, protegiendo las estructuras internas contra la deshidratación y los daños causados por factores mecánicos, químicos, térmicos y de luz (Takeo et al., 2015), desarrollando mecanismos rápidos y eficientes para cerrar las brechas en su barrera y curar heridas.

Un proceso de reparación de tejidos se divide clásicamente en cuatro fases principales: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación dérmica (Juncos et al., 2020), respuesta inmune que protege contra infecciones patógenas y al mismo tiempo respalda a los microorganismos comensales a través de una adaptación del eje huésped-microbiota (Naik et al., 2015; Wilkinson & Hardman, 2020).

Hemostasia

La hemostasia se inicia al detectar lesiones en los microvasos, y el mecanismo de reflejo neuronal promueve la contracción de las células musculares lisas vasculares, lo que permite la rápida constricción de los vasos lesionados (Velnar et al., 2009).

Para prevenir el sangrado excesivo, se activa la hemostasia cuando se detectan lesiones en los vasos sanguíneos más pequeños (J. Li et al., 2007). El sistema nervioso desencadena una respuesta de contracción en las células musculares lisas de los vasos, lo que permite que se estrechen rápidamente y reduzcan el flujo sanguíneo en las áreas dañadas (Juncos et al., 2020).

Inflamación

Durante las etapas iniciales de la inflamación, se observa la presencia predominante de neutrófilos y monocitos en el sitio de la lesión. Los neutrófilos migran hacia las células endoteliales que rodean el área de la herida, de 24 a 36 horas después de la lesión. Este proceso está mediado por factores quimiotácticos como la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), TGF- β , componentes del complemento y péptidos derivados de metionil formil bacteriana (Juncos et al., 2020). A medida que la inflamación progresa, el número de neutrófilos disminuye y los macrófagos (monocitos que se han diferenciado en el tejido) se vuelven más predominantes (Li et al., 2007).

Proliferación

Durante la fase proliferativa de la cicatrización de heridas, los queratinocitos, los fibroblastos, los macrófagos y las células endoteliales se activan de manera extensiva para coordinar el cierre de la herida, la deposición de matriz y la angiogénesis (Bray et al., 2021). Esta fase se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos en la herida, proceso conocido como angiogénesis (Olsson et al., 2019).

La migración de los fibroblastos hacia la zona de la herida marca el inicio de la fase proliferativa (Nowak-Sliwinska et al., 2018). Estas células activadas producen una variedad de sustancias, como citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas e hipoxia, que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y otros procesos implicados en la cicatrización de heridas (Kang et al., 2016).

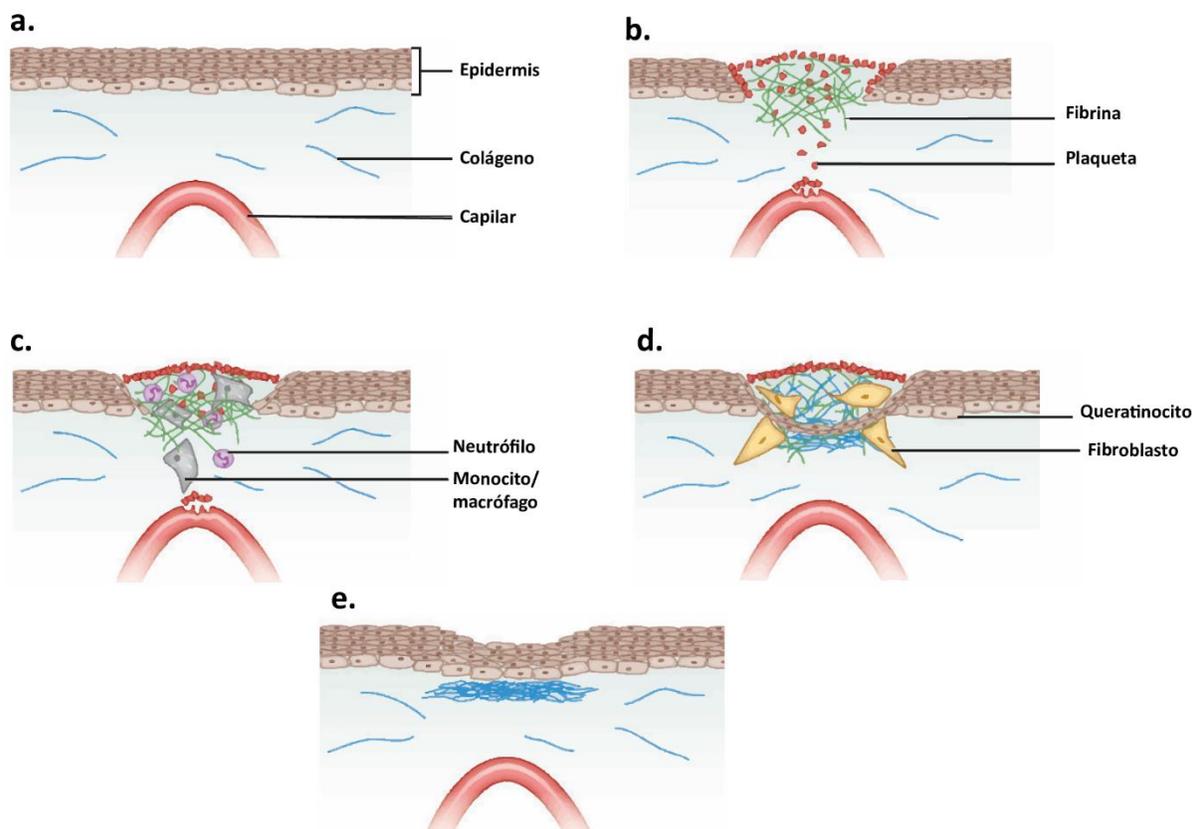
Remodelación dérmica

En esta etapa los fibroblastos son responsables de reemplazar el coágulo inicial de fibrina con sustancias como la fibronectina y proteoglicanos, y posteriormente forman fibrillas de colágeno maduras a medida que avanza el proceso de reparación (ver fig. 4) (Wilkinson & Hardman, 2020).

Durante la fase de remodelación de la cicatrización de heridas, ocurre una sustitución de la matriz extracelular provisional por fibras de colágeno más gruesas y organizadas, lo que resulta en un aumento gradual de la resistencia a la tracción a lo largo de varios meses (Broughton et al., 2006). Además, la herida experimenta contracción, la cual es llevada a cabo por los miofibroblastos. En caso de que alguna fase del proceso de curación se vea interrumpida, pueden desarrollarse cicatrices atróficas, cicatrices hipertróficas, queloides y heridas crónicas (Bray et al., 2021).

Figura 4

Proceso de cicatrización en adultos multicelulares



Nota. (a) Una piel intacta con un capilar subyacente en su estado previo a la lesión. (b) Etapa de hemostasia. (c) Fase inflamatoria. (d) Fase de proliferación y migración. (e) Fase de resolución y remodelación. Adaptado de Sonnemann et al. (2011).

Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos (Hicklin & Ellis, 2005; Mashouri et al., 2019). En respuesta a una lesión, las células endoteliales microvasculares experimentan un proceso de proliferación y migración hacia el área afectada, donde generan nuevos vasos sanguíneos que se fusionan con otros para establecer una red tubular estable y funcional (Spannuth et al., 2008).

En este sentido, la hipoxia desencadena el proceso de angiogénesis al activar la producción de factores inducibles por hipoxia (HIFs) y la ciclooxigenasa 2, lo que a su vez resulta en la liberación de VEGF y otros factores (Huang et al., 2005; Wilkinson & Hardman, 2020).

Por su parte, la vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/receptor del VEGF (VEGFR) y otros factores de crecimiento endotelial, regulan la angiogénesis al unirse a receptores en la superficie de las células endoteliales normales, estimulando así el crecimiento y la supervivencia de los nuevos vasos sanguíneos (Momeny et al., 2017).

Durante el proceso de proliferación, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) desempeña un papel crucial al prevenir la apoptosis de estas células mediante la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 (Mashouri et al., 2019). Además, se ha observado que la matriz de fibrina, presente en el entorno de la herida, estimula la angiogénesis al inducir cambios fenotípicos en las células endoteliales, lo que a su vez promueve su migración hacia el sitio de la lesión y contribuye al proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos (Kato, 2013).

Efecto angiogénico de los exosomas

Los exosomas liberados por células tumorales desempeñan un papel clave en la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos (Ahmadi & Rezaie, 2020). Estos exosomas transportan factores angiogénicos como el VEGF, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina-8 (IL-8), entre otros (Nishida et al., 2006).

En particular, los exosomas liberados por las células de punta endotelial, que son las células líderes en los extremos de los brotes vasculares, contienen niveles elevados de la proteína delta-like-4 (Dll-4), la cual activa la vía Notch en las células endoteliales microvasculares adyacentes, induciendo la

formación de nuevos capilares (Sharghi-Namini et al., 2014). Se ha demostrado que los exosomas derivados de *Triticum aestivum* (trigo) tienen una potente capacidad inductora de angiogénesis *in vitro* en células endoteliales, demostrando efectos en la proliferación y migración de células endoteliales, epiteliales y fibroblastos dérmicos, así como niveles de ARNm del colágeno tipo I en el proceso de cicatrización de heridas (Şahin et al., 2019).

En la actualidad, los reemplazos de piel se han convertido en una alternativa terapéutica para abordar la mayoría de las lesiones cutáneas, gracias al uso de andamios biocompatibles combinados con células madre y sustancias biológicamente activas (Shafiei et al., 2021). Un reemplazo de piel óptimo debe caracterizarse por su notable porosidad y permeabilidad, lo que favorece sus propiedades curativas (Aderibigbe & Buyana, 2018). En consecuencia, los fibroblastos, al reconocer y absorber los EXOs diferenciados derivados de células madre del tejido adiposo (ADSCs), pueden modificar sus funciones, entre ellas migración, replicación y síntesis de colágeno (Hu et al., 2016).

Ensayo de scratch

El ensayo scratch *in vitro* es una técnica que estudia la migración celular. Consiste en crear un gap o raspado en un monocapa celular confluyente, lo que induce el movimiento de células hacia la apertura para cerrar el "raspado" y restablecer contactos célula-célula. Se capturan imágenes al principio y en intervalos regulares durante la migración para determinar la velocidad de migración celular (Liang et al., 2007).

En este sentido, Zhao et al. (2018) estudió la internalización de 100 µg/µL de exosomas derivados de células estromales mesenquimales corneales humanas (cMSC) por parte de células epiteliales corneales humanas (HCECs) *in vitro* mediante un ensayo de scratch, donde tras un período de 72 horas de tratamiento, las HCECs exhibieron una reducción notable en el área de raspado, de hasta 77.5% de cicatrización corneal en comparación con el grupo de control.

Así también, Rahman et al. (2016) encontró que los exosomas obtenidos a partir de células cancerosas altamente metastásicas presentes en suero humano de cáncer de pulmón, así como aquellos provenientes de suero de cáncer de pulmón en etapas avanzadas, inducen a la migración, invasión y proliferación en células epiteliales bronquiales humanas no cancerosas receptoras (HBECs) en un experimento de raspado. En el ensayo, demostraron que los exosomas (a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fueron internalizados por las células HBEC en confluencia durante un período de 16 horas. Luego, se procedió a realizar un raspado en las células y se tomaron imágenes en los momentos designados (0 horas y 12 horas).

Es posible inferir que entre las ventajas de este método se encuentra su capacidad para simular la migración celular en condiciones *in vivo*. Además, replica los patrones de migración observados en células conectadas de manera flexible (como los fibroblastos) o en capas de células (como las células epiteliales) durante la migración *in vivo* (Cory, 2011). Asimismo, es un método sencillo para estudiar la migración celular *in vitro* y solo requiere suministros comunes y económicos que se encuentran en la mayoría de los laboratorios capaces de cultivar células (Bobadilla et al., 2019).

Una desventaja de este ensayo es que requiere más tiempo para llevarse a cabo en comparación con algunas técnicas más rápidas. Se precisa de un período de uno a dos días para que se forme una monocapa de células y luego de 8 a 18 horas adicionales para que las células migren y cierren la herida. También dependerá del área de raspado y de la concentración tanto de células como de tratamiento aplicado (Liang et al., 2007).

Vaccinium meridionale Swartz (mortiño)

Generalidades

El mortiño es una fruta endémica y exclusiva de la región de los Andes, específicamente en Ecuador, Colombia y Perú (Kumar et al., 2019). Es un arbusto ramificado que puede alcanzar hasta 2.5

metros de largo. Su fruto es una baya de 5 a 10 mm de diámetro, de color rojo oscuro, con un sabor ácido y agrio. Sus hojas son diminutas, con bordes dentados o lobulados y venas dispuestas en forma de pinnadas (ver fig. 5) (Coba et al., 2012).

Sus flores son pequeñas, midiendo menos de 1 cm, y pueden presentarse solitarias o en racimos. El cáliz puede estar unido o no al pedicelo, y el hipanto tiene una forma redondeada con 5 lóbulos lanceolados. La corola, en forma de urna, puede ser de color blanco o rosado, con 5 lóbulos que se curvan hacia atrás. Los estambres, de 8 a 10 en número, tienen la misma longitud que el tubo de la corola, con filamentos libres y anteras que se abren poricidamente en el extremo apical. El ovario, de 5 lóculos, es ínfero, y el estilo es ligeramente más largo que el tubo de la corola (Coba et al., 2012).

Figura 5

Flor, fruto y esquema del mortiño



Nota. (a) Flor del mortiño. (b) Fruto del mortiño. (c) Esquema. Adaptado de Flor de Venezuela (n.d.), Plantas de Colombia (2014) & Swartz (1794).

Taxonomía

A continuación, se presenta la taxonomía del mortiño.

Tabla 1*Taxonomía del mortiño*

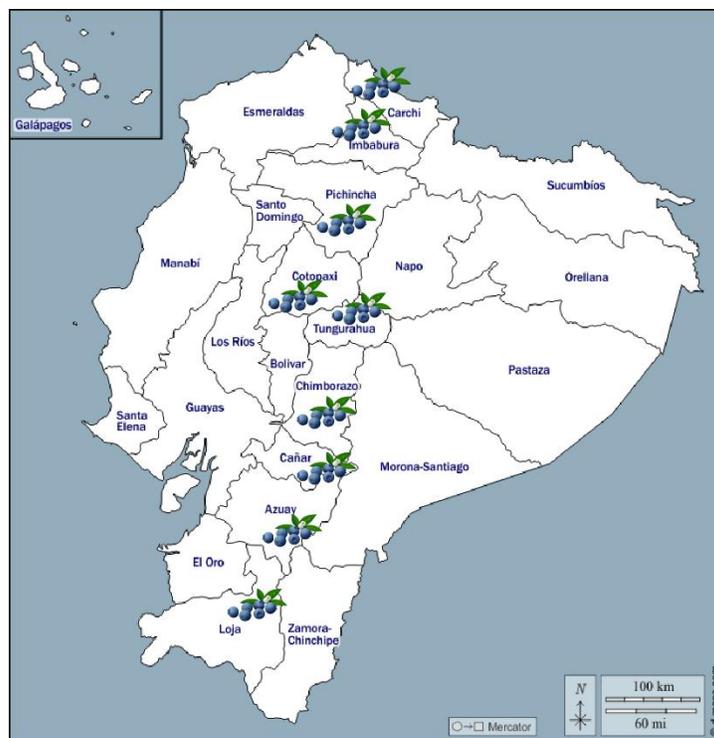
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	<i>Vaccinium</i>
Especie	<i>V. meridionale</i> Swartz 1788

Nota. Obtenido de Efferth et al. 2016.

Distribución

El mortiño se encuentra en abundancia en la vertiente occidental de la cordillera de los Andes. Se distribuye desde la provincia de Carchi en el norte hasta la provincia de Loja en el sur (ver fig. 6). Es una especie adaptable que se encuentra en diversas altitudes, desde los 1600 hasta los 3800 metros sobre el nivel del mar y puede prosperar en climas tanto templados como fríos, con temperaturas que oscilan entre 8 y 16 °C (Coba et al., 2012; Correa & Bernal, 1990). Este arbusto crece en varios tipos de bosques, incluyendo los bajos secos y los húmedos, siempre y cuando el suelo sea húmedo y bien drenado (Zapata et al., 2019).

Figura 6

Distribución del mortiño en Ecuador

Nota. Elaborado en d-maps.

Composición

El mortiño es conocido por su riqueza en diversos compuestos bioactivos, como la quercetina, el ácido hidroxicinámico, ácido cafeico y ácido clorogénico, que constituyen alrededor del 67% de los compuestos fenólicos presentes en esta baya (Moncayo, 2020; Schreckinger et al., 2010; Vasco et al., 2009). Además, se ha identificado la presencia de delphinidina-3-arabinosa y la cianidina-3-arabinosa, que representan aproximadamente el 89% del total de antocianinas en el mortiño (Vasco et al., 2009).

Los estudios realizados han demostrado que las antocianinas son los compuestos más destacados en el mortiño, siendo una parte importante de los fenoles totales presentes en esta baya. En concreto, se ha determinado que las antocianinas de cianidina son las más predominantes, alcanzando

una cantidad aproximada de 345 mg de cianidina por cada 100 g de mortiño (Vasco et al., 2009).

Además, también contiene minerales como potasio, calcio, fósforo, magnesio y vitaminas del complejo B y C (Efferth et al., 2016; Llivisaca-Contreras et al., 2022a). A continuación, se presenta una tabla con la composición específica del fruto de mortiño.

Tabla 2

Composición del fruto de mortiño

Parámetro	Valor	Unidades
Agua	80	%
Fibra	7.6 ± 2.2	%
pH	3.8	N/A
Proteínas	0.6 – 0.7	g/100 g
Carbohidratos	14.5 – 18.1	g/100 g
Grasas Totales	0.6 – 1	g/100 g
Calorías	84 – 75	Kcal/100 g
Hierro	0.64 ± 0.2	mg/100 g
Potasio	607 ± 73	mg/100 g
Calcio	17.0 ± 2.3	mg/100 g
Magnesio	10.2 ± 1.1	mg/100 g
Cobre	0.12 ± 0.02	mg/100 g
Zinc	0.13 ± 0.02	mg/100 g
Fenoles totales	608.05 - 882	mg GAE/100 g
Polifenoles totales	107.4 ± 6.7	mg GAE/100 g
Antocianinas totales	1095.4 ± 19.2	mg/100 g
Proantocianidinas	4.6 ± 0.3	%
Flavonoides totales	6.5 ± 0.7	mg EC/g
Flavonoles totales	41.6 ± 10.2	mg/100 g
Taninos totales	4.2 ± 0.8	mg TAEq/g
Vitamina C	45.9 ± 6.7	mg/100 g
B-Carotenos	70.6 ± 2.0	µg/100 g
Tiamina	0.05	mg/100 g
Luteína	866.6 ± 7.5	µg/100 g
Ácido neoclorogénico	1.5 ± 0.5	N/A
Ácido clorogénico	9.5 ± 2.9	N/A
Ácido pantoténico	0.09	mg/100 g

Nota. *GAE = Equivalente de ácido gálico; TAEq = equivalente de ácido tánico. Adaptado de (Alarcón-Barrera et al., 2018; Coba et al., 2012; Llivisaca et al., 2018; Llivisaca-Contreras et al., 2022b; Martínez, 2022; Prencipe et al., 2014; Schreckinger et al., 2010; Vasco et al., 2009)

Compuestos bioactivos del mortiño

Los flavonoides se caracterizan por su poder antioxidante notable, ejercen como eliminadores de radicales libres y tienen la capacidad de actuar como quelantes de metales. Además, poseen la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, lo que se traduce en una amplia variedad de actividades fisiológicas beneficiosas. Entre ellas, se encuentran sus propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, anticancerígenas, antihipertensivas, antiartríticas y antimicrobianas (Leitão et al., 2005).

Las bayas y arándanos silvestres contienen antioxidantes fenólicos que tienen la capacidad de interactuar con las lipoproteínas de baja densidad y brindarles protección contra la oxidación, destacando una importante actividad antioxidante celular (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Vinson et al., 2001).

En las bayas del género *Vaccinium*, además de las antocianinas, los ácidos fenólicos y los flavonoles, también podemos encontrar las procianidinas (PACs). Estas procianidinas son flavonoides compuestos por unidades de (b)-catequina y/o (-)-epicatequina (Garzón et al., 2020). En términos generales, las PACs exhiben propiedades antibacterianas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Laplante et al., 2012; Leitão et al., 2005).

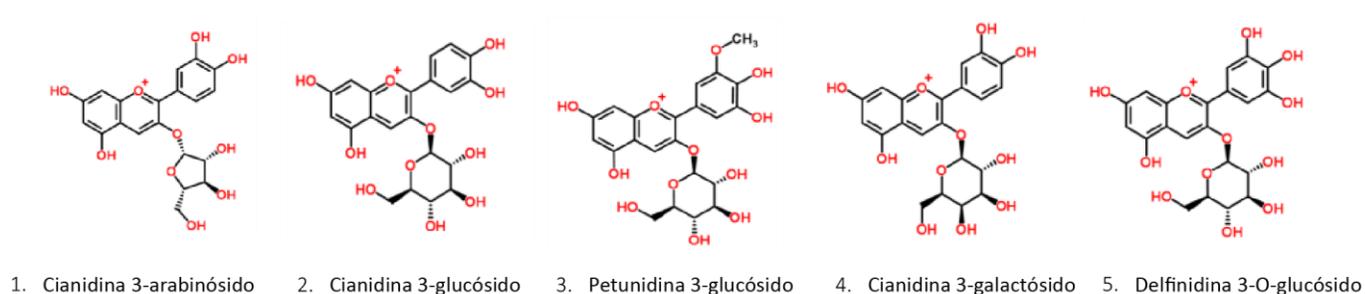
Se ha comprobado que estos polifenoles tienen propiedades citotóxicas y antiproliferativas contra células cancerosas (Garzón et al., 2020; González et al., 2017). En este sentido, los compuestos fenólicos ejercen influencia sobre proteínas clave pro-apoptóticas, como caspasas-3 y -9, y también intervienen en la regulación de la vía inflamatoria principal dirigida por NF-κB. En consecuencia, el ácido gálico y la cianidina-3-O-glucósido (ver fig. 7), afectan a marcadores inflamatorios como CCR5, CCR1 y el

receptor Toll-like 4 (TLR4) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con liposacáridos (Arango-Varela et al., 2020). Asimismo, se encontró que el jugo de la baya andina disminuye la viabilidad celular de las células SW480, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS), una reducción en la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) e inducción de apoptosis tardía (Agudelo-Quintero et al., 2022; Arango-Varela et al., 2021).

Figura 7

Compuestos de mortiño

Compuestos de *Vaccinium meridionale* Swartz



Nota. Adaptado de González et al. (2017).

Solanum quitoense Lamarck (naranja)

Generalidades

La naranja es originaria de los Andes, nativa de Colombia, Ecuador y Perú. Es una planta perenne que puede alcanzar una altura de hasta 3 metros, sus tallos son robustos y se extienden, volviéndose quebradizos y leñosos a medida que envejecen. Las hojas, dispuestas alternativamente en los tallos, son de color verde en la superficie adaxial, presentan venas púrpuras y están densamente pubescentes. Tienen una longitud de aproximadamente 60 cm y un ancho de 45 cm. Las inflorescencias son laterales, con pedúnculos cortos y contienen pocas flores (Woodson & Schery, 1973).

El fruto es una drupa globosa con una cubierta firme, con una cubierta pilosa urticante, de 2 a 6 cm de diámetro aproximadamente, pulpa jugosa, una cobertura amarilla-naranja y una semilla de consistencia ósea, de tono morado oscuro (ver fig. 8) (Yepes, 2021).

Figura 8

Flor, fruto y esquema de la Naranjilla



Nota. (a) Flor de naranjilla. (b) Fruto de naranjilla. (c) Esquema. Adaptado de Flora Toskana GmbH (2023), Real Jardín Botánico-CSIC (n.d.) & Wave Hill (2020).

Taxonomía

A continuación, se presenta la taxonomía de la naranjilla.

Tabla 3

Taxonomía de la naranjilla

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida

Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. quitoense</i> Lamarck 1793

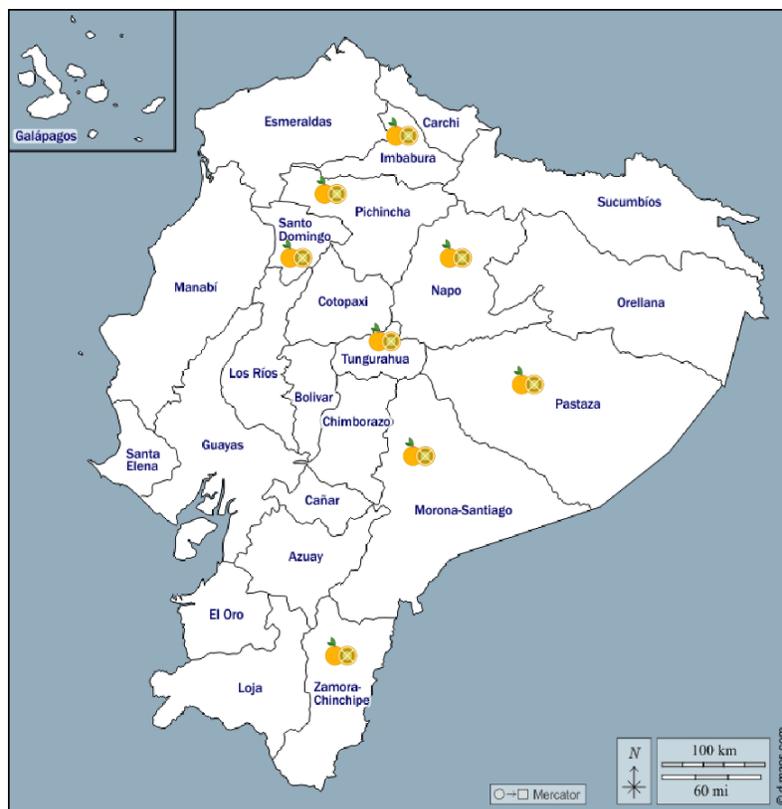
Nota. Adaptado de McMullen (1999).

Distribución

Se distribuye en los bosques húmedos de la cordillera de los Andes, entre los 1200 y 2300 metros sobre el nivel del mar, especialmente entre Ecuador y Colombia (ver fig. 9) (González et al., 2014; Lobo, 2000). La planta requiere condiciones de temperatura ideales que oscilan entre 15 y 24 °C, siendo 20 °C la temperatura óptima para su desarrollo óptimo. Asimismo, es necesario que los suelos sean ligeramente ácidos, con un pH que se encuentre en el rango de 5.5 a 6.0 (González et al., 2014).

Figura 9

Distribución de la naranjilla en Ecuador



Nota. Elaborado en d-maps.

Composición

Las frutas de esta planta contienen niveles elevados de vitaminas A y C y otros compuestos antioxidantes valiosos. Al llegar a la madurez, las plantas distribuyen su biomasa seca de la siguiente manera: alrededor del 40% corresponde a los tallos, el 33,8% a las frutas, el 15,54% a las hojas, el 10,56% a las raíces y el 0,4% a las flores (Trejo-Téllez et al., 2022).

La naranjilla es una fruta con una rica variedad de compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos, dihidrochalconas, estilbenos, antocianinas, flavones, flavononas, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y otros fenoles (Hinestroza-Córdoba et al., 2021). También contiene glucósidos de quercetina

(quercetina-3-rutinósido), glucósidos de isorhamnetina y glucósidos de kaempferol, junto con β -glucósido y ácidos clorogénicos (Forero et al., 2016; Gancel et al., 2008).

La composición de carotenoides en la naranjilla destaca por la presencia predominante de trans- β -caroteno, mientras que los ésteres de carotenoides se encuentran en menor cantidad. Asimismo, se han identificado ácidos grasos como el ácido α -linolénico y el ácido linoleico, siendo el primero el más abundante (Gancel et al., 2008).

Estas frutas representan una valiosa fuente de vitaminas E, C, B1, B2, B3, B6 y provitamina A, así como minerales esenciales como hierro, calcio, fósforo, potasio y nitrógeno. Además, contienen carbohidratos y proteínas que contribuyen a su valor nutricional (Ramírez et al., 2018). A continuación, se presenta una tabla con la composición específica de la fruta de naranjilla.

Tabla 4

Composición del fruto de naranjilla

Parámetro	Valor	Unidades
Agua	90.46	g/100g
Fibra	0.46	g/100g
pH	3	N/A
Proteínas	0.64	g/100 g
Carbohidratos	7.74	g/100 g
Carotenoides	0.127	mg/100g
Vitamina C	53.33	mg/100g
Hierro	0.1	mg/100 g
Potasio	309	mg/100 g
Calcio	4.8	mg/100 g
Fósforo	9.5	mg/100 g
Magnesio	12.4	mg/100 g
Sodio	0.5	mg/100 g
Zinc	0.2	mg/100 g
Polifenoles totales	81	mg/100 g
Fenoles totales	151.6 \pm 25	mg/Kg
Taxifolina	0.3	mg/Kg
Hidrato de rutina	51.1 \pm 3.6	mg/Kg
Ácido p-cumárico	0.4	mg/Kg
Ácido clorogénico	98.6 \pm 29	mg/Kg

Ácido gálico	1.3	mg/Kg
--------------	-----	-------

Nota. Adaptado de Loizzo et al. (2019), Revelo et al. (2010) & Sánchez (2022).

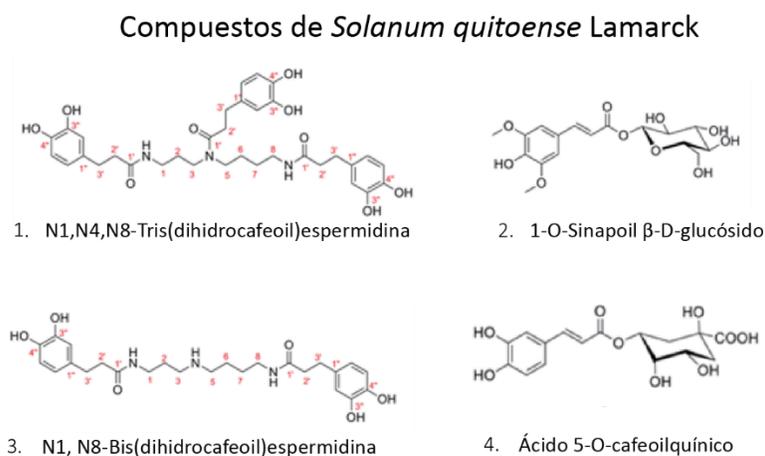
Compuestos bioactivos de la naranjilla

La naranjilla es una importante fuente de compuestos de espermidina (ver fig. 10), de donde se derivan las poliaminas, que tienen un papel clave en la regulación de la proliferación celular, la expresión génica y las señales celulares. Asimismo, se ha evidenciado que tienen efectos notables en la diferenciación celular del sistema inmunológico y la modulación de las reacciones inflamatorias (Gancel et al., 2008).

Durante un estudio de los compuestos antioxidantes de la naranjilla, se encontró una cantidad significativa de compuestos fenólicos y carotenoides en la pulpa, destacando el caroteno y la luteína como los principales compuestos bioactivos (Gancel et al., 2008). Además, posee un importante valor nutricional con altas concentraciones de vitamina C y hierro, lo que le confiere posibles propiedades diuréticas y tónicas (Gómez et al., 2014).

Figura 10

Compuestos de naranjilla



Nota. Adaptado de: Forero et al. (2016).

Capítulo III: Materiales y métodos

Aislamiento de exosomas

Preparación de extractos

Para la preparación de los extractos, las frutas fueron lavadas con agua destilada en tres ocasiones, asegurándose de eliminar cualquier contaminación. Luego, se procedió a pesar las frutas limpias, obteniendo un total de 454 gramos de mortiño y 300 gramos de naranjilla. Posteriormente, se utilizó una licuadora para procesar el mortiño y la naranjilla por separado, sin agregar agua en ninguno de los casos. Una vez obtenidos los extractos, se tamizaron meticulosamente para separar la pulpa, las semillas y la cáscara. El jugo resultante (150 mL) se recolectó en un recipiente estéril y se conservó en fundas ziploc en el refrigerador a 4°C.

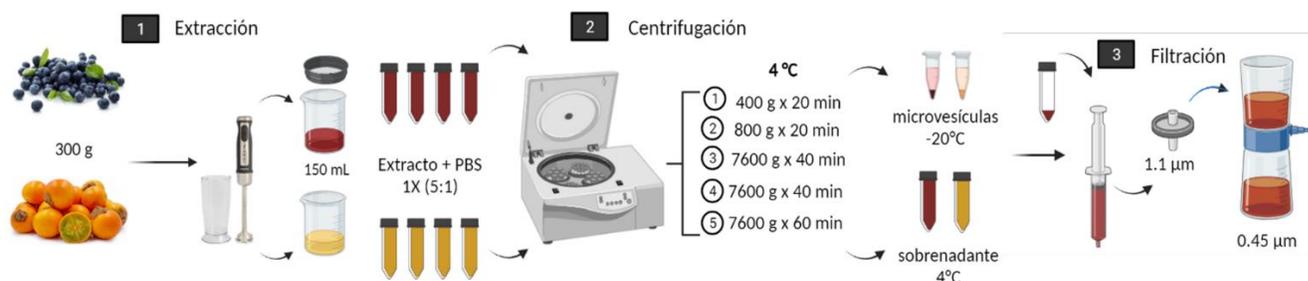
Centrifugaciones seriadas

La metodología de centrifugaciones seriadas se llevó a cabo utilizando los siguientes materiales: tubos Falcón de 50 mL (*Thermo Scientific*[™], Ref.: 339650), Eppendorf de 2 mL, puntas de 1000 µL, PBS 1X autoclavado y filtrado, y agua destilada y autoclavada. Primero, se colocaron los jugos en los tubos Falcón de 50 mL (*Thermo Scientific*[™], Ref.: 339650), los cuales fueron debidamente rotulados. Luego, se agregó PBS 1X en una concentración de 5:1, utilizando aproximadamente 40 mL de extracto y 10 mL de PBS. Los tubos fueron homogenizados mediante agitación. A continuación, se realizaron cinco centrifugaciones secuenciales a 4°C. La primera centrifugación se llevó a cabo a 400g durante 20 minutos, eliminando el pellet y transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo. Este proceso se repitió para las siguientes centrifugaciones: la segunda a 800g durante 20 minutos, la tercera a 7600g durante 40 minutos, la cuarta a 7600g durante 40 minutos y la quinta a 7600 g durante 60 minutos. Tanto el sobrenadante obtenido en la última centrifugación como el pellet resultante fueron conservados. Los exosomas se purificaron a partir del sobrenadante, mientras que las microvesículas se encontraron en el pellet. El pellet fue resuspendido con 1000 µL de agua destilada en tubos de 2 mL, los cuales fueron

etiquetados con el número de tubo, fecha y tipo de extracto. Los pellets se almacenaron a temperaturas de -20°C . Los sobrenadantes fueron conservados en tubos nuevos y se almacenaron a 4°C . Antes de la purificación de los exosomas los sobrenadantes obtenidos de las centrifugaciones secuenciales fueron filtrados a 1.1 y 0.45 μm . Es importante destacar que se mantuvo la cadena de frío durante todas las centrifugaciones seriadas. A continuación, se resume la metodología propuesta en centrifugaciones seriadas.

Figura 11

Preparación de extractos y extracción de exosomas a partir de mortiño y naranjilla



Nota. Elaborado en Biorender.

Purificación mediante kit Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen™, Ref.: 4484449)

Se hidrató la columna con 650 μL de PBS 1X filtrado y autoclavado, dejándola reposar durante 15 minutos. Se realizó un vórtex en los tubos que contenían el gel para homogeneizarlo adecuadamente. A continuación, se colocó el spin en la columna de colección y se centrifugó a 750g durante 2 minutos. Se añadieron 20 μL al spin que se colocó en el tubo de elución ($1,5$ mL) y se centrifugó a 750g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el eluido del tubo de elución y se almacenó en tubos de $0,6$ mL, debidamente rotulados. Este procedimiento se repitió hasta completar 60 μL por tubo, realizando el proceso en 3 columnas por fruta. El pool de exosomas fue cuantificado mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Ref.: J999). Finalmente, los tubos se almacenaron a -80°C , asegurando una correcta

conservación de los exosomas purificados. A continuación, se resume la metodología propuesta en el aislamiento mediante kit.

Figura 12

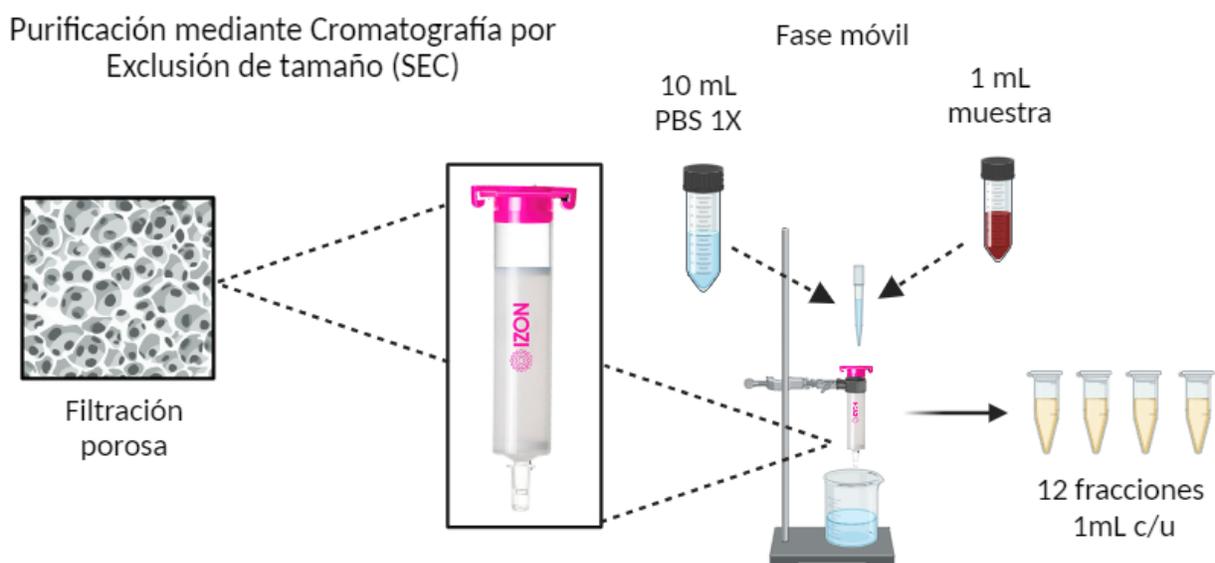
Purificación de exosomas mediante Kit



Nota. Elaborado en Biorender.

Purificación mediante Cromatografía por Exclusión de Tamaño (SEC)

En primer lugar, se temperó la columna *qEVOoriginal* (IZON Science, Sp1, 70 nm) a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de su uso. Se procedió a equilibrarla con 10 mL de PBS 1X autoclavado y filtrado, recogiendo los desechos en un vaso de precipitación. Sin permitir que la columna se seque, se pasó 2 mL del sobrenadante recuperado de la fruta seleccionada, a través de la columna. Cuando la muestra alcanzó aproximadamente 2 cm del final de la columna, se recolectaron 12 fracciones de 1 mL cada una. Antes de iniciar un nuevo pase, se lavó la columna con aproximadamente 10 mL de PBS 1X. Este mismo procedimiento se repitió dos veces para cada fruta. Las fracciones recolectadas se cuantificaron utilizando espectrofotometría en el *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific™, Ref.: J999) y se almacenaron a -20°C. Una vez finalizado el aislamiento, se limpió la columna con 5 mL de NaOH 0,5 N y se lavó con 15 mL de PBS 1X, para luego refrigerarla a 4°C. A continuación, se resume la metodología correspondiente a la purificación mediante cromatografía por exclusión de tamaño.

Figura 13*Purificación de exosomas mediante SEC*

Nota. Elaborado en Biorender.

Cuantificación de exosomas mediante BCA (Sigma-Aldrich, Ref.: B9643-1L)

En primera instancia, se preparó una placa con 96 pocillos, agregando una serie de proteínas de referencia y 25 μ L de cada muestra a analizar. Cada muestra se agitó brevemente durante 3 segundos y se homogeneizó mediante pipeteo en tres ocasiones antes de dispensarla. Como referencia se utilizó PBS 1x y albúmina de suero bovino (BSA a 2 mg/mL). Una vez completada la carga de los pocillos, se procedió a preparar una solución de trabajo en una proporción de 50:1 (Reactivo A: solución de ácido bicinónico y Reactivo B: solución de sulfato de cobre (II) pentahidratado al 4%). A continuación, se añadieron 200 μ L de dicha solución en cada pocillo, homogeneizándola adecuadamente mediante pipeteo. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente por unos 5 minutos. La absorbancia se midió a 562 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas

Multiskan Go (*Thermo Scientific*[™], Ref.: N10588). Luego se realizó el cálculo de la absorbancia neta ($NET\ Abs_{562}$) mediante la ecuación 1 (ec.1).

$$NET\ Abs_{562} = A_{562}muestra - A_{562}blanco \text{ (ec. 1)}$$

Posteriormente, se construyó una curva de calibración con el fin de obtener una ecuación que permitiera calcular la concentración final de proteína en las muestras, expresada en mg/mL (ec.2).

$$y = mX + b \text{ (ec. 2)}$$

Siendo:

Y=Absorbancia neta obtenida a 562 m

X=Concentración final de proteína en mg/mL

m y b=Valores constantes generados en la ecuación

La ecuación obtenida para el cálculo final de la concentración de proteína se describe mediante la ecuación 3 (ec.3).

$$[Proteína] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{NET\ Abs_{562} - b}{m} \times 1000 \text{ (ec. 3)}$$

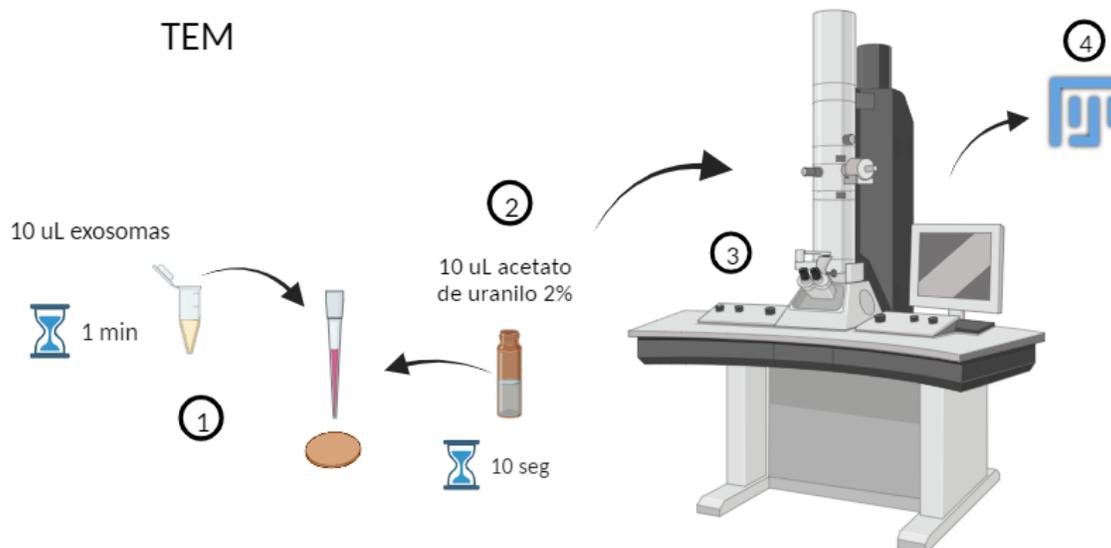
Caracterización de exosomas mediante TEM

El proceso de tinción TEM se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos. En primer lugar, se colocaron 10 μ L de muestra de exosomas sobre el mesh de cobre (*TED PELLA INC, No. 01753-F*) en el lado más oscuro y se permitió que la muestra se absorbiera durante 2 minutos. Posteriormente, se eliminó el exceso de muestra utilizando papel filtro. A continuación, se fijó la muestra utilizando 10 μ L de acetato uranilo al 2% durante 10 segundos y se absorbió el exceso de líquido con papel filtro. Se realizaron tres lavados adicionales con agua destilada y se eliminó el excedente de líquido mediante papel filtro. El análisis fue realizado mediante TEM (*FEI-Tecnai Spirit Twin, 120kV*) a una resolución de

100nm y 200nm. Las imágenes se analizaron mediante el programa ImageJ y FIJI. A continuación, se resume la metodología propuesta para la caracterización de exosomas mediante TEM.

Figura 14

Caracterización de exosomas mediante TEM



Nota. Elaborado en Biorender.

Viabilidad celular

Las líneas celulares se mantenían almacenadas a una temperatura de -180°C en un tanque de nitrógeno líquido (*Thermo Scientific™*, Ref.: CY509106). Se procedió a extraer el pasaje celular correspondiente, que luego fue resuspendido en 1 mL de medio, previamente atemperado a una temperatura de 37°C , y se transfirió cuidadosamente a un tubo Falcon estéril (*Thermo Scientific™*, Ref.: 339650), junto con 1 mL de medio. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos para obtener un pellet. Este pellet resultante fue hábilmente resuspendido en 1 mL de medio de cultivo, para finalmente ser transferido a un Flask 25 (*Thermo Scientific™*, Ref.: 156367). La incubación se llevó a cabo a una temperatura de 37°C y se mantuvo un ambiente con un 5% de dióxido de carbono

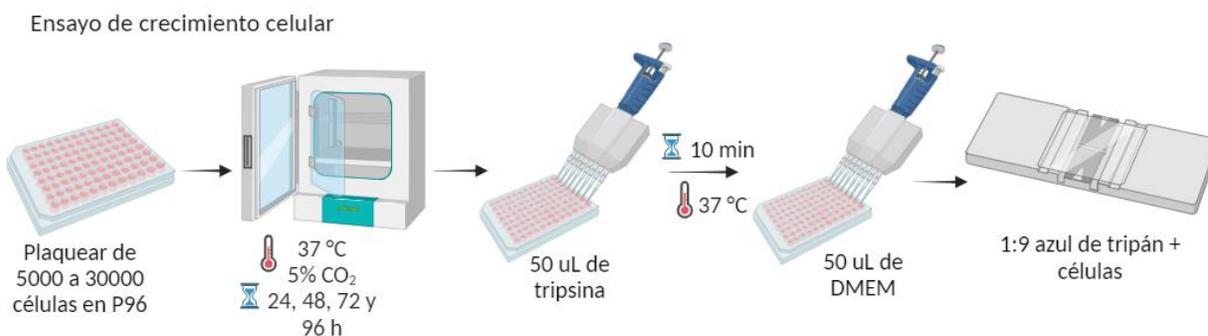
(CO₂), en conformidad con los requerimientos específicos para el desarrollo adecuado de las células. Las células de HaCaT se mantuvieron en medio Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (*Gibco*, Ref.: A14430-01) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 100 uL de Estreptomicina/Penicilina.

Determinación de la curva de crecimiento celular para HaCaT

Se realizaron evaluaciones del crecimiento celular en cuatro intervalos temporales distintos para las células HaCaT: 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas. En un inicio, se llevaron a cabo cálculos apropiados para sembrar 5000, 10000, 15000, 20000, 25000 y 30000 células en cuatro repeticiones, distribuidas en tres intervalos de tiempo, en una placa P96. Después de la preparación de la placa, esta fue sometida a una incubación a 37°C con un 5% de CO₂ durante 24 horas. Posterior a este lapso, las células en los diferentes momentos temporales fueron separadas utilizando 50 uL de tripsina incubada a una temperatura igual a 37°C con un 5% de CO₂. En última instancia, para detener la reacción, se incorporaron 50 µL de medio DMEM, seguido de una tinción con azul de tripán en una proporción de dilución 1:10 en relación a las células. A continuación, se resume la metodología propuesta en cuanto al crecimiento celular.

Figura 15

Ensayo de curva de crecimiento celular para HaCaT



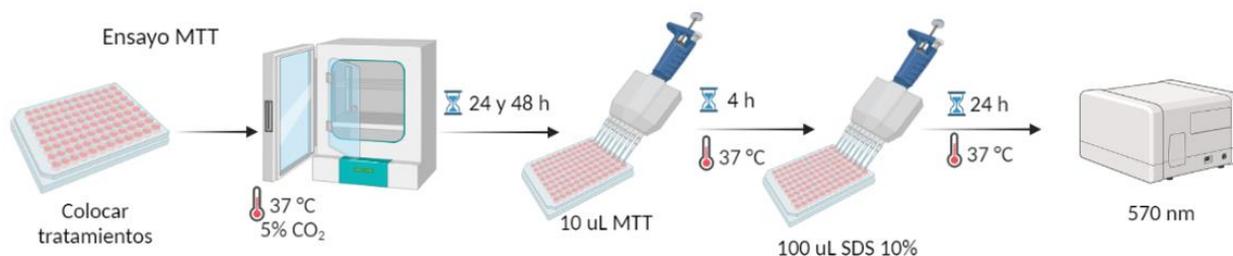
Nota. Elaborado en Biorender.

Determinación de la viabilidad celular mediante MTT

La viabilidad de las células en las muestras de exosomas fue evaluada en la línea celular HaCaT mediante el uso del ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-H-tetrazolio). En primer lugar, se llevó a cabo el proceso de levantamiento celular como se explicó anteriormente. A continuación, se realizaron los cálculos correspondientes para sembrar 100,000 células en cada pocillo de una placa P96. Tras la preparación de la placa, esta se sometió a una incubación a una temperatura de 37°C con un 5% de CO₂ durante un período de 24 horas. Pasado este tiempo, se procedió al cambio de medio en todos los pocillos de las placas preparadas el día anterior, aplicando los tratamientos con las siguientes concentraciones: 2 ng/uL para RNA derivado de exosomas mediante TRIzol, y 100 y 200 ug para exosomas obtenidos a través de kit y qEV, respectivamente. Como control positivo se incluyeron células junto con el medio DMEM y se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) puro como control negativo de viabilidad celular. La incubación prosiguió en un ambiente con un 5% de CO₂ a 37°C. Después de 24 y 48 horas desde la incubación de los tratamientos, se agregó el reactivo de MTT (5mg/mL) (*Invitrogen*, Ref.: M6494) en una cantidad de 10 uL por cada pocillo, y se efectuó una incubación de 4 horas a 37°C con un 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 uL de SDS al 10% para disolver los cristales de formazán. Finalmente, las muestras fueron sometidas a una lectura en un espectrofotómetro *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*[™], Ref.: N10588) a 570 nm, tanto a las 24 como a las 48 horas. Se procedió a realizar el análisis estadístico de la viabilidad celular utilizando la ecuación 4 (ec.4):

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{NET_{Abs\ 570} \times 100}{Promedio\ NET_{Abs\ 570}\ (Control)}$$

A continuación, se resume la metodología del ensayo MTT.

Figura 16*Ensayo MTT*

Nota. Elaborado en Biorender.

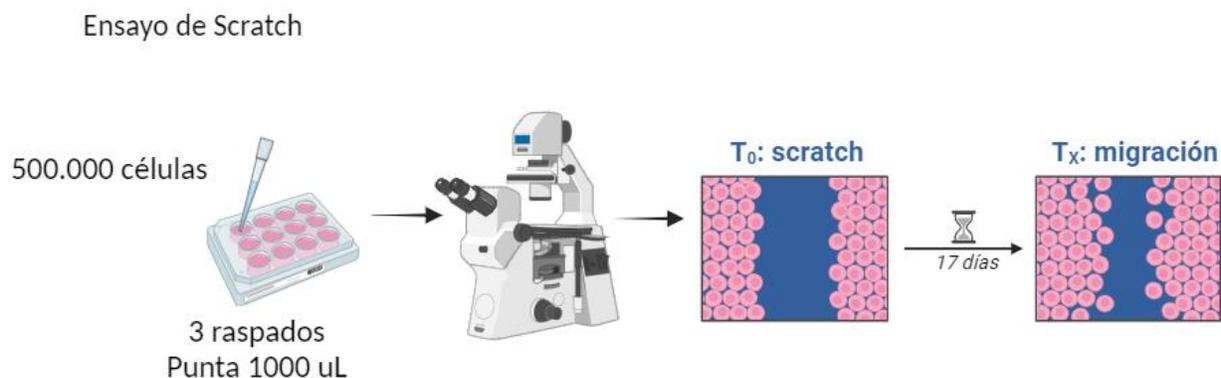
Estimación del efecto cicatrizante mediante ensayo de scratch

En primer lugar, se llevó a cabo el proceso de levantamiento de las células contenidas en un Flask de cultivo. Para esto, se procedió a realizar dos lavados utilizando una cantidad de 2 mL de PBS en cada enjuague. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de tripsina y se llevó a cabo la incubación de las células a una temperatura de 37°C en un ambiente con un 5% de CO₂ durante un período de 5 minutos. Luego de obtener una suspensión adecuada de las células, se añadió 1 mL de medio DMEM y se procedió a transferir el contenido a un nuevo tubo. Con el fin de facilitar el proceso, se realizó una centrifugación a una velocidad de 300 g durante 4 minutos para eliminar el sobrenadante. Después de resuspender las células en 4 mL de medio y asegurar su homogeneización completa, se procedió al conteo celular utilizando una cámara de Neubauer con gran precisión. Seguidamente, se sembraron 2 millones de células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se incubaron a 37°C con un 5% de CO₂. Luego de 96 h, una vez que las células alcanzaron la confluencia, se realizó un raspado mediante el uso de una punta de micropipeta de 1000 uL. Se aplicaron los tratamientos correspondientes, es decir, 20 ug de EN y EM obtenidos mediante kit y qEV, respectivamente. Como controles, se utilizaron células junto con el medio DMEM, y se empleó cloruro de cobalto (COCl₂) como control negativo de viabilidad celular. Durante un

período de 17 días, se evaluó el cierre de la cicatriz y las imágenes obtenidas se analizaron utilizando los programas ImageJ y FIJI. A continuación, se resume la metodología del ensayo de scratch.

Figura 17

Ensayo de Scratch



Nota. Elaborado en Biorender.

Extracción de RNAs

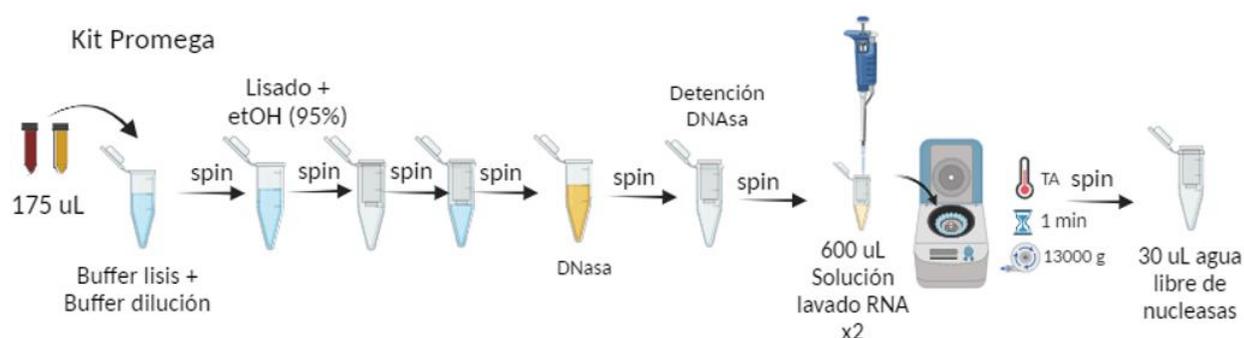
Extracción de RNAs mediante Kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Ref.: Z3100)

Se transfirieron 175 μ l de buffer de lisis de ARN con BME añadido a un tubo de microcentrífuga estéril, al cual se añadió la muestra en una concentración 1:1. A continuación, se agregaron 350 μ l de buffer de dilución de ARN (azul) a 175 μ l de lisado y se mezcló suavemente por inversión 3-4 veces. Luego, se sometió el tubo a una incubación a 70°C durante 3 minutos, seguida de una centrifugación durante 10 minutos a 13,000 \times g. Asimismo, se transfirieron 500 μ l de la solución de lisado aclarada a un nuevo tubo de microcentrífuga y se añadieron 200 μ l de etanol al 95% al lisado aclarado, mezclándolo. Después, la mezcla se transfirió al conjunto de columna de centrifugación y se sometió a una centrifugación a 13,000 \times g durante 1 minuto. Posteriormente, se preparó la mezcla de incubación de DNasa y se aplicó directamente en la membrana dentro de la cesta de centrifugación, seguida de una

incubación a 20-25°C durante 17 minutos. Después de esta incubación, se agregó la Solución de Detención de DNasa y se sometió a otra centrifugación a 13,000 × g durante 2 minutos. Se transfirió del tubo de colección al tubo de elución y se agregó 50 µl de Agua Libre de Nucleasas (DEPC) a la membrana. Se centrifugó a 13,000 × g durante 1 minuto y se repitió este paso, para una elución total con 100 µl. Finalmente, se almacenó el tubo de elución que contiene el ARN purificado a -80°C. A continuación, se resume la metodología de extracción de RNAs mediante kit.

Figura 18

Extracción de RNAs mediante Kit



Nota. Elaborado en Biorender.

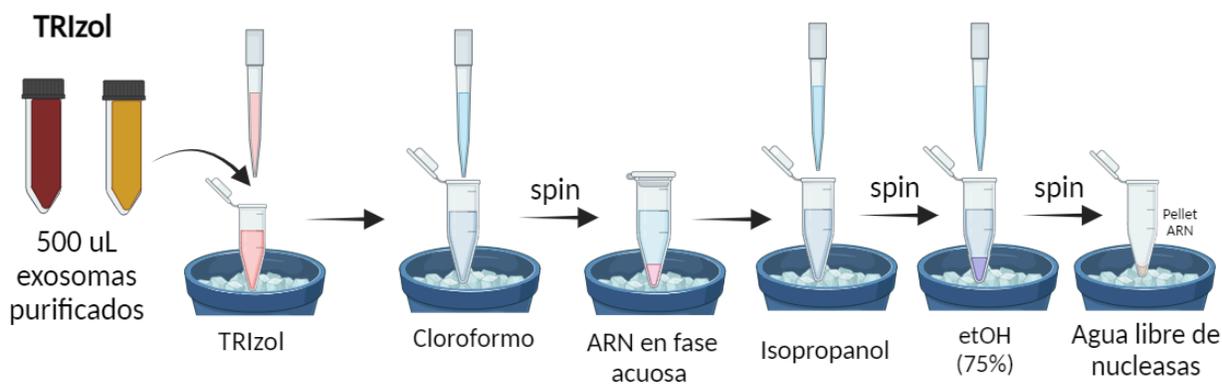
Extracción de RNAs mediante TriReagent (Cat. #TR 118)

Se dispensaron 500 uL de muestra en un tubo eppendorf y se añadió 500 uL del reactivo TRIreagent, permitiendo una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12000 g durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante en otro tubo. A continuación, se adicionaron 100 uL de cloroformo, mezclando mediante inversión y dejando reposar por 3 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo otra centrifugación a 1200 g durante 15 minutos a 4°C, lo que resultó en la separación de la mezcla en una fase orgánica que contiene proteínas (color rosa), una interfase que contiene DNA (color blanco) y una fase acuosa que contiene RNA (incolora).

Utilizando una micropipeta, se recuperó la fase acuosa de RNA y se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 250 uL de isopropanol, agitando vigorosamente mediante inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego, se realizó otra centrifugación a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, observándose la formación de un pellet blanco en el fondo del tubo. Por tanto, se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar cuidadosamente el pellet con 500 uL de etanol al 75%. Finalmente, se llevó a cabo otra centrifugación a 7500 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el etanol y se permitió que el pellet se secase al aire libre dentro de una cabina de flujo laminar. Finalizando, el RNA se resuspendió en 30 uL de DEPC. A continuación, se resume la metodología propuesta de extracción de RNAs mediante TRIzol.

Figura 19

Extracción de RNAs mediante TRIzol



Nota. Elaborado en Biorender.

Determinación de la cantidad y calidad del RNA extraído

Se cuantificaron las muestras utilizando el equipo *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific™*, Ref.: J999), donde se agregaron 2 uL de cada volumen de RNA extraído y se realizaron las lecturas de las relaciones 260/280 y 260/230, parámetros que indican la pureza del RNA.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism para evaluar y representar gráficamente los resultados obtenidos. Se aplicó un diseño factorial de dos factores y los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías en GraphPad Prism8, Los datos se presentaron con alta precisión mediante la media junto con la desviación estándar de la media (SEM) ($\text{Media} \pm \text{SEM}$). Las respectivas barras de error y los valores de p de significancia se calcularon con el análisis estadístico en GraphPad Prism.

Capítulo IV: Resultados y discusión

Aislamiento de exosomas

Purificación mediante kit Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen™ 4484449)

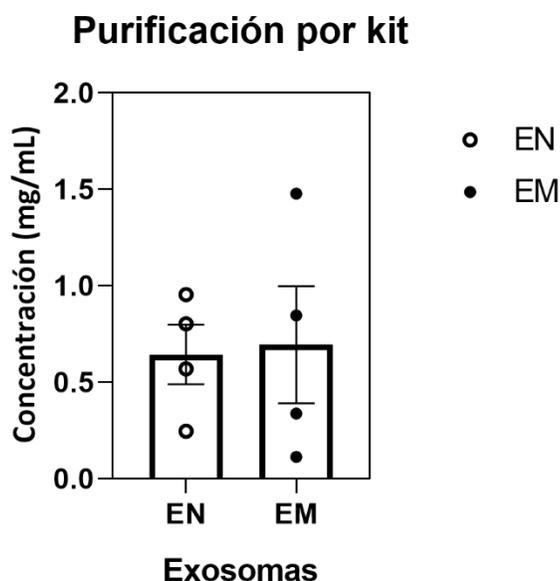
A continuación, se observa la concentración de proteína (mg/mL) obtenida por la purificación de exosomas mediante el kit *Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen™ 4484449)* (ver fig. 20), la cuantificación se realizó a través de la medición de la absorbancia a 280 nm con espectrofotometría en *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™ J999)*. La purificación mediante kit permitió la eliminación de sales y contaminantes presentes en los extractos de exosomas (Hasan et al., 2022; Jia et al., 2022; Santos-Coquillat et al., 2022) de una forma rápida y sencilla en comparación con métodos tradicionales de purificación como la ultracentrifugación, filtros de centrifugación y diálisis (Life Technologies Corporation, 2013).

En referencia a este punto, se pudo notar que los EN presentan un contenido proteico de 0,7087 mg/mL, mientras que los EM presentan una concentración proteica de 1,366 mg/mL durante las purificaciones realizadas utilizando esta técnica.

Figura 20

Distribución de la concentración de EM y EN mediante kit Exosome Spin Columns (MW3000)

(Invitrogen™ 4484449)



Nota. La figura muestra la concentración de proteínas obtenida con la columna del kit en las muestras de naranjilla y mortiño. Los datos obtenidos se representaron como la media \pm la desviación estándar (SEM) en GraphPad Prism 8.

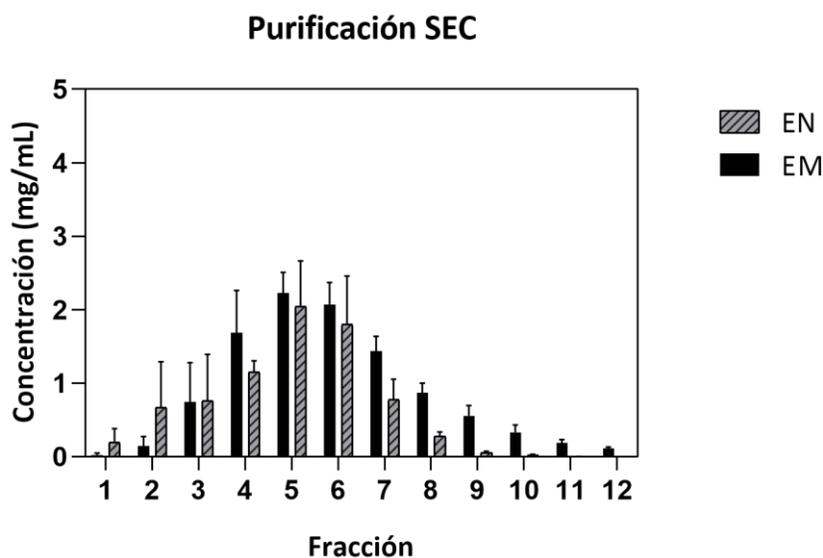
Purificación mediante SEC

La aplicación de la técnica de cromatografía de exclusión de tamaño utilizando la columna *qEVOoriginal* (IZON Science, Sp1, 70 nm) permitió obtener una concentración elevada (expresada en mg/mL) de proteínas en las fracciones 1-12, utilizando un volumen vacío de 6 mL. Para determinar dicha concentración, se utilizó el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific™ J999) midiendo la absorbancia a 280 nm.

En este sentido, se sabe que los exosomas eluyen aproximadamente $1 \pm 0,5$ mL después del volumen vacío, según lo reportado por Izon Science Ltd (2018). De esta manera, se determinó que el rango de fracciones que contiene los exosomas con un diámetro de 70 nm varía según la muestra utilizada. En cuanto a la muestra de mortiño, esta variación engloba desde la fracción F3 hasta la F10, llegando a un valor proteico de 2,203 mg/mL al emplear 1 mL de muestra. En contraste, en la muestra de naranjilla, se extiende desde la fracción F2 hasta la F7, alcanzando un contenido proteico de 2,061 mg/mL bajo las mismas condiciones (ver fig. 21).

Figura 21

Distribución de la concentración de exosomas derivados de 1 mL de muestra de mortiño y naranjilla mediante SEC



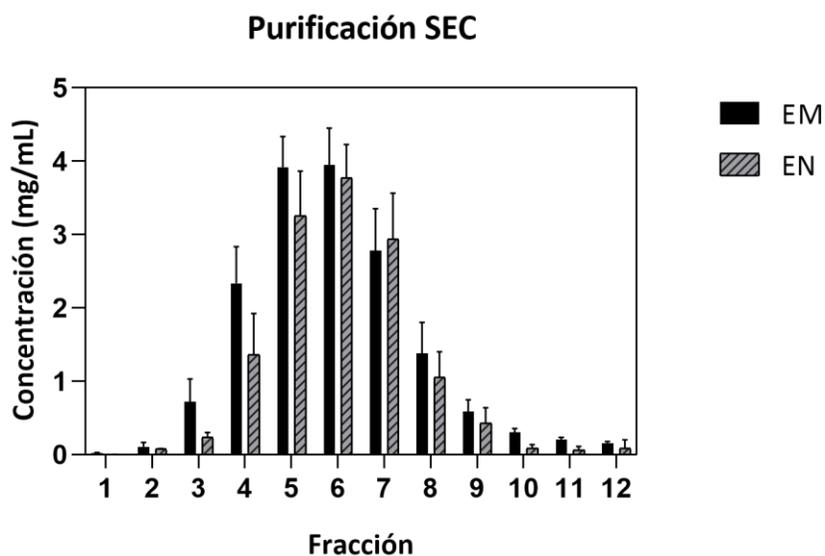
Nota. La figura muestra la distribución de exosomas en dos muestras diferentes: mortiño y naranjilla. Al utilizar 1 mL de muestra de mortiño, se observó que los exosomas se encuentran en el intervalo de fracciones que va desde la F3 hasta la F10. Mientras que, para la naranjilla, se identificó que los

exosomas se encuentran en el intervalo de fracciones que va desde la F2 hasta la F7. Los datos obtenidos se representaron como la media \pm la desviación estándar (SEM) en GraphPad Prism 8.

La fig. 22 ilustra la distribución de exosomas en dos muestras distintas: mortiño y naranjilla. Al aumentar el volumen de la muestra a 2 mL en el contexto del mortiño, se pudo notar que el intervalo de fracciones que alberga los exosomas se expande desde la F3 hasta la F10, presentando un contenido proteico de 3,930 mg/mL. En contraposición, en relación a la muestra de naranjilla, esta variación se localiza entre la F4 y la F9, con un valor proteico de 3,833 mg/mL.

Figura 22

Distribución de la concentración de exosomas derivados de 2 mL de muestra de mortiño y naranjilla mediante SEC



Nota. Los datos obtenidos se representaron como la media \pm la desviación estándar (SEM) en GraphPad Prism 8.

Al incrementar el volumen de la muestra de mortiño de 1 a 2 mL en la metodología SEC (fig. 21-22), se observó un notorio aumento en el contenido proteico de 2,203 a 3,930 mg/mL. Esto contrasta con los resultados de la naranjilla, en los que se reveló un contenido proteico de 2,061 a 3,833 mg/mL.

Mediante la implementación de SEC, se logra una depuración más intensa en los exosomas aislados, aunque enfrenta el desafío de una recuperación de la muestra limitada (Sidhom et al., 2020). La selección de la columna y la resina en el proceso de separación vía SEC se torna esencial para alcanzar el tamaño de partícula anhelado durante el aislamiento. Desde esta perspectiva, las partículas con diámetros menores a 70 nm tienden a experimentar una elución más tardía en la columna qEV 70 nm (Izon Science Ltd, 2018). Consecuentemente, los exosomas que presentan diámetros menores a 70 nm podrían ubicarse en las fracciones finales, donde ocurre una elución más intensa de proteínas. Este descubrimiento concuerda con la mayor presencia de proteínas en las fracciones obtenidas para ambas muestras, tanto de mortiño como de naranjilla, en volúmenes de 1 y 2 mL, respectivamente.

Resulta importante resaltar que, dado que la SEC se apoya en la gravedad para operar, este método podría conservar las estructuras integrales y la bioactividad de los exosomas, lo que podría ser valioso para ensayos posteriores (P. Li et al., 2017; Suharta et al., 2021).

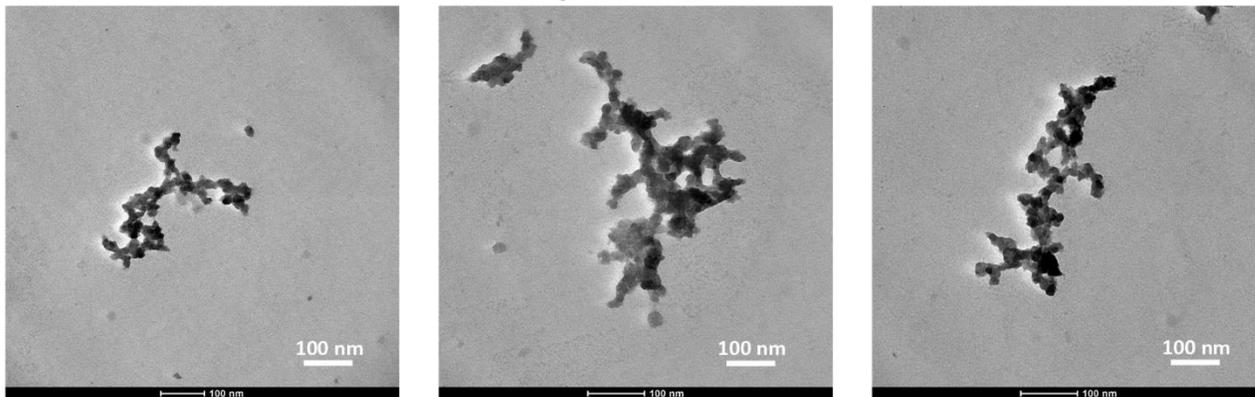
Caracterización de exosomas mediante TEM

La integridad y la distribución de tamaño de los exosomas se evaluaron a una escala de 100 nm mediante TEM. Se determinó que los EM presentaron un tamaño promedio de partícula que osciló entre 18 y 56 nm, exhibiendo una morfología semiesférica ovalada hueca, tal como se puede apreciar en la fig. 23.

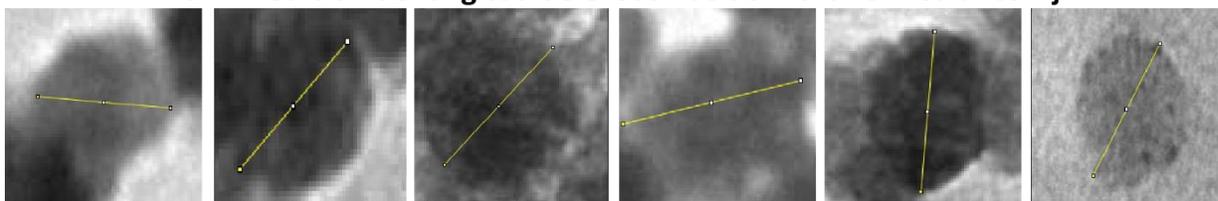
Figura 23

Análisis de integridad y distribución de tamaño de EM mediante TEM

a. Exosomas de mortiño purificados mediante kit

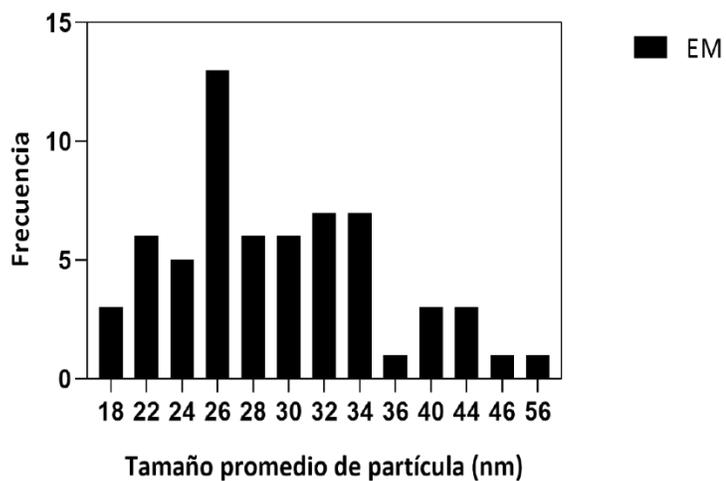


b. Medición de longitud de exosomas de mortiño mediante Fiji



c. Histogramas de distribución de frecuencia de tamaño

Histograma de tamaño de EM

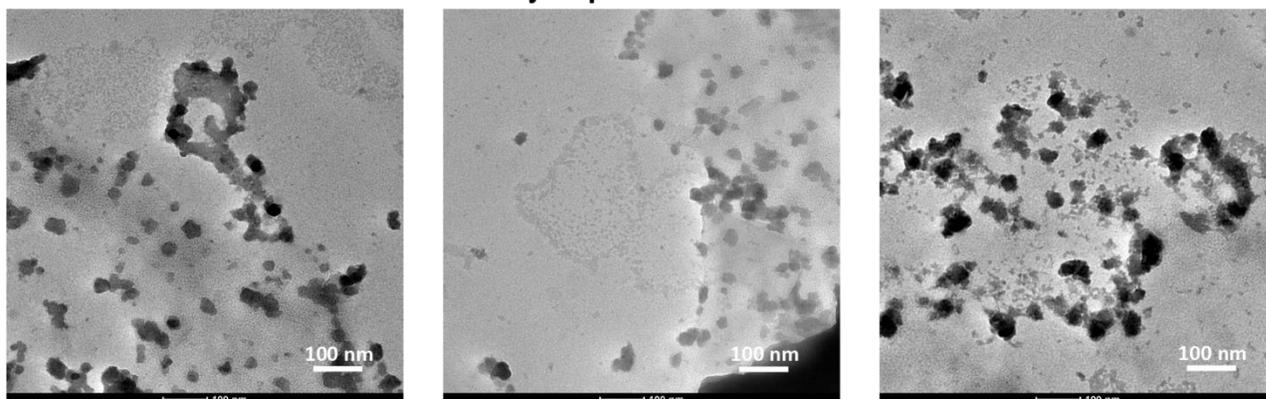


Nota. a-b. La figura muestra los resultados del análisis de integridad y distribución de tamaño de los EM utilizando TEM. c. Los exosomas presentaron un tamaño promedio de partícula igual a 26 nm, mostrando una morfología semiesférica ovalada hueca.

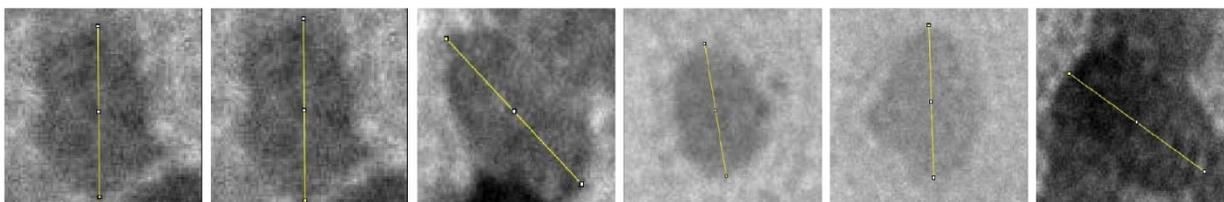
En cuanto a los EN también mostraron una morfología semiesférica ovalada, con un tamaño promedio de partícula entre 30 y 70 nm, como se ilustra en la fig. 24.

Figura 24

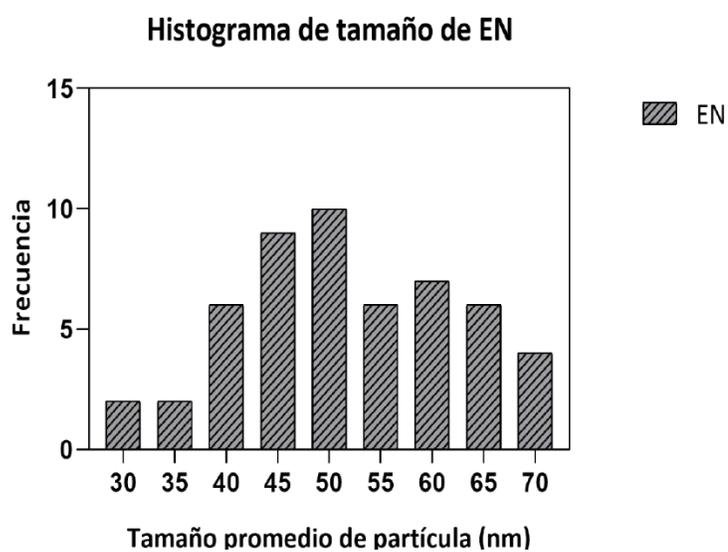
Análisis de integridad y distribución de tamaño de EN mediante TEM



b. Medición de longitud de exosomas de naranjilla mediante Fiji



c. Histogramas de distribución de frecuencia de tamaño



Nota. a-b. La figura muestra los resultados del análisis de integridad y distribución de tamaño de los EN utilizando TEM. c. Los exosomas presentaron un tamaño promedio de partícula igual a 50 nm, mostrando una morfología semiesférica ovalada.

En los histogramas de distribución (ver fig. 24), se observó que el tamaño medio de los EN purificados mediante kit rondaba los 50 nm. Este resultado se asemeja a los hallazgos de Sánchez (2022), donde se evidenció que los EN aislados mediante SEC y kit exhibieron un tamaño medio de alrededor de 40 nm. En contraposición, la longitud de la población de partículas predominantes en los aislamientos del mortño (ver fig. 23) se midió en 26 nm, una dimensión no congruente con las mediciones realizadas por Martínez (2022), quien registró una agrupación promedio de 46 nm mediante el empleo de la técnica SEC. Dentro del espectro de los resultados para los EM, se llegaron incluso a detectar dimensiones menores, a partir de los 18 nm, lo que sugiere la posibilidad de que la mayoría de las partículas sean en realidad agregados proteicos más que vesículas (Baranyai et al., 2015).

No obstante, el tamaño de los exosomas es semejante al de las vesículas intraluminales (ILVs) a partir de las cuales se originan (Raposo & Stoorvogel, 2013), estas son de forma esférica o elipsoidal, mostrando heterogeneidad en cuanto a su tamaño (generalmente con un diámetro que oscila entre 30 y 100 nm) (Janas et al., 2015; Von Bartheld & Altick, 2011). Asimismo, Woith, & Melzig (2019) señalan que los tamaños de los exosomas obtenidos de plantas parecen ser específicos de cada especie, lo cual concuerda con la categorización de exosomas pequeños en estas variedades.

Por otro lado, el tamaño de los exosomas aislados también está influenciado por el método de aislamiento empleado, el kit *Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen™ 4484449)* es recomendado para eliminar las impurezas de bajo peso molecular (<3000 MW) (componentes del buffer, sales, nucleótidos y oligonucleótidos cortos) de las preparaciones de exosomas (Life Technologies Corporation, 2013). Sin embargo, no se ha documentado un diámetro típico para los exosomas obtenidos mediante este kit. No obstante, se ha constatado una recuperación exosómica más elevada en comparación con la ultracentrifugación (Y. T. Tang et al., 2017).

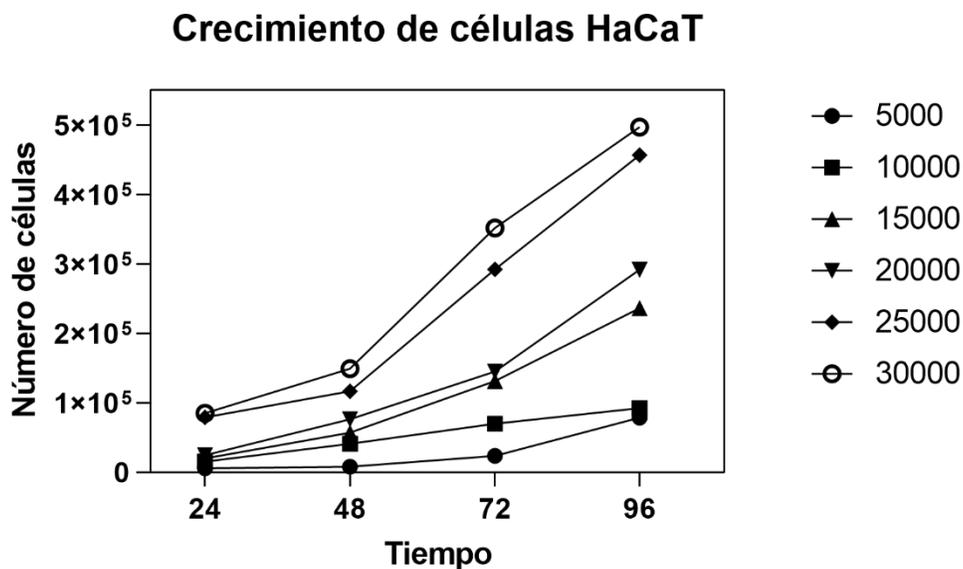
Viabilidad celular

Determinación de curva de crecimiento celular para HaCaT

Las células HaCaT representan una línea de queratinocitos epidérmicos humanos que mantienen las características de queratinas epidérmicas propias de las capas celulares más especializadas de la epidermis humana en su estado natural y resultan beneficiosas para la realización de ensayos de migración celular *in vitro* (Kulesz et al., 2010). En este sentido, los resultados del ensayo de crecimiento celular a lo largo del tiempo para las células HaCaT: a las 24, 48, 72 y 96 horas, arrojaron un crecimiento exponencial para el número de 5000, 10000, 15000, 20000, 25000 y 30000 células, respectivamente (ver fig. 25).

Figura 25

Curva de crecimiento de la línea celular HaCaT



Nota. Se llevaron a cabo evaluaciones para obtener la curva de crecimiento celular en cuatro intervalos temporales distintos para las células HaCaT: 24, 48, 72 y 96 horas, con una cantidad de entre 5000 a 30000 células.

Es posible identificar una tendencia general en el aumento del crecimiento celular a medida que se prolonga el tiempo de cultivo. A lo largo de las concentraciones y las diferentes horas evaluadas, se nota que el crecimiento celular tiende a aumentar. Este incremento puede atribuirse a varios factores, como la adaptación de las células al medio de cultivo, la proliferación celular y la ausencia de factores de estrés significativos (Colombo et al., 2017; Jones et al., 2001).

Un aspecto interesante de los resultados es la variabilidad en la respuesta celular según la concentración inicial. A lo largo de las 24 horas, se observa un aumento constante en la proliferación en todas las concentraciones, pero las tasas de aumento varían. Por ejemplo, a 24 horas, las concentraciones más altas (25000 y 30000 células) muestran una proliferación significativamente mayor en comparación con las concentraciones más bajas (5000 y 10000 células). Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, esta brecha entre las concentraciones parece reducirse, ya que las células de concentraciones iniciales más bajas comienzan a alcanzar niveles comparables a las concentraciones más altas. Esto se explica dado que el nivel de confluencia afecta significativamente en las células HaCaT reaccionando ante una elevada densidad celular (Capone et al., 2000; Wilson, 2013).

En cuanto a las 72 y 96 h de cultivo, se observa un aumento marcado en el crecimiento celular en todas las concentraciones. En concordancia con Colombo et al. (2017), los resultados obtenidos sugieren que las células de concentraciones iniciales más bajas pueden estar experimentando una fase de crecimiento más acelerada o un ajuste más efectivo al entorno de cultivo a largo plazo.

A partir de la fig. 25, se derivó una ecuación correspondiente al desarrollo de las células por tiempo, la cual se presenta en los siguientes términos:

Tabla 5.

Ecuación de la curva de crecimiento celular para HaCaT

Tiempo (h)	Ec. exponencial	R²
24	$y=52921e^{0,407X}$	0,9069
48	$y=20336e^{0,511X}$	0,933
72	$y=8785,5e^{0,5183X}$	0,9309
96	$y=4119,9e^{0,5255X}$	0,8831

Nota. Las ecuaciones presentadas en la tabla reflejan el modelo de crecimiento exponencial para cada período de tiempo específico.

Determinación de la viabilidad celular mediante MTT

Se realizó un ensayo MTT para evaluar la viabilidad celular de los exosomas derivados de naranjilla y mortiño en la línea celular HaCaT a los tiempos de exposición de 24 y 48 horas. Las concentraciones utilizadas fueron de 2 ng/uL para RNA derivado de exosomas mediante TRIzol, y 100 y 200 ug para exosomas obtenidos mediante kit y qEV (fig. 26-27). Se utilizaron células más el medio (DMEM) como control positivo y DMSO puro como control negativo de viabilidad celular.

Los análisis que evalúan la actividad metabólica se revelan como apropiados para medir la proliferación celular, su viabilidad y la citotoxicidad. La conversión de las sales de tetrazolio, como el MTT, en compuestos formazán coloreados solamente se manifiesta en células que ostentan actividad metabólica. Las células viables convierten el reactivo MTT en un producto formazán coloreado, el cual es insoluble en agua, precipita en el interior celular y debe ser extraído en una solución de solubilización como SDS o DMSO (Minor, 2004; Tolosa et al., 2015).

Los resultados indican que el ARN derivado de los EM generó una reducción en la viabilidad celular en la línea HaCaT, al ser administrado a una concentración de 2 ng/uL. A las 24 horas, la viabilidad disminuyó significativamente a un nivel del 61,45% (****p <0,0001), y a las 48 horas, esta reducción se situó en un 39,91% (****p <0,0001).

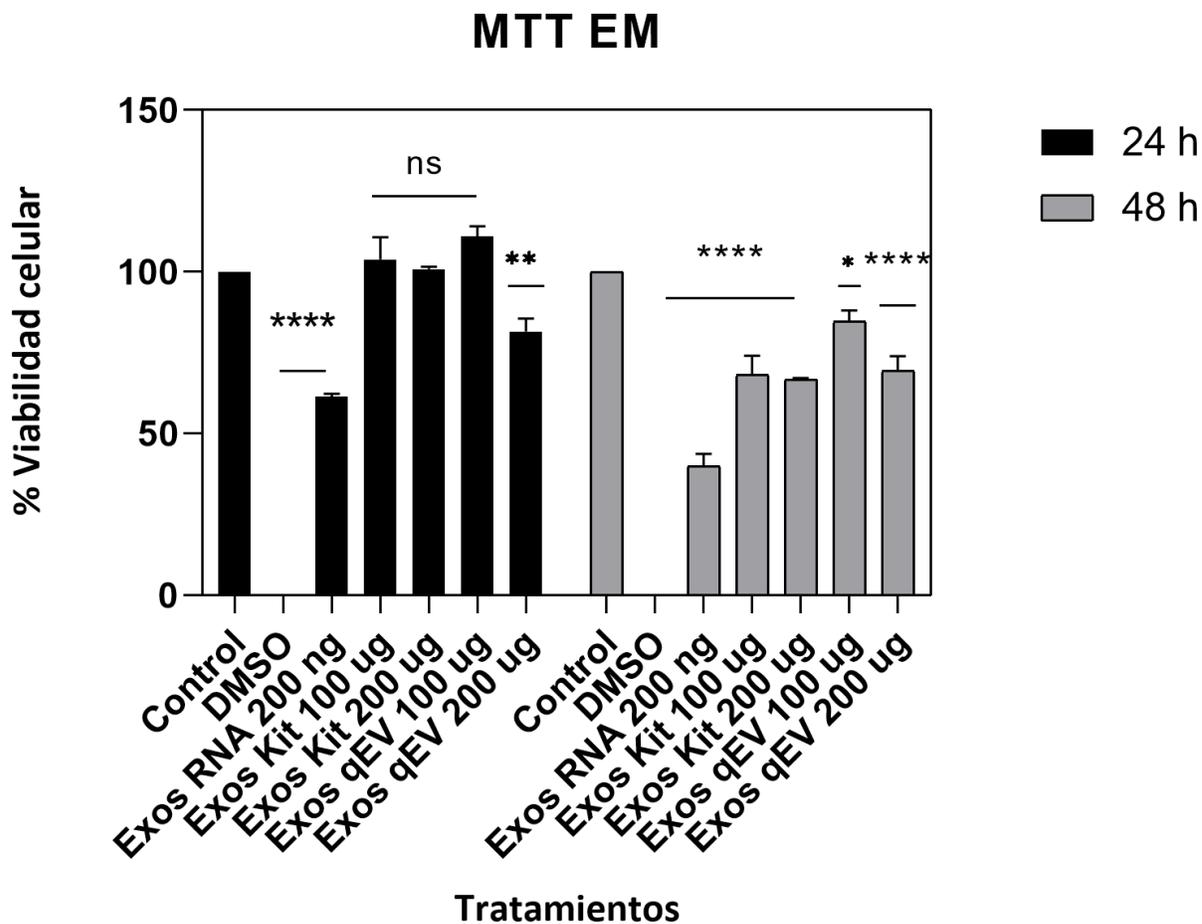
Por otro lado, los resultados correspondientes a los tratamientos empleando EM no demostraron significancia en comparación con el grupo de control en lo que respecta a la viabilidad celular. A concentraciones de 100 μg (obtenidas mediante el kit y qEV), no se observaron diferencias significativas con respecto al control a las 24 horas, registrando valores de 103,75% ($p= 0,8626$) y 110,89% ($p= 0,0565$), respectivamente. Mientras que, los exosomas una concentración de 200 μg , obtenidos mediante kit, presentaron no significancia con respecto al control de viabilidad, registrando un valor igual a 100,75% ($p=0,9997$). Al contrario que los exosomas obtenidos mediante qEV, los cuales sí presentaron una disminución en la viabilidad celular del 81,58% (** $p= 0,0050$) a las 24 h.

Al analizar los tratamientos a las 48 horas de exposición, se evidenció una disminución en la viabilidad celular en los grupos tratados con EM. A una concentración de 100 μg (obtenidos mediante el kit) y 200 μg (obtenidos mediante kit y qEV), se observaron diferencias significativas, con niveles de viabilidad de 68,19% (**** $p <0,0001$), 66,81% (**** $p <0,0001$) y 69,40% (**** $p <0,0001$), respectivamente. En contraste, los exosomas a una concentración de 100 μg obtenidos mediante qEV presentó una diferencia en la viabilidad celular igual a 84,64% (* $p=0,0224$).

En relación al tiempo de exposición, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular al aumentar de 24 a 48 horas con una variación total del 4,91% (**** $p <0,0001$).

Figura 26

Viabilidad celular en la línea celular HaCaT evaluada con RNA de exosomas y EM



Nota. Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular MTT en las líneas celulares HaCaT para evaluar los efectos de diferentes concentraciones de RNA a partir de exosomas (2 ng/uL) y solo exosomas (100 ug y 200 ug) derivados de muestras de mortño. La exposición se realizó durante períodos de 24 y 48 horas. Todos los resultados obtenidos se expresaron mediante la media \pm SEM, y para el análisis estadístico, se utilizó el programa Graphpad Prism8 con un ANOVA de dos vías con el test Dunnett. Las significancias estadísticas se representaron como sigue: * $p=0,0224$, ** $p=0,0050$, *** $p=0,0001$, **** $p<0,0001$, NS (no significativo).

Ahora bien, el ARN derivado de los EN no demostró significancia en la viabilidad celular en la línea HaCaT, al ser administrado a una concentración de 2 ng/uL. A las 24 horas, la viabilidad registró un valor de 104,27% ($p=0,3699$), y a las 48 horas, de 88,20% ($p=0,0020$).

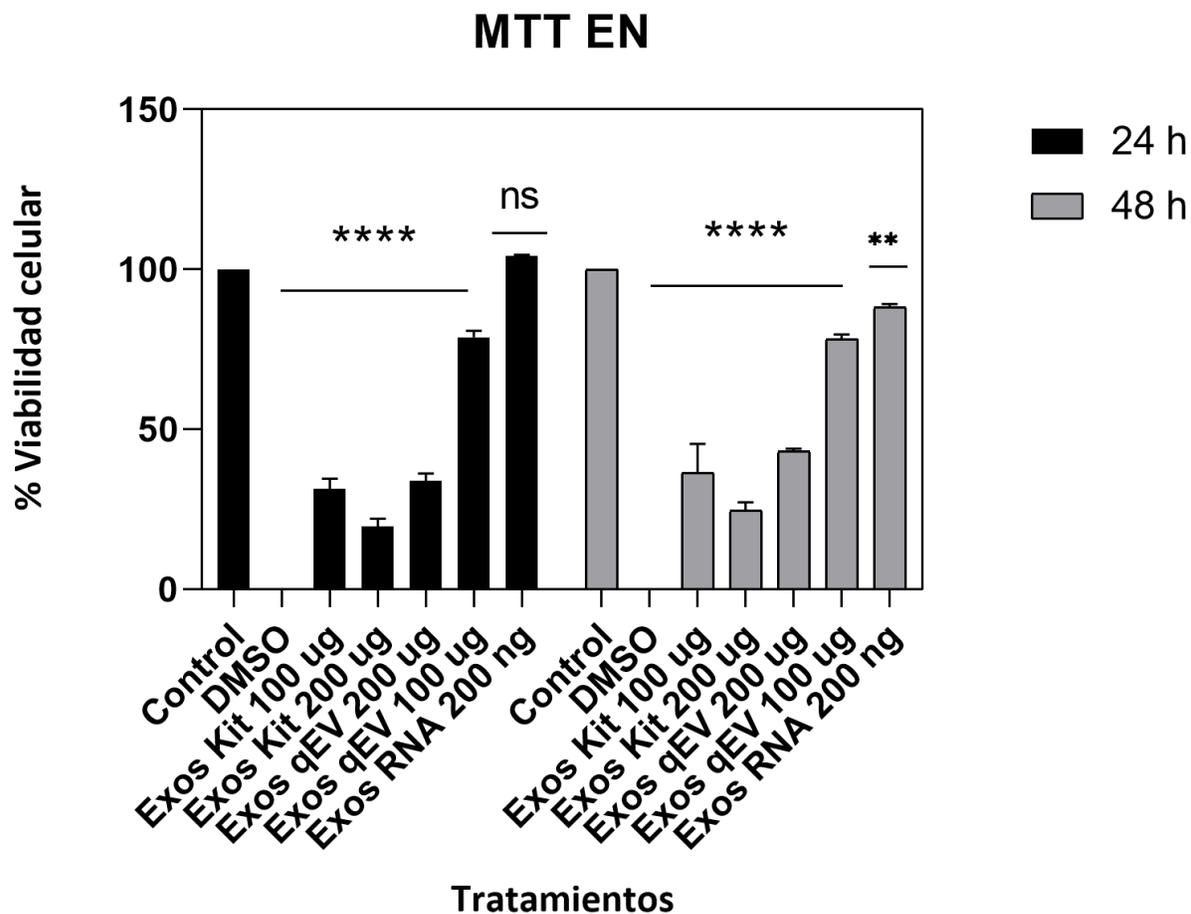
Los resultados correspondientes a los tratamientos empleando EN demostraron una marcada disminución en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control. A las 24 horas, las concentraciones de 100 μg (obtenidas mediante el kit y qEV) registraron valores de 31,33% (**** $p < 0,0001$) y 78,79% (**** $p < 0,0001$), respectivamente. Así también, los exosomas a una concentración de 200 μg (obtenidos mediante kit y qEV), presentaron una disminución con respecto al control de viabilidad, registrando un valor igual a 19,58% (**** $p < 0,0001$) y 33,84% (**** $p < 0,0001$), respectivamente, a las 24 horas de exposición.

Al analizar los tratamientos a las 48 horas de exposición, se evidenció una marcada disminución en la viabilidad celular en los grupos tratados con EN. A una concentración de 100 μg (obtenidos mediante el kit y qEV) se observaron diferencias significativas, con niveles de viabilidad de 36,50% (**** $p < 0,0001$) y 78,30% (**** $p < 0,0001$), respectivamente. Asimismo, los exosomas a una concentración de 200 μg (obtenidos mediante kit y qEV) presentaron diferencias significativas en la disminución de la viabilidad celular con valores igual a 24,55% (**** $p < 0,0001$) y 43,08% (**** $p < 0,0001$).

En relación al tiempo de exposición, no se observaron diferencias significativas ($p=0,1506$) en la viabilidad celular al aumentar de 24 a 48 horas para todos los tratamientos derivados de naranjilla.

Figura 27

Viabilidad celular en la línea celular HaCaT evaluada con RNA de exosomas y EN



Nota. Con el objetivo de analizar los efectos de diversas concentraciones de RNA extraídos de exosomas (2 ng/uL) y solo exosomas (100 ug y 200 ug) obtenidos a partir de muestras de naranjilla, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular MTT en las líneas celulares HaCaT. Durante este estudio, las células fueron expuestas a los tratamientos durante 24 y 48 horas. Todos los resultados obtenidos se expresaron mediante la media \pm SEM, y para un análisis estadístico detallado, se empleó el programa Graphpad Prism8, realizando un ANOVA de dos vías con el test Dunnett. Las significancias estadísticas se

representaron de la siguiente manera: * $p=0,0224$, ** $p=0,0050$, *** $p=0,0001$, **** $p<0,0001$, NS (no significativo).

En cuanto a la evaluación de los EM, la disminución de la viabilidad celular por parte de las muestras de ARN y cuando se aplicaron concentraciones equivalentes a 200 μg de exosomas (separados utilizando el método qEV) durante un período de 24 h, se evidenció una reducción en la viabilidad celular. Sin embargo, en el caso de las muestras tratadas con concentraciones de 100 μg (aislados mediante kit y qEV) y 200 μg (aislados mediante qEV), no se manifestó efecto citotóxico. Por otro lado, a las 48 h de exposición al tratamiento, se evidenció una notable disminución en la viabilidad celular de los EM, tanto para las concentraciones de 100 (aislados mediante kit) y 200 μg (aislados mediante kit y qEV), lo cual sugiere que el efecto citotóxico se intensifica con el tiempo. Estos hallazgos muestran similitudes con los resultados reportados por Martínez (2022), que en su trabajo destacó una reducción considerable en la viabilidad celular en dependencia de la concentración (5 y 20 μg), así al exponer células HeLa a EM, en una concentración de 20 μg durante un lapso de 48 horas, la citotoxicidad celular se veía aumentada. Este patrón podría sugerir la acumulación de componentes nocivos o el desencadenamiento de vías celulares desfavorables que en última instancia impactan la viabilidad células.

Los componentes bioactivos principales que se hallan en diversos extractos de mortiño son reconocidos como el cianidina-3-O glucósido, epigallocatequina-3-galato, quercetina, kaempferol, ácido elágico, ácido clorogénico y ácido gálico. Estos elementos ejercen influencia en una gama de actividades, tales como la capacidad antioxidante, la detención del ciclo celular, la promoción de la apoptosis, la capacidad de inhibir la proliferación y la supervivencia de las células, la disminución de la inflamación, la restricción de la angiogénesis, la supresión de la metástasis y la habilidad para obstaculizar la adherencia y el desplazamiento de las células (Vahapoglu et al., 2022). Por consiguiente, se puede inferir que a una concentración de exosomas igual a 200 μg , estos mecanismos proapoptóticos se activan y desencadenan dichas reacciones a lo largo del tiempo.

Uno de los procesos celulares de gran relevancia es la autofagia, el cual involucra una serie de eventos intracelulares de degradación y reciclaje. Esta operación juega un rol esencial en el mantenimiento de la estabilidad interna de la célula y en la eliminación de elementos celulares deteriorados o envejecidos. En este escenario, cualquier perturbación en la función de la autofagia podría potenciar el aumento en la liberación y traspaso entre células de proteínas nocivas, llevado a cabo por los exosomas (Baixauli et al., 2014). Esta acumulación puede llevar a una serie de eventos desencadenantes que contribuyen a la muerte celular. Como consecuencia, este mecanismo podría tener una participación directa en la expansión de ciertas enfermedades, como las neurodegenerativas, donde se identifica la acumulación intracelular de proteínas que presentan problemas de plegamiento y toxicidad (Guo & Lee, 2014).

Por otro lado, Zhang et al. (2016) menciona que, la viabilidad química de los exosomas se halla interconectada con su proceso de degradación y disolución, a la par de su estabilidad coloidal, la cual puede ser afectada por factores como el pH, la presencia de iones y la presencia de macromoléculas en el entorno circundante. Por tanto, la integridad de los exosomas presentes en las muestras también ejerce una influencia significativa sobre la variación en la citotoxicidad sobre las células.

En cuanto a los EN a concentraciones de 100 y 200 μg demostró una marcada citotoxicidad en las líneas celulares HaCaT en un tiempo de 24 y 48 horas. Estos hallazgos concuerdan con los resultados de Sánchez (2022), quien evaluó EN en células HEK, HFF y HeLa a una concentración de 20 μg . En contraste, al emplear una concentración de 5 μg de EN en HFF, obtuvo una mayor proliferación celular, lo que indica una correlación inversa entre la concentración de exosomas y la viabilidad celular.

En este contexto, los impactos de citotoxicidad manifestados por los exosomas podrían estar vinculados a sus propiedades intrínsecas, que engloban tanto su contenido molecular intrínseco como interacción con las células huésped (Y. Zhao et al., 2021). En consecuencia, es posible que los

compuestos bioactivos en los EN interactúen de manera desfavorable con las células HaCaT, desencadenando respuestas citotóxicas más agresivas. En este sentido, el contenido de diversos compuestos fenólicos (Hinestroza-Córdoba et al., 2021), quercetina-3-rutinósido, glucósidos de isorhamnetina y glucósidos de kaempferol, así como los β -glucósidos y ácidos clorogénicos (Forero et al., 2016; Gancel et al., 2008) le podría conferir la capacidad de inhibir la viabilidad celular. Asimismo, es plausible que, en concentraciones más altas, ciertos componentes puedan haber desencadenado respuestas de regulación celular, contrarrestando así el potencial citotóxico observado a concentraciones más bajas. Pues es conocido que, el contenido de carotenoides, ácido ascórbico y espermidina presentes en la naranjilla, le confieren propiedades antiproliferativas y antioxidantes a esta fruta (Gancel et al., 2008).

Estimación del efecto cicatrizante mediante ensayo de scratch

Se llevó a cabo un ensayo de scratch para evaluar el efecto angiogénico de los EN y EM en la línea celular HaCaT durante un período de 17 días (ver fig. 28). Las concentraciones utilizadas fueron de 20 μ g para los exosomas obtenidos mediante kit y qEV. Como controles se emplearon sólo células y concavalina (10 μ g). Mientras que como control negativo de viabilidad celular se utilizó cloruro de cobalto (400 μ M), DMSO y mitomicina (10 μ g).

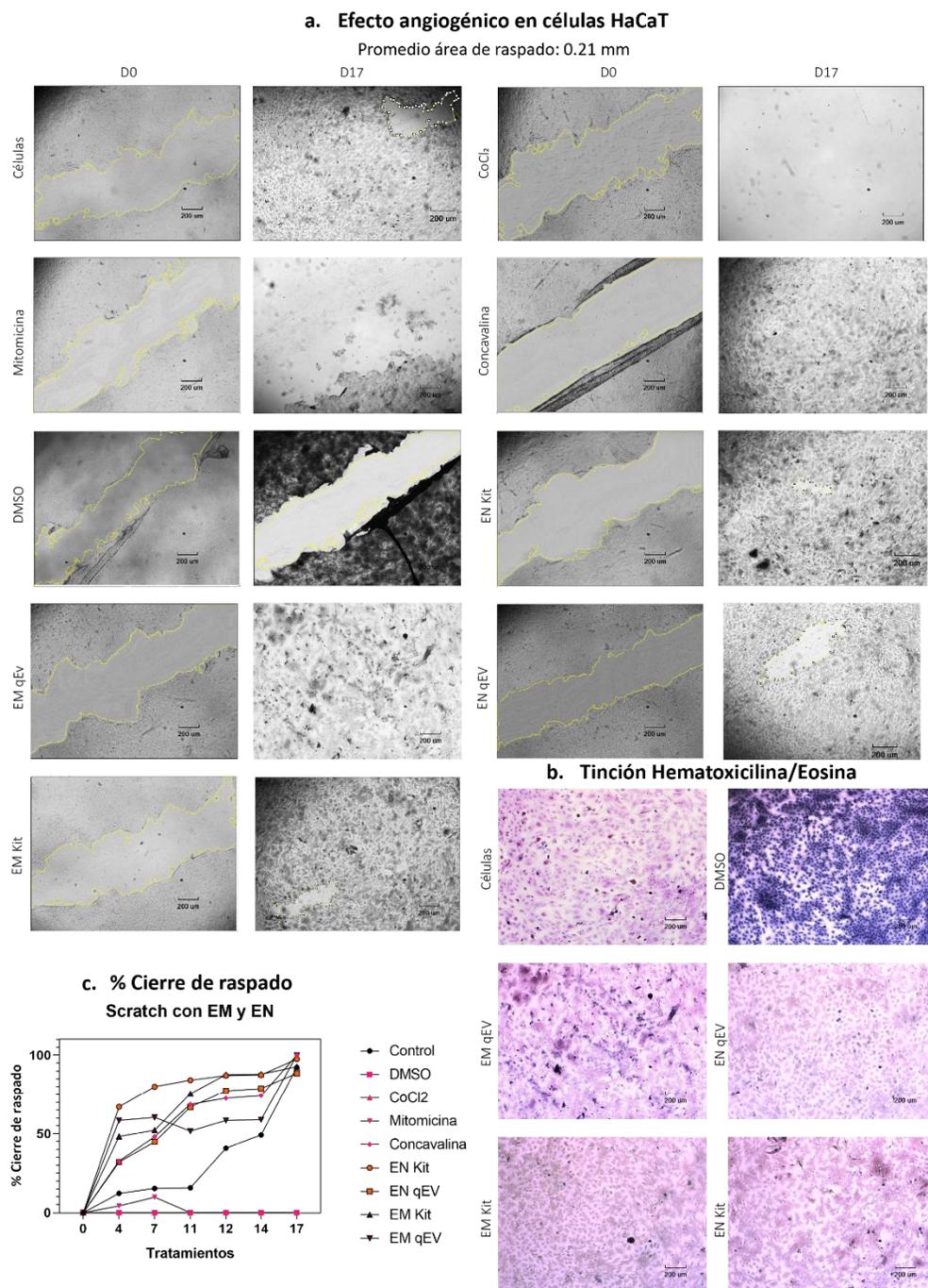
Los resultados indican que se evidenció una disparidad en la tasa de crecimiento celular de la línea HaCaT en contraste con el grupo de control (constituido únicamente por células) (92,3% de viabilidad celular) cuando se sometieron a los diversos tratamientos. Específicamente, al emplear una concentración de 20 μ g de EN obtenidos mediante el método de kit, se registró un aumento significativo del 97,5% en la proliferación celular (**p=0.0009), mientras que no se observaron diferencias notables (ns) en el caso de los EN aislados mediante la técnica qEV tras 17 días de exposición. De manera similar, al utilizar 20 μ g de EM obtenidos a través del método de kit, se evidenció un aumento igual al 92,7% en

la proliferación celular (* $p=0.0126$), y nuevamente no se encontraron diferencias significativas (ns) para los EM obtenidos mediante qEV durante el mismo período.

En cuanto a los controles experimentales, tanto el CoCl_2 como el DMSO exhibieron una reducción considerable en la viabilidad celular, con porcentajes iguales a -113,5% y -75%, respectivamente, con un valor de ** $p=0.0094$ después de 17 días de exposición, según se ilustra en la fig. 28. Además, el control negativo basado en la mitomicina mostró una significativa disminución en la proliferación celular con un valor porcentual igual a -105,4% y * $p=0.0169$. En contraste, el control positivo correspondiente a la concavalina no demostró diferencias significativas (ns).

Figura 28

Efecto angiogénico en la línea celular HaCaT evaluado con EN y EM



Nota. a. Efecto angiogénico en células HaCaT mediante el ensayo de scratch. Se analizó el efecto angiogénico de exosomas (20 ug) aislados de muestras de naranjilla y mortiño mediante un ensayo de scratch en líneas celulares HaCaT. El período de exposición de las células a los tratamientos fue de 17 días. Las barras de escala se indican a 200 μ m. b. Tinción de células con diferentes tratamientos en ensayo de scratch. c. Resultados de porcentaje de cierre de cicatriz en la herida a lo largo del tiempo. El promedio de área de raspado es igual a 0.21 mm. Los resultados obtenidos se expresaron como media \pm SEM. Para el análisis estadístico, se utilizó el programa Graphpad Prism8 y se realizó un ANOVA de dos vías. La significancia estadística se indicó mediante el uso de los símbolos *p, **p, ***p, ****p y NS (no significativo).

La proliferación celular inducida por el control con concavalina sugiere la capacidad de las células HaCaT para responder positivamente a sus estímulos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Hawage et al. (2016), donde a una concentración de 10 μ g/mL de Con A resultó en un incremento notable en la supervivencia celular en contraste con las células que no fueron sometidas a la estimulación con Con A. Por otro lado, los controles con mitomicina, DMSO y CoCl_2 resultaron en una disminución de la viabilidad celular, lo que apunta a sus efectos inhibitorios y citotóxicos sobre la proliferación celular (Vang Mouritzen & Jenssen, 2018; C. Yang et al., 2011), lo cual valida la metodología experimental.

En lo que respecta a los resultados de viabilidad, se sugiere que el incremento en la viabilidad celular asociado al tratamiento con EN y EM obtenidos a través del kit, en contraste con los resultados no significativos derivados de los exosomas purificados mediante qEV, puede estar influenciado por el proceso de aislamiento y la concentración de exosomas (20 μ g) administrada.

La variabilidad en los resultados entre los dos procedimientos de purificación podría estar relacionada con las propiedades inherentes de los exosomas obtenidos en cada método. Los exosomas

recolectados mediante el kit podrían contener moléculas como ácidos nucleicos (ARN) que fomentan una mayor interacción con las células HaCaT, lo cual podría llevar a un incremento en la viabilidad celular observada (Than et al., 2018). En contraste, los exosomas aislados a través de qEV podrían tener una menor capacidad de interacción con las células, posiblemente debido al prolongado tiempo requerido para la extracción mediante cromatografía qEV. Durante este proceso, es factible que el rendimiento de ácidos nucleicos se reduzca, específicamente mRNA, lo cual podría explicar la falta de un efecto considerable en la viabilidad celular (Sidhom et al., 2020). Así pues, el procedimiento se extiende por un período prolongado, existe la posibilidad de que los ácidos nucleicos presentes en los exosomas puedan degradarse debido a factores como la temperatura, la exposición a enzimas y la interacción con las superficies de las columnas (M. Lee et al., 2016).

En concordancia, los exosomas se han confirmado como elementos cruciales en la comunicación intercelular, dado que contienen una variedad de factores celulares como proteínas y microARNs (Gentile & Garovich, 2019). En una investigación realizada por Yang et al. (2020), los exosomas derivados de células madre de tejido adiposo (AD-exos) tuvieron un efecto similar en el proceso de curación de heridas de piel en ratones BALB/c, observando un efecto acelerador significativo en el séptimo día después de la herida, un proceso que puede estar relacionado con la expresión diferencial de microARNs inducida por la inyección de AD-exos. En este sentido, Cheng et al. (2020), realizó un ensayo de scratch sobre células HaCaT, cuyos resultados reflejaron que las vesículas extracelulares derivadas de las células madre mesenquimales (MSC) que transportaban miR-27b podrían tener el potencial de agilizar el proceso de cicatrización de heridas cutáneas mediante la activación al alza de JUNB e IRE1 α , lograda mediante la inhibición de ITCH.

Los queratinocitos en estado de reposo generan señales para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y para el VEGF. Sin embargo, cuando se activan debido a agentes bacterianos o a daño directo causado por luz ultravioleta o productos químicos, la forma en que

expresan citoquinas y quimiocinas se modifica (Nestle et al., 2009; Suter et al., 2009), aumentando sus niveles en condiciones de enfermedades de la piel, como la psoriasis o la dermatitis atópica (Albanesi et al., 2007; Colombo et al., 2017). Las células HaCaT tienen la capacidad de liberar factores de crecimiento y citocinas que tienen el potencial de activar la angiogénesis en las células endoteliales vecinas. Estos factores abarcan el VEGF, el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y otros (Shima A'b et al., 1995; X. H. Yang et al., 2006). Dentro del mecanismo de angiogénesis, las células cancerosas emplean el VEGF para activar la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) en las células endoteliales activadas. Estas enzimas descomponen la matriz extracelular, permitiendo que las células endoteliales migren y, a medida que lo hacen, se dividan, organizándose en estructuras tubulares que gradualmente se convierten en una red de vasos sanguíneos madura, gracias a la contribución de factores de adhesión como las integrinas α o β (Nishida et al., 2006). Por tanto, el VEGF desempeña un papel crucial en el desarrollo y la revitalización de los tejidos.

La observación mediante tinción con hematoxilina y eosina (HE) mostró que los exosomas purificados a través de qEv y kit, obtenidos de mortiño y naranjilla, tuvieron un impacto positivo en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales HaCaT. En la fig. 30-b, se evidencian los componentes citoplasmáticos de color rosa en los tratamientos con exosomas, mientras que los núcleos se presentan en un tono azul oscuro (Fischer et al., 2008).

Extracción de RNAs

Determinación de la cantidad y calidad del RNA extraído

En relación al análisis de la cantidad y calidad del ARN, se pudo verificar que los conjuntos de muestras de EM exhibieron una mayor cantidad de ARN en comparación con los resultados derivados de los EN (fig. 29-30). Reflejando un promedio de concentraciones en los pools igual a 211,3875 ng/uL para las muestras de EM y de 154,25 ng/uL en los EN.

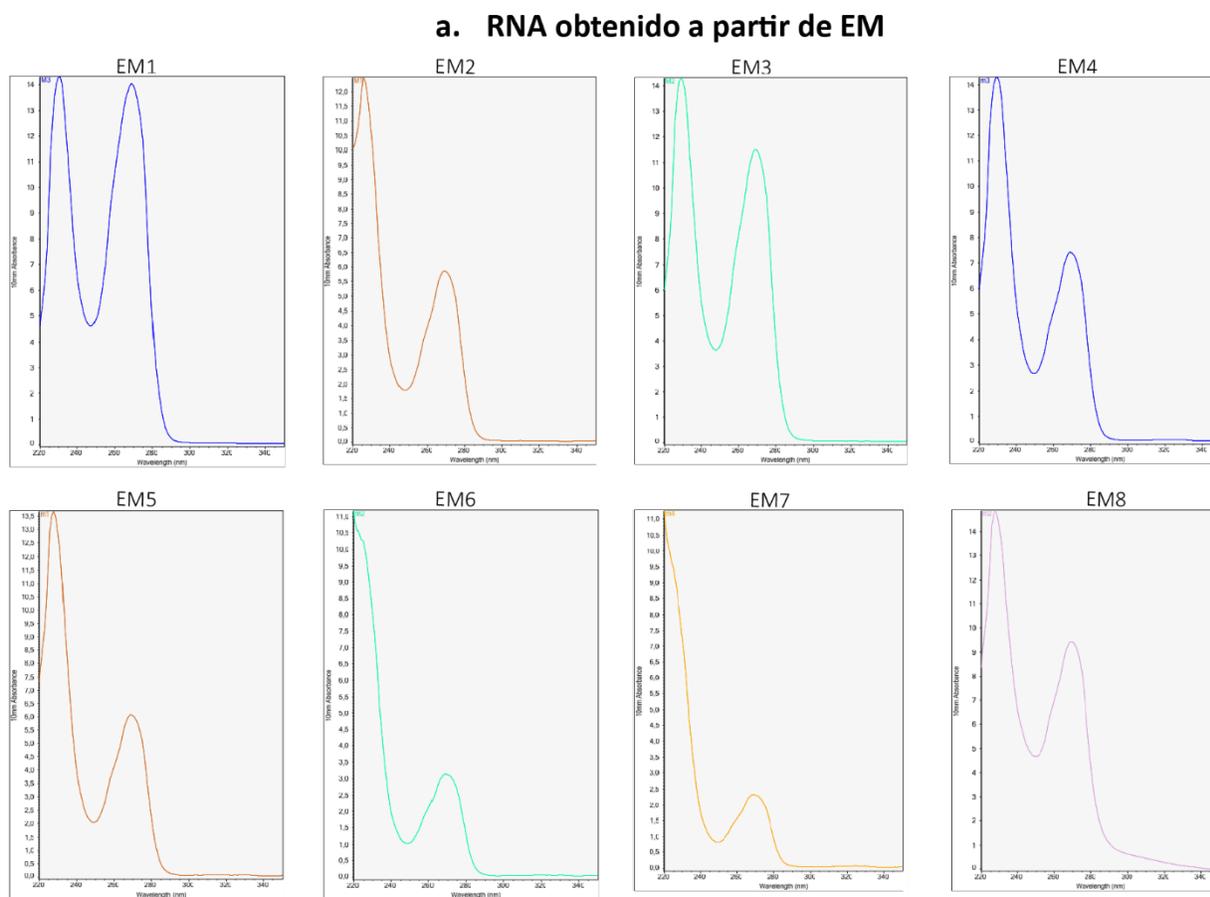
Sin embargo, es importante señalar que, tanto el RNA obtenido a partir de EM y EN, exhibieron una evidente presencia de contaminación por fenoles, compuestos aromáticos, carbohidratos, sales o polisacáridos, indicada por el pico a 230 nm, así como una baja concentración en la relación 260/230, que idealmente debería situarse dentro del rango de 2.00-2.20 (Eldh et al., 2012; El-Khoury et al., 2016). Ahora bien, la lectura de absorbancia a 230 nm (A_{230}) también se reconoce como sensible a la estructura de las proteínas (P. F. Liu et al., 2009). Los perfiles UV de soluciones proteicas generalmente exhiben cambios graduales en lugar de picos a 230 nm. En este sentido, las proteínas en estado plegado presentan una A_{230} mayor que aquellas en estado desplegado (Park & Marqusee, 2005).

Por otra parte, dentro del ámbito de los exosomas y su habilidad para llevar cargas, la lectura de absorbancia a 230 nm guarda una relación directa con la capacidad de incorporación de sustancias, tales como medicamentos o moléculas activas. Esta relación surge a partir de las características inherentes de estos compuestos. En consecuencia, es plausible inferir que tanto la naranjilla como el mortiño podrían contener componentes susceptibles de medirse a esta absorbancia. Cenik (2022) en su investigación, donde incorporaron carga de Docetaxel en exosomas derivados de células HeLa, llevaron a cabo una medición de la absorbancia a 230 nm utilizando un espectrofotómetro UV. El objetivo de esta medición era evaluar la eficacia de la carga de Docetaxel en los exosomas y sus capacidades de carga de la sustancia activa.

En contraste, en lo que respecta al índice de pureza caracterizado por la relación 260/280, indicativo de ausencia proteica y peptídica, las muestras derivadas de EM se mantuvieron en un intervalo adecuado, oscilando entre 1.80-2.00 (ver fig. 29) (Ahlberg et al., 2021; Patel et al., 2011). Por otro lado, las muestras provenientes de EN exhibieron una calidad inferior distante de los criterios óptimos del radio 260/280 (ver fig. 30).

Figura 29

Cantidad y calidad de RNA de EM

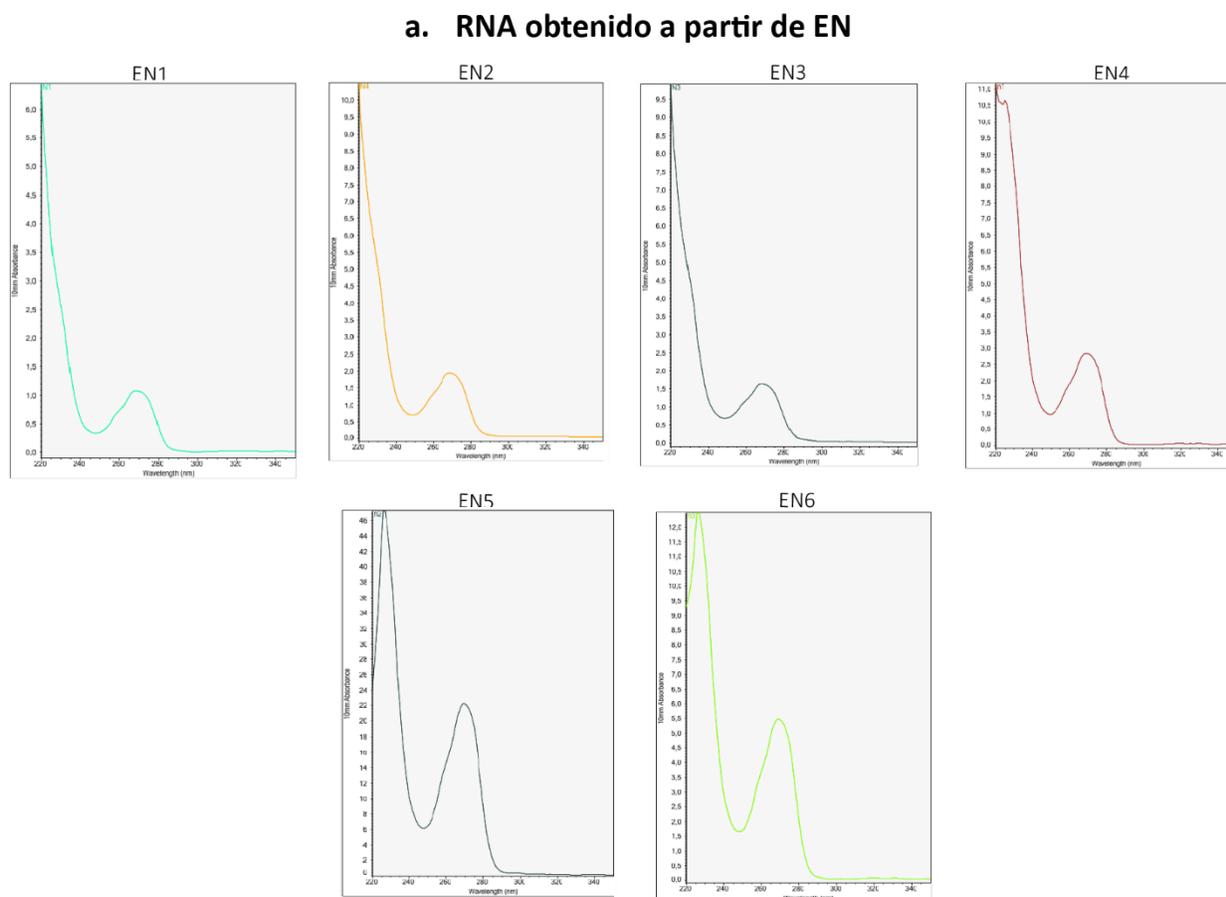
**b. Cuantificación de muestras de RNA de EM**

Sample ID	Nucleic Acid (ng/ μ L)	260/280	260/230
EM1	422	2,17	0,74
EM2	157,5	1,77	0,37
EM3	323,9	2,01	0,57
EM4	201,8	1,86	0,35
EM5	163,3	1,79	0,31
EM6	83,6	1,69	0,26
EM7	61,7	1,67	0,21
EM8	277,3	1,61	0,49

Nota. a. Gráficas del RNA obtenido a partir de EM. b. Cuantificación de las muestras de RNA. La cantidad y calidad del RNA fue analizada mediante el software *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, v1.6)*.

Figura 30

Cantidad y calidad de RNA de exosomas obtenido a partir de naranjilla



b. Cuantificación de muestras de RNA de EN

Sample ID	Nucleic Acid (ng/ μ L)	260/280	260/230
EN1	28,6	1,65	0,28
EN2	52,5	1,66	0,26
EN3	46,3	1,68	0,25
EN4	74,8	1,69	0,22
EN5	577,3	1,6	0,35
EN6	146	1,77	0,33

Nota. a. Gráficas del RNA obtenido a partir de EN. b. Cuantificación de las muestras de RNA. La cantidad y calidad del RNA fue analizada mediante el software *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific™, v1.6).

Los exosomas transportan una colección particular de miARNs, otros ARNs pequeños no codificantes (piARN, snARN, snoARN, scaARN, YARN), ARNs antisentido naturales, ARNt y sus fragmentos, ARNm y sus fragmentos, ARNr y ARNs largos no codificantes (Batagov & Kurochkin, 2013; Li et al., 2014; Manterola et al., 2014; Valadi et al., 2007; Vojtech et al., 2014). El perfil de ARN en los exosomas frecuentemente no refleja el de las células progenitoras, lo que sugiere que el empaquetado de ARN en los exosomas es un proceso selectivo (Creemers et al., 2012; Guduric-Fuchs et al., 2012). Dado que se encuentran conjuntos de miARN similares en las vesículas secretadas por diversos tipos celulares, podría existir un mecanismo común para la exportación selectiva de miARNs (Guduric-Fuchs et al., 2012). Aunque dicho mecanismo común es desconocido, recientemente se ha logrado algún avance, demostrando que los miARNs exosomales son seleccionados por proteínas, ARNm diana o modificaciones postranscripcionales (Janas et al., 2015; Koppers-Lalic et al., 2014; Squadrito et al., 2014; Villarroya-Beltri et al., 2013).

En el análisis cuantitativo y estequiométrico de los contenidos de ARN en los exosomas, se destaca una clara disparidad: tan solo una molécula de ARN por cada 10 exosomas. Además, al considerar que el porcentaje de miARN en el total del ARN exosomal suele variar entre el 10% y el 40% (Li et al., 2014), se vuelve evidente que la proporción de exosomas "vacíos" (sin ninguna molécula de ARN) supera a la de exosomas ocupados (que contienen al menos una molécula de ARN). Para identificar una única copia de un miARN particularmente abundante, en promedio, se deben analizar más de 100 exosomas.

En términos generales, cada exosoma incorpora un promedio de 0.00825 moléculas de miARN (Chevillet et al., 2014), lo que significa que solo una molécula se encuentra presente por cada ~120 vesículas extracelulares (VEs). Este panorama se complejiza considerando que un cuerpo multivesicular (MVB) alberga, en promedio, 24 VEs (Von Bartheld & Altick, 2011). En consecuencia, la liberación de un

miARN requiere la fusión de cinco MVB con la membrana plasmática, en promedio (Janas et al., 2015). Esta podría ser la razón subyacente de la baja concentración de ARN obtenida en las muestras de EN.

Ahora bien, debido a que el ARN contenido en los exosomas es principalmente de naturaleza pequeña, la presencia de ARN ribosomal es escasa o prácticamente nula en estos compartimentos. Por tanto, los análisis de ARN basados en geles carecen de los dos picos correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 18S y 28S, que son prominentes en el análisis del ARN celular (Lässer et al., 2012). Esto puede corroborarse con el método de extracción de exosomas empleado, puesto que los enfoques de SEC, especialmente qEV, capturan una amplia cantidad de fragmentos con longitudes inferiores a 15 nt (Buschmann et al., 2018). Debido a esto, no se consideró óptimo realizar un análisis en gel de agarosa (electroforesis) ya que no sería representativo ni informativo.

Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En relación a la obtención de EN y EM utilizando cromatografía por exclusión de tamaño, se observó una variabilidad en los tamaños y fracciones que contenían los exosomas en ambas muestras. En el caso del mortiño, se encontró que las fracciones F3 hasta F10 albergaban exosomas con un contenido proteico de 2,203 mg/mL, mientras que, en la naranjilla, las fracciones F2 hasta F7 contenían exosomas con un contenido proteico de 2,061 mg/mL. Cuando se aumentó el volumen de la muestra de mortiño a 2 mL, se observó un aumento en el contenido proteico a 3,930 mg/mL, en contraste con la naranjilla que mostró una variación similar entre las fracciones F4 y F9 con un contenido proteico de 3,833 mg/mL.

Los hallazgos de los efectos angiogénicos de los exosomas en la línea celular HaCaT indican que los EN y EM tienen un impacto significativo en la proliferación celular. Específicamente, los EN obtenidos a través del método de kit mostraron un aumento del 97,5% en la proliferación celular, mientras que los

EM obtenidos de la misma manera presentaron un aumento del 92,7%. Sin embargo, los exosomas de ambas frutas aislados mediante la técnica qEV no mostraron diferencias notables en la proliferación celular en comparación con el grupo de control. Estos resultados sugieren que el método de obtención de exosomas puede influir en sus efectos angiogénicos en células HaCaT.

Los pools de extracciones de RNA mostraron un promedio de concentraciones de 211,3875 ng/uL para las muestras de EM y de 154,25 ng/uL en los EN. En cuanto al análisis de pureza y calidad del RNA extraído a partir de los exosomas, se encontraron diferencias entre las muestras de mortiño y naranjilla. Ambas muestras mostraron contaminación por compuestos como fenoles, aromáticos, carbohidratos y sales, indicada por el pico a 230 nm y la baja relación 260/230. Sin embargo, en términos de la relación 260/280, que refleja la ausencia de proteínas y péptidos, las muestras de mortiño se mantuvieron en un rango adecuado (1.80-2.00), mientras que las muestras de naranjilla mostraron una calidad inferior.

Recomendaciones

Para lograr una comprensión más profunda y completa de las propiedades de los exosomas derivados de frutas andinas, se recomienda la exploración y comparación de métodos de proteómica. Asimismo, el empleo de técnicas de alta resolución, como DLS, citometría de flujo o análisis por nanopartículas en seguimiento (NTA), para un análisis más detallado.

Se sugiere llevar a cabo estudios específicos para comprender cómo las variaciones en la composición de exosomas originados en frutas andinas podrían influir en los efectos angiogénicos en diversos tipos de células y condiciones experimentales. Explorar este aspecto con meticulosidad y profundidad permitiría obtener una comprensión enriquecedora sobre la interacción de los exosomas con diferentes tipos de células.

Dado que los enfoques de SEC, especialmente qEV, pueden capturar fragmentos de ARN más cortos en proporciones significativas, se sugiere investigar y comparar distintos métodos de extracción de exosomas, para determinar cuál proporciona la mejor calidad y cantidad de ARN para su análisis. Esto asegurará la representatividad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Las técnicas basadas en secuenciación de nueva generación (NGS) y la cuantificación de ARN basada en amplificación pueden proporcionar información más precisa sobre el contenido de ARN en los exosomas.

Referencias

- Aderibigbe, B. A., & Buyana, B. (2018). Alginate in wound dressings. In *Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020042>
- Agudelo-Quintero, M. L., Luzardo-Ocampo, I., Lopera-Rodríguez, J. A., Maldonado-Celis, M. E., & Arango-Varela, S. S. (2022). *Bioactive Compounds from Andean Berry (Vaccinium meridionale Swartz) Juice Inhibited Cell Viability and Proliferation from SW480 and SW620 Human Colon Adenocarcinoma Cells*. 17. <https://doi.org/10.3390/foods2022-12984>
- Ahlberg, E., Jenmalm, M. C., & Tingö, L. (2021). Evaluation of five column-based isolation kits and their ability to extract miRNA from human milk. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(16), 7973–7979. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16726>
- Ahmadi, M., & Rezaie, J. (2020). Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: Possible therapeutic implications. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02426-5>
- Alarcón-Barrera, K. S., Armijos-Montesinos, D. S., García-Tenesaca, M., Iturralde, G., Jaramilo-Vivanco, T., Granda-Albuja, M. G., Giampieri, F., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against

cytotoxic oxidative damage. *Journal of Berry Research*, 8(3), 223–236. <https://doi.org/10.3233/JBR-180316>

Albanesi, C., De Pità, O., & Girolomoni, G. (2007). Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. In *Clinics in Dermatology* (Vol. 25, Issue 6, pp. 581–588). <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.08.013>

Amid, A., Johan, N. N., Jamal, P., & Zain, W. N. W. M. (2011). Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. *African Journal of Biotechnology*, 10(81), 18653–18656. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2734>

Arango-Varela, S. S., Luzardo-Ocampo, I., Maldonado-Celis, M. E., & Campos-Vega, R. (2020). Andean berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice in combination with Aspirin modulated anti-inflammatory markers on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109541>

Arango-Varela, S. S., Luzardo-Ocampo, I., Reyes-Dieck, C., Yahia, E. M., & Maldonado-Celis, M. E. (2021). Antiproliferative potential of Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice in combination with Aspirin in human SW480 colon adenocarcinoma cells. *Journal of Food Biochemistry*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13760>

Baixaui, F., López-Otín, C., & Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and autophagy: Coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Frontiers in Immunology*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00403>

Baranyai, T., Herczeg, K., Onódi, Z., Voszka, I., Módos, K., Marton, N., Nagy, G., Mäger, I., Wood, M. J., El Andaloussi, S., Pálinkás, Z., Kumar, V., Nagy, P., Kittel, Á., Buzás, E. I., Ferdinandy, P., & Giricz, Z. (2015). Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of

ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS ONE*, 10(12).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145686>

Batagov, A. O., & Kurochkin, I. V. (2013). Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology Direct*, 8(1).

<https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-12>

Bellato, M., De Marchi, D., Gualtieri, C., Sauta, E., Magni, P., Macovei, A., & Pasotti, L. (2019). A Bioinformatics Approach to Explore MicroRNAs as Tools to Bridge Pathways Between Plants and Animals. Is DNA Damage Response (DDR) a Potential Target Process? *Frontiers in Plant Science*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01535>

Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Meseguer, A., & Alarcón, T. (2019). In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(151). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0709>

Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>

Bray, E. R., Oropallo, A. R., Grande, D. A., Kirsner, R. S., & Badiavas, E. V. (2021). Extracellular vesicles as therapeutic tools for the treatment of chronic wounds. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101543>

Bridge, G., Monteiro, R., Henderson, S., Emuss, V., Lagos, D., Georgopoulou, D., Patient, R., & Boshoff, C. (2012). *The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis*. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04>

- Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). Wound healing: An overview. In *Plastic and Reconstructive Surgery* (Vol. 117, Issue 7 SUPPL.).
<https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9>
- Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., & Touyz, R. M. (2013). Microparticles: Biomarkers and beyond. In *Clinical Science* (Vol. 124, Issue 7, pp. 423–441).
<https://doi.org/10.1042/CS20120309>
- Buschmann, D., Kirchner, B., Hermann, S., Märte, M., Wurmser, C., Brandes, F., Kotschote, S., Bonin, M., Steinlein, O. K., Pfaffl, M. W., Schelling, G., & Reithmair, M. (2018). Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1481321>
- Camacho, E. (2017). *Prevalencia de úlceras por presión en pacientes ingresados en el Hospital Delfina Torres de Concha* [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador].
<https://repositorio.pucese.edu.ec/handle/123456789/1310>
- Capone, R. B., Pai, S. I., Koch, W. M., Gillison, M. L., Danish, H. N., Westra, W. H., Daniel, R., Shah, K. V., Sidransky, D., & Hopkins, J. (2000). Detection and Quantitation of Human Papillomavirus (HPV) DNA in the Sera of Patients with HPV-associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 6, 4171–4175. <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/6/11/4171/3260953/df110004171p.pdf>
- Cenik, M., Abas, B. I., Kocabiyik, B., Demirbolat, G. M., & Cevik, O. (2022). Development of a New Drug Delivery System from HELA-Derived Exosomes and the Effect of Docetaxel-Loaded Exosomes on Mitochondrial Apoptosis. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 17(3), 931–939.
<https://doi.org/10.1007/s12247-021-09566-1>

- Cheng, S., Xi, Z., Chen, G., Liu, K., Ma, R., & Zhou, C. (2020). Extracellular vesicle-carried microRNA-27b derived from mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via E3 ubiquitin ligase ITC. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(19), 11254–11271.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15692>
- Chevillet, J. R., Kang, Q., Ruf, I. K., Briggs, H. A., Vojtech, L. N., Hughes, S. M., Cheng, H. H., Arroyo, J. D., Meredith, E. K., Gallichotte, E. N., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Morrissey, C., Stirewalt, D. L., Hladik, F., Yu, E. Y., Higano, C. S., & Tewari, M. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(41), 14888–14893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408301111>
- Chin, A. R., Fong, M. Y., Somlo, G., Wu, J., Swiderski, P., Wu, X., & Wang, S. E. (2016). Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. *Cell Research*, 26(2), 217–228.
<https://doi.org/10.1038/cr.2016.13>
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). *Estudio etnobotánico del mortiño (Vaccinium floribundum) como alimento ancestral y potencial alimento funcional*. 16(2), 5–13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047400002>
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., & Dell’Aglia, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/7435621>
- Correa, J., & Bernal, H. (1990). *Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello: Vol. Tomo VII*. SECAB Ciencia y tecnología.

- Cory, G. (2011). Scratch-Wound Assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 769, pp. 25–30). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_2
- Creemers, E. E., Tijssen, A. J., & Pinto, Y. M. (2012). Circulating MicroRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? In *Circulation Research* (Vol. 110, Issue 3, pp. 483–495). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247452>
- Cvjetkovic, A., Lötvall, J., & Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>
- 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 Nanoplatfoms. In *Molecular Therapy* (Vol. 29, Issue 1, pp. 13–31). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.030>
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. In *Cells* (Vol. 8, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Efferth, T., Banerjee, M., Paul, N. W., Abdelfatah, S., Arend, J., Elhassan, G., Hamdoun, S., Hamm, R., Hong, C., Kadioglu, O., Naß, J., Ochwangi, D., Ooko, E., Ozenver, N., Saeed, M. E. M., Schneider, M., Seo, E. J., Wu, C. F., Yan, G., ... Titinchi, S. J. J. (2016). Biopiracy of natural products and good bioprospecting practice. In *Phytomedicine* (Vol. 23, Issue 2, pp. 166–173). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.006>
- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013a). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 5, pp. 347–357). <https://doi.org/10.1038/nrd3978>

- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013b). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 5, pp. 347–357). <https://doi.org/10.1038/nrd3978>
- Eldh, M., Lötvall, J., Malmhäll, C., & Ekström, K. (2012). Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular Immunology*, *50*(4), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.02.001>
- Elwaily, M. I., & Elsergany, A. R. (2021). Emerging role of exosomes and exosomal microRNA in cancer: pathophysiology and clinical potential. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *147*(3), 637–648. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03534-5>
- El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F., & Berchem, G. (2016). Assessing cellular and circulating miRNA recovery: The impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19529>
- Farooqi, A. A., Desai, N. N., Qureshi, M. Z., Librelotto, D. R. N., Gasparri, M. L., Bishayee, A., Nabavi, S. M., Curti, V., & Daglia, M. (2018). Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 1, pp. 328–334). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.010>
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., & Ali, M. (2016). Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *180*(6), 1076–1092. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2153-1>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, *3*(5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>

Flor de Venezuela. (n.d.). *Vaccinium meridionale Sw.*

<https://floradevenezuela.com/floradevenezuelaWeb/Ericaceae/Vacciniummeridionale/Vacciniummeridionale.html>

Flora Toskana GmbH. (2023). *Solanum quitoense - Lulu, Naranjilla*. [https://www.flora-](https://www.flora-toskana.com/en/plant-archive/859-solanum-quitoense-lulu-naranjilla.html)

[toskana.com/en/plant-archive/859-solanum-quitoense-lulu-naranjilla.html](https://www.flora-toskana.com/en/plant-archive/859-solanum-quitoense-lulu-naranjilla.html)

Forero, D. P., Masatani, C., Fujimoto, Y., Coy-Barrera, E., Peterson, D. G., & Osorio, C. (2016). Spermidine

derivatives in lulo (*Solanum quitoense* Lam.) fruit: Sensory (taste) versus biofunctional (ACE-inhibition) properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(26), 5375–5383.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01631>

Gancel, A. L., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Ruales, J., & Vaillant, F. (2008). Identifying carotenoids and phenolic compounds in naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo hybrid), an Andean fruit.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, *56*(24), 11892–11899.

<https://doi.org/10.1021/jf801515p>

Garzón, G. A., Soto, C. Y., López-R, M., Riedl, K. M., Browmiller, C. R., & Howard, L. (2020). Phenolic

profile, in vitro antimicrobial activity and antioxidant capacity of *Vaccinium meridionale swartz* pomace. *Heliyon*, *6*(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03845>

Gentile, P., & Garcovich, S. (2019). Concise review: Adipose-derived stem cells (ASCs) and adipocyte-secreted exosomal microrna (A-SE-miR) modulate cancer growth and promote wound repair. In

Journal of Clinical Medicine (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm8060855>

Ghosh, R. (2006). Rapid antibody screening by membrane chromatographic immunoassay technique.

Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, *844*(1),

163–167. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.030>

Giovanni, C., Maria-Chiara, D., Stefania, B., Cristina, G., Valentina, F., & Ciro, T. (2011).

Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res*, *1*(1), 98–110.

www.ajcr.us

Gómez, F., Trejo, L., García, C., & Cadeña, J. (2014). Lulo (*Solanum quitoense* [Lamarck.]) como cultivo

novedoso en el paisaje agroecosistémico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *9*,

1741–1753. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v0i9.1061>

Gong, M., Yu, B., Wang, J., Wang, Y., Liu, M., Paul, C., Millard, R. W., Xiao, D.-S., Ashraf, M., & Xu, M.

(2017). Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and

promote angiogenesis. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 28). www.impactjournals.com/oncotarget/

González, D., Ordóñez, L., Vanegas, P., & Vásquez, H. (2014). Cambios en las propiedades fisicoquímicas

de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) cosechados en tres grados de madurez. *Acta*

agronómica, *63*(1), 11-17. *Acta Agronómica*, *1*(63), 11–17.

González, Samudio, I., Sequeda-Castañeda, L. G., Celis, C., Iglesias, J., & Morales, L. (2017). Cytotoxic and

antioxidant capacity of extracts from *Vaccinium meridionale* Swartz (Ericaceae) in transformed

leukemic cell lines. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *7*(3), 24–30.

<https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70305>

Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C. L., Medina, R. J., & Simpson, D. A. (2012). Selective

extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types.

BMC Genomics, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-357>

Guo, J. L., & Lee, V. M. Y. (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative

diseases. In *Nature Medicine* (Vol. 20, Issue 2, pp. 130–138). <https://doi.org/10.1038/nm.3457>

- Hajjalayani, M., Tewari, D., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. M., Farzaei, M. H., & Abdollahi, M. (2018). Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: Therapeutic targets and drug delivery systems. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 13, pp. 5023–5043). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S174072>
- Harding, C. V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes: Looking back three decades and into the future. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 367–371). <https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>
- Hasan, H., Sohal, I. S., Soto-Vargas, Z., Byappanahalli, A. M., Humphrey, S. E., Kubo, H., Kitdumrongthum, S., Copeland, S., Tian, F., Chairoungdua, A., & Kasinski, A. L. (2022). Extracellular vesicles released by non-small cell lung cancer cells drive invasion and permeability in non-tumorigenic lung epithelial cells. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04940-6>
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W., & Liu, Y. (2017). A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS ONE*, *12*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>
- Herath, K. H. I. N. M., Bing, S. J., Cho, J., Kim, A., Shin, S., Kim, G. O., Lee, J. chul, & Jee, Y. (2016). Anti-inflammatory activities of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) in concanavalin A stimulated murine splenocytes and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced murine skin edema. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *83*, 1353–1364. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.042>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 75, Issue 2, pp. 193–208). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>

- Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(5), 1011–1027.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.081>
- Hinestroza-Córdoba, L. I., Barrera, C., Seguí, L., & Betoret, N. (2021). Potential use of vacuum impregnation and high-pressure homogenization to obtain functional products from lulo fruit (*Solanum quitoense* lam.). *Foods*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040817>
- Hu, L., Wang, J., Zhou, X., Xiong, Z., Zhao, J., Yu, R., Huang, F., Zhang, H., & Chen, L. (2016). Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports*, *6*.
<https://doi.org/10.1038/srep32993>
- Huang, S. P., Wu, M. S., Shun, C. T., Wang, H. P., Hsieh, C. Y., Kuo, M. L., & Lin, J. T. (2005). Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, *12*(1), 229–241.
<https://doi.org/10.1007/s11373-004-8177-5>
- Inkson, B. J. (2016). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* (pp. 17–43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>
- Izon Science Ltd. (2018). *Size Exclusion Columns for Extracellular Vesicle Isolation*. www.izon.com
- Janas, T., Janas, M. M., Sapoń, K., & Janas, T. (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. In *FEBS Letters* (Vol. 589, Issue 13, pp. 1391–1398). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.036>

- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, *177*(2), 428-445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>
- Jia, Y., Chen, J., Zheng, Z., Tao, Y., Zhang, S., Zou, M., Yang, Y., Xue, M., Hu, F., Li, Y., Zhang, Q., Xue, Y., & Zheng, Z. (2022). Tubular epithelial cell-derived extracellular vesicles induce macrophage glycolysis by stabilizing HIF-1 α in diabetic kidney disease. *Molecular Medicine*, *28*(1). <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00525-1>
- Jones, L. J., Gray, M., Yue, S. T., Haugland, R. P., & Singer, V. L. (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT w cell proliferation assay. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 254). www.elsevier.nl/locate/jim
- Joshi, B. S., de Beer, M. A., Giepmans, B. N. G., & Zuhorn, I. S. (2020). Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano*, *14*(4), 4444–4455. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10033>
- Juncos, A. D., Dunne, N. J., & McCarthy, H. O. (2020). Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing applications. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 114). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110994>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115425>
- Kang, T., Jones, T. M., Naddell, C., Bacanamwo, M., Calvert, J. W., Thompson, W. E., Bond, V. C., Chen, Y. E., & Liu, D. (2016). Adipose-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of

miRNA-31. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(4), 440–450. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0177>

Katoh, M. (2013). Therapeutics targeting angiogenesis: Genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 32(4), 763–767. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1444>

Kim, J., Li, S., Zhang, S., & Wang, J. (2022). Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. In *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 17, Issue 1, pp. 53–69). Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.006>

Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M. A. J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J. M., Ylstra, B., de Menezes, R. X., Würdinger, T., Meijer, G. A., & Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Reports*, 8(6), 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027>

Kulesz, M., Gallegos, J., & Liu, Y. (2010). *Multistage Carcinogenesis: Cell and Animal Models*. Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01402-0>

Kumar, B., Vizuete, K. S., Sharma, V., Debut, A., & Cumbal, L. (2019). Ecofriendly synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Andean Mortiño berry as reductant and its photocatalytic activity. *Vacuum*, 160, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.11.027>

Lai, R. C., Chen, T. S., & Lim, S. K. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. In *Regenerative Medicine* (Vol. 6, Issue 4, pp. 481–492). <https://doi.org/10.2217/rme.11.35>

- Laplante, K. L., Sarkisian, S. A., Woodmansee, S., Rowley, D. C., & Seeram, N. P. (2012). Effects of cranberry extracts on growth and biofilm production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* species. *Phytotherapy Research*, 26(9), 1371–1374. <https://doi.org/10.1002/ptr.4592>
- Lässer, C., Eldh, M., & Lötval, J. (2012). Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of Visualized Experiments*, 59, 1–6. <https://doi.org/10.3791/3037>
- Lee, M., Ban, J. J., Im, W., & Kim, M. (2016). Influence of storage condition on exosome recovery. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(2), 299–304. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0781-x>
- Lee, Y., El Andaloussi, S., & Wood, M. J. A. (2012). Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics*, 21(R1). <https://doi.org/10.1093/hmg/dd317>
- Leitão, D. P., Cristina Polizello, A. M., Ito, I. Y., & César Spadaro, A. C. (2005). Antibacterial Screening of Anthocyanic and Proanthocyanic Fractions from Cranberry Juice. In *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD J Med Food* (Vol. 8, Issue 1).
- Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L., & Nusrat, A. (2015). Wound repair: Role of immune-epithelial interactions. In *Mucosal Immunology* (Vol. 8, Issue 5, pp. 959–968). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.63>
- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. In *Theranostics* (Vol. 7, Issue 3, pp. 789–804). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>

- Li, Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0502>
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Life Technologies Corporation. (2013). *Exosome Spin Columns (MW3000) Product Information - MAN0008464 - Rev 1.0*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0008464_Rev01_PI_08Aug2013.pdf
- Lindenbergh, M. F. S., & Stoorvogel, W. (2018). *Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol>
- Liu, P. F., Avramova, L. V., & Park, C. (2009). Revisiting absorbance at 230 nm as a protein unfolding probe. *Analytical Biochemistry*, 389(2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.028>
- Liu, W. zhao, Ma, Z. jun, & Kang, X. wen. (2022). Current status and outlook of advances in exosome isolation. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 414, Issue 24, pp. 7123–7141). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04253-7>
- Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., & Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep17319>

- Llvisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Science and Nutrition*, *6*(4), 934–942. <https://doi.org/10.1002/fsn3.638>
- Llvisaca-Contreras, S. A., León-Tamariz, F., Manzano-Santana, P., Ruales, J., Naranjo-Morán, J., Serrano-Mena, L., Chica-Martínez, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2022a). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): An Underutilized Superplant from the Andes. In *Horticulturae* (Vol. 8, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050358>
- Llvisaca-Contreras, S. A., León-Tamariz, F., Manzano-Santana, P., Ruales, J., Naranjo-Morán, J., Serrano-Mena, L., Chica-Martínez, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2022b). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): An Underutilized Superplant from the Andes. In *Horticulturae* (Vol. 8, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050358>
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegmanns, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>
- Lobo, M. (2000). Papel de la variabilidad genética en el desarrollo de los frutales andinos como alternativa productiva. In *Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales - CDTF*.
- Loizzo, M. R., Lucci, P., Núñez, O., Tundis, R., Balzano, M., Frega, N. G., Conte, L., Moret, S., Filatova, D., Moyano, E., & Pacetti, D. (2019). Native Colombian fruits and their by-products: Phenolic profile, antioxidant activity and hypoglycaemic potential. *Foods*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/foods8030089>
- Lopera, Y. E., Fantinelli, J., González Arbeláez, L. F., Rojano, B., Ríos, J. L., Schinella, G., & Mosca, S. (2013). Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of *Vaccinium meridionale*

- Swartz during ischemia-reperfusion in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/516727>
- Luo, Y., Wang, P., Wang, X., Wang, Y., Mu, Z., Li, Q., Fu, Y., Xiao, J., Li, G., Ma, Y., Gu, Y., Jin, L., Ma, J., Tang, Q., Jiang, A., Li, X., & Li, M. (2017). Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00488-y>
- Manterola, L., Guruceaga, E., Pérez-Larraya, J. G., González-Huarriz, M., Jauregui, P., Tejada, S., Diez-Valle, R., Segura, V., Samprón, N., Barrena, C., Ruiz, I., Agirre, A., Ayuso, Á., Rodríguez, J., González, Á., Xipell, E., Matheu, A., López De Munain, A., Tuñón, T., ... Alonso, M. M. (2014). A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro-Oncology*, 16(4), 520–527. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not218>
- Martínez, A. (2022). *Obtención de exomas a partir de Prunus salicifolia Kunth, Rosacea (capulí) y Vaccinium meridionale Sw. Ericaceae (mortiño)* [Universidad de las Fuerzas Armadas]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/33863>
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. M., Molaei, F., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- McAndrews, K. M., & Kalluri, R. (2019). Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0963-9>

- McMullen, C. (1999). *Flowering plants of the Galápagos*. Cornell University Press. Cornell University Press.
- Minor, L. (2004). *Cell Viability Assays Assay Guidance Manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- Momeny, M., Sabourinejad, Z., Zarrinrad, G., Moghaddaskho, F., Eyvani, H., Yousefi, H., Mirshahvaladi, S., Poursani, E. M., Barghi, F., Poursheikhani, A., Dardaei, L., Bashash, D., Ghazi-Khansari, M., Tavangar, S. M., Dehpour, A. R., Yaghmaie, M., Alimoghaddam, K., Ghavamzadeh, A., & Ghaffari, S. H. (2017). Anti-tumour activity of tivozanib, a pan-inhibitor of VEGF receptors, in therapy-resistant ovarian carcinoma cells. *Scientific Reports*, 7(April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45954>
- Moncayo, P. (2020). *Mortinoño (Vaccinium floribundum, Kunth), compuestos bioactivos, desarrollo agroindustrial* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
http://38.43.142.130/bitstream/handle/20.500.12672/16631/Moncayo_mp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J. L., Han, S. J., Harrison, O. J., Wilhelm, C., Conlan, S., Himmelfarb, S., Byrd, A. L., Deming, C., Quinones, M., Brenchley, J. M., Kong, H. H., Tussiwand, R., Murphy, K. M., Merad, M., Segre, J. A., & Belkaid, Y. (2015). Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature*, 520(7545), 104–108.
<https://doi.org/10.1038/nature14052>
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 679–691).
<https://doi.org/10.1038/nri2622>
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. In *Nutrition* (Vol. 30, Issue 2, pp. 134–144). <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Nishida, N. (2006). *Vascular Health and Risk Management Angiogenesis in Cancer Angiogenesis in cancer*. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s23213>
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., Augustin, H. G., Bates, D. O., van Beijnum, J. R., Bender, R. H. F., Bergers, G., Bikfalvi, A., Bischoff, J., Böck, B. C., Brooks, P. C., Bussolino, F., Cakir, B., Carmeliet, P., Castranova, D., ... Griffioen, A. W. (2018). Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. In *Angiogenesis* (Vol. 21, Issue 3, pp. 425–532). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9613-x>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- O'Brien, K., Ughetto, S., Mahjoum, S., Nair, A. V., & Breakefield, X. O. (2022). Uptake, functionality, and re-release of extracellular vesicle-encapsulated cargo. *Cell Reports*, 39(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110651>
- Olsson, M., Järbrink, K., Divakar, U., Bajpai, R., Upton, Z., Schmidtchen, A., & Car, J. (2019). The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. In *Wound Repair and Regeneration* (Vol. 27, Issue 1, pp. 114–125). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/wrr.12683>
- Park, C., & Marqusee, S. (2005). Pulse proteolysis: A simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nature Methods*, 2(3), 207–212. <https://doi.org/10.1038/nmeth740>

- Patel, R. S., Jakymiw, A., Yao, B., Pauley, B. A., Carcamo, W. C., Katz, J., Cheng, J. Q., & Chan, E. K. L. (2011). High resolution of microRNA signatures in human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 56(12), 1506–1513. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.05.015>
- Plantas de Colombia. (2014). *Vaccinium meridionale – Ericaceae*. https://plantasdecolombia.com/2014/10/17/vaccinium-meridionale-ericaceae/img_2942/
- Prencipe, F. P., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.016>
- Rahman, M. A., Barger, J. F., Lovat, F., Gao, M., Otterson, G. A., & Nana-Sinkam, P. (2016). *Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition* (Vol. 7, Issue 34). www.impactjournals.com/oncotarget
- Ramírez, F., Kallarackal, J., & Davenport, T. L. (2018). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) reproductive physiology: A review. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 238, pp. 163–176). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.046>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 373–383). <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Jadczyk, T., Greco, N. J., Wojakowski, W., Tendera, M., & Ratajczak, J. (2012). Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: Can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies. In *Leukemia* (Vol. 26, Issue 6, pp. 1166–1173). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.389>

Real Jardín Botánico-CSIC. (n.d.). *Acuarela Solanum*. <https://mutis.rjb.csic.es/paginas/laminadibujo.php>

Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., Vaiverde, F., León, J., & Gallegos, P. (2010). *Manual del cultivo ecológico de la naranjilla*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2773>

Şahin, F., Koçak, P., Güneş, M. Y., Özkan, İ., Yıldırım, E., & Kala, E. Y. (2019). In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *188*(2), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2913-1>

Sánchez, M. (2022). *Obtención de exosomas de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav, Solanaceae), naranjilla (Solanum quitoense Lamarck, Solanaceae) y uvilla (Physalis peruviana L., Solanaceae)* [Universidad de las Fuerzas Armadas]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/32988>

Santana, S. M., Antonyak, M. A., Cerione, R. A., & Kirby, B. J. (2014). Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations. *Biomedical Microdevices*, *16*(6), 869–877. <https://doi.org/10.1007/s10544-014-9891-z>

Santos-Coquillat, A., Herreros-Pérez, D., Samaniego, R., González, M. I., Cussó, L., Desco, M., & Salinas, B. (2022). Dual-labeled nanoparticles based on small extracellular vesicles for tumor detection. *Biology Direct*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s13062-022-00345-7>

Schreckinger, M. E., Wang, J., Yousef, G., Lila, M. A., & De Mejia, E. G. (2010). Antioxidant capacity and in Vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(16), 8966–8976. <https://doi.org/10.1021/jf100975m>

Shafiei, M., Ansari, M. N. M., Razak, S. I. A., & Khan, M. U. A. (2021). A comprehensive review on the applications of exosomes and liposomes in regenerative medicine and tissue engineering. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13152529>

- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 18, pp. 820–897). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sharghi-Namini, S., Tan, E., Ong, L. L. S., Ge, R., & Asada, H. H. (2014). Dll4-containing exosomes induce capillary sprout retraction in a 3D microenvironment. *Scientific Reports*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep04031>
- Shi, R., Wang, P., Li, X., Chen, J., Li, Y., Zhang, X., Zhang, C., Jiang, T., Li, W., Ding, W., & Cheng, S. (2015). Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. In *Oncotarget* (Vol. 6, Issue 29). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Shima A'b, D. T., Deutsch, U., & D'amore A'b'd', P. A. (1995). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability**. In *FEBS 15903 FEBS Letters* (Vol. 370).
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Sonnemann, K. J., & Bement, W. M. (2011). Wound repair: Toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 237–263. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154251>
- Spannuth, W. A., Sood, A. K., & Coleman, R. L. (2008). Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5(4), 194–204. <https://doi.org/10.1038/ncponc1051>

- Squadrito, M. L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G. D., Lyle, R., Ibberson, M., & De Palma, M. (2014). Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells. *Cell Reports*, 8(5), 1432–1446. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.035>
- 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. In *Journal of Food Science* (Vol. 86, Issue 7, pp. 2838–2850). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15787>
- Suter, M. M., Schulze, K., Bergman, W., Welle, M., Roosje, P., & Müller, E. J. (2009). The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Veterinary Dermatology*, 20(5–6), 515–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00819.x>
- Swartz, O. (1794). 1048421 *Vaccinium meridionale Sw.* http://www.plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=78507
- Takeo, M., Lee, W., & Ito, M. (2015). Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023267>
- Tang, C. Y., & Yang, Z. (2017). Transmission Electron Microscopy (TEM). In *Membrane Characterization* (pp. 145–159). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5>
- Tang, Y. T., Huang, Y. Y., Zheng, L., Qin, S. H., Xu, X. P., An, T. X., Xu, Y., Wu, Y. S., Hu, X. M., Ping, B. H., & Wang, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 834–844. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Broadbent, J. A., Leavesley, D. I., Salomon, C., & Parker, T. J. (2018). Differential expression of keratinocyte-derived extracellular vesicle mirnas discriminate exosomes

from apoptotic bodies and microvesicles. *Frontiers in Endocrinology*, 9(SEP).

<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00535>

Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 8, pp. 581–593). <https://doi.org/10.1038/nri2567>

Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1250, pp. 333–348). Humana Press Inc.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26

Trejo-Téllez, L. I., Gómez-Merino, F. C., García-Albarado, J. C., & Peralta-Sánchez, M. G. (2022). Organic Substrates Differentially Affect Growth and Macronutrient Concentrations of Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) Seedlings. *Horticulturae*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121200>

Trentini, M., Zanotti, F., Tiengo, E., Camponogara, F., Degasperri, M., Licastro, D., Lovatti, L., & Zavan, B. (2022). An Apple a Day Keeps the Doctor Away: Potential Role of miRNA 146 on Macrophages Treated with Exosomes Derived from Apples. *Biomedicines*, 10(2).

<https://doi.org/10.3390/biomedicines10020415>

Vahapoglu, B., Erskine, E., Subasi, B. G., & Capanoglu, E. (2022). Recent studies on berry bioactives and their health-promoting roles. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 1). MDPI.

<https://doi.org/10.3390/molecules27010108>

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

- Vang Mouritzen, M., & Jenssen, H. (2018). Optimized scratch assay for in vitro testing of cell migration with an automated optical camera. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(138).
<https://doi.org/10.3791/57691>
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum* kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. In *The Journal of International Medical Research* (Vol. 37, Issue 5).
- Vergauwen, G., Dhondt, B., Van Deun, J., De Smedt, E., Berx, G., Timmerman, E., Gevaert, K., Miinalainen, I., Cocquyt, V., Braems, G., Van Den Broecke, R., Denys, H., De Wever, O., & Hendrix, A. (2017). Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02599-y>
- Villa, F., Quarto, R., & Tasso, R. (2019). Extracellular vesicles as natural, safe and efficient drug delivery systems. In *Pharmaceutics* (Vol. 11, Issue 11). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110557>
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
- Vinson, J. A., Teufel, K., & Wu, N. (2001). Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. In *Atherosclerosis* (Vol. 156).
www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

- Vojtech, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R. P., Strobl, J., Westerberg, K., Gottardo, R., Tewari, M., & Hladik, F. (2014). Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7290–7304. <https://doi.org/10.1093/nar/gku347>
- Von Bartheld, C. S., & Altick, A. L. (2011). Multivesicular bodies in neurons: Distribution, protein content, and trafficking functions. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 93, Issue 3, pp. 313–340). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.003>
- Wang, W., Liu, D., Zhang, X., Chen, D., Cheng, Y., & Shen, F. (2018). Plant microRNAs in cross-kingdom regulation of gene expression. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19072007>
- Wave Hill. (2020, October 1). *Solanum quitoense (Naranjilla)*. <https://www.wavehill.org/discover/garden-journal/solanum-quitoense-naranjilla>
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2016). Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 141(15), 4640–4646. <https://doi.org/10.1039/c6an00892e>
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. In *Open Biology* (Vol. 10, Issue 9). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Wilson, V. G. (2013). *Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes* (pp. 33–41). https://doi.org/10.1007/7651_2013_42

- Woith, E., & Melzig, M. F. (2019). Extracellular vesicles from fresh and dried plants—Simultaneous purification and visualization using gel electrophoresis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020357>
- Woodson, R. E., & Schery, R. W. (1973). Flora of Panama. Part IX. Family 170. In *Source: Annals of the Missouri Botanical Garden* (Vol. 60, Issue 3).
- 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, R., Simpson, R. J., & Greening, D. W. (2017). A protocol for isolation and proteomic characterization of distinct extracellular vesicle subtypes by sequential centrifugal ultrafiltration. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1545, pp. 91–116). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_7
- Yang, C., Ling, H., Zhang, M., Yang, Z., Wang, X., Zeng, F., Wang, C., & Feng, J. (2011). Oxidative stress mediates chemical hypoxia-induced injury and inflammation by activating NF-kb-COX-2 pathway in HaCaT cells. *Molecules and Cells*, 31(6), 531–538. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-1025-3>
- Yang, C., Luo, L., Bai, X., Shen, K., Liu, K., Wang, J., & Hu, D. (2020). Highly-expressed microRNA-21 in adipose derived stem cell exosomes can enhance the migration and proliferation of the HaCaT cells by increasing the MMP-9 expression through the PI3K/AKT pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 681. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108259>
- Yang, F., Liao, X., Tian, Y., & Li, G. (2017). Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies. In *Biotechnology Journal* (Vol. 12, Issue 4). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201600699>

- Yang, X. H., Man, X. Y., Cai, S. Q., Yao, Y. G., Bu, Z. Y., & Zheng, M. (2006). Expression of VEGFR-2 on HaCaT cells is regulated by VEGF and plays an active role in mediating VEGF induced effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(1), 31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.213>
- Yates, C. C., Hebda, P., & Wells, A. (2012). Skin Wound Healing and Scarring: Fetal Wounds and Regenerative Restitution. In *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* (Vol. 96, Issue 4, pp. 325–333). <https://doi.org/10.1002/bdrc.21024>
- Yepes, M. (2021). *Diversidad de plantas e insectos asociados a cultivos ecológicos de Solanum quitoense Lam. y Solanum betaceum Cav., en invernaderos del ISER, Pamplona-Norte de Santander.*
- Zapata, I. C., Álzate, A. F., Zapata, K., Arias, J. P., Puertas, M. A., & Rojano, B. (2019). Effect of pH, temperature and time of extraction on the antioxidant properties of *Vaccinium meridionale* Swartz. *Journal of Berry Research*, 9(1), 39–49. <https://doi.org/10.3233/JBR-18299>
- Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. V. (2015). Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4), 319–323. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074476>
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., ... Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, 22(1), 107–126. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.158>
- Zhang, Li, L., & Kumar, A. (2008). *Materials Characterization Techniques* (1 st). CRC Press.
- Zhang, M., Viennois, E., Prasad, M., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, Z., Han, M. K., Xiao, B., Xu, C., Srinivasan, S., & Merlin, D. (2016). Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the

prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer.

Biomaterials, 101, 321–340. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.018>

Zhang, M., Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D. (2016). Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases. In *Tissue Barriers* (Vol. 4, Issue 2). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1134415>

Zhao, B., Li, X., Shi, X., Shi, X., Zhang, W., Wu, G., Wang, X., Su, L., & Hu, D. (2018). Exosomal MicroRNAs Derived from Human Amniotic Epithelial Cells Accelerate Wound Healing by Promoting the Proliferation and Migration of Fibroblasts. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5420463>

Zhao, Y., Liu, P., Tan, H., Chen, X., Wang, Q., & Chen, T. (2021). Exosomes as Smart Nanoplatforms for Diagnosis and Therapy of Cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.743189>

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, Z., Li, X., Liu, J., Dong, L., Chen, Q., Liu, J., Kong, H., Zhang, Q., Qi, X., Hou, D., Zhang, L., Zhang, G., Liu, Y., Zhang, Y., Li, J., Wang, J., Chen, X., Wang, H., Zhang, J., ... Zhang, C. Y. (2015). Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Research*, 25(1), 39–49. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.130>

Zhu, K., Liu, M., Fu, Z., Zhou, Z., Kong, Y., Liang, H., Lin, Z., Luo, J., Zheng, H., Wan, P., Zhang, J., Zen, K., Chen, J., Hu, F., Zhang, C. Y., Ren, J., & Chen, X. (2017). Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006946>

Zhu, L., Sun, H. T., Wang, S., Huang, S. L., Zheng, Y., Wang, C. Q., Hu, B. Y., Qin, W., Zou, T. T., Fu, Y., Shen, X. T., Zhu, W. W., Geng, Y., Lu, L., Jia, H. liang, Qin, L. X., & Dong, Q. Z. (2020). Isolation and characterization of exosomes for cancer research. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00987-y>