



**Obtención de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav,
Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla
(*Physalis peruviana* L., Solanaceae)**

Sánchez Nicolalde, María Gabriela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Biotecnología

PhD Torres Arias, Marbel

2 de septiembre de 2022

Certificación Copyleaks

COPYLEAKS

Documento para Copyleaks_Sanchez.pdf

Scanned on: 12:51 August 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	48
Words with Minor Changes	3
Paraphrased Words	55
Omitted Words	0



MARBEL
TORRES



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular, "Obtención de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae)", fue realizado por la señorita **Sánchez Nicolalde, María Gabriela**, 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, 29 de agosto del 2022

Firma:



MARBEL
TORRES

PhD Torres Arias, Marbel.

C.C.: 1802949154



Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Sánchez Nicolalde María Gabriela**, con C.C. 1727065227, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Obtención de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae)"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 29 de agosto del 2022

Firma:



.....
Sánchez Nicolalde, María Gabriela

C.C. 1727065227



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Sánchez Nicolalde María Gabriela**, con C.C. 1727065227, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Obtención de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae)**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 29 de agosto del 2022

Firma:



.....
Sánchez Nicolalde, María Gabriela

C.C. 1727065227

Dedicatoria

A la vida que me presento muchos obstáculos de los cuales tuve que aprender, a la Gaby del pasado que pensaba que no lo íbamos a lograr, esta es la prueba de que sí se puede con mucho esfuerzo y constancia, de que todo depende de uno mismo y cualquier dificultad no es el fin del mundo aunque se sienta así; a la Gaby del futuro porque sin esto no podríamos cumplir el resto de nuestras metas; y a todas esas personitas que contribuyeron a que llegue donde estoy hoy día, especialmente a mi ñañita Josette.

Agradecimientos

A Dios por bendecirme y llevarme a este punto de mi vida.

A mi familia, especialmente a mis padres: María Dolores y Orlando por su preocupación, apoyo y ánimos en todos estos años de carrera universitaria.

Especialmente a mis hermanas, Josette y Sofía, siento que sin ellas no lo hubiera logrado, les debo mucho.

A mi tutora Marbel Torres PhD, por abrirme las puertas de su laboratorio, permitirme realizar mi proyecto de titulación y compartir sus conocimientos.

A Fernanda Toscano, Andrea Aluisa y Alex Gavilanes, por ser una guía y apoyo en la parte experimental del proyecto.

A Alexis Debut PhD, por su ayuda en la adquisición de las imágenes de microscopía.

A mis compañeros y amigos que me han acompañado durante mi vida universitaria que, sin sus risas y amistad, la carrera no hubiera sido lo mismo.

Índice de contenidos

Certificación Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	10
Índice de figuras	11
Abreviaturas.....	12
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Antecedentes	16
Justificación	16
Objetivos	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
Hipótesis.....	19
Capítulo II: Revisión Bibliográfica	20
Exosomas	20
Biogénesis y composición.....	20
Aplicaciones	23
Cicatrización de heridas.....	25
Frutas Andinas.....	26
Generalidades	26
Composición química	30
Propiedades biológicas.....	37
Mecanismo de acción.....	43
Técnicas de aislamiento y purificación de exosomas	44
Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	45
Métodos de caracterización de exosomas	50
Western Blot	50
Capítulo III: Metodología.....	55

Aislamiento de exosomas.....	55
Preparación de extractos	55
Centrifugaciones seriadas	55
Purificación mediante columna de exclusión de tamaño (SEC)	55
Purificación de exosomas por kit.....	56
Cuantificación de proteínas mediante Bradford	56
Caracterización de exosomas	57
Caracterización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) ...	57
Caracterización de exosomas mediante Western Blot (WB)	57
Determinación de la citotoxicidad.....	60
Ensayo de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT).....	60
Análisis estadístico	62
Capítulo IV: Resultados	63
Caracterización de exosomas	63
Aislamiento de exosomas.....	63
Caracterización de exosomas mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) ...	63
Análisis del perfil proteico	66
Electroforesis vertical	66
Western Blot (WB)	69
Determinación de la citotoxicidad.....	72
Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT).....	72
Capítulo V: Discusión.....	78
Caracterización de exosomas	78
Análisis del perfil proteico	80
Determinación de la citotoxicidad.....	82
Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones	87
Conclusiones	87
Recomendaciones	87
Bibliografía	89
Apéndices.....	99

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de tomate de árbol, naranjilla y uvilla	26
Tabla 2 Características climáticas y edáficas del tomate de árbol, naranjilla y uvilla	28
Tabla 3 Composición nutricional del tomate de árbol.....	31
Tabla 4 Compuestos fenólicos de tomate de árbol en mg/Kg	32
Tabla 5 Composición nutricional de la naranjilla	33
Tabla 6 Compuestos fenólicos de naranjilla en mg/Kg	34
Tabla 7 Composición nutricional de la uvilla	35
Tabla 8 Compuestos fenólicos de uvilla en mg/Kg	36
Tabla 9 Porcentaje de ácidos grasos de tomate de árbol, naranjilla y uvilla	36
Tabla 10 Compuesto y efecto biológico de tomate de árbol.....	38
Tabla 11 Compuesto y efecto biológico de uvilla	40
Tabla 12 Compuesto y efecto biológico de naranjilla.....	42
Tabla 13 Actividad antioxidante e hipoglucemiante de tomate de árbol, naranjilla y uvilla	43
Tabla 14. Métodos de aislamiento y purificación de exosomas	46
Tabla 15 Métodos de caracterización de exosomas.....	51

Índice de figuras

Figura 1 Biogénesis de exosomas	20
Figura 2 Estructura de exosomas	22
Figura 3 Propiedades biológicas de EP	24
Figura 4 Flor y fruta de tomate de árbol, naranjilla y uvilla	27
Figura 5 Provincias donde se producen tomate de árbol, naranjilla y uvilla	29
Figura 6 Aislamiento de exosomas	56
Figura 7 Caracterización de exosomas	59
Figura 8 Determinación de la citotoxicidad mediante MTT	61
Figura 9 Cuantificación de proteínas por espectrofotómetro. A280nm	63
Figura 10 Observación de exosomas de tomate de árbol por TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 2% a 120kV	64
Figura 11 Observación de exosomas de naranjilla por TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 2% a 120kV	65
Figura 12 Observación de Exosomas de uvilla por TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 2% a 120kV	66
Figura 13 Perfil proteico de exosomas aislados por SEC y kit	67
Figura 14 Análisis densitométrico de los geles de electroforesis	68
Figura 15 Western Blot de exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla.....	69
Figura 16 Análisis densitométrico de las membranas de Western Blot.....	71
Figura 17 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT tras 24 y 48 horas de exposición de 5 y 20ug de sobrenadantes, microvesículas y exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla	73
Figura 18 Comparación de viabilidad celular entre concentraciones de 5 y 20ug de sobrenadantes, microvesículas y exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla.....	76

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
°C	Grados Centígrados
CMV	Cuerpos multivesiculares
CoCl ₂	Cloruro de Cobalto
DLS	Tecnología de dispersión dinámica de luz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECL	Enhanced Chemiluminescence (Quimioluminiscencia mejorada)
ELISA	Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
EP	Exosomas derivados de plantas
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte
Exo	Exosomas
g	Gramos
GAM-HRP	Anti ratón de cabra conjugado a peroxidasa de rábano
HEK293T	Células de riñón embrionario humano
HeLa	Células cancerígenas de cuello uterino
HFF	Fibroblastos humanos
IAC	Inmunoafinidad
Klf4	Factor 4 Kruppel-like
mg	Miligramos
mm	Milímetros
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTT	Colorimétrico con Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio
MV	Microvesículas

N	Naranja
NLRP3	Dominio de pirina de la familia NLR que contiene 3
NP	Nanovesículas derivadas de plantas
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
NTA	Tecnología de análisis de seguimiento de nanopartículas
PBS	Buffer Fosfato Salino
PEG	Polietileno Glicol
PH	Potencial de hidrógeno
PVDF	polyvinylidene difluoride
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SN	Sobrenadante
SNARE	Complejos solubles del receptor de la proteína de fijación del factor sensible a la N-etilmaleimida
SOX2	Sex determining Region Y-box 2)
TSOX2	Tomate
TBS	Buffer Tris Salino
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TTBS	Buffer Tris Salino + Twen
U	Uvilla
UC	Ultracentrifugación diferencial
UF	Ultrafiltración
UI	UI microlitros
VE	Vesículas extracelulares
VIL	Vesículas intraluminales
WB	Western Blot

Resumen

Los cuerpos multivesiculares (CMV) de frutas excretan pequeñas vesículas (40-100 nm) conocidas como exosomas en el área extracelular para la comunicación célula a célula. Los exosomas contienen factores de transcripción, citoquinas, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Son usados en biomedicina por sus propiedades para regular la función antioxidante, anti-inflamatoria y regulatoria de células inmunes innatas y macrófagos asociados a tumores; administración de genes o fármacos, supresión del crecimiento tumoral y proliferación celular. En este estudio nos hemos interesado en tres frutas andinas: tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck) y uvilla (*Physalis peruviana* L.) que tienen propiedades antioxidantes. Se ha demostrado en diferentes líneas celulares que los exosomas derivados de plantas como uva, jengibre, limón, mandarina, zanahoria, coco, brócoli, trigo, ginseng y manzana tienen propiedades biológicas que pueden tener mejores beneficios terapéuticos que la propia planta de origen. El objetivo del estudio era aislar exosomas de estas frutas por columna de exclusión de tamaño, caracterizarlos mediante microscopía de transmisión electrónica y Western Blot e investigar la actividad proliferativa en tres líneas celulares y su citotoxicidad mediante ensayo de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT). Nuestros resultados mostraron que es posible aislar mediante columna de exclusión de tamaño una población de exosomas de tomate árbol, naranjilla y uvilla con morfología y tamaño similar, que muestran la presencia de las proteínas Alix, CD81 y CD63, además de que juegan un papel importante en la proliferación de líneas celulares humanas HFF, HEK y HeLa.

Palabras clave: microscopía de transmisión electrónica, Western Blot, antioxidante, antiproliferativa

Abstract

Fruit multivesicular bodies (MVBs) excrete small (40-100 nm) vesicles known as exosomes into the extracellular area for cell-to-cell communication. Exosomes contain transcription factors, cytokines, nucleic acids, lipids, and proteins. They are used in biomedicine for their properties to regulate the antioxidant, anti-inflammatory and regulatory function of innate immune cells and macrophages associated with tumors; gene or drug delivery, suppression of tumor growth and cell proliferation. In this study we have been interested in three Andean fruits: tree tomato (*Solanum betaceum* Cav), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck) and uvilla (*Physalis peruviana* L.) that have antioxidant properties. Exosomes derived from plants such as grape, ginger, lemon, tangerine, carrot, coconut, broccoli, wheat, ginseng, and apple have been shown in different cell lines to have biological properties that may have better therapeutic benefits than the plant of origin itself. The aim of the study was to isolate exosomes from these fruits by size exclusion column, characterize them by transmission electron microscopy and Western Blot, and investigate the proliferative activity in three cell lines and their cytotoxicity by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). Our results showed that it is possible to isolate by size exclusion column a population of exosomes from tree tomato, naranjilla and uvilla with similar morphology and size, which show the presence of Alix, CD81 and CD63 proteins, in addition to the fact that they play an important role in the proliferation of human cell lines HFF, HEK and HeLa.

Key words: transmission electron microscopy, Western Blot, antioxidant, antiproliferative

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

En 1946 se publicó el primer estudio que demostraba la existencia de vesículas extracelulares (VE) observadas como partículas derivadas de plaquetas procoagulantes en plasma normal. Antes de la década de 1980 se hablaba de la liberación de “fragmentos de membranas” o “polvo de plaquetas”, a partir de ese año los exosomas eran considerados desechos celulares que mediaban la comunicación de célula a célula (Gurunathan et al., 2019; Yáñez-Mó et al., 2015). El término “exosoma” fue propuesto por Rose Johnstone para describir pequeñas vesículas de 40-1000nm. En 1983 junto con Harding encontraron vesículas de 50nm liberadas por cuerpos multivesiculares (CMV) de reticulocitos sanguíneos en maduración por endocitosis hacia el espacio extracelular. Después el término se adoptó para vesículas entre 40 y 100nm. (Gurunathan et al., 2019; Yáñez-Mó et al., 2015)

Las VE se han aislado de varios tipos de células y fluidos biológicos desde saliva, orina, fluido nasal y bronquial, líquido amniótico, leche materna, plasma, suero, fluido cerebroespinal hasta líquido seminal (Gioia et al., 2020)

Existen estudios sobre exosomas derivados de plantas (EP) como uva, limón, brócoli, zanahoria, toronja, coco, jengibre, trigo, ginseng y manzana (Gioia et al., 2020; J. Kim et al., 2022).

Justificación

A lo largo de la historia el hombre ha utilizado productos naturales para diversos propósitos incluyendo medicinales, productos que en la actualidad son de interés en la industria farmacéutica debido al papel que juegan contra enfermedades, infecciones microbianas y procesos inflamatorios (Khushnud & Mousa, 2013; Silva et al., 2013). Uno de los desafíos comprende la baja biodisponibilidad de compuestos naturales como flavonoides y polifenoles tienen (Silva et al., 2013; Thilakarathna &

Rupasinghe, 2013; Williamson & Manach, 2005), pero este problema se puede resolver mediante el desarrollo de fármacos basados en nanotecnología aumentando la biodisponibilidad de estos compuestos y por ende su efectividad y eficacia en el tratamiento de enfermedades como inflamaciones, cáncer y otras relacionadas al sistema inmune (J. Kim et al., 2022; Gioia et al., 2020).

Los sistemas de nanotransportadores permiten superar las limitantes de la administración de productos naturales ya que aumentan su solubilidad (Sharma, 2014), selectividad, eficacia y seguridad; mejora la entrega de medicamentos dirigiendo el compuesto a un órgano específico o al sitio de la enfermedad de forma pasiva, admiten alta capacidad de carga, se disuelven rápido en la sangre, disminuye los efectos secundarios (Gioia et al., 2020), su pequeño tamaño les permite penetrar barreras y muestran mayor retención debido al escaso drenaje linfático (Chidambaram et al., 2011). No obstante, antes de la utilización de nanopartículas como vehículos de administración de fármacos se debe probar la eficiencia de absorción por parte de las células diana (de Jong et al., 2020).

En los últimos años las investigaciones se han dirigido a la obtención de nanovesículas derivadas de plantas (NP) debido a sus apreciables propiedades para aplicaciones clínicas como tamaño, alta tasa de internalización, baja toxicidad e inmunogenicidad, biocompatibilidad, alta estabilidad en el tracto gastrointestinal, fácil producción a gran escala y capacidad de superar la barrera hematoencefálica (Gioia et al., 2020).

Los exosomas estimulan la respuesta inmune actuando como presentadores de antígeno (Chaput & Théry, 2011), participan en la regeneración y reparación de tejidos (Doyle & Wang, 2019). Además, presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y pro regenerativas (Gioia et al., 2020) sugiriendo su uso en terapias pro angiogénicas para la regeneración de órganos o anti angiogénicas para el tratamiento contra el cáncer (Yáñez-Mó et al., 2015).

Se ha demostrado en diferentes líneas celulares que los exosomas derivados de plantas como uva, jengibre, limón, mandarina, zanahoria, coco, brócoli, trigo, ginseng y manzana tienen propiedades biológicas que pueden tener mejores beneficios terapéuticos que la planta de origen (Gioia et al., 2020). En este estudio nos hemos interesado en tres frutos específicos: tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck) y uvilla (*Physalis peruviana* L.) pertenecientes a la familia Solanaceae, los exosomas aislados de los extractos de estas frutas podrían ser útiles para aplicaciones en biomedicina por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas.

Objetivos

Objetivo general

Obtener exosomas a partir de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae)

Objetivos específicos

1. Caracterizar exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae) mediante microscopía electrónica.
2. Analizar el perfil proteico de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae) mediante electroforesis vertical.
3. Determinar la citotoxicidad de exosomas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae) mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT).

Hipótesis

Los exosomas aislados a partir de pulpa de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav, Solanaceae), naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck, Solanaceae) y uvilla (*Physalis peruviana* L., Solanaceae) mediante columna de exclusión de tamaño presentan en su composición las proteínas CD81, CD63 y Alix y no muestran citotoxicidad frente a líneas celulares humanas.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

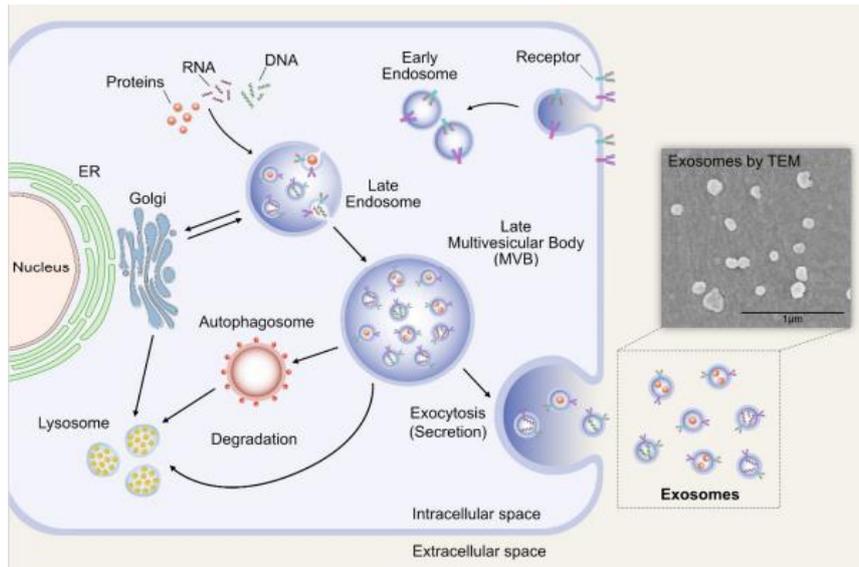
Exosomas

Biogénesis y composición

Según el mecanismo de liberación y el tamaño existen tres tipos de vesículas extracelulares (VE): exosomas cuyo diámetro es menor a 150nm producidos por exocitosis, microvesículas (MV) con un tamaño aproximado de 100-1000nm originados por una protrusión hacia el exterior de la membrana plasmática y cuerpos apoptóticos que superan los 1000nm derivados de células en apoptosis (Gioia et al., 2020; Gurunathan et al., 2019). La biogénesis de exosomas ocurre vía exocitosis de endosomas multivesiculares y se liberan al ambiente extracelular durante la fusión de la membrana plasmática con los cuerpos multivesiculares (CMV) (Harding et al., 1983). Este proceso se da en tres pasos: 1) gemación de endosomas por invaginación de la membrana plasmática, 2) formación de CMV que contienen vesículas intraluminales (VIL) a partir de la membrana endosomal y 3) fusión de CMV con la membrana plasmática de varios tipos de células y liberación de VIL en forma de exosomas (Batista et al., 2011; Cocucci & Meldolesi, 2015; Hessvik & Llorente, 2018). Las endosomas tempranos y CMV participan en las funciones endocíticas y de tráfico del material celular incluyendo la clasificación, el almacenamiento, el reciclaje, el transporte y la liberación de proteínas (Borges et al., 2013). Estos exosomas funcionan como mensajeros para la comunicación con otras células mediante acoplamiento vesicular y fusión con la ayuda del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) y los complejos solubles del receptor de la proteína de fijación del factor sensible a la N-etilmaleimida (SNARE) (Henne et al., 2013).

Figura 1

Biogénesis de exosomas



Nota. Adaptado de *Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes* (p. 4) por S. Gurunathan et al., 2019, *Cells*.

Los CMV de frutas excretan pequeñas vesículas (30-100 nm) en el área extracelular conocidas como exosomas para la comunicación célula a célula (Suharta et al., 2021; Tauro et al., 2012). Las plantas producen exosomas en respuesta a un estrés biótico o abiótico; por ejemplo, una infección patógena inducirá la proliferación de CMV estimulando el sistema inmune de la planta en defensa contra ese patógeno (An et al., 2006).

Los exosomas derivados de plantas (EP) son similares a los exosomas derivados de mamíferos en morfología, distribución de tamaño, densidad, carga eléctrica superficial y ciertos componentes (Ju et al., 2013). Los exosomas contienen componentes del núcleo, mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático, incluyendo factores de transcripción, citoquinas, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas de endosomas, de la membrana plasmática y del citosol que regulan procesos fisiológicos (Gurunathan et al., 2019; Jeppesen et al., 2019; Y. Zhang et al., 2020). Estas biomoléculas se encuentran en el interior de los exosomas envueltos por una bicapa fosfolipídica (Gioia et al., 2020).

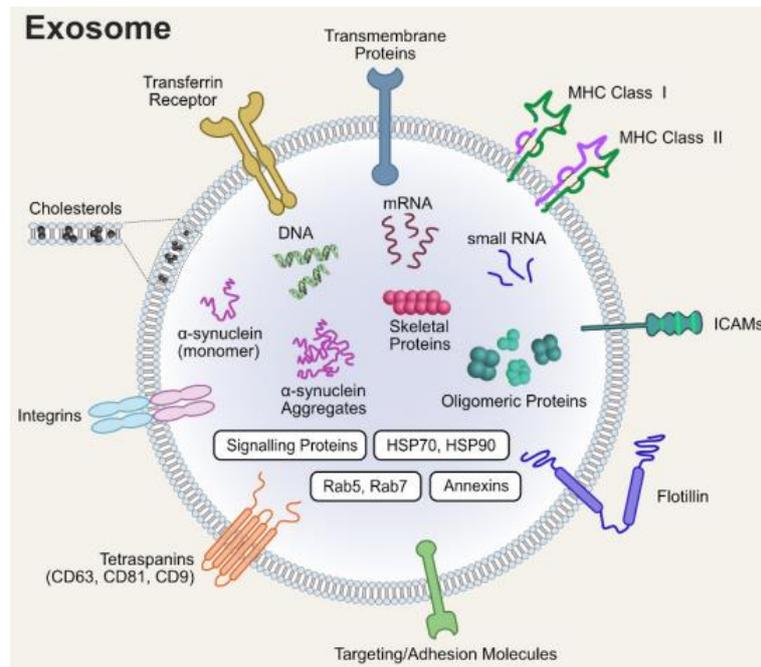
La composición de la bicapa lipídica de EP es diferente de la de exosomas derivados de células de mamíferos, siendo glicerol y fosfolípidos las principales clases de lípidos (Gioia et al., 2020; C. Yang et al., 2018). Las membranas exosomales de EP están compuestas de digalactosildiacylglicerol, monogalactosildiacylglicerol, ácido fosfatídico y fosfatidilcolinas que le proporcionan actividades de regulación propias de células de mamíferos favoreciendo la comunicación interespecies (Teng et al., 2018).

La fracción proteica incluye proteínas relacionadas a la fusión y transporte de membranas (Rab, GTPases), de choque térmico (HSP70, HSP90), tetraspaninas (CD63, CD81), proteínas relacionadas con el complejo ESCRT (Tsg101, Alix), integrinas, y componentes específicos como CD45 y MHC-II (Gurunathan et al., 2019; Jeppesen et al., 2019; Y. Zhang et al., 2020). El complejo ESCRT consiste en cuatro complejos proteicos (ESCRT-0, I, II y III) y el complejo asociado AAA ATPasa Vps4 que están involucrados en la síntesis, maduración y clasificación de cargas de EP (Henne et al., 2013; J. Kim et al., 2022). En cuanto a EP se han identificado proteínas como patelinas 1-3, penetración 1, cadena pesada de clatrina y de choque térmico (Woith & Melzig, 2019).

Los componentes macromoleculares participan en las funciones celulares, respuesta inmune, inflamación, muerte celular, angiogénesis y el estado patológico de enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Howitt & Hill, 2016).

Figura 2

Estructura de exosomas



Nota. Adaptado de *Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes* (p. 11) por S. Gurunathan et al., 2019, *Cells*.

Aplicaciones

Los exosomas son usados en biomedicina por sus propiedades contra enfermedades relacionadas a la inflamación y cánceres, para regular la función antioxidante, antiinflamatoria y regulatoria de células inmunes innatas y macrófagos asociados a tumores; homeostasis del tejido intestinal, administración de genes o fármacos, supresión del crecimiento tumoral, proliferación celular y reducción de la acumulación de lípidos y fibrosis (Gioia et al., 2020) (fig. 3). Varios estudios destacan su actividad en el proceso de curación, prevención de gingivitis e infecciones y mantenimiento de la microbiota intestinal beneficiosa (Suharta et al., 2021). Dentro del sistema nervioso intervienen en el crecimiento de neuritas, formación de mielina y supervivencia neuronal (Doyle & Wang, 2019)

Sirven para monitorear la respuesta de un paciente a cierto tratamiento, el desarrollo de vacunas por ser vesículas presentadoras de antígenos (Chaput & Théry,

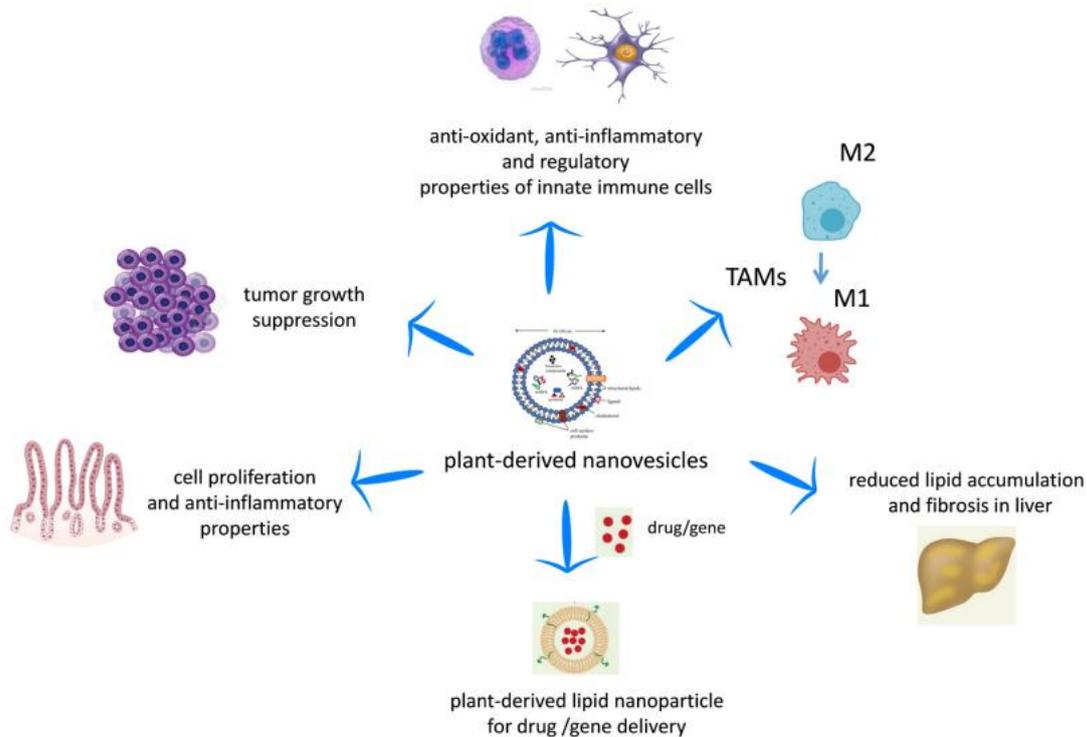
2011), prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias promoviendo factores de curación y bloqueando los factores dañinos (M. Zhang, Collins, et al., 2016; M. Zhang & Merlin, 2018).

Gracias a sus características fisiológicas, químicas y biológicas, los EP se emplean como nanotransportadores de fármacos capaces de administrarse a diferentes dosis (C. Yang et al., 2018); además se consideran más seguros que otros nanotransportadores artificiales como nanopartículas basadas en oro, plata, carbón y copolímeros (Wolfram et al., 2015). Sus efectos terapéuticos se derivan de los productos bioquímicos naturales de las plantas de origen (J. Kim et al., 2022).

Las ventajas son que los exosomas pueden derivarse de un sinnúmero de plantas comestibles, presentan baja toxicidad, inmunogenicidad reducida, absorción celular eficiente, vida media circulante prolongada, alta estabilidad y biocompatibilidad, son bien tolerados por el cuerpo humano y de fácil producción a gran escala, pueden penetrar las membranas celulares y dirigirse a un tipo de célula específico (J. Kim et al., 2022; Lai et al., 2013).

Figura 3

Propiedades biológicas de EP



Nota. Adaptado de *Biological properties and therapeutic effects of plant-derived nanovesicles* (p. 1098) por S. Gioia et al., 2020, Open Medicine.

Cicatrización de heridas

La cicatrización de heridas es un proceso que incluye hemostasia, inflamación, angiogénesis, proliferación de fibroblastos, depósito de colágeno y remodelación de tejidos (Leoni et al., 2015). Se ha demostrado que los productos naturales tienen una actividad alta sobre las heridas mediante la reducción de factores oxidativos, supresión de citocinas proinflamatorias, potenciación de enzimas antioxidantes y promoción de la neovascularización y las vías angiogénicas (Hajjalayani et al., 2018).

Las nanovesículas (NV) de toronja, jengibre y brócoli limitan la producción de citocinas proinflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, aumentan los mediadores antioxidantes y antiinflamatorios en los macrófagos, bloquean la activación de NLRP3, reducen las especies reactivas de oxígeno (ROS) y aumenta la traslocación de Nrf2 (Chen et al., 2019; Deng et al., 2017; Mu et al., 2014; B. Wang et al., 2014; Zhuang et al., 2015). La translocación nuclear del factor nuclear (derivado de eritroide 2)

similar a 2 (Nrf2) activa un patrón de defensa citoprotector pleiotrópico que incluye antioxidantes y protege contra enfermedades inflamatorias al inhibir las lesiones tisulares mediadas por estrés oxidativo (Gioia et al., 2020; R. Wang et al., 2013).

Asimismo, las NV derivadas de uva, trigo y jengibre promueven la proliferación de células madre y la formación de organoides, inducen citocinas proinflamatorias (IL-10, IL-22), aceleran la cicatrización de heridas y aumentan la expresión de colágeno (Ju et al., 2013; Şahin et al., 2019; M. Zhang, Viennois, et al., 2016). Ju et al. señaló la capacidad de las NV de uva para regular al alza la expresión de marcadores pluripotentes de células como SOX2, Oct4 y Klf4, a la vez que inducen la proliferación de células madre intestinales Lgr5^{hi} impulsando la homeostasis del tejido epitelial intestinal para su regeneración (Ju et al., 2013). Las NV obtenidas del trigo tienen la habilidad de regenerar la piel por su acción migratoria y proliferativa en fibroblastos endoteliales, dérmicos y epiteliales, aumentan el nivel de expresión de ARNm de colágeno tipo I y estimulan la formación vascular durante el proceso de cicatrización (Şahin et al., 2019). Las NV de jengibre originan la cicatrización de heridas intestinales al momento que expresan proteínas de la mitocondria y del citoplasma como axina, proteínas de shock térmico y quinesinas (M. Zhang, Viennois, et al., 2016)

Frutas Andinas

Generalidades

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav), la naranjilla (*Solanum quitoense* Lamarck) y la uvilla (*Physalis peruviana* L.) son plantas originarias de los Andes (Albarracín, 2013; Flores Rodríguez, 2007; Valverde et al., 2010). Las tres pertenecen a la familia Solanaceae, el tomate de árbol y la naranjilla son del mismo género *Solanum*, y la uvilla del género *Physalis*.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de tomate de árbol, naranjilla y uvilla

Nombre común	Tomate de árbol	Naranjilla	Uvilla
Reino	Plantae	Plantae	Plantae
División	Angiospermae	Angiospermae	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Simpetala	Dicotyledoneas
Orden	Solanales	Tubiflora	Tubiflora
Familia	Solanaceae	Solanaceae	Solanaceae
Genero	<i>Solanum</i>	<i>Solanum</i>	<i>Physalis</i>
Especie	<i>betaceum</i>	<i>quitoense</i>	<i>peruviana</i>
Nombre Científico	<i>Solanum betaceum</i> Cav.	<i>Solanum quitoense</i> Lamarck	<i>Physalis peruviana</i> L.

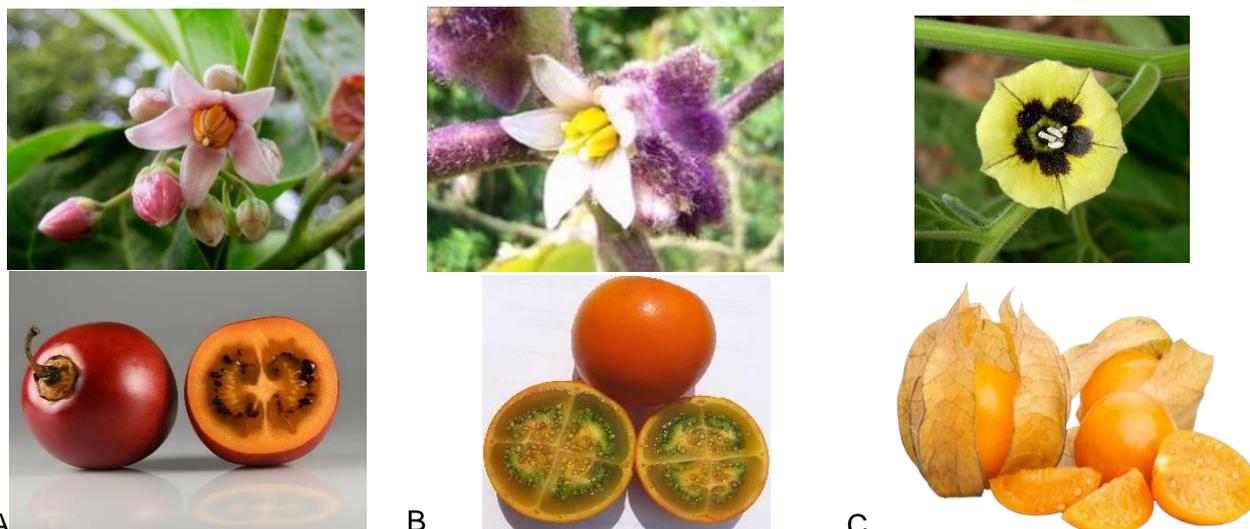
Nota. Tomado de *Clasificación taxonómica* (p. 5) por S. Buono et al., 2018, PROCISUR. *Clasificación taxonómica* (p. 24) por J. Revelo et al., 2010, INIAP. *Clasificación vegetal* (p.7) por E. Quinga Toasa, 2021, *Fundación Humana Pueblo a Pueblo Ecuador* y *Fundación Mujeres*.

El tomate de árbol es un arbusto semileñoso perenne y mide de 2-4m de altura (Zambrano Cabrera, 2011). Su baya ovoide está cubierta de una cáscara en tonalidades morada, naranja, roja o amarilla según la variedad y su pulpa tiene 200-400 semillas pequeñas (Flores Rodríguez, 2007). La naranjilla tiene ramificaciones de tallos semileñosos y gruesos. Su fruto es redondo de 4 a 6 cm de diámetro con cascara en tonos desde anaranjado a amarillo y en su interior tiene cuatro compartimentos llenos de pulpa de color verdoso con varias semillas pequeñas (Valverde et al., 2010).

La uvilla es un arbusto perenne, herbáceo y fuertemente ramificado de 2m de altura, produce una baya carnosa amarillenta y anaranjada con abundantes semillas, recubierto por el cáliz a manera de capuchón (Albarracín, 2013).

Figura 4

Flor y fruta de tomate de árbol, naranjilla y uvilla



A

B

C

Nota. A) Tomate de árbol B) Naranjilla C) Uvilla Tomado de *Flores del árbol del tomate y brotes*, por Greyling, L., s.f., (<https://www.publicdomainpictures.net/es/view-image.php?image=62667&picture=flores-del-arbol-del-tomate-y-brotes>). CC0 Public Domain; Fruto de tomate de árbol. Tomado de *Solanum betaceum*, anónimo, 2022, Wikipedia (https://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_betaceum). Tomado de *Naranjilla*, anónimo, 2022, Wikipedia, (https://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_quitoense). Tomado de *Flor de Uvilla* por Babiloni, J., 2012, Sangrando en verde (<http://jardin-mundani.blogspot.com/2012/03/physalis-peruviana-el-bombon-andino.html>). *Fruto de uvilla* por Coopfruits, s.f., (<https://coopfruits.com/index.php/gallery>)

En la tabla 2 se presentan algunos de los requerimientos edáficos y climáticos para el crecimiento de estas plantas.

Tabla 2

Características climáticas y edáficas del tomate de árbol, naranjilla y uvilla

Característica	Tomate de árbol	Naranjilla	Uvilla
Altitud (msnm)	1000 - 3000	850 - 1500	2000 – 3000
Precipitación (mm)	500 - 2500	1800 - 4000	1000 - 1500
Temperatura (°C)	14 - 20	17 - 29	15 - 20

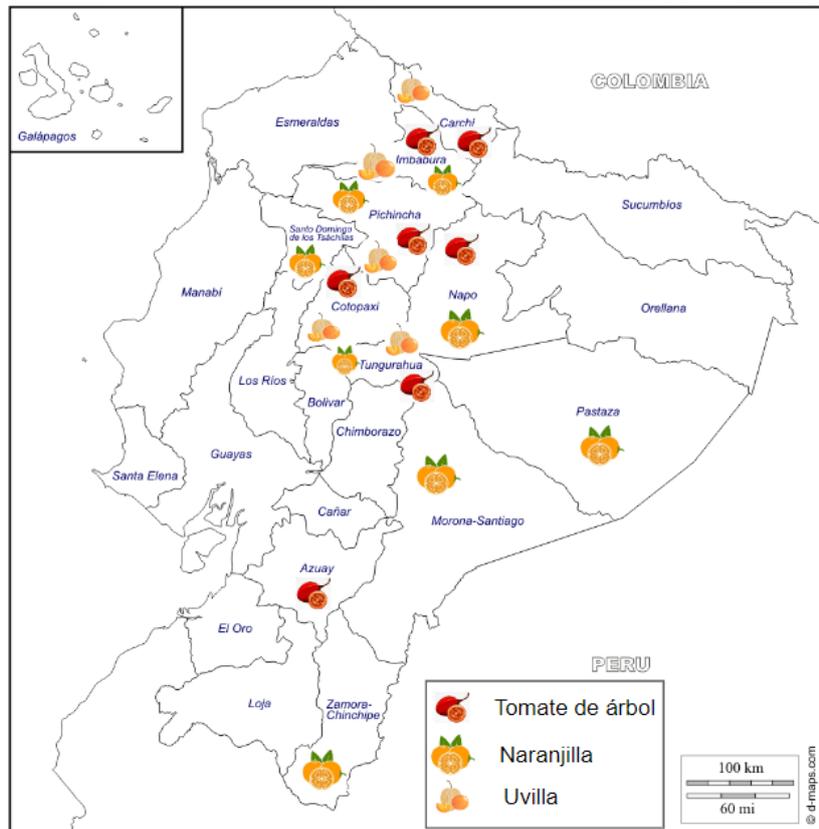
Característica	Tomate de árbol	Naranjilla	Uvilla
Suelo	Franco con 4-5% de materia orgánica profundo y bien drenado	Franco, franco arcilloso o franco arenoso, profundo con buen contenido de materia orgánica y buen drenaje	Franco y franco-arcilloso con alto contenido de materia orgánica y buen drenaje
pH	6-7	5,3 - 6	5,5 - 6,8.

Nota. Tomado de *Condiciones agroecológicas*, por INIAP, 2014, (<http://www.tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rtomatea>). *Creación de un centro de acopio para la exportación de uvilla desde el cantón Pillaro-Ambato hacia Berlin-Alemaní* (p. 11) por C. Albarracín, 2013.

Las principales zonas de producción tanto del tomate de árbol, como la naranjilla y uvilla se ubican en la sierra y amazonia, en su mayor parte al norte del país. La figura 5 representa un esquema de las provincias que los cultivan.

Figura 5

Provincias donde se producen tomate de árbol, naranjilla y uvilla en Ecuador



Nota. Elaboración propia en Paint

Composición química

En el tomate de árbol se han encontrado vitamina C, derivados de hidroxicinamoilo (ácido rosmarínico y ácido cafeoilquínico), antocianinas, taninos, carotenoides y flavonoides (antocianinas) (Orqueda et al., 2020).

Burri et al. describió los pigmentos: feofitina, clorofila (A, C1, C2 and C3) y carotenoides. El mayor pigmento fue β -caroteno (45%), seguido de zeaxantina (7-13%), luteína y anteraxantina estuvieron por encima del 5% y otros compuestos de xantofila incluyendo violaxantina, astaxantina, sifonaxantina, diadinoxantina, flavoxantina A, dinoxantina, y flavoxantina B. Entre las antocianinas están los rutinósidos de cianidina, delfinidina y pelargonidina (T. Diep et al., 2020); entre los flavonoides están quercetina and miricetina (Vasco et al., 2009).

Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran los ácidos hidroxicinámicos (ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico y rosmarínico) que representan el 55%, ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, elágico y vanílico), flavonol (kaempferol), flavanona (naringina), flavanoles (catequina, epicatequina) y glucósidos de flavonol (rutina, kaempferol-3 -rutinósido e isorhamnetin-3-rutinósido); siendo el ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquínico) y kaempferol-3-rutinoside los fenoles dominantes (T. Diep et al., 2020; Espín et al., 2016).

Tabla 3

Composición nutricional del tomate de árbol

Componentes	Contenido para 100g de fruta
Acidez	1,93-1,60
Brix	11,50-10,50
Calorías	30
pH	3,17-3,80
Humedad	86,03-87,07%
Carbohidratos	7g
Ceniza	0,6g
Fibra	1,1g
Proteína	2g
Calcio	9mg
Caroteno	1000UI
Fósforo	41mg
Hierro	0,90mg
Niacina	1,07mg
Riboflavina	0,03mg
Tiamina	0,10mg

Componentes	Contenido para 100g de fruta
Vitamina C	25mg
Vitamina E	2,10mg

Nota. Adaptado de *Estudio de factibilidad para la producción y exportación del tomate de árbol del cantón el chaco hacia España* (p. 9) por W. Zambrano, 2011.

Tabla 4

Compuestos fenólicos de tomate de árbol en mg/Kg

Compuesto	Cascara	Pulpa	Semillas
(+)-catequina	-	-	0.8 ± 0.2
Ácido clorogénico	253.8 ± 3.8	125.5 ± 1.2	37.7 ± 1.3
Ácido transcinámico	-	28.7 ± 2.0	-
Ácido p-cumárico	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-
Epicatequina	-	-	2.5 ± 0.1
Ácido ferúlico	8.7 ± 0.2	7.6 ± 0.1	-
Hidrato de rutina	9.5 ± 1.4	-	0.7 ± 0.0
Ácido sinápico	10.3 ± 0.7	1.6 ± 0.2	-
Siringaldehído	0.7 ± 0.0	-	-
Taxifolina	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Σ fenoles	284.1 ± 1.2	165.1 ± 2.2	42.1 ± 1.2

Nota. Adaptado de *Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycaemic Potential*, (p. 6) por M. Loizzo et al, 2019, *Foods*

Los compuestos fenólicos de la naranjilla se categorizan en ácidos fenólicos (1%), dihidrochalconas (1%), estilbenos (3%), antocianinas (4%), flavones (7%), flavononas (8%), ácidos hidroxicinámicos (15%) flavonoides (22%) y otros fenoles (7%) (Hinestroza-Córdoba et al., 2021). Entre los glucósidos de flavonol se han encontrado glucósidos de quercetina (quercetina-3-rutinósido), glucósidos de

isorhamnetina, glucósidos de kaempferol (Gancel et al., 2008) y β -glucósido (Forero et al., 2016). También se han descubierto ácidos clorogénicos (Loizzo et al., 2019) como ácido 5-O-cafeoilquínico y ácido 4-O-cafeoilquínico y sus hexóxidos (Gancel et al., 2008), y dihidrocafeoil espermidina (Gancel et al., 2008)

Con respecto a los carotenoides están el 13-cis- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno, luteína y all-trans- β -caroteno, el cual es el carotenoide principal representando el ~45%; los ésteres representan el 12% (Gancel et al., 2008). El ácido α -linolénico y ácido linoleico son los ácidos grasos encontrados, el primero es el más abundante (Gancel et al., 2008).

Tabla 5

Composición nutricional de la naranjilla

Componentes	Contenido para 100g de fruta
Humedad	90,46 %
pH	3
Acidez	2,56 %
Sólidos solubles	10,8 °Brix
Cenizas	0,59 %
Proteína	0,64 %
Fibra	0,46%
Carbohidratos	7,74%
Azúcares totales	4,62%
Azúcares reductores	2,40%
Vitamina C	53,33mg
Polifenoles totales	81mg
Carotenoides	0,127mg
Calcio	4,8mg

Componentes	Contenido para 100g de fruta
Magnesio	12,4mg
Fósforo	9,5mg
Potasio	309mg
Sodio	0,5mg
Hierro	0,1mg
Zinc	0,2mg

Nota. Tomado de *Características químicas de los frutos cultivares comerciales de naranjilla* (p. 38) por J. Revelo et al., 2010, INIAP.

Tabla 6

Compuestos fenólicos de naranjilla en mg/Kg

Compuesto	Cáscara	Pulpa + semillas
Ácido clorogénico	98.6 ± 29	19.1 ± 1.0
Ácido p-cumárico	0.4 ± 0.0	-
Ácido gálico	1.3 ± 0.0	-
Hidrato de rutina	51.1 ± 3.6	-
Taxifolina	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Σ fenoles	151.6 ± 25	20.0 ± 1.0

Nota. Adaptado de *Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycaemic Potential*, (p. 6) por M. Loizzo et al, 2019, *Foods*

Para la uvilla se han caracterizado diferentes flavonoides, terpenoides y glicósidos (Castro et al., 2015), fenoles, saponinas, witanólidos, peruviosis, fisaperuvina, irinianos, ácido cinamoilo, kaempferol y di y triglicósidos de quercetina (Muñoz et al., 2021; Nocetti et al., 2020); siendo la rutina (quercetina-3-O-rutinósido), quercetina-7-O-glucósido-3-O-rutinósido y kaempferol-3-O-rutinósido los principales flavonoides (Nocetti et al., 2020).

Muñoz et al. detalló la composición de la uvilla, entre terpenos los carotenoides son los mayormente encontrados (11,15%), seguidos de los monoterpenos (8,76%), sesquiterpenos (5,57%) y diterpenos (3,18%). El trans- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno y all-trans- α -criptoxantina son los carotenoides principales. Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides son los más representativos (5,17%), continúan los derivados del ácido cinámico (3,98%), compuestos monofenólicos (1,79%), ácidos fenólicos (1,39%), cumarinas (0,79 %), ésteres fenólicos (0,79 %), chalconas (0,39 %), aldehídos fenólicos (0,39 %) y estilbenos (0,19 %). Los fenoles más abundantes fueron el ácido gálico, el ácido 4-hidroxibenzoico y el kaempferol (Muñoz et al., 2021).

La leucina, fenilalanina, treonina y valina son los aminoácidos esenciales más importantes; de igual forma el ácido glutámico, la arginina y ácido aspártico de los aminoácidos no esenciales; el ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico de los ácidos grasos; el β -tocoferol de los tocoferoles; y campesterol δ -5-avenasterol y β -sitosterol de los esteroides (Nocetti et al., 2020).

Tabla 7

Composición nutricional de la uvilla

Componentes	Contenido para 100g de fruta
Calorías	54
Proteína	1,50g
Grasa	0,50g
Carbohidrato	11g
Fibra	0,40g
Cenizas	0,70g
Calcio	9mg
Fósforo	2,10mg
Hierro	1,70mg

Componentes	Contenido para 100g de fruta
Vitamina A	1730 UI
Tiamina	0,01mg
Riboflavina	0,17mg
Niacina	0,80mg
Ácido ascórbico	20mg

Nota. Adaptado de *Creación de un centro de acopio para la exportación de uvilla desde el cantón Pillaro-Ambato hacia Berlin-Alemaní* (p. 8) por C. Albarracín, 2013.

Tabla 8

Compuestos fenólicos de uvilla en mg/Kg

Compuesto	Cáscara	Pulpa + semillas
Ácido clorogénico	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Ácido gálico	0.9 ± 0.0	-
Polidatina	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.07
Hidrato de rutina	0.1 ± 0.0	-
∑ fenoles	3.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2

Nota. Adaptado de *Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycaemic Potential*, (p. 6) por M. Loizzo et al, 2019, *Foods*

Tabla 9

Porcentaje de ácidos grasos de tomate de árbol, naranjilla y uvilla

Fatty Acids	<i>S. Quitoense</i>		<i>P. Peruviana</i>		<i>C. Betacea</i>			
	Peel	Pulp + Seed	Peel	Pulp + Seed	Peel	Pulp	Seed	Peel
C16:0	22.6 ± 0.1	25.6 ± 0.4	20.6 ± 2.6	19.5 ± 0.7	22.9 ± 0.4	19.8 ± 0.1	13.6 ± 0.0	15.4 ± 0.1
C18:0	6.3 ± 0.2	4.7 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	2.2 ± 0.0
C20:0	n.d.	n.d.	5.4 ± 0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SFA	28.9 ± 0.1	30.3 ± 0.6	28.8 ± 2.1	22.0 ± 0.5	25.4 ± 0.2	21.5 ± 0.2	16.9 ± 0.1	17.6 ± 0.1
C16:1	1.6 ± 0.1	n.d.	0.6 ± 0.0	1.4 ± 0.1	n.d.	1.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0
C18:1 9	12.7 ± 0.3	17.0 ± 0.1	26.5 ± 0.5	20.5 ± 0.5	41.4 ± 0.3	39.1 ± 0.2	17.2 ± 0.6	11.3 ± 0.0
C18:1 11	3.6 ± 0.3	n.d.	6.4 ± 0.1	8.4 ± 0.4	2.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.0
MUFA	18.0 ± 0.7	17.0 ± 0.1	33.5 ± 0.6	30.3 ± 1.0	43.7 ± 0.4	41.7 ± 0.4	19.3 ± 0.8	13.0 ± 0.1
C18:2 n-6	11.5 ± 0.1	23.5 ± 0.9	3.6 ± 0.1	11.9 ± 0.1	10.4 ± 0.1	13.1 ± 0.2	58.3 ± 1.0	63.9 ± 0.3
C18:3 n-6	n.d.	n.d.	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C18:3 n-3	41.6 ± 0.9	29.2 ± 0.5	29.8 ± 1.3	31.4 ± 1.0	20.5 ± 0.4	23.6 ± 0.7	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.0
PUFA	53.1 ± 0.8	52.7 ± 0.5	37.7 ± 1.5	47.7 ± 0.4	30.9 ± 0.3	36.8 ± 0.5	63.8 ± 0.9	69.4 ± 0.2

SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; n.d.; not detectable. Results represents means ± standard deviation (S.D.) (n = 3)

Nota. Adaptado de *Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycaemic Potential*, (p. 6) por M. Loizzo et al, 2019, *Foods*.

Propiedades biológicas

Se usan comúnmente en la preparación de muchas comidas, en la industria se utilizan para producir principalmente mermeladas y dulces, además de snacks, jugos, licores y cocteles; pero también se han aplicado como medicina tradicional por sus propiedades nutraceuticas debido a la combinación de compuestos bioactivos presentes en las frutas (Viera et al., 2022).

Varios estudios han descrito que el tomate de árbol previene el síndrome metabólico (Orqueda et al., 2020), es un aglutinante de ácidos biliares, emulsificante y estabilizante de alimentos ricos en grasas, puede retener aceite y agua e inhibe la formación de ácido úrico (Flores Rodríguez, 2007); es un antimicrobiano y antiinflamatorio para dolores de garganta y encías inflamadas, reduce el colesterol (Vasco et al., 2009) y tiene propiedades antibacteriales contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*, *S. pyogenes* (T. Diep et al., 2020), bacterias fitopatógenas y hongos xilófagos y fitopatógenos (Ordóñez et al., 2006); hipolipémicas (Orqueda et al., 2020), antienvjecimiento, antidiabéticas, antiinflamatorias, anticancerígenas (Tabla 10)

Su capacidad antioxidante se le atribuye a antocianinas (T. Diep et al., 2020), pero principalmente a compuestos fenólicos (Orqueda et al., 2020), entre ellos

flavonoides (Vasco et al., 2009) que también le confieren su actividad antiviral (Viera et al., 2022) y antibacteriana (T. T. Diep et al., 2021). Sus ácidos fenólicos, antocianinas, taninos y carotenoides pueden inhibir ciertas enzimas (Orqueda et al., 2020) (tabla 10).

Tabla 10

Compuesto y efecto biológico de tomate de árbol.

Propiedad	Compuesto	Referencia
Antibacteriana	Éster de cafeoil ácido rosmarínico	(Espin et al., 2016)
	Flavonoides	(T. T. Diep et al., 2021)
	Rutina	(T. Diep et al., 2020)
Antioxidante	Ácidos hidroxicinamóilos: ácido rosmarínico, 3-O-ácido cafeoilquínico, ácido clorogénico	(T. Diep et al., 2020; Espin et al., 2016; Orqueda et al., 2020)
	Antocianina: delfinidina 3-rutinósido,	(T. Diep et al., 2020)
	Ácido ascórbico	(Viera et al., 2022)
	β -caroteno, α -tocopherol	(Burri et al., 2011; Vasco et al., 2009)
	Queracianina, pelargonidina 3-rutinósido, tulipanina, delfinidina 3-O- α -l-ramnosil- β -d-glucósido-3'-O- β -d-glucósido	(Espin et al., 2016)
	Compuestos fenólicos, saponinas	(Elizalde-Romero et al., 2021)
Antiinflamatorio	Ácido clorogénico	(T. T. Diep et al., 2021)
	Antocianinas a base de delfinidina	(Liu et al., 2018)

Propiedad	Compuesto	Referencia
	Galactoarabinoglucuronoxilanos	(do Nascimento et al., 2013)
Anticancerígeno	Saponinas, carotenoides	(T. T. Diep et al., 2020; Elizalde-Romero et al., 2021)
	Ácido clorogénico, rutina, antocianinas	(T. Diep et al., 2020)
Antidiabético	Ácidos fenólicos	(Orqueda et al., 2020)
Anti-obesidad	Ácido rosmarínico y ácido cafeoilquínico	(Orqueda et al., 2020; Spínola & Castilho, 2017)
Antiviral	Flavonoides	(Viera et al., 2022)
	Saponinas	(Elizalde-Romero et al., 2021)
	Rutina	(T. Diep et al., 2020)
Anti nociceptivo	galactoarabinoglucuronoxilanos	(do Nascimento et al., 2013)

Nota. Elaboración propia

En Ecuador la uvilla se usa de forma tradicional como desinfectante y para curar heridas (antiséptico) (Tene et al., 2007), ejerce una actividad como hipoglicémico inhibiendo la α -amylase (Muñoz et al., 2021), antipirético (Muñoz et al., 2021), anti fibrótico (Nocetti et al., 2020), antimicrobiano actuando sobre bacterias Gram positivas y negativas y levaduras: *Pseudomonas syringae* (Muñoz et al., 2021), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Lactococcus lactis* (Nocetti et al., 2020).

Además, protege contra trastornos del tracto gastrointestinal, enfermedades del sistema endocrino y sistema respiratorio, asma, malaria, reumatismo, dermatitis y hepatitis; es un diurético e inmunomodulador (Muñoz et al., 2021), reduce los niveles de colesterol total, colesterol LDL, triacilglicerol total, ácido úrico, urea y la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica (Nocetti et al., 2020); protege contra la lesión renal aguda y mejora la histología renal (Ezzat et al., 2021).

Muchos estudios han revelado su composición fitoquímica y la propiedad que le confiere dicho compuesto (tabla 11). Los minerales, ácidos grasos, fenoles, flavonoides, saponinas, entre otros compuestos le dan un poder anti proliferativo incluyendo células cancerígenas (Nocetti et al., 2020). El 4 β -hidroxiwitanólido E previene la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (W.-J. Yang et al., 2020).

Tabla 11

Compuesto y efecto biológico de uvilla

Propiedad	Compuesto	Referencia
Antioxidante	Compuestos fenólicos;	(Etzbach et al., 2018)
	Carotenoides: (all-E)-luteína (60%) y (all-E)- β -caroteno (22%), (all-E)-neoxantina, (all-E)-violaxantina, (Z)-luteína, (todo-E)-taraxantina y (Z)-taraxantina	
	Flavonoides	(Toro A. et al., 2013)
	Witanólidos: 4 β -hidroxiwitanólido E	(Nocetti et al., 2020)
	α -tocoferol, β -tocoferol	(Azzi, 2019; Chasquibol & Yácono, 2015)

Propiedad	Compuesto	Referencia
	Acido ascórbico	(Wahdan et al., 2019)
	Ácido rosmarínico, ácido ursólico, ácido gálico, catequina y galato de epicatequina	(Mier-Giraldo et al., 2017)
Antinflamatorio	Ácido 4-hidroxibenzoico	(H. Kim et al., 2020)
	Luteína	(Muñoz et al., 2021)
	Ésteres alifáticos de sacarosa: peruviosis A y B, γ -tocoferol	(Nocetti et al., 2020)
Antidiabético	fisalinas A, B, D y F y glucósidos	(Nocetti et al., 2020)
	Ácido 4-hidroxibenzoico	(H. Kim et al., 2020)
	Ácido gálico	(Muñoz et al., 2021)
	Kaempferol	(Alkhalidy et al., 2018)
Anti proliferativo	4-beta-hidroxi withanólido	(Chiu et al., 2013)
	Witaperuvina C y fisalactona	(Sang-Ngern et al., 2016)
	γ -tocopherol, esterres alifáticos de sacarosa: peruviosis A y B	(Nocetti et al., 2020)
	Ácido 4-hidroxibenzoico	(H. Kim et al., 2020)
Anti-hepatotóxica:	Flavonoides, saponina, fenoles	(Arun & Asha, 2007)
Antimicrobiano	Ésteres alifáticos de sacarosa: peruviosas A y B;	(Nocetti et al., 2020)

Propiedad	Compuesto	Referencia
	fenoles, flavonoides, xantina, saponinas, witanólidos	
Antifúngico	Ácido 4-hidroxibenzoico Ésteres alifáticos de sacarosa: peruviosas A y B	(H. Kim et al., 2020) (Nocetti et al., 2020)
Antienvjecimiento	Ácido 4-hidroxibenzoico	(H. Kim et al., 2020)
Antiviral	Ácido 4-hidroxibenzoico	(H. Kim et al., 2020)
Insecticida	Ésteres alifáticos de sacarosa: peruviosas A y B	(Nocetti et al., 2020)

Nota. Elaboración propia

La naranjilla ayuda al buen funcionamiento de los riñones, su consumo es recomendado para personas que sufren gota, funciona como diurético, anticáncer, regenerador de tejidos y tonificantes (Granados et al., 2013); también regula la alteración del metabolismo de la glucosa, por lo que se considera un hipoglucemiante (Loizzo et al., 2019) e inhibe la enzima convertidora de angiotensina I (ACE-I), por lo que se usa como antihipertensivo (Forero et al., 2016) (tabla 12).

Tabla 12

Compuesto y efecto biológico de naranjilla

Propiedad	Compuesto	Referencia
Antioxidante	Fenoles, carotenoides y ácido ascórbico	(Gancel et al., 2008)
Antidiabético	flavonoides (rutina), ácido clorogénico	(Loizzo et al., 2019)
Antihipertensivo	N1, N4, N8 -tris (dihidrocafeoil)	(Forero et al., 2016)

Propiedad	Compuesto	Referencia
	espermidina y N1, N8 -bis-	
	(dihidrocafeoil)	
	espermidina	

Nota. Elaboración propia

Tabla 13

Actividad antioxidante e hipoglucemiante de tomate de árbol, naranjilla y uvilla

Title	Sample	DPPH (IC ₅₀ µg/mL)	ABTS (IC ₅₀ µg/mL)	β-Carotene Bleaching Test (IC ₅₀ µg/mL)	FRAP (µM Fe(II)/g)	RACI	GAS	α-Amylase (IC ₅₀ µg/mL)	α-Glucosidase (IC ₅₀ µg/mL)
Solanaceae									
<i>S. quitoense</i>	Peel	38.8 ± 2.1 ****	167.6 ± 3.7 ****	11.1 ± 1.3 ****	49.4 ± 1.5 ****	-0.43	0.81	31.8 ± 1.2 ****	27.9 ± 1.0
	Pulp + Seed	61.3 ± 2.0 ****	576.8 ± 7.5 ****	6.9 ± 0.5	16.2 ± 2.5 ****	-0.38	0.87	54.9 ± 2.4	57.1 ± 2.0 ****
<i>P. peruviana</i>	Peel	117.9 ± 5.1 ****	843.3 ± 3.9 ****	10.2 ± 1.1 ***	13.0 ± 0.8 ****	0.20	1.72	34.1 ± 2.2 ****	37.6 ± 2.5
	Pulp + Seed	65.3 ± 2.1 ****	> 1000	19.3 ± 1.6 ****	7.3 ± 0.6 ****	-0.03	1.40	64.3 ± 3.0 ****	45.0 ± 1.1
<i>C. betacea</i>	Peel	74.7 ± 3.5 ****	149.8 ± 3.6 ****	21.9 ± 1.5 ****	63.9 ± 3.5	0.05	1.52	77.1 ± 3.3 ****	32.9 ± 2.9 **
	Pulp	141.3 ± 5.5 ****	463.8 ± 4.7 ****	93.8 ± 4.5 ****	9.8 ± 0.6 ****	0.68	2.42	92.7 ± 3.8 ****	95.1 ± 4.6 ****
	Seed	57.9 ± 1.5 ****	329.8 ± 3.3 ****	58.2 ± 4.0 ****	25.4 ± 2.5 ****	-0.09	1.30	102.9 ± 4.0 ****	195.1 ± 4.7 ****

Data are given as media ± S.D. (n = 3); 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity Assay; Antioxidant Capacity Determined by Radical Cation 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺), β-Carotene bleaching test, Ferric Reducing Ability Power (FRAP); Relative antioxidant capacity Index (RACI); Global Antioxidant Score (GAS); * Propyl gallate, ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as positive control in antioxidant test, while acarbose was used in carbohydrate hydrolysing enzyme inhibition assays. Differences within and between groups were evaluated by one-way ANOVA followed by a multicomparison Dunnett's test (=0.05); **** p < 0.0001, *** p < 0.001, ** p < 0.05 compared with the positive controls.

Nota. Adaptado de *Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycemic Potential*, (p. 6) por M. Loizzo et al, 2019, *Foods*

Mecanismo de acción

El tomate de árbol es un antioxidante gracias su capacidad de secuestrar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), ser un protector de la membrana de los glóbulos rojos y depurador de O₂⁻, H₂O₂ y NO (Orqueda et al., 2020), disminuir la peroxidación lipídica (Burri et al., 2011), absorber radicales de oxígeno, ser un agente reductor de hierro (T. T. Diep et al., 2020), capturar radicales libres por la presencia de grupos hidroxilo en su composición (Elizalde-Romero et al., 2021) y proteger el daño del ADN (T. Diep et al., 2020).

Asimismo, la uvilla tiene características antioxidantes ya que cumple una función protectora contra el daño de ADN y disfunción mitocondrial (Chasquibol & Yácono, 2015), reduce las enzimas asociadas al estrés oxidativo (Toro A. et al., 2013) e iones férricos (Muñoz et al., 2021), inhibe la peroxidación lipídica, actúa para la

eliminación del anión superóxido y la inhibición de las actividades de la xantina oxidasa (S. J. Wu et al., 2006).

El 4 β -hidroxiwitanolido E aislado de la uvilla potencia la actividad antioxidante e inhibe el estrés oxidativo cuando actúa como activador del Nrf2 durante la afección pulmonar obstructiva crónica, mediante la interrupción de la interacción proteína-proteína Nrf2-Keap1 mediante modificación de residuos de cisteína Cys288 y Cys151 en Keap1 y la consecuente supresión de la ubiquitinación de Nrf2. También bloquea la respuesta inflamatoria de NF-kB estimulada por LPS (W.-J. Yang et al., 2020)

Castro et al. observó una mejora en ratas con colitis tratadas con un extracto obtenido de los calices de uvilla mediante la baja liberación de NO por macrófagos, secuestro de radicales libres, disminución de la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α), regulación de la expresión a la alta de MUC2 y regulación a la baja de genes envueltos en la respuesta inflamatoria: NLRP3, iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6 e IL-10, ligera reducción de la actividad de la enzima MPO que sugiere una reducida infiltración de neutrófilos en el colón (Castro et al., 2015).

La uvilla atenúa la inflamación por inducción de λ -carragenina, inhibición del óxido nítrico y prostaglandina E2 (Peng et al., 2016), previene la generación de NO, la liberación de PGE2 y la expresión de iNOS y COX-2 (Wu et al., 2006).

También actúa como antienvjecimiento por su regulación a alta de elastina, fibrilina-1 y colágeno tipo I (Cicchetti et al., 2018)

La naranjilla tiene una alta actividad antioxidante debido a su habilidad para eliminar radicales libres, proteger de la peroxidación lipídica, ser un agente reductor, quencer de oxígeno singlete y donador de hidrógeno (Loizzo et al., 2019); secuestrar de radicales libres y quelar metales de transición (Bagattoli et al., 2016).

Técnicas de aislamiento y purificación de exosomas

Existen diferentes métodos de aislar y purificar exosomas, en la tabla 14 se pueden apreciar algunos de los más utilizados con sus ventajas y desventajas.

Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

La técnica de aislamiento de exosomas más usada es la cromatografía de exclusión por tamaño (Kuo & Jia, 2017; Sidhom et al., 2020). Esta técnica comprende dos fases: la muestra como fase móvil y el polímero de gel poroso como fase estacionaria (Böing et al., 2014). La columna puede empaquetarse con varios polímeros de gel como agarosa (Sephacryl), dextranos reticulados (Sephadex), alildextrano (Sephacryl) o poliacrilamida (Biogel P) (Sidhom et al., 2020).

La técnica se basa en una elución diferencial según el tamaño donde las partículas grandes eluyen primero, seguido de vesículas pequeñas enriquecidas con exosomas y luego proteínas no exosomales que están concentradas en las últimas fracciones. SEC separa vesículas grandes de pequeñas a la vez que elimina la contaminación de proteínas solubles no unidas a exosomas (Kuo, & Jia, 2017). A pesar del bajo rendimiento y ligera pérdida de pureza, los exosomas conservan su integridad, identidad, morfología y funcionalidad ya que hace uso de la gravedad, permitiendo que los exosomas mantengan sus características vesiculares propias (Gámez-Valero et al., 2016; Mol et al., 2017; Sidhom et al., 2020). Tampoco requiere de grandes volúmenes de muestra (Sidhom et al., 2020).

El resultado es un aislado exosomal homogéneo con bajos niveles de contaminación y coprecipitados (Navajas et al., 2019).

Tabla 14*Métodos de aislamiento y purificación de exosomas*

Métodos de Aislamiento y Purificación	Principio	Ventajas	Desventajas
Ultracentrifugación diferencial (UC)	Centrifugación seriada a altas velocidades y duración en un medio homogéneo permitiendo que las partículas más grandes se sedimenten primero.	<ul style="list-style-type: none"> • Simple • Fácil uso • Accesible a largo plazo • Tiempo moderado • Simple preparación • Reproducibilidad • Reactivos de bajo costo • Diferenciación por tamaño y densidad • Fácil operación 	<ul style="list-style-type: none"> • Purificación adicional por contaminación en el producto final. • Equipo costoso • Producción de agregados exosomales • Grandes volúmenes de pesos iniciales
Ultracentrifugación por gradiente	Ultracentrifugación ascendente de un conjunto de capas de diferente concentración en presencia de un gradiente de densidad preconstruído	<ul style="list-style-type: none"> • Bioactividades diferenciadas • Diferenciación por tamaño, masa, densidad y niveles de estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Costosa • Alta capacitación • Equipo calificado

Métodos de Aislamiento y Purificación	Principio	Ventajas	Desventajas
Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	Separación diferencial de partículas por la interacción de una fase móvil con el producto deseado y una fase estacionaria porosa, en donde las partículas de mayor tamaño van a eludir primero seguida de las más pequeñas y así consecutivamente hasta obtener el producto deseado.	<ul style="list-style-type: none"> • Estructuras y bioactividad intactas. • Tiempo relativamente corto • Obtención de exosomas relativamente homogéneos • Rentable • Alto rendimiento y pureza comparado con PEG y UC • Bajo costo • Mínimamente invasivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita UC para aumentar la pureza. • Necesita complementarse con HPLC para obtener alta pureza • No se puede diferenciar entre exosomas y microvesículas • Tasa de recuperación intermedia por lo que se requiere gran cantidad de muestra. • Se debe controlar las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre la fase móvil y estacionaria que puedan alterar la bioactividad del exosoma • No se pueden procesar múltiples muestras

Métodos de Aislamiento y Purificación	Principio	Ventajas	Desventajas
Inmunofluorescencia (IAC)	Los antígenos expresados en la superficie de los exosomas interaccionan con perlas magnéticas o nanocubos cargados de anticuerpos separando así la partícula deseada de mezcla heterogénea.	<ul style="list-style-type: none"> • Alta especificidad, sensibilidad, pureza y rendimiento • Se puede utilizar menos volumen y obtener el mismo rendimiento que UC • Mayor superficie de contacto para capturar exosomas en comparación con un ELISA 	<ul style="list-style-type: none"> • Heterogeneidad de las superficies exosomales • Al tratar de eliminar el Ac unido puede causar daño en la integridad del exosoma • Anticuerpos inespecíficos • Altos costos • Condiciones de almacenamiento complicadas
Precipitación (PEG6000)	Quelación de los exosomas por polietilenglicol-6000 permitiendo que estos precipiten con una centrifugación de baja velocidad	<ul style="list-style-type: none"> • Nanopartículas de diámetro variado. • Costos relativamente bajos • Tiempo moderado • Se pueden procesar varias muestras a la vez. • Fácil operación 	<p>Menor rendimiento en comparación con UC</p> <p>Coprecipitación de impurezas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se obtiene menor cantidad de polifenoles bioactivos. • Necesita apoyo de inmunoprecipitación para aumentar la pureza

Métodos de Aislamiento y Purificación	Principio	Ventajas	Desventajas
Ultrafiltración (UF)	Obtención de exosomas mediante segregación a través de una matriz con poros de tamaño predeterminado	<ul style="list-style-type: none"> • Sin equipos costosos • Poca mano de obra • Tiempo relativamente corto 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil de separar el complejo formado. • Menor rendimiento y pureza en comparación con UC • Puede producir deformación y ruptura del exosoma • Baja pureza • Unión inespecífica entre la matriz porosa y los exosomas.

Métodos de Aislamiento y Purificación	Principio	Ventajas	Desventajas
Microfluídica	Unión antígeno – anticuerpo por la unión específica en un dispositivo microfluídico tipo chip (ExoChip), electrodos de oro o de nanointerfaz de óxido de grafeno/polidopamina (Go/PDA).	<ul style="list-style-type: none"> • Alto rendimiento • Diferenciación por inmunoespecificidad, tamaño y densidad • Rápido y eficiente • Alta pureza 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispositivos costosos y complejos • Pequeño volumen de muestra • Poco estandarizado para aislamiento de exosomas

Nota. Adaptado de (Sidhom et al., 2020; Suharta et al., 2021; Y. Zhang et al., 2020)

Métodos de caracterización de exosomas

Los métodos para caracterizar exosomas son de dos tipos: caracterización externa para analizar el tamaño de partícula y morfología y caracterización interna, por ejemplo, de lípidos o proteínas de membrana (Y. Zhang et al., 2020). En la tabla 15 se mencionan las ventajas y desventajas de los métodos más comunes.

Western Blot

El Western Blot también conocido como Inmunoblotting se basa en la unión por afinidad de un antígeno, en este caso de la proteína diana, y un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno (Doyle & Wang, 2019). Las vesículas se lisan y sus proteínas se desnaturalizan para separarse mediante SDS-PAGE y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (Gallagher et al., 2008). La membrana es expuesta primeramente a un anticuerpo contra el antígeno de interés y después a un anticuerpo secundario que se detecta por el grupo de peroxidasa o fosfatasa alcalina al que está acoplado (Doyle & Wang, 2019).

Se utiliza para detectar proteínas exosomales internas y de superficie; pero la calidad del anticuerpo utilizado limita su reproducibilidad y especificidad (Doyle & Wang, 2019).

Tabla 15

Métodos de caracterización de exosomas

Métodos de Caracterización	Principio	Ventajas	Desventajas
Microscopio electrónico de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)	Evalúa la morfología de vesículas exosomales mediante la detección del haz de electrones dispersos (SEM) y que atraviesan la muestra (TEM), en este último caso estos	<ul style="list-style-type: none"> • Imágenes de partículas submicrónicas con alta resolución • Distinción de tamaño y morfología 	<ul style="list-style-type: none"> • Muchos parámetros de optimización • Personal altamente capacitado • Equipo costoso • Preparación extensiva de la muestra

Métodos de Caracterización	Principio	Ventajas	Desventajas
	son revelados por una pantalla fluorescente.		<ul style="list-style-type: none"> • Necesita un pretratamiento de UC o UF.
Tecnología de dispersión dinámica de luz (DLS)	Seguimiento del movimiento de partículas mediante diferentes niveles o fluctuaciones de intensidad de luz que determinan el coeficiente de difusión de partículas, las cuales son captadas por un microscopio	<ul style="list-style-type: none"> • Determina tanto el tamaño como la concentración • Fácil de usar • Se usa poco volumen mínimo 70 μL • Pocos parámetros de optimización • Recopilación de datos a través de un software 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas en mezclas heterogéneas • Difícil detección y diferenciación de microvesículas y exosomas porque esta sesgado a detectar partículas más grandes
Tecnología de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	Cálculo del tamaño de partículas mediante su coeficiente de difusión (Ecuación de Stokes-Einstein) dentro de una cámara en donde un microscopio capta el movimiento de las partículas a través de una luz laser que interactúa con ellas.	<ul style="list-style-type: none"> • Determina partículas entre 10 y 1000 nm de diámetro. • Determina tanto el tamaño como la concentración. • Recopilación de datos a través de un software • Reconocimiento ideal de partículas en mezclas heterogéneas 	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen mínimo es 0,5 mL • Se necesita personal capacitado. • Muchos parámetros de optimización • No fenotipa las vesículas ni determina su origen

Métodos de Caracterización	Principio	Ventajas	Desventajas
		<ul style="list-style-type: none"> Más rápido en comparación con TEM y DLS 	
Western Blot	<p>Detección de exosomas mediante su lisado y desnaturalización en donde las proteínas restantes son separadas en un SDS-PAGE y luego transferidas a una membrana en donde son expuestas a un anticuerpo que reconoce el antígeno de interés, posterior a ello se utiliza un anticuerpo secundario con fluorescencia para su revelación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Amplia accesibilidad Alto rendimiento Los resultados se pueden presentar en fotografías 	<ul style="list-style-type: none"> Tiempo muy extenso Baja especificidad Reproducibilidad limitada Alta cantidad de muestra Revela muy poca información (No es multiplexado) Semicuantitativo Necesita personal capacitado El uso de varios reactivos y geles lo hace muy costoso
Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	<p>Inmovilización antígeno – anticuerpo sobre la superficie de una microplaca</p>	<ul style="list-style-type: none"> Rápido y sencillo Alta especificidad No se producen reacciones cruzadas con anticuerpos secundarios Se pueden analizar varias muestras simultáneamente. 	<ul style="list-style-type: none"> Se necesita un pretratamiento de UC o UF. Baja sensibilidad porque no hay amplificación de señal con un anticuerpo secundario Inmunoreactividad

Métodos de Caracterización	Principio	Ventajas	Desventajas
		<ul style="list-style-type: none"> • No necesita personal muy capacitado 	<ul style="list-style-type: none"> • No distingue entre microvesículas y exosomas
Citometría de flujo	<p>Detección de exosomas mediante la conjugación de un anticuerpo fluorescente contra un antígeno de superficie del mismo que al pasar por un haz de láser focalizado este los excita y los revela.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Alto rendimiento • Ayuda a la cuantificación de las partículas • Revela múltiples características celulares (tamaño, granulosidad) • Identifica simultáneamente varias poblaciones celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Instrumentos con límites de detección • Mala interpretación la existencia de agregación vesicular. • Se necesita una previa inmovilización de los exosomas para poder ser revelados • Equipo costoso • Personal capacitado • Precio conocimiento de su composición proteica

Nota. Adaptado de (Doyle & Wang, 2019; Dragovic et al., 2011; Taylor & Posch, 2014; Y. Wu et al., 2015)

Capítulo III: Metodología

Aislamiento de exosomas

Preparación de extractos

A partir de 15, 9 y 16 oz de fruta fresca madura de tomate de árbol, naranjilla y uvilla respectivamente, se extrajo 325mL de jugo de tomate de árbol, 300mL de naranjilla y 300mL de uvilla lavando las frutas previamente. Los extractos se almacenaron a 4°C. El proceso se hizo por duplicado.

Centrifugaciones seriadas

En tubos falcón de 50mL se colocaron los extractos y PBS 1X en concentración 1:1 y se homogeneizaron por vórtex. Se realizaron centrifugaciones seriadas utilizando el sobrenadante a 400 g durante 20 minutos a 4°C, seguido de 20 minutos a 800g a 4°C y a 7600g por 40 minutos a 4°C. El pellet corresponde a las microvesículas que fueron resuspendidas en 500uL de PBS 1X y se almacenaron a -20°C para posterior análisis.

El sobrenadante se sometió a un gradiente de filtración por filtros de 1.1um (Thermo Scientific 722-2000), 0.45um (Whatman 6780–2504) y 0.22um (Syringe SPE-22-030). El sobrenadante filtrado se almacenó a -20 °C.

Purificación mediante columna de exclusión de tamaño (SEC)

La columna qEVOoriginal (iZON Science) se equilibró con 10mL de PBS 1X, se añadió 2mL del sobrenadante y 5mL más de PBS 1X e inmediatamente se recolectó alrededor de 20 fracciones de 0,5mL cada una sin dejar que se seque la columna. Se procedió a concentrar las fracciones utilizando tubos Amicon de 100kDa (Amicon® Ultra-4 10K device - 10,000 MWCO). La concentración de proteínas de todas las fracciones se cuantificó en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Las muestras concentradas se guardaron a -20°C.

Purificación de exosomas por kit

A 1mL de sobrenadante se añadió 500uL del reactivo del kit Total Exosome Isolation (from other body fluids) (Invitrogen™ 4484453), se homogeneizó y se dejó 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 10000g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó 5 minutos a 10000g. El pellet se resuspendió en 125uL de PBS 1X y se cuantificó en el nanodrop. Las muestras se guardaron a -20°C.

Cuantificación de proteínas mediante Bradford

La concentración de proteínas de las muestras se cuantificó utilizando el reactivo de ensayo de proteína Coomassie (Bradford) (Thermo Scientific 23200). En una placa de 96 pocillos se preparó la gamma de proteína estándar BSA y se colocaron 5uL de cada muestra y el blanco (PBS 1X). Se añadió 250uL del reactivo Bradford a todos los pocillos y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 595 nm en el espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific™ Cat N° N10588) y se calculó la absorbancia neta (NET A562nm) (Ecuación 1) restando la absorbancia del blanco para determinar la concentración de proteínas en ug/mL a partir de la curva estándar (Ecuación 2) tomando en cuenta el factor de dilución de ser el caso (Ecuación 3 y 4).

$$NET A_{595} = A_{595_{muestra}} - A_{595_{blanco}} \quad \text{Ec. 1}$$

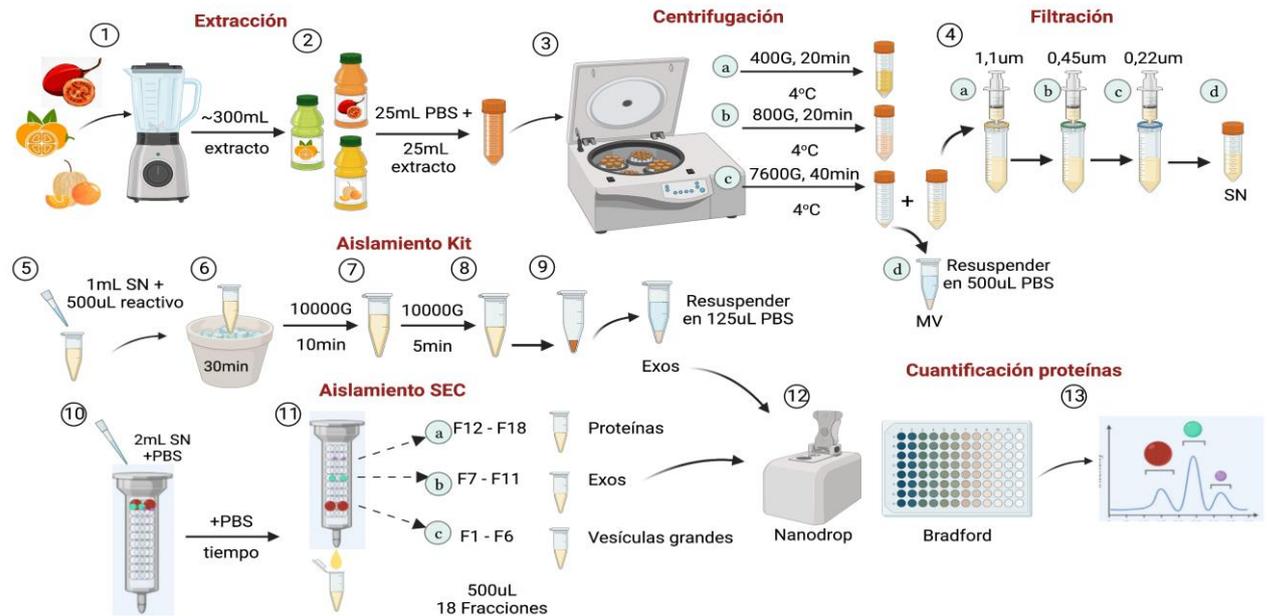
$$NET A_{595} = a \times [\text{Proteína}] + b \quad \text{Ec. 2}$$

$$FD = \frac{\text{Volumen total}}{\text{Volumen de muestra}} \quad \text{Ec. 3}$$

$$[\text{Proteína}] = [\text{Proteína}]_{calculada} \times FD \quad \text{Ec. 4}$$

Figura 6

Aislamiento de exosomas



Nota. Elaboración propia en Biorender

Caracterización de exosomas

Caracterización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se colocó 10 µL de las muestras de exosomas obtenidos sobre el mesh de cobre (TED PELLA INC, No. 01753-F) y se dejó absorber durante 1 minuto, con papel filtro se retiró el exceso. Posteriormente se fijaron con 10 µL de acetato de uranilo al 2% durante 10 segundos. Se retiró nuevamente el excedente con papel filtro, se lavó tres veces con agua destilada y se dejó secar la muestra para su observación en el TEM (FEI - Tecnai Spirit Twin, 120kV) a una resolución de 200nm y 500nm.

Las imágenes se analizaron en el programa ImageJ.

Caracterización de exosomas mediante Western Blot (WB)

Para el Western Blot (WB) en primer lugar se realizó una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Se utilizaron una proteína control (IgY) y alícuotas de las muestras de exosomas, cuyo volumen fue

calculado tomando en cuenta la concentración de proteínas de cada una para una cantidad de 50ug de proteína y un volumen final de 25uL (Ecuación 5).

$$V_{alicuota} = \frac{V_{muestra}(uL) \times Cantidad\ de\ proteina\ (ug)}{(Proteina)(ug)} \quad Ec. 5$$

Las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes/reductoras, para lo cual se les agregó buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, SC24948) en concentración 1:5 y se mezclaron 5 minutos por vórtex, y se añadió buffer de carga 4X 1:1. Las muestras se sometieron a un proceso de shock térmico incubando a 95°C, después de 5 minutos se colocaron inmediatamente en hielo.

Para la electroforesis vertical se utilizó el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad 1658004). Se elaboraron dos geles de poliacrilamida 4-10%, uno para la verificación de la presencia de proteínas en el gel después de la electroforesis y el otro para la transferencia de proteínas a una membrana. El gel de separación (lower) se preparó al 10% y el gel de concentración (upper) al 4% en placas de vidrio aseguradas con sujetadores sobre la matriz de polimerización. Se cargaron 25uL de las muestras en cada pocillo y 3uL del marcador de peso molecular para proteínas (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad) y se dejó correr el gel a 120V.

El gel de separación se sumergió en solución de tinción azul de Coomassie (Bio-Rad 0,5% con metanol 25% y ácido acético glacial 50%) e incubó durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Después se removió el colorante con solución de lavado mediante sucesivos lavados en agitación. Se verificó la presencia de proteínas en el gel en el fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad 12003154).

El otro gel de separación se sumergió en buffer de transferencia Towbin durante 10 minutos, se humedecieron seis piezas de papel Whatman y una membrana de PVDF en el buffer y se ensambló el sandwich de transferencia en el cassette. Para

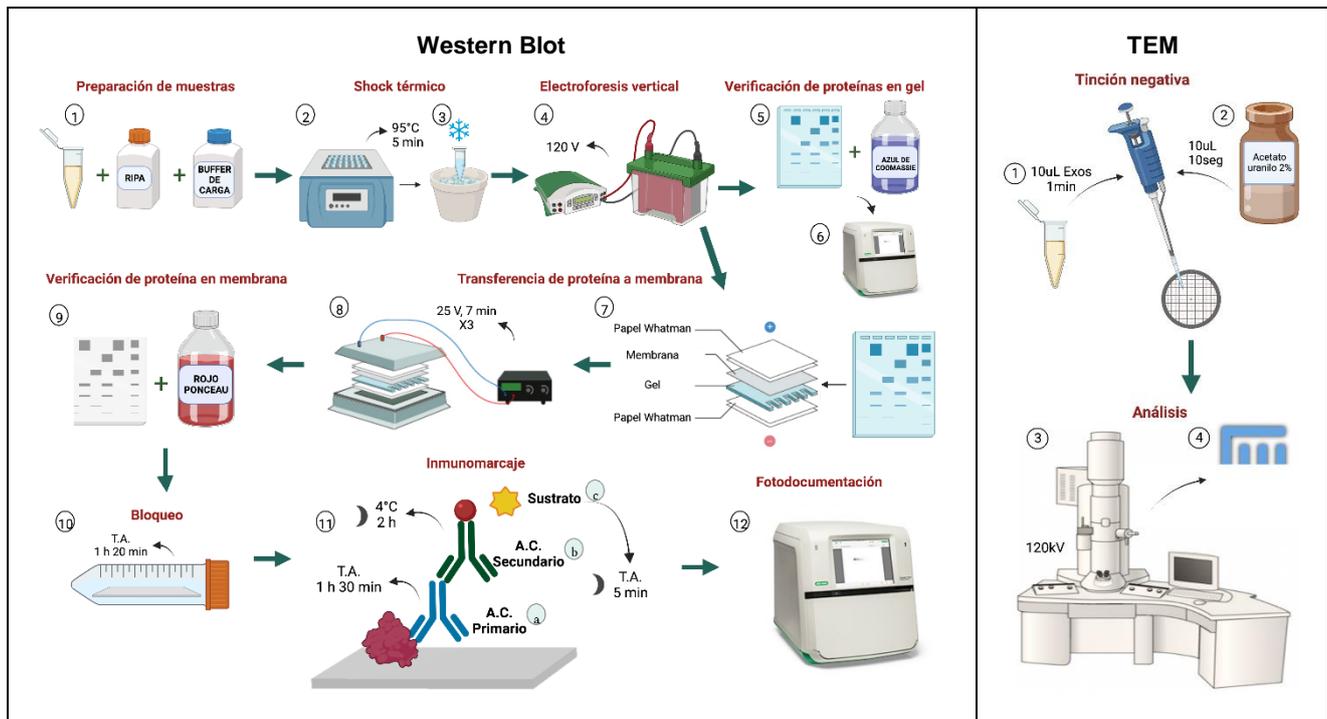
transferir las proteínas a la membrana de PVDF se colocó el cassette en el equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad 1704155) durante 3 ciclos de 7 minutos a 25V.

Se lavó la membrana en buffer TBS 1X durante 10 minutos en agitación y se incubó a 4°C con solución de bloqueo durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron seis lavados de 10 minutos en agitación con buffer TTBS. Se incubó la membrana en solución de anticuerpo primario: anti-Alix 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, sc-53540), anti-CD81 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-166029), anti-CD63 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5275) durante dos horas a temperatura ambiente, seguido de cinco lavados de 10 minutos en agitación con buffer TTBS. La membrana se incubó por dos horas en oscuridad con anticuerpo secundario GAM-HRP 1:15000 (Bio-Rad, 170-5047), seguido de seis lavados de 10 minutos en agitación con buffer TTBS. La membrana se colocó dentro de un protector plástico, se cubrió toda la membrana con la solución de sustrato preparada con el kit Clarity ECL Western Substrate (Bio-Rad 1705060) y se dejó 5 minutos en oscuridad. Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia con el escáner de membranas del ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad 12003154).

Las imágenes de los geles y membranas se analizaron con el programa Image Lab (Biorad).

Figura 7

Caracterización de exosomas



Nota. Elaboración propia en Biorender

Determinación de la citotoxicidad

Ensayo de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT)

La citotoxicidad de los exosomas, microvesículas y sobrenadante se determinó mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2- H - tetrazolio) sobre tres líneas celulares: HeLa (células cancerígenas de cuello uterino), HEK293T (células de riñón embrionario humano) y HFF (fibroblastos humanos) durante 24 y 48 horas. Las células de HFF se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 15% de SBF, y las HEK y HeLa en medio EMEN con 10% de SBF.

Se acondicionó el medio respectivo y la tripsina a 37°C en baño María, se vació el flask con células y lavó dos veces con PBS 1X, se agregó 2mL de tripsina 1% e incubó a 37°C hasta que se levanten las células adheridas a la base del flask (6 minutos HFF, 3 minutos HEK y 8 minutos HeLa aproximadamente). Se lavó nuevamente dos veces con PBS 1X, se colocó 2mL de medio y se recogió todo el contenido en un tubo falcon de 15mL. Se centrifugó 5 minutos a 1200g HFF y a 1500g HEK y HeLa, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 4mL de medio.

Se hizo el conteo celular mezclando 10uL del medio con células y 90uL de azul de tripan y se colocó en la cámara de Neubauer para contabilizar las células vivas (Ecuación 8) y calcular el volumen de células necesario para el ensayo para 10000 células por pocillo. En una canaleta se colocó el volumen de células (Ecuación 9) y de medio calculado (Ecuación 10) y con ayuda de una micropipeta multicanal se colocó 100uL en cada pocillo en una placa P96 y se dejó a 37°C hasta el día siguiente. Una vez que las células se han sembrado, se colocaron los controles: CoCl₂, DMSO y tratamientos: exosomas, microvesículas y sobrenadante para 5 y 20ug/mL según el plan de placa y se incubó a 37°C. Transcurrido el tiempo de ensayo (24 y 48 horas), se colocó en todos los pocillos 10uL de MTT (5mg/mL) protegido de la luz y 4 horas después 100uL de SDS al 10% con HCl al 1% y se dejó incubar a 37°C. Se midió la absorbancia de las placas con el espectrofotómetro Multiskan GO a 570nm luego de 24 horas de haber colocado el MTT en cada caso. El porcentaje de viabilidad celular se expresó a partir de las absorbancias.

$$\# \text{ cel plaqueo} = \# \text{ placas} \times \text{ pocillos} \times \# \text{ cel/pocillo} \quad \text{Ec. 6}$$

$$V_{\text{plaqueo}} = \# \text{ placas} \times \# \text{ pocillos} \times V/\text{pocillo} \quad \text{Ec. 7}$$

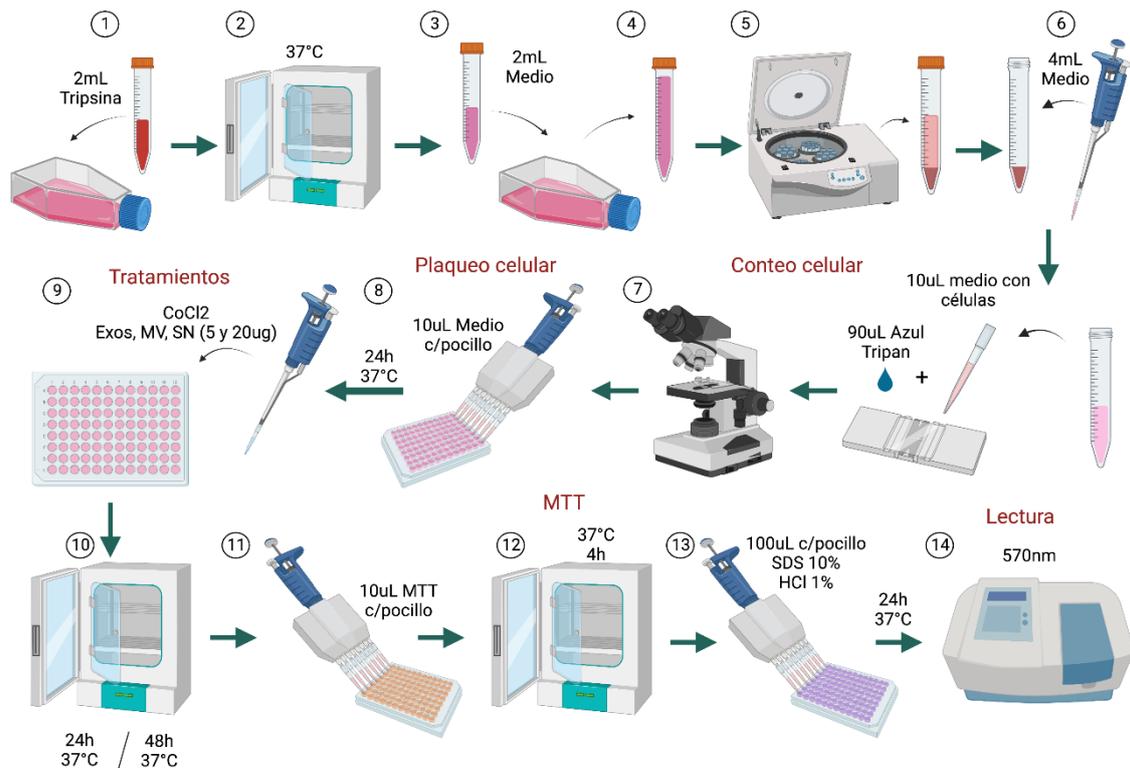
$$\# \text{ cel contadas} = \frac{\# \text{ células}}{\# \text{ cuadrantes}} \times \frac{1}{\text{Factor } V_{\text{camara}}} \times \frac{1}{FD} \times V_{\text{cel resuspendida}} \quad \text{Ec. 8}$$

$$V_{\text{cel}} = \frac{V_{\text{cel resuspendidas}} \times \text{cel plaqueo}}{\# \text{ cel contadas}} \quad \text{Ec. 9}$$

$$V_{\text{medio}} = V_{\text{plaqueo}} - V_{\text{cel}} \quad \text{Ec. 10}$$

Figura 8

Determinación de la citotoxicidad mediante MTT



Nota. Elaboración propia en Biorender

Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de viabilidad obtenidos tras el ensayo MTT se expresaron como medias \pm SEM y se realizó un ANOVA de tres vías, seguido de Duncan post hoc utilizando el paquete de software estadístico InfoStat. Se consideró como diferencias significativas valores $*p < 0,10$.

Capítulo IV: Resultados

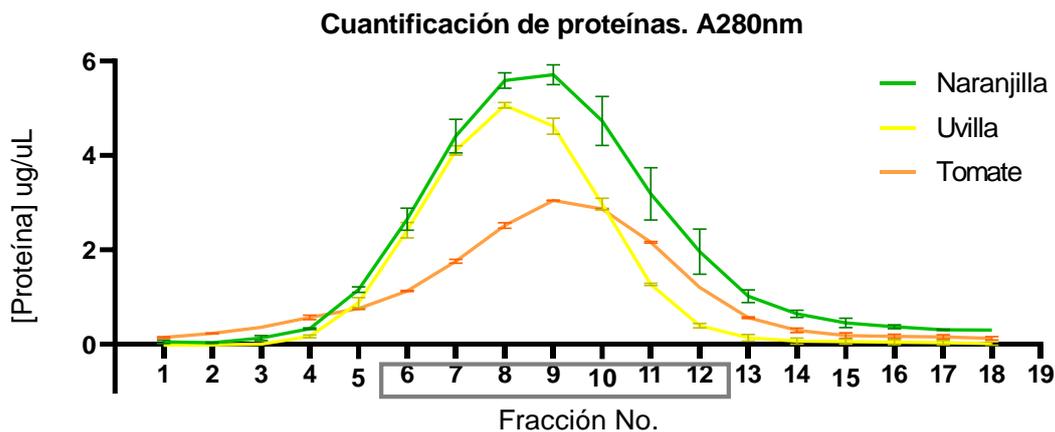
Caracterización de exosomas

Aislamiento de exosomas

Por el método de columna de exclusión de tamaño se recolectaron 18 fracciones de 500uL cada una. La cantidad de proteínas de las fracciones que contienen exosomas aislados mediante columna de exclusión de tamaño (SEC) se obtuvo por espectrofotometría a una absorbancia de longitud de onda de 280nm. Las concentraciones más altas de proteínas (2,416 – 5,922 ug/uL) pertenecen a naranjilla en las fracciones 6-11 y las más bajas (1,109 – 3,051 ug/uL) a tomate de árbol en F6 - F12. La uvilla presentó en F6 – F10 concentraciones medias entre 2,250 y 5,123 ug/uL (fig. 9).

Figura 9

Cuantificación de proteínas por espectrofotómetro. A280nm



Nota. Concentración de proteínas en ug/mL de 18 fracciones separadas por SEC. En las fracciones F6 - F12 se encuentran los exosomas. Los valores se presentan como medias \pm SEM. Realizado en GraphPad

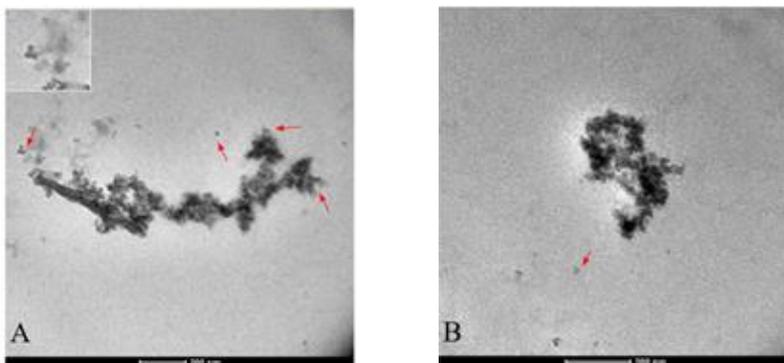
Caracterización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

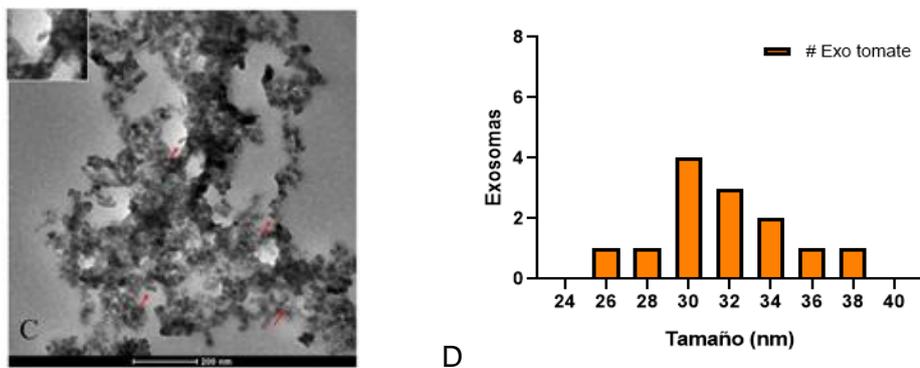
Las imágenes obtenidas mediante TEM de las muestras de exosomas purificados por SEC y kit de aislamiento, permitieron identificar a los exosomas como pequeñas partículas esféricas alargadas con fondo negro y un borde blanco que indica la presencia de una bicapa lipídica.

Se analizaron 3 imágenes de tomate de árbol, 7 de naranjilla y 5 de uvilla obteniendo un rango de diámetro de partícula entre 25-35nm, 32-110 nm y 30-69 nm en tomate de árbol, naranjilla y uvilla respectivamente. En las figuras 10D, 11E y 12E están representados los histogramas de distribución de frecuencia de los tamaños para cada fruta. Los exosomas de tomate de árbol representan a los más pequeños comparados con el resto de frutas, la mayoría tenían un tamaño de 30nm (fig. 10); mientras que en los exosomas de naranjilla la moda fue de 40nm, a excepción de un único exosoma que mide 110nm, siendo este el más grande de todas las frutas (fig.11). En el caso de la uvilla la mayoría de exosomas tenían un diámetro de 35nm, además de dos exosomas de 70nm y uno de 60nm (fig. 12).

Figura 10

Observación de exosomas de tomate de árbol por TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 2% a 120kV

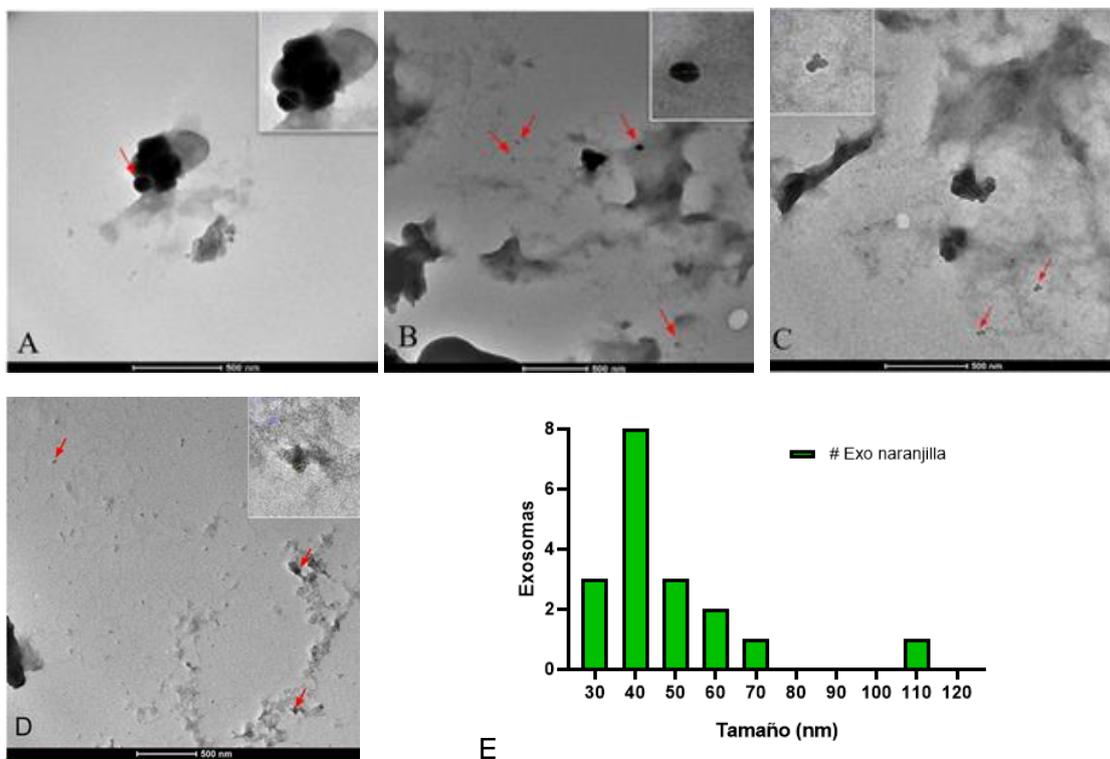




Nota. A – C) Exosomas aislados por SEC. Resolución 200nm. Imágenes analizadas en ImageJ D) Histograma de distribución de frecuencia de los tamaños de exosomas observados. Realizado en GraphPad

Figura 11

Observación de exosomas de naranjilla por TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 2% a 120kV

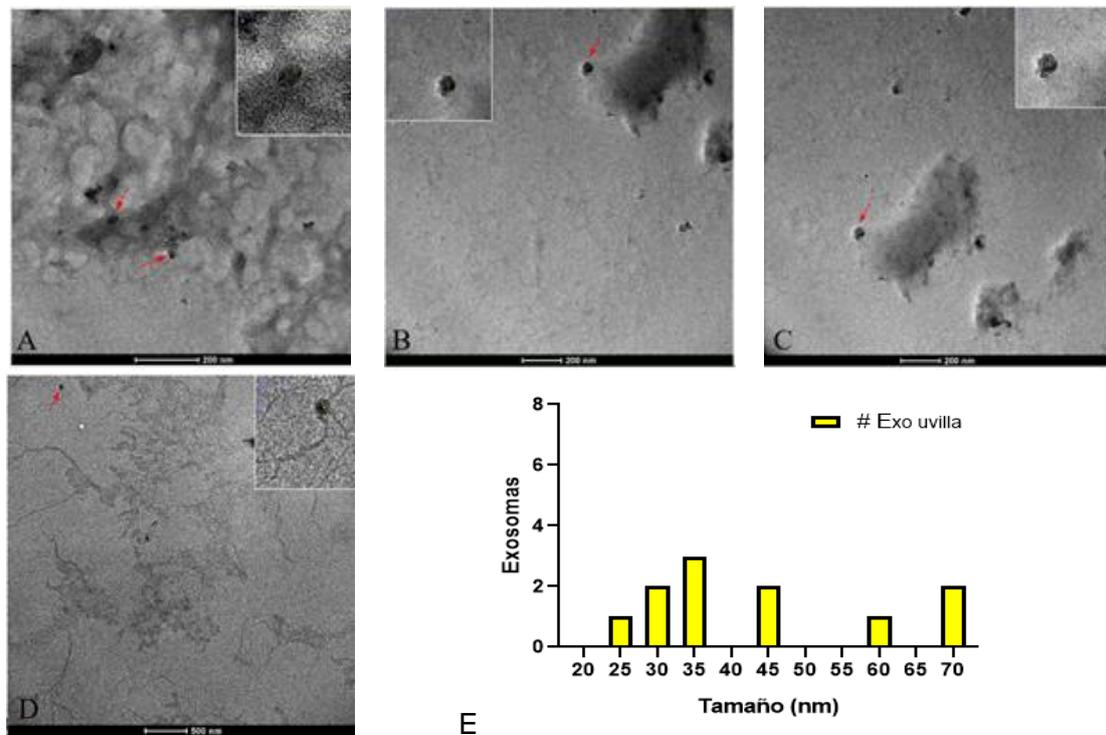


Nota. A – C) Exosomas aislados por SEC. Resolución 500nm D) Exosomas aislados por kit. Resolución 500nm. Imágenes analizadas en ImageJ E) Histograma de

distribución de frecuencia de los tamaños de exosomas observados. Realizado en GraphPad

Figura 12

Observación de Exosomas de uvilla por TEM con tinción negativa de acetato de uranilo al 2% a 120kV.



Nota. A – C) Exosomas aislados por SEC. Resolución 200nm. D) Exosoma aislado por kit. Resolución 500nm. Imágenes analizadas en ImageJ D) Histograma de distribución de frecuencia de los tamaños de exosomas observados. Realizado en GraphPad

Análisis del perfil proteico

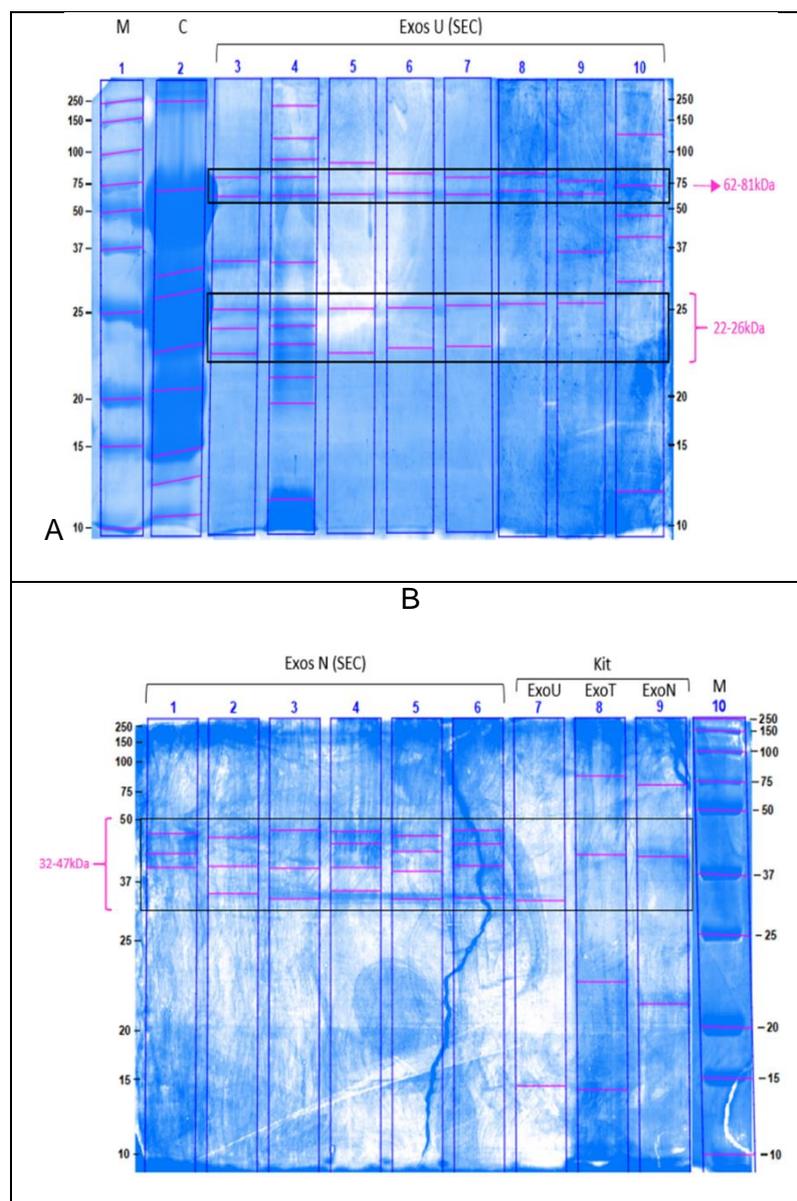
Electroforesis vertical

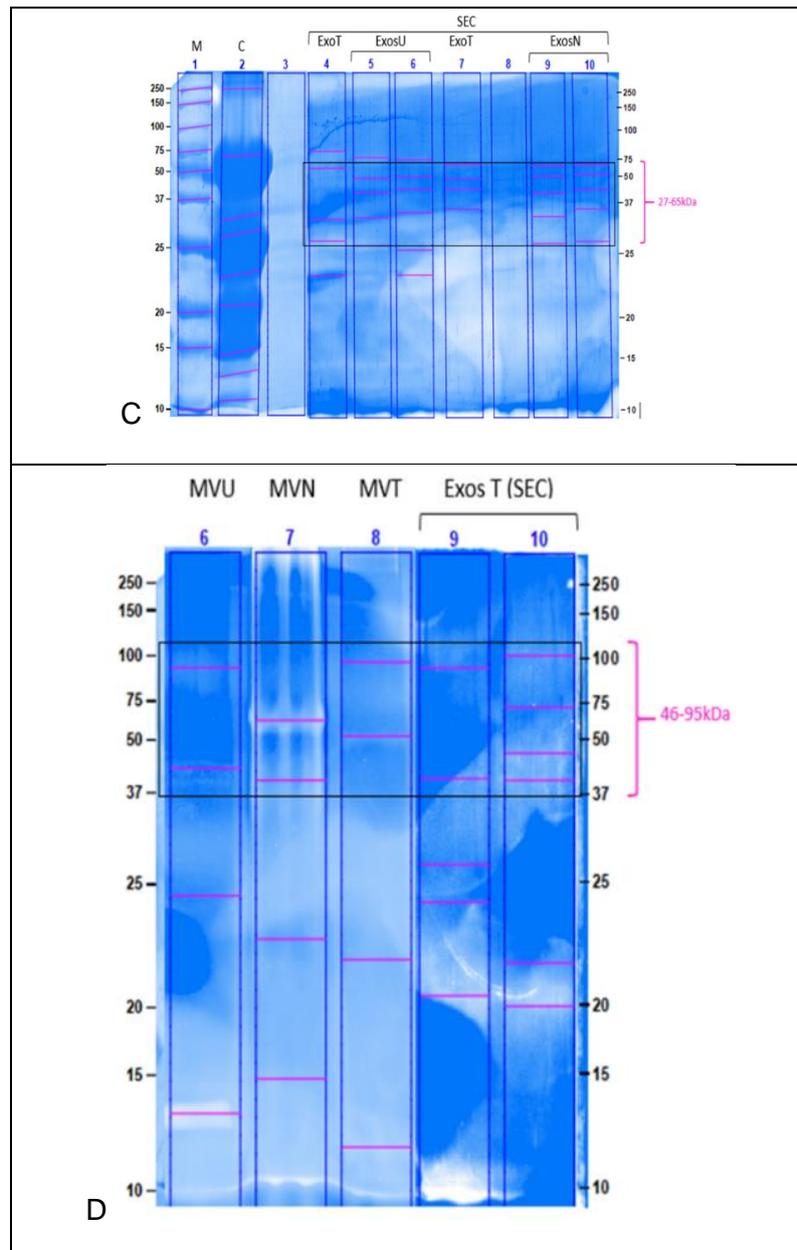
Las proteínas extraídas de las muestras de microvesículas y exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla se separaron con SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie Blue para analizar el perfil proteico. Según el resultado de la tinción del gel, se distinguen bandas de peso molecular similar en la parte superior y media del gel para los exosomas de uvilla aislados por SEC, de 62-81 kDa y 22-26 kDa

respectivamente (fig. 13A). Para los exosomas de naranjilla aislados igualmente por SEC se observan bandas semejantes con un tamaño de 32-47kDa, rango para el que también se evidencia una banda en los exosomas aislados por kit de las tres frutas (fig. 13B). Los exosomas de tomate de árbol aislados por SEC presentan bandas similares entre 46 y 95 kDa junto con las microvesículas de las tres frutas (fig. 13D). Los exosomas aislados por SEC de las tres frutas tienen el mismo perfil entre 27 y 65 kDa (fig. 13C).

Figura 13

Perfil proteico de exosomas aislados por SEC y kit

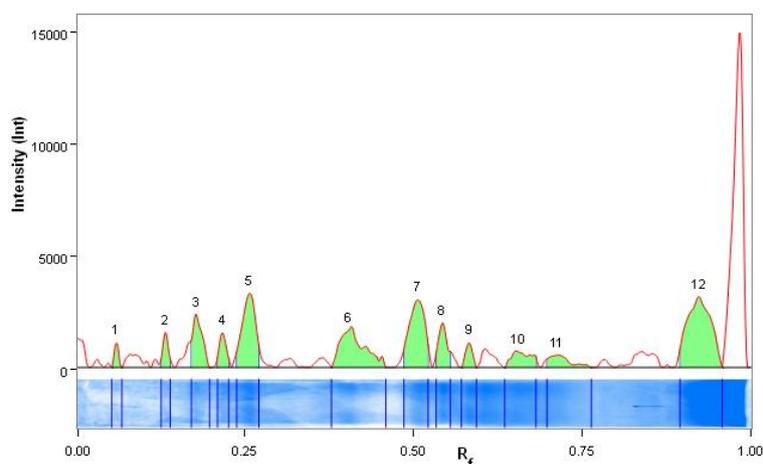




Nota. A-D) Geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes/reductoras con tinción Coomassie Blue. MV: microvesículas, Exo: exosomas, T: tomate de árbol, N: naranjilla, U: uvilla, M: marcador de peso molecular, C: control (IgY)

Figura 14

Análisis densitométrico de los geles de electroforesis



Nota. Picos de intensidad de las bandas del gel fig.13A correspondiente a exosomas de uvilla aislados por SEC. Analizado en ImageLab

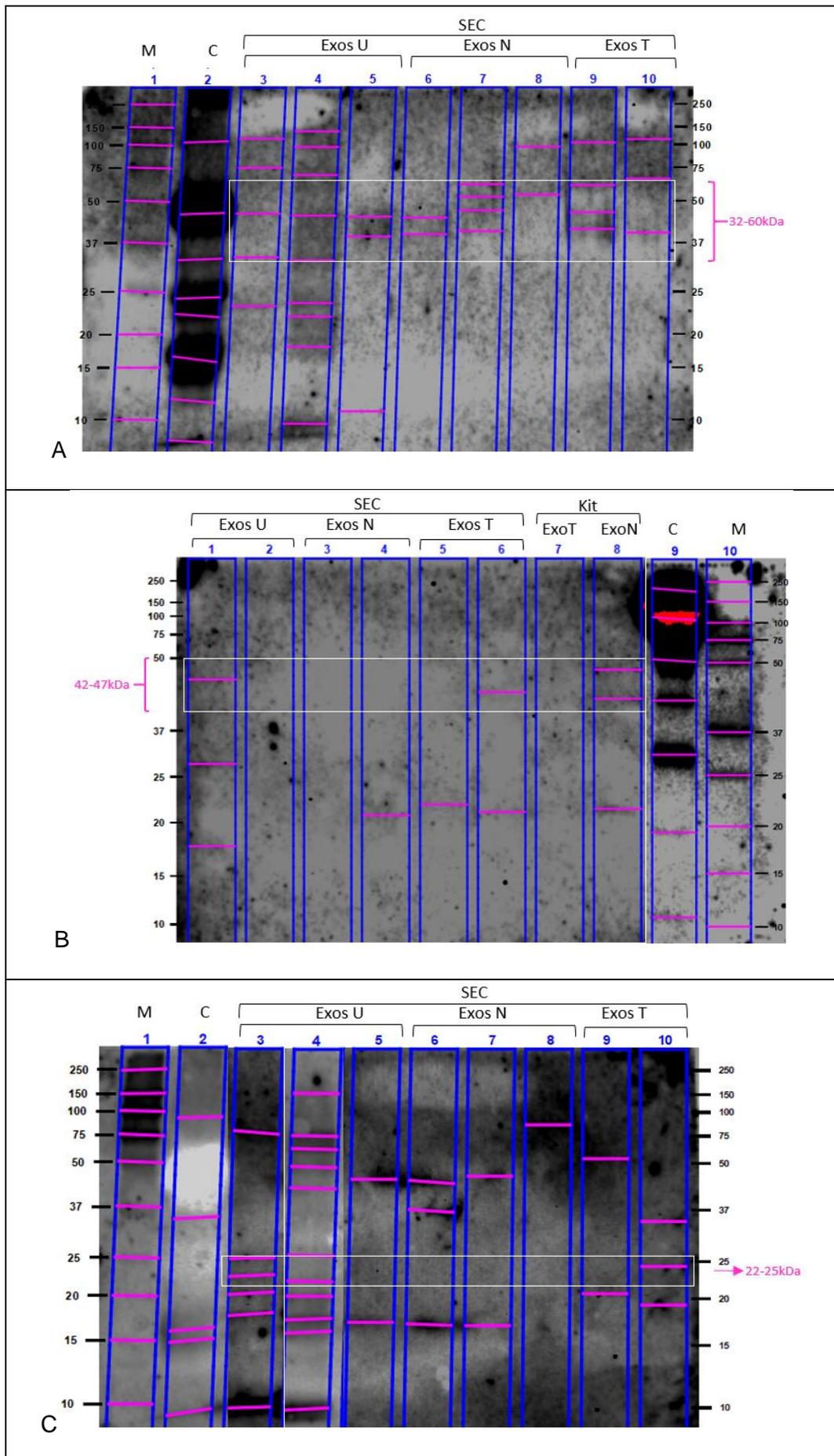
Western Blot (WB)

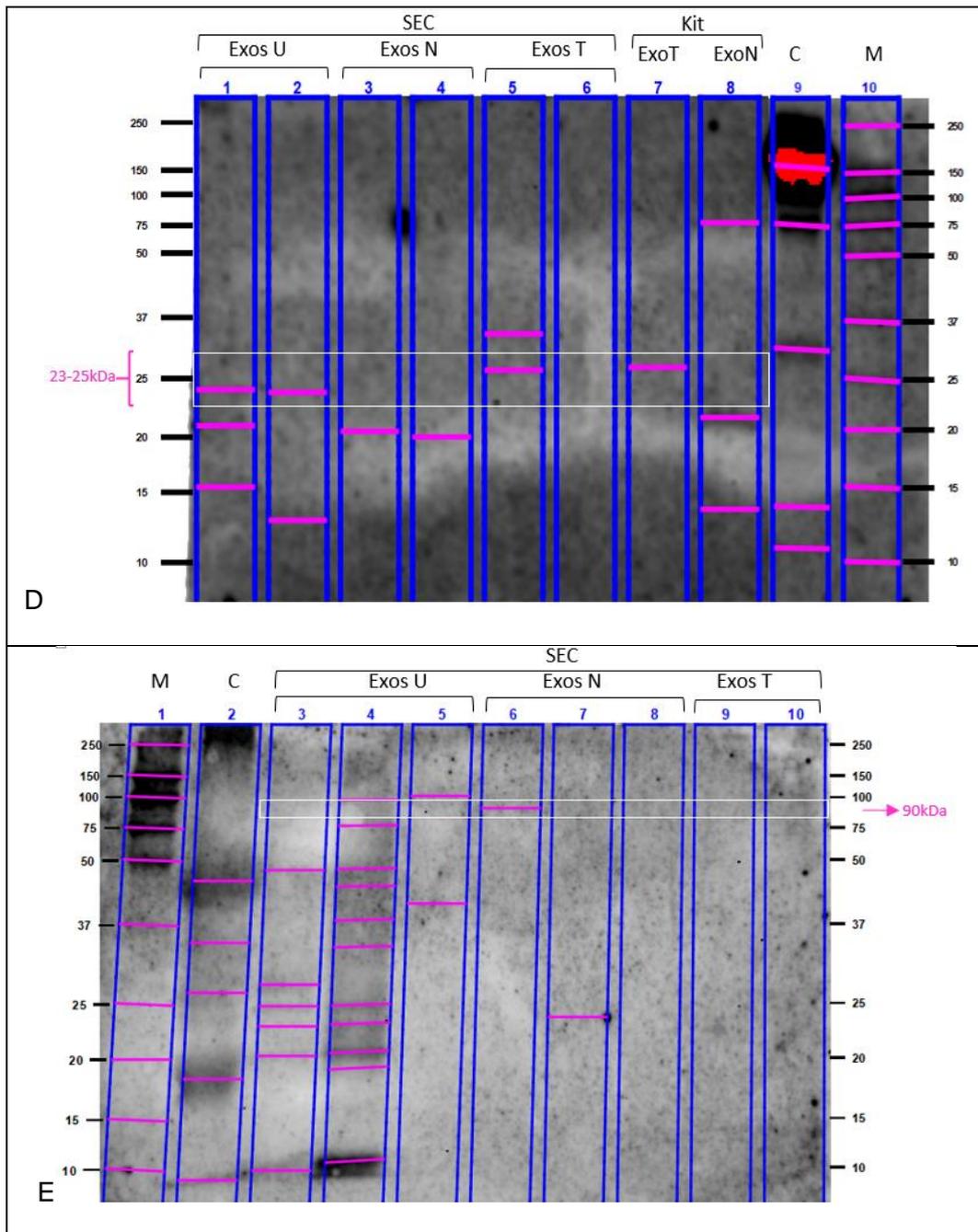
La expresión de proteínas exosomales se examinó mediante inmunodetección para diferentes marcadores exosomales. Según el tamaño ya conocido de las proteínas CD63 (30-60kDa) (Santa Cruz Biotechnology, s. f.-b), CD81 (22-26kDa) (Santa Cruz Biotechnology, s. f.-c) y Alix (90kDa) (Santa Cruz Biotechnology, s. f.-a), se determinó qué muestras presentaban las proteínas mencionadas mediante el análisis de las membranas de PVDF en ImageLab.

De acuerdo al Western Blot se detectó la presencia de las proteínas CD63 y CD81 en los exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla aislados por SEC con un tamaño de 32-60 kDa y 22-25 kDa respectivamente. La proteína Alix se identificó únicamente en los exosomas de naranjilla (90 kDa) (fig. 15)

Figura 15

Western Blot de exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla

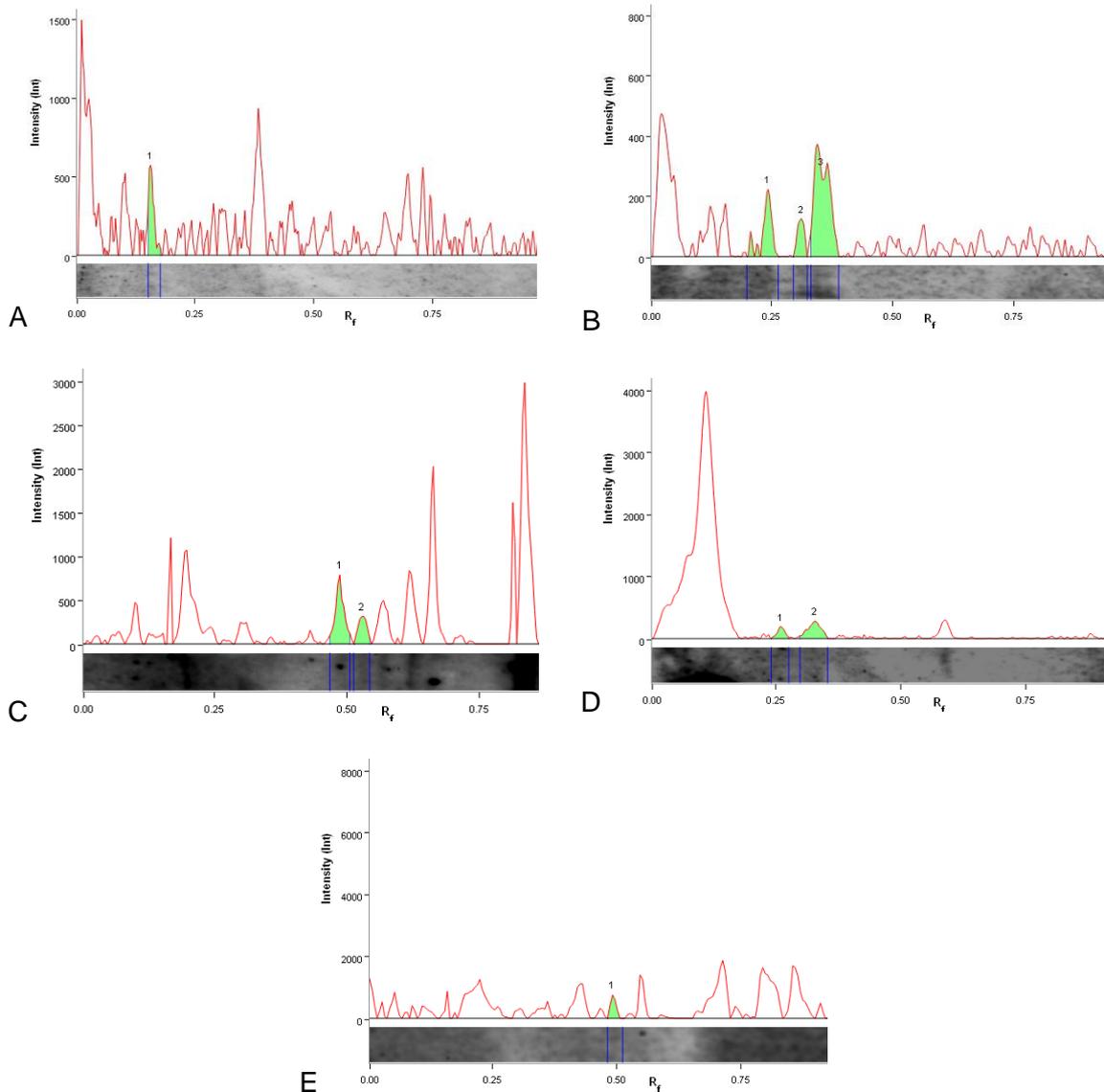




Nota. Detección de A) CD63 B) CD63 C) CD81 D) CD81 y E) Alix en membrana PVDF. Exo: exosomas, T: tomate de árbol, N: naranjilla, U: uvilla, M: marcador de peso molecular, C: control (IgY).

Figura 16

Análisis densitométrico de las membranas de Western Blot



Nota. Picos de intensidad de las bandas detectadas en el A) carril 6 de la membrana fig. 15E correspondiente a Exos de naranjilla marcados con Alix, B) carril 9 de la membrana fig. 15A correspondiente a Exos de tomate de árbol marcados con CD63, C) carril 3 de la membrana fig. 15C correspondiente a Exos de uvilla marcados con CD81 D) carril 8 de la membrana fig. 15B correspondiente a Exos de naranjilla marcados con CD63 E) carril 5 de la membrana fig. 15D correspondiente a Exos de tomate de árbol marcados con CD81. Elaborado en ImageLab

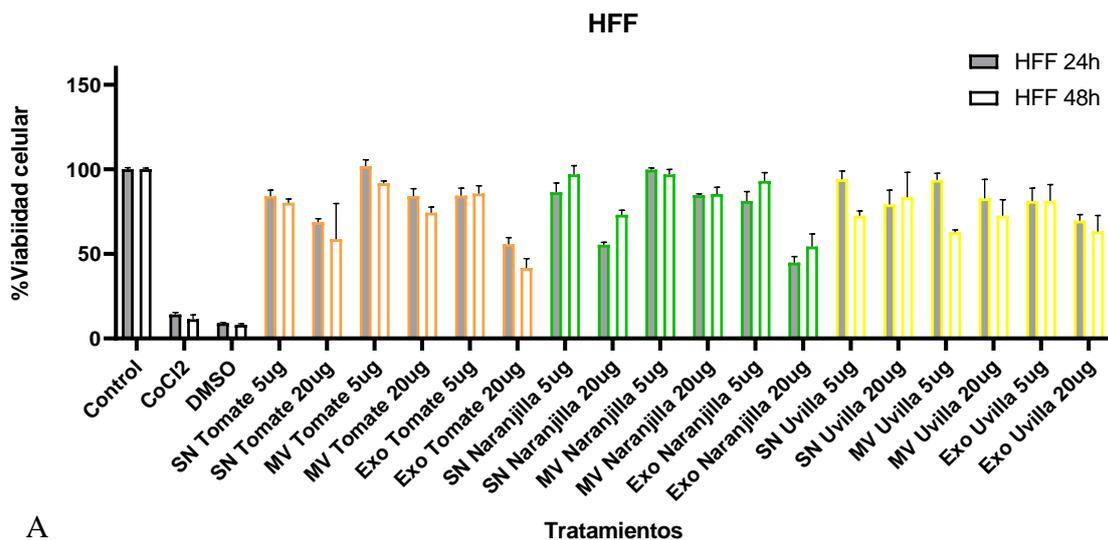
Determinación de la citotoxicidad

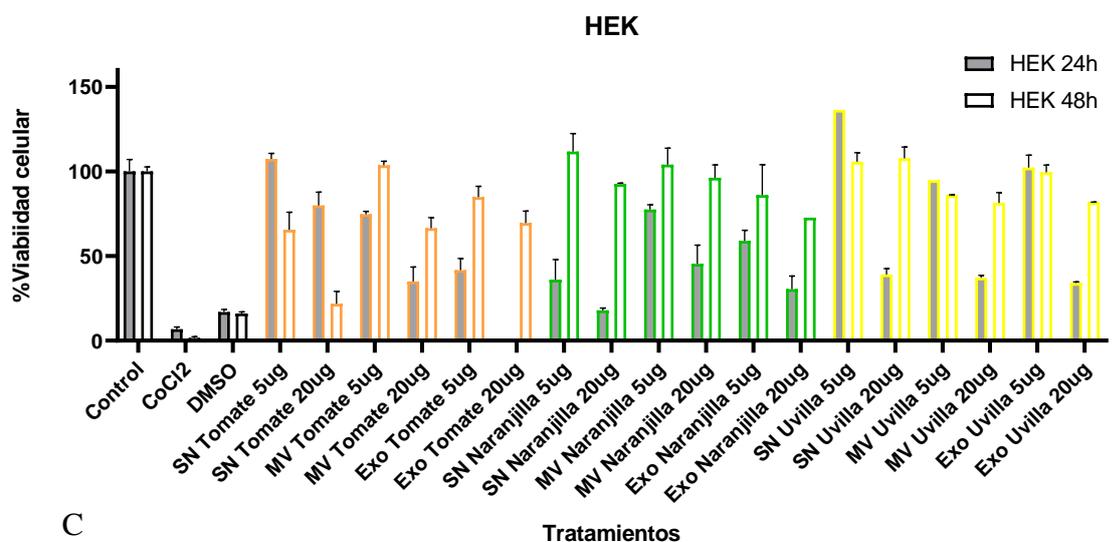
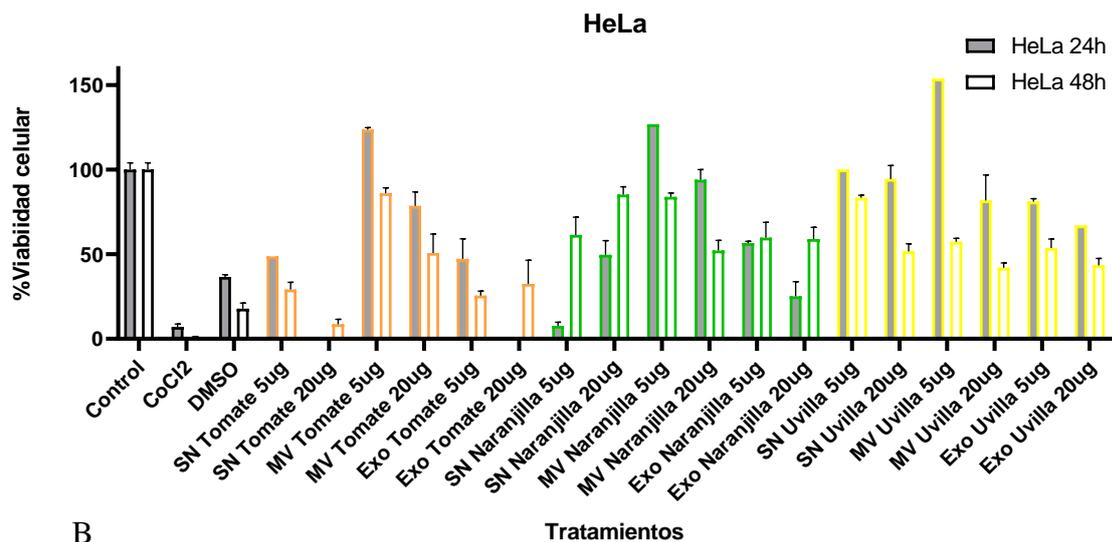
Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT)

La viabilidad celular inducida por dos diferentes concentraciones (5 y 20ug) de sobrenadantes (5-8ug/uL), microvesículas (9-12ug/uL) y exosomas (3-6ug/uL) de tomate de árbol, naranjilla y uvilla se estudió en tres líneas celulares: HFF, HeLa y HEK a 24 y 48 horas con dos repeticiones. Se observa que el CoCl₂ y DMSO, usados como controles negativos, ciertamente reducen la viabilidad celular, siendo el CoCl₂ el más efectivo para generar apoptosis de células HEK y HeLa. También analizando únicamente las dos concentraciones en todas las líneas celulares se demostró que 20ug produce menos viabilidad (fig. 17).

Figura 17

Ensayo de viabilidad celular mediante MTT tras 24 y 48 horas de exposición de 5 y 20ug de sobrenadantes, microvesículas y exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla





Nota. A) HFF B) HeLa y C) HEK. El color tomate representa tomate de árbol, verde: naranjaJilla y amarillo: uvilla. Control: medio de cultivo con las células correspondientes, CoCl₂: cloruro de cobalto, DMSO: dimetilsulfóxido, SN: sobrenadante, MV: microvesículas, Exo: exosomas.

El ANOVA muestra que el tratamiento y la concentración por separado son significativos con un nivel de confianza del 90%, al igual que el efecto de la interacción entre ambos factores, indicando que la cantidad de variación con la que ambos elementos contribuyen a la respuesta de viabilidad celular depende tanto del tipo de

tratamiento como concentración del mismo; a excepción de los datos obtenidos en las células HFF 24h y HEK 48h que muestran que la combinación entre tratamiento y concentración no es muy significativa ($p=0.2$).

El análisis estadístico de la prueba de Duncan indica que en promedio el porcentaje de viabilidad celular de los tratamientos con una letra común son parecidas, lo cual implica que no son significativamente diferentes ($p>0,10$). Por el contrario, aquellos tratamientos que se muestran con letras diferentes no guardan similitud entre sus medias considerando la variable de concentración; por lo tanto, existen diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos. Para las células HFF la mejor viabilidad celular en 24 horas la presentan los tratamientos que conforman el grupo F, siendo estas las microvesículas de tomate de árbol y de uvilla de 5ug, las microvesículas de naranjilla de 5 y 20ug, y los sobrenadantes de uvilla y naranjilla de 5ug; es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos, aunque 5ug de las microvesículas de tomate de árbol suponen la mayor proliferación (101%) (fig. 18A). Las células HFF proliferan más a las 48 horas cuando están expuestos a 5ug de las muestras de naranjilla sean estas sobrenadantes, microvesículas o exosomas y también con 5ug de microvesículas de tomate de árbol (91-97%) (fig. 18B)

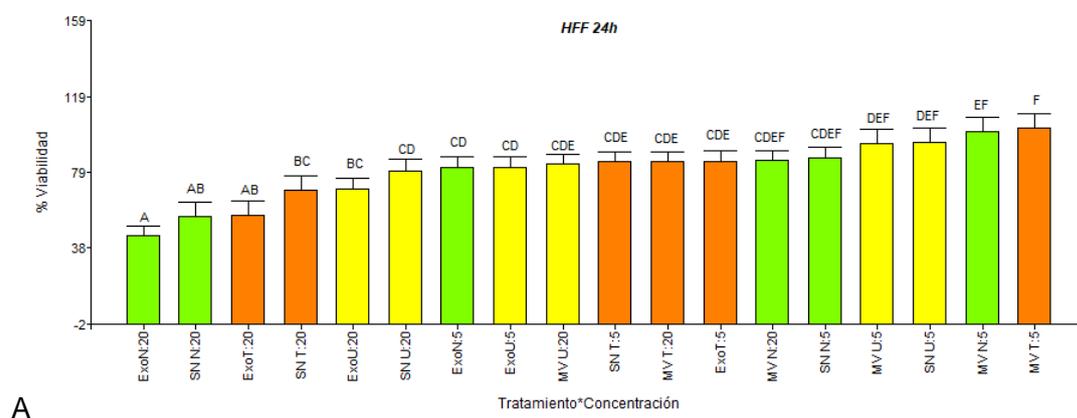
En las células HeLa el tratamiento que produce mayor citotoxicidad; es decir menor viabilidad celular, a las 24 horas de exposición son los exosomas y sobrenadante de tomate de árbol a 20ug, junto con el sobrenadante de naranjilla a 5ug; contrario a las microvesículas de tomate de árbol y naranjilla a 5ug con las que se obtuvo la mayor viabilidad 123 y 126% respectivamente (fig. 18C). A las 48 horas se obtuvo que el mejor tratamiento para proliferación celular de HeLa es 5ug de las microvesículas de tomate de árbol (86%), seguido de 20ug del sobrenadante de naranjilla (85,32%), y 5ug de microvesículas de naranjilla (84%) y sobrenadante de

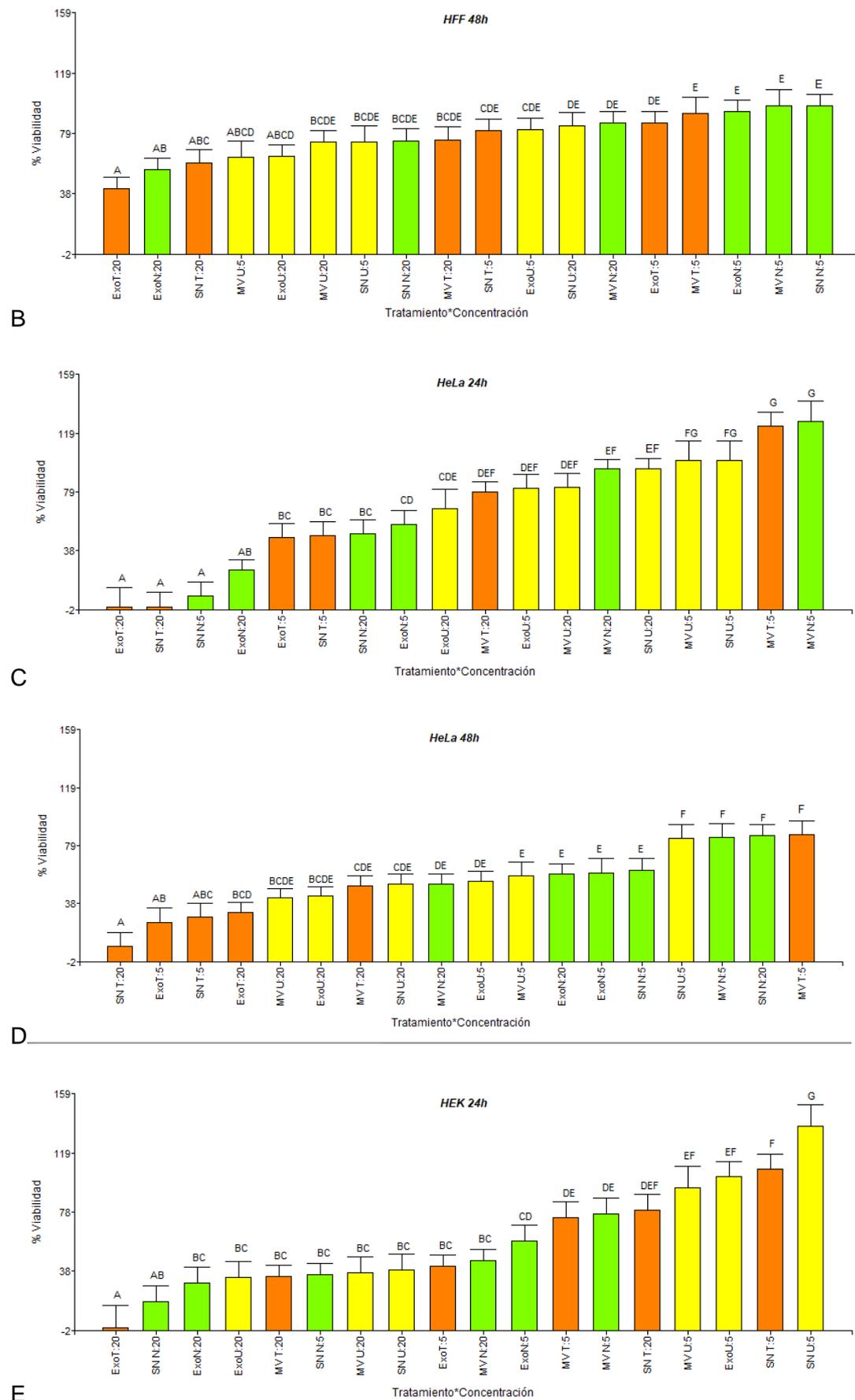
uvilla (83,38%); mientras que 20ug del sobrenadante de tomate de árbol inhibe su crecimiento hasta el 8,66% (fig. 18D).

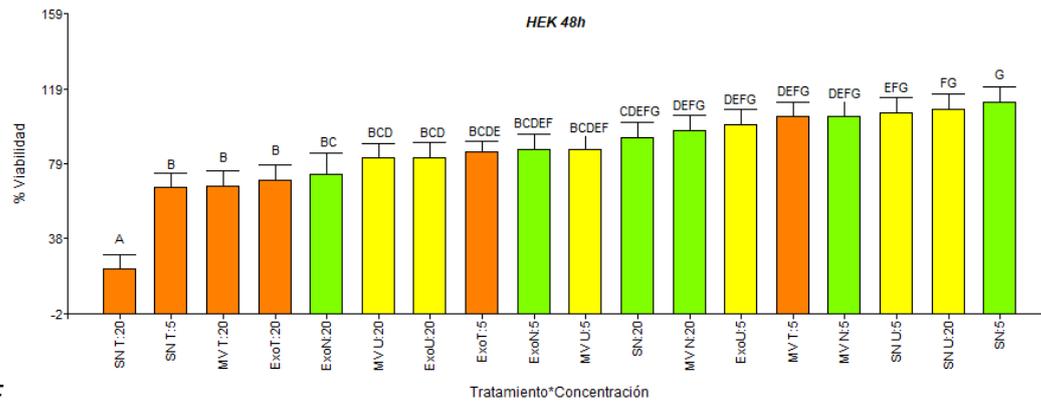
Las células HEK aumentan su viabilidad celular a las 24 horas cuando están bajo la influencia de 5ug o 20ug de sobrenadante de tomate de árbol y 5ug de sobrenadante, exosomas o microvesículas de uvilla. El mayor porcentaje de viabilidad se obtuvo con el sobrenadante de uvilla (136,52%) (fig. 18E). A las 48 horas el sobrenadante de naranjilla (5ug), al igual que el sobrenadante de uvilla (5 y 20ug), las microvesículas de naranjilla y tomate de árbol (5ug), los exosomas de uvilla (5ug), y las microvesículas y sobrenadante de naranjilla (20ug) son estadísticamente iguales; es decir, todos estos tratamientos pueden proporcionar una viabilidad similar ($\pm 100\%$) (fig. 18F).

Figura 18

Comparación de viabilidad celular entre concentraciones de 5 y 20ug de sobrenadantes, microvesículas y exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla







F

Nota. A) HFF a 24h B) HFF a 48h C) HeLa a 24h D) HeLa a 48h E) HEK a 24 F) HEK a 48h de exposición. Los valores se presentan como medias \pm SEM. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f, g) en una misma barra muestran diferencias significativas en la viabilidad celular entre cada tratamiento, según la comparación de Duncan ($p < 0,10$). El color tomate representa tomate de árbol, verde: naranjilla y amarillo: uvilla. SN: sobrenadante, MV: microvesículas, Exo: exosomas, T: tomate, N: naranjilla, U: uvilla

Capítulo V: Discusión

Caracterización de exosomas

En los histogramas de distribución de frecuencia de los tamaños de exosomas (fig. 10-12) se observó una población homogénea en el tomate de árbol, no así en uvilla y naranjilla donde se encontró el exosoma de diámetro superior (110nm). Woith & Melzig mencionan que los tamaños de los exosomas derivados de plantas parecen ser específicos de la especie (Woith & Melzig, 2019).

La metodología SEC no discrimina entre exosomas y microvesículas del mismo tamaño (Sidhom et al., 2020), generalmente los procedimientos de aislamiento no purifican tipos específicos de vesículas extracelulares (VE) sino que producen mezclas complejas (Yáñez-Mó et al., 2015); pero la combinación con otros métodos como el de inmunocaptura podrían ayudar a identificar el subtipo de VE. El tamaño y la composición de la membrana de las VE son altamente heterogéneos dependiendo de

la fuente celular, el estado y la condición ambiental, y sus técnicas de aislamiento o enriquecimiento (Yáñez-Mó et al., 2015).

Aparte se ha visto que la célula modifica la producción de exosomas de acuerdo a sus necesidades (Doyle & Wang, 2019), en total se identificaron 18 exosomas de naranjilla, 11 de uvilla y 13 de tomate de árbol a una resolución de 200 y 500nm, sugiriendo que ciertas plantas más que otras pueden tener mejor rendimiento en la producción de exosomas a gran escala.

En el tomate de árbol no se logró observar ningún exosoma aislado por kit, probablemente porque se utilizó un kit de aislamiento para fluidos corporales, debido a que no existe aún en el mercado uno propio para extractos de plantas y como mencionan otros estudios, la biogénesis de exosomas derivados de plantas es ligeramente diferente de la biogénesis de exosomas derivados de mamíferos (J. Kim et al., 2022).

La eficiencia del método SEC se consigue a bajas velocidades lineales, por lo tanto, una disminución de la velocidad de flujo resulta en una especificidad, integridad y funcionalidad mejoradas de los exosomas aislados (Mol et al., 2017); sin embargo, necesita grandes volúmenes de partida para compensar el bajo rendimiento exosomal total (Guerreiro et al., 2018). La producción de ARNm y de proteínas de las vesículas también se ven afectadas con esta técnica (Buschmann et al., 2018). La columna utilizada para la obtención de exosomas por SEC (qEVoriginal, iZON), permite un volumen mínimo de 500uL de muestra, con lo que se obtuvieron lecturas de concentración de proteínas muy bajas por lo que se utilizó un volumen inicial de 2mL del extracto de frutas. La cuantificación de proteínas indica que las concentraciones más altas de proteína (ug/uL) se encuentran entre las fracciones 6 y 12, las mismas que corresponden a los exosomas (fig. 9). De acuerdo al protocolo de referencia, las VE eluyen en las fracciones 7, 8 y 9 con bajos niveles en las fracciones 10 y 11, las

fracciones siguientes contienen altos niveles de proteína, pero bajos niveles de vesículas (iZON, 2018).

Análisis del perfil proteico

Pocsfalvi et al. determinó que los perfiles de SDS de cuatro especies diferentes de *Citrus* fueron parecidos entre sí, pero los patrones de proteínas de microvesículas y nanovesículas fueron bastante diferentes (Pocsfalvi et al., 2018). Igualmente, en el presente estudio los exosomas de las tres frutas pertenecientes a la misma familia Solanaceae mostraron perfiles similares según el análisis de los geles de la SDS-PAGE, aunque también compartieron algunas bandas del mismo tamaño con sus microvesículas.

Las bandas débiles indican un bajo contenido de proteína, Zhang et al. encontró mediante un ensayo de perfil proteómico por UPLC-MS/MS que exosomas derivados de jengibre tenían un bajo contenido de proteína, en su mayoría proteínas del citosol, como la actina y enzimas proteolíticas, y otras pocas proteínas de membrana (M. Zhang, Viennois, et al., 2016). Las bandas más prominentes corresponden a los Exos de uvilla, que concuerda con los resultados de la cuantificación de proteínas, pues fueron los exosomas de concentración más alta después de los Exos de naranjilla (2-6ug/uL). Las colas de cometa son el resultado de la amplia distribución de tamaños de EP, aunque las vesículas más pequeñas quedan en los poros del gel y se excluyen las más grandes (Woith & Melzig, 2019).

Además, el tamaño de las bandas observadas está dentro del rango de peso molecular (kDa) esperado para los marcadores exosomales que se deseaban identificar mediante Western Blot.

Los resultados de la transferencia de proteínas de exosomas a una membrana de PVDF y su inmunomarcaje con CD81, CD63 y Alix muestran unas bandas más

claras que otras. Según Yáñez-Mó et al., el perfil proteómico depende de cómo los exosomas fueron aislados (Yáñez-Mó et al., 2015).

Western Blot es una técnica usada comúnmente en el análisis de vesículas extracelulares (VE) para demostrar la presencia de proteínas diana que se han reportado estar asociadas a VE, adicionalmente proporciona información sobre el tamaño de diferentes proteínas (Shao et al., 2018); la cual sirvió para determinar que todas las muestras de Exos están enriquecidos con CD63 y CD81. Estas proteínas pertenecen a la familia de tetraspaninas, las cuales son altamente expresadas en exosomas por participar en la maduración biosintética y el tráfico de membranas (Shao et al., 2018). Además, las tetraspaninas no están únicamente expresadas solo en exosomas, también se han identificado en cuerpos apoptóticos y microvesículas (Crescitelli et al., 2013).

Por el contrario, para Alix se observó únicamente una sola banda en la muestra de Exos de naranjilla. Alix al igual que TSG101, HSC70 y HSP90 β son proteínas accesorias del complejo ESCRT, el cual interviene en el transporte de cuerpos multivesiculares CMV y la formación de exosomas (Morita et al., 2007). Sin embargo, se ha demostrado un mecanismo de liberación de exosomas dependiente de la enzima esfingomielinasa en células que carecen de ESCRT (Stuffers et al., 2009; van Niel et al., 2011), lo cual podría explicar la ausencia de la proteína Alix en la muestra analizada, pero si la presencia de CD63 y CD81.

Entre las proteínas transmembrana CD9, CD63 y CD81 han sido reconocidas como posibles marcadores de exosomas derivados de mamíferos (Kowal et al., 2016), pero aún no se han identificado marcadores de exosomas derivados de plantas y tampoco existe un marcador que pueda únicamente identificar VE (Yáñez-Mó et al., 2015). A pesar de que nuestros exosomas no son iguales a los exosomas de mamíferos, se comprobó por los marcadores expresados que su tamaño y

composición son similares, ambos tipos de exosomas comparten algunas proteínas incluyendo CD63, CD81 y Alix.

Determinación de la citotoxicidad

Los ensayos de exosomas derivados de plantas (EP) sobre otras células demuestran su potencial como agentes en procesos de regulación entre especies, incluso entre reinos (Regente et al., 2017). Los EP presentan diferentes características y compuestos dependiendo del origen celular de los exosomas, asimismo tienen distintas vías de señalización y mecanismos de absorción celular (J. Kim et al., 2022). Como se observó en el ensayo de MTT los exosomas de tomate de árbol, naranjilla y uvilla, incluyendo sus sobrenadantes y microvesículas tienen un comportamiento diferente.

Estudios reportan que la citotoxicidad de los exosomas derivados de plantas es baja debido a que son nanopartículas naturales y se originan de células, por lo tanto, tienen componentes celulares (You et al., 2021). Comparando únicamente las dos concentraciones de 5 y 20ug en todas las líneas celulares se demostró que 20ug tiene la menor viabilidad celular sea a 24 o 48 horas. Otro ensayo de MTT realizado por Li et al. en células HEK293 con 5, 10, 20, 40 y 80ug/mL de nanovesículas jengibre resultó en una baja citotoxicidad con más del 80% de proliferación celular después de 24h para todas las concentraciones, con mejores resultados a 10ug/mL (Li et al., 2018). Asimismo, células HEK293 no exhibieron citotoxicidad después de 72h de ser tratadas con nanopartículas derivadas de ginseng a 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30ug/mL (Cao et al., 2019).

Un ensayo conducido a 24, 48 y 72 horas usando nanovesículas derivadas de limón en concentraciones de 5 y 20ug demostró que estas nanovesículas ejercen un actividad antiproliferativa en algunas líneas celulares cancerosas de colon, pulmón y leucemia pero no en células normales de forma dependiente de la dosis y el tiempo

(Raimondo et al., 2015); lo cual no se vio en el presente estudio, ya que tanto en células no malignas (HFF y HEK) y células malignas (HeLa) todos los tratamientos tienen una conducta diferente independientemente de la concentración y tiempo de prueba, no existe una correlación entre estos dos factores.

El ácido fosfatídico es uno de los fosfolípidos que comprenden las membranas exosomales. Este compuesto activa la diana de mamíferos de rapamicina (mTOR) y las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) estimulando la absorción de nanovesículas derivadas de plantas por células de mamíferos y su acción en el crecimiento y la proliferación celular (Liu et al., 2013; X. Wang et al., 2006); además interviene en la recuperación y varios procesos de salud y enfermedades humanas (J. Kim et al., 2022). La concentración de este compuesto podría explicar el hecho de que 5ug de los Exos de uvilla en HEK de 24 y 48 horas y 5ug de Exos de naranjilla en HFF de 48 horas tienen una viabilidad más alta que el resto (102.3, 99.5 y 93.2% respectivamente), entendiendo que si existen grandes cantidades de ácido fosfatídico hay mayor proliferación celular y viceversa.

Por otro lado, existe la posibilidad de que en las muestras donde no se evidenció cambios en la proliferación respecto al control e incluso una alta toxicidad, las VE hayan estado inactivas pues la estabilidad de las partículas también influye, su estabilidad química depende de la degradación y disolución de las partículas y su estabilidad coloidal es susceptible al pH, iones y macromoléculas del medio en que se encuentran (M. Zhang, Viennois, et al., 2016).

A pesar de que no se encontraron ensayos sobre la citotoxicidad de exosomas de las frutas elegidas en líneas celulares, varios estudios han reportado la toxicidad de sus extractos. Un estudio del extracto de frutas de uvilla mostró una inhibición de las células HeLa y una reducción dependiente de la dosis de citocinas proinflamatorias incluyendo IL-6, la cual se ha demostrado que estimula la proliferación de tumores y promueve angiogénesis, los autores concluyeron que existe una relación entre el

contenido de polifenoles, la actividad citotóxica y antioxidante, esta última se debe a la presencia de ácido rosmarínico, ácido ursólico, ácido gálico, catequina y galato de epicatequina (Mier-Giraldo et al., 2017). De igual forma, el 4 β -hidroxiwitanolido E induce la producción de ROS y el daño del ADN en las células de cáncer de mama (Peng et al., 2016), mismo efecto que podría tener en las células HeLa. En otro estudio los extractos de brotes y hojas de uvilla no poseen un efecto citotóxico sobre las células HeLa a concentraciones bajas, pero un IC₅₀ de 100 μ g/mL indujo apoptosis al alterar la expresión del ARNm de genes antiapoptóticos de la familia de genes Bcl-2 que regulan la apoptosis en HeLa (Çakir et al., 2014). Se observó que la misma línea celular tenía 66% de viabilidad a las 24 horas con 20 μ g de Exos de uvilla, mientras que con el resto de muestras se mantuvo entre 80 y 100%. A las 48 horas se evidenció mayor disminución de células con 20 μ g de MV (42%), Exos (43,4%) y SN (51,7%) de uvilla, conjuntamente con 5 μ g de Exos (53,7%).

En células HEK los mejores resultados de proliferación se obtuvieron a las 24 horas para 5 μ g de SN y Exos de uvilla y a las 48 horas para 20 μ g de SN, siendo estos 136.5%, 102.3% y 107.8% respectivamente. Sang-Ngern et al. indicaron que su actividad antiinflamatoria y quizá proliferativa de células normales está relacionada a la inhibición de la producción de NO y el bloqueo del factor de transcripción NF- κ B de células transfectadas (HEK 293/NF- κ B-Luc) en exposición a compuestos del cáliz de uvilla, entre ellos 4 β -hidroxiwithanolido E, witaperuvina C y fisalactona (Sang-Ngern et al., 2016).

Witanólidos e ixocaroolactonas aislados de *Physalis philadelphica*, especie relacionada con la uvilla, mostraron citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer humano, pero no mostraron toxicidad para células normales HFF (Xu et al., 2018). Similar a este estudio, en el que todas las muestras de uvilla mantuvieron una viabilidad de 69-94% a las 24 horas y 63-84% a las 48 horas en células HFF.

Se ha visto que las poliaminas ayudan a la expresión génica, proliferación celular, señalización celular, diferenciación de células inmunitarias, regulación de reacciones inflamatorias, captación de radicales libres (Edreva, s. f.), reparación tisular (Larqué et al., 2007), respuesta al estrés, inhibición de la oxidación lipídica y organogénesis (Santiago-Silva et al., 2011). La naranjilla es una buena fuente de espermidina, pues todas las poliaminas presentes son derivados de este compuesto (Gancel et al., 2008), al cual se puede atribuir su capacidad de proliferación celular. Las muestras de naranjilla tenían un rango de viabilidad celular en HFF de 44-100%, en HEK a 24 horas de 30.4-77.5%, a excepción de SN de 20ug que llegó al 17.9%, a las 48 horas el menor porcentaje fue de 72.7% con 20ug de Exos, incluso la viabilidad aumentó hasta 111.8% con 5ug de SN.

Por sus características antiproliferativa y antioxidante de la naranjilla que le confieren los fenoles, carotenoides y ácido ascórbico (Gancel et al., 2008), se esperaba ver en HeLa una disminución de células, lo cual se cumplió a las 24 horas de exposición para el SN de 5ug (7.71%) y Exos de 20ug (25.2%); sin embargo, en las MV de 5ug se identificó el efecto contrario, la viabilidad incrementó en 127%. A las 48 horas la menor inhibición se obtuvo con las MV de 20ug que redujeron las células casi a la mitad (52%).

El β -caroteno del tomate de árbol inhibe los radicales libres que pueden dañar las células humanas y ADN y tiene efectos de protección contra la apoptosis (Burri et al., 2011). El porcentaje de proliferación para HFF fue de 55-102% en 24 horas y a 48 horas disminuyó ligeramente en 41-92%. El mayor porcentaje de viabilidad en HEK fue de 107% a las 24 horas aplicando 5ug de SN de tomate de árbol y de 103.7% a las 48 horas con 5ug de MV; mientras que en el mismo tiempo de ensayo el porcentaje más bajo de 21.8% se consiguió con 20ug de SN. En HeLa también se vio un efecto positivo sobre la proliferación con 5ug de las MV, el cual fue de 123.7% en 24 horas y del 86% para 48 horas; aunque aquí igualmente hubo un efecto negativo del SN a

20ug que redujo la viabilidad a 8.7%. Su poder antiproliferativo se debe al contenido de ácido clorogénico, rutina y antocianinas (T. Diep et al., 2020).

Burri et al midieron el índice relativo antioxidante (RACI) e índice global antioxidante (GAS) y basándose en esos valores reportaron que la naranjilla tiene el mayor potencial antioxidante sobre el tomate de árbol y uvilla, además mencionaron que hay una correlación entre el poder férrico (FRAP) y el contenido de fenoles (Burri et al., 2011).

La actividad antioxidante de los compuestos bioactivos de plantas depende de su estructura y concentración, la cantidad de estas sustancias esta influenciada por la variedad de plantas, grado de madurez, condiciones ambientales y factores genéticos (Bagattoli et al., 2016). Una variable importante que no fue tomada en cuenta para la experimentación es el estado de madurez de la fruta, aunque se escogieron frutos maduros. Andrade-Cuvi et al. observaron un incremento en el contenido de fenoles totales conforme aumentaba la madurez de la naranjilla, según los autores, los frutos maduros presentan una capacidad antioxidante 50% mayor que los frutos maduros e inmaduros (Andrade-Cuvi et al., 2015). Se reportaron resultados similares en uvilla (Zelada & Carrasco, 2008) y tomate de árbol (Cuesta et al., 2013).

Por lo tanto, nuestros resultados mostraron, de acuerdo a la hipótesis planteada, que es posible aislar mediante columna de exclusión de tamaño una población de exosomas de tomate árbol, naranjilla y uvilla con morfología y tamaño similar, que muestran la presencia de las proteínas Alix, CD81 y CD63, además de que juegan un papel importante en la proliferación de líneas celulares humanas.

Capítulo VI: Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

1. La técnica de cromatografía de exclusión de tamaño permite aislar exosomas enriquecidos entre las fracciones 6 y 12 con concentraciones y tamaños de 2-6ug/uL y 32-110nm para naranjilla, 1-3ug/uL y 25-35nm para tomate de árbol, y 2-5ug/uL y 30-69nm para uvilla respectivamente.
2. Los exosomas obtenidos de las tres frutas tienen un perfil proteico similar y presentan en su composición las proteínas CD63 (32-60 kDa) y CD81 (22-25 kDa). En los exosomas de naranjilla también se identificó la proteína Alix (90kDa).
3. El nivel de citotoxicidad que muestran los exosomas, microvesículas y sobrenadantes de las tres frutas es independiente del tipo de célula y la planta de origen, aunque las tres líneas celulares (HFF, HEK y HeLa) tienen mayor viabilidad cuando están expuestas a 5ug de los tratamientos que a concentraciones de 20ug. Las diferencias en la capacidad antioxidante están relacionadas con el contenido fenólico y su composición química.

Recomendaciones

1. Combinar el método SEC con otros métodos de aislamiento como ultrafiltración, ultracentrifugación o basados en PEG para optimizar el rendimiento y pureza de los exosomas obtenidos, o utilizar técnicas de inmunocaptura que permiten identificar a la vez marcadores exosomales. Además de hacer un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) para obtener información del tamaño y concentración de los exosomas.
2. Para conocer la composición de los exosomas se recomienda hacer ensayos del perfil proteómico y lipídico con espectrometría de masas e identificar proteínas que han sido descritas como propias de exosomas derivados de

plantas (patelinas 1-3, penetración 1, cadena pesada de clatrina) para establecer posibles marcadores exosomales de plantas.

3. Evaluar la capacidad antioxidante de los exosomas en modelos *in vivo* mediante ensayos ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), FRAP (poder antioxidante reductor de iones férricos), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato) y ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), y estudiar la capacidad de absorción celular de los exosomas mediante microscopía de fluorescencia.

Bibliografía

- Albarracín, C. (2013). Creación de un centro de acopio para la exportación de uvilla desde el cantón Pillaro-Ambato hacia Berlin-Alemaní. 213.
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, Y., Luo, J., McMillan, R., Zhen, W., Zhou, K., & Liu, D. (2018). The Flavonoid Kaempferol Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetes by Suppressing Hepatic Glucose Production. *Molecules*, 23(9), 2338. <https://doi.org/10.3390/molecules23092338>
- An, Q., Hückelhoven, R., Kogel, K.-H., & Van Bel, A. J. E. (2006). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular Microbiology*, 8(6), 1009-1019. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00683.x>
- Andrade-Cuvi, M. J., Moreno-Guerrero, C., Concellón, A., & Guijarro-Fuertes, M. (2015). CARACTERIZACIÓN DE LA NARANJILLA (*Solanum quitoense*) COMUN EN TRES ESTADOS DE MADUREZ. 16(2), 215-221.
- Arun, M., & Asha, V. V. (2007). Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.038>
- Azzi, A. (2019). Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biology*, 26, 101259. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101259>
- Bagattoli, P. C. D., Cipriani, D. C., Mariano, L. N. B., Correa, M., Wagner, T. M., Noldin, V. F., Filho, V. C., & Niero, R. (2016). Phytochemical, Antioxidant and Anticancer Activities of Extracts of Seven Fruits Found in the Southern Brazilian Flora. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(1), 34-40.
- Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Muñoz, K. D., & Mahal, L. K. (2011). Identification of a Conserved Glycan Signature for Microvesicles. *Journal of Proteome Research*, 10(10), 4624-4633. <https://doi.org/10.1021/pr200434y>
- 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), 23430. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
- Borges, F. T., Reis, L. A., & Schor, N. (2013). Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46, 824-830. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132964>
- Buono, S., Aguirre, C. M., Abdo, G., Perondi, H. M., & Ansonnaud, G. (2018). Tomate árbol. *Solanum betaceum* (Cav), Sendt. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). https://www.procisur.org.uy/adjuntos/01e8c39fb854_e-arbol-PROCISUR.pdf
- Burri, B. J., Chang, J. S. T., & Neidlinger, T. R. (2011). β -Cryptoxanthin- and α -carotene-rich foods have greater apparent bioavailability than β -carotene-rich foods in Western diets. *British Journal of Nutrition*, 105(2), 212-219. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003260>
- Çakir, Ö., Pekmez, M., Çepni, E., Candar, B., & Fidan, K. (2014). Evaluation of biological activities of *Physalis peruviana* ethanol extracts and expression of Bcl-2 genes in HeLa cells. *Food Science and Technology*, 34, 422-430. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0060>

- Castro, J., Ocampo, Y., & Franco, L. (2015). Cape Gooseberry [*Physalis peruviana* L.] Calyces Ameliorate TNBS Acid-induced Colitis in Rats. *Journal of Crohn's and Colitis*, 9(11), 1004-1015. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv132>
- Chaput, N., & Théry, C. (2011). Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 33(5), 419-440. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0233-9>
- Chasquibol, N., & Yácono, J. C. (2015, diciembre). Composición fitoquímica del aceite de las semillas del fruto del «Aguaymanto», *Physalis peruviana* L. http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000400003
- Chen, X., Zhou, Y., & Yu, J. (2019). Exosome-like Nanoparticles from Ginger Rhizomes Inhibited NLRP3 Inflammasome Activation. *Molecular Pharmaceutics*, 16(6), 2690-2699. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00246>
- Chidambaram, M., Manavalan, R., & Kathiresan, K. (2011). Nanotherapeutics to Overcome Conventional Cancer Chemotherapy Limitations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 67-77. <https://doi.org/10.18433/J30C7D>
- Chiu, C.-C., Haung, J.-W., Chang, F.-R., Huang, K.-J., Huang, H.-M., Huang, H.-W., Chou, C.-K., Wu, Y.-C., & Chang, H.-W. (2013). Golden Berry-Derived 4 β -hydroxywithanolide E for Selectively Killing Oral Cancer Cells by Generating ROS, DNA Damage, and Apoptotic Pathways. *PLoS ONE*, 8(5), e64739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064739>
- Cicchetti, E., Duroure, L., Le Borgne, E., & Laville, R. (2018). Upregulation of Skin-Aging Biomarkers in Aged NHDF Cells by a Sucrose Ester Extract from the Agroindustrial Waste of *Physalis peruviana* Calyces. *Journal of Natural Products*, 81(9), 1946-1955. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01069>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E. I., & Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 20677. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20677>
- Cuesta, L., Andrade Cuví, M. J., Moreno Guerrero, C., & Concellón, A. (2013). Contenido de compuestos antioxidantes en tres estados de maduración de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) cultivado a diferentes alturas (m.s.n.m.). *Enfoque UTE*, 4(1), 32-49. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v4n1.23>
- de Jong, B., Barros, E. R., Hoenderop, J. G. J., & Rigalli, J. P. (2020). Recent Advances in Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems and Their Potential in Precision Medicine. *Pharmaceutics*, 12(11), 1006. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111006>
- Deng, Z., Rong, Y., Teng, Y., Mu, J., Zhuang, X., Tseng, M., Samykutty, A., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Suttles, J., & Zhang, H.-G. (2017). Broccoli-Derived Nanoparticle Inhibits Mouse Colitis by Activating Dendritic Cell AMP-Activated Protein Kinase. *Molecular Therapy*, 25(7), 1641-1654. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.025>
- Diep, T., Pook, C., & Yoo, M. (2020). Phenolic and Anthocyanin Compounds and Antioxidant Activity of Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Antioxidants*, 9(2), 169. <https://doi.org/10.3390/antiox9020169>

- Diep, T. T., Pook, C., Rush, E. C., & Yoo, M. J. Y. (2020). Quantification of Carotenoids, α -Tocopherol, and Ascorbic Acid in Amber, Mulligan, and Laird's Large Cultivars of New Zealand Tamarillos (*Solanum betaceum* Cav.). *Foods*, 9(6), 769. <https://doi.org/10.3390/foods9060769>
- Diep, T. T., Yoo, M. J. Y., Pook, C., Sadooghy-Saraby, S., Gite, A., & Rush, E. (2021). Volatile Components and Preliminary Antibacterial Activity of Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Foods*, 10(9), 2212. <https://doi.org/10.3390/foods10092212>
- do Nascimento, G. E., Hamm, L. A., Baggio, C. H., Werner, M. F. de P., Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2013). Structure of a galactoarabinoglucuronoxylan from tamarillo (*Solanum betaceum*), a tropical exotic fruit, and its biological activity. *Food Chemistry*, 141(1), 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.023>
- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- Elizalde-Romero, C. A., Montoya-Inzunza, L. A., Contreras-Angulo, L. A., Heredia, J. B., & Gutiérrez-Grijalva, E. P. (2021). *Solanum* Fruits: Phytochemicals, Bioaccessibility and Bioavailability, and Their Relationship With Their Health-Promoting Effects. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.790582>
- Espin, S., Gonzalez-Manzano, S., Taco, V., Poveda, C., Ayuda-Durán, B., Gonzalez-Paramas, A. M., & Santos-Buelga, C. (2016). Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, 194, 1073-1080. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.131>
- Etzbach, L., Pfeiffer, A., Weber, F., & Schieber, A. (2018). Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MS. *Food Chemistry*, 245, 508-517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.120>
- Ezzat, S. M., Abdallah, H. M. I., Yassen, N. N., Radwan, R. A., Mostafa, E. S., Salama, M. M., & Salem, M. A. (2021). Phenolics from *Physalis peruviana* fruits ameliorate streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in rats via induction of autophagy and apoptosis regression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 111948. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111948>
- Flores Rodríguez, P. (2007). Proyecto para la producción de tomate de árbol en San Gabriel, Provincia del Carchi y su comercialización en los principales mercados de la Ciudad De Quito. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/2311>
- 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>
- Gallagher, S., Winston (tank transfer systems), S. E., Fuller (tank transfer systems), S. A., & Hurrell (tank transfer systems; rev, J. G. R. (2008). Immunoblotting and

- Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 83(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1008s83>
- Gámez-Valero, A., Monguió-Tortajada, M., Carreras-Planella, L., Franquesa, M., Beyer, K., & Borràs, F. E. (2016). Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Scientific Reports*, 6(1), 33641.
<https://doi.org/10.1038/srep33641>
- 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), 11890-11899. <https://doi.org/10.1021/jf801515p>
- Gioia, S. D., Hossain, M. N., & Conese, M. (2020). Biological properties and therapeutic effects of plant-derived nanovesicles. *Open Medicine*, 15(1), 1096-1122. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0160>
- Granados, C., Torrenegra, M. E., Acevedo, D., & Romero, P. (2013). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del aperitivo vínico de lulo (*Solanum quitoense* L.). *Información Tecnológica*, 24(6), 11-12. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000600006>
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307.
<https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hajialyani, 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. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 5023-5043. <https://doi.org/10.2147/IJN.S174072>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 97(2), 329-339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Henne, W. M., Stenmark, H., & Emr, S. D. (2013). Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a016766-a016766. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016766>
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193-208.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- 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), 817.
<https://doi.org/10.3390/foods10040817>
- Howitt, J., & Hill, A. F. (2016). Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(52), 26589-26597.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R116.757955>
- iZON. (2018). QEVoriginal Size Exclusion Columns for Extracellular Vesicle Isolation. <https://bonsailab.com/wp-content/uploads/2018/10/qEVoriginalBrochure-1.pdf>
- 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>
- Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z.-B., Wang, B., Zhang, L., Roth, M., Welti, R., Mobley, J., Jun, Y., Miller, D., &

- Zhang, H.-G. (2013). Grape Exosome-like Nanoparticles Induce Intestinal Stem Cells and Protect Mice From DSS-Induced Colitis. *Molecular Therapy*, 21(7), 1345-1357. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.64>
- Khushnud, T., & Mousa, S. A. (2013). Potential Role of Naturally Derived Polyphenols and Their Nanotechnology Delivery in Cancer. *Molecular Biotechnology*, 55(1), 78-86. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9623-7>
- Kim, H., Kim, S. Y., Sim, G. Y., & Ahn, J.-H. (2020). Synthesis of 4-Hydroxybenzoic Acid Derivatives in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(36), 9743-9749. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03149>
- Kim, J., Li, S., Zhang, S., & Wang, J. (2022). Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 53-69. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.006>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), E968-E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Kuo, W. P., & Jia, S. (2017). *Extracellular Vesicles: Methods and protocols* (Vol. 1660). Human Press. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-7253-1>
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Tan, K. H., & Lim, S. K. (2013). Exosomes for drug delivery—A novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnology Advances*, 31(5), 543-551. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.008>
- Larqué, E., Sabater-Molina, M., & Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23(1), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.006>
- Leoni, G., Neumann, P.-A., Sumagin, R., Denning, T., & Nusrat, A. (2015). Wound repair: Role of immune–epithelial interactions. *Mucosal immunology*, 8(5), 959-968. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.63>
- Li, Z., Wang, H., Yin, H., Bennett, C., Zhang, H., & Guo, P. (2018). Arrowtail RNA for Ligand Display on Ginger Exosome-like Nanovesicles to Systemic Deliver siRNA for Cancer Suppression. *Scientific Reports*, 8, 14644. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32953-7>
- Liu, Y., Su, Y., & Wang, X. (2013). Phosphatidic Acid-Mediated Signaling. En D. G. S. Capelluto (Ed.), *Lipid-mediated Protein Signaling* (Vol. 991, pp. 159-176). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9_9
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F. M., Visser, R. G. F., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 6, 52. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>
- Mier-Giraldo, H., Díaz-Barrera, L. E., Delgado-Murcia, L. G., Valero-Valdivieso, M. F., & Cáez-Ramírez, G. (2017). Cytotoxic and Immunomodulatory Potential Activity of *Physalis peruviana* Fruit Extracts on Cervical Cancer (HeLa) and Fibroblast (L929) Cells. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4), 777-787. <https://doi.org/10.1177/2156587217718751>
- Mol, E. A., Goumans, M.-J., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G., & Vader, P. (2017). Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(6), 2061-2065. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.011>
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., & Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins

- of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal*, 26(19), 4215-4227. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601850>
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z.-B., Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2014). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular nutrition & food research*, 58(7), 1561-1573. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300729>
- Muñoz, P., Parra, F., Simirgiotis, M. J., Sepúlveda Chavera, G. F., & Parra, C. (2021). Chemical Characterization, Nutritional and Bioactive Properties of *Physalis peruviana* Fruit from High Areas of the Atacama Desert. *Foods*, 10(11), 2699. <https://doi.org/10.3390/foods10112699>
- Navajas, R., Corrales, F. J., & Paradela, A. (2019). Serum Exosome Isolation by Size-Exclusion Chromatography for the Discovery and Validation of Preeclampsia-Associated Biomarkers. En V. Brun & Y. Couté (Eds.), *Proteomics for Biomarker Discovery* (Vol. 1959, pp. 39-50). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9164-8_3
- Nocetti, D., Núñez, H., Puente, L., Espinosa, A., & Romero, F. (2020). Composition and biological effects of goldenberry byproducts: An overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(12), 4335-4346. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10386>
- Ordóñez, R. M., Ordóñez, A. A. L., Sayago, J. E., Nieva Moreno, M. I., & Isla, M. I. (2006). Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. *Fruit. Peptides*, 27(6), 1187-1191. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.11.016>
- Orqueda, M. E., Torres, S., Zampini, I. C., Cattaneo, F., Di Pardo, A. F., Valle, E. M., Jiménez-Aspee, F., Schmeda-Hirschmann, G., & Isla, M. I. (2020). Integral use of Argentinean *Solanum betaceum* red fruits as functional food ingredient to prevent metabolic syndrome: Effect of in vitro simulated gastroduodenal digestion. *Heliyon*, 6(2), e03387. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03387>
- Peng, C. Y., You, B. J., Lee, C. L., Wu, Y. C., Lin, W. H., Lu, T. L., Chang, F.-C., & Lee, H. Z. (2016). The Roles of 4 β -Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* on the Nrf2-Anti-Oxidant System and the Cell Cycle in Breast Cancer Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 44(03), 617-636. <https://doi.org/10.1142/S0192415X16500348>
- Pocsfalvi, G., Turiák, L., Ambrosone, A., del Gaudio, P., Puska, G., Fiume, I., Silvestre, T., & Vékey, K. (2018). Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *Journal of Plant Physiology*, 229, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.006>
- Quinga Toasa, E. (2021). Manual de Cultivo de Uvilla (Fundación Humana Pueblo a Pueblo Ecuador y Fundación Mujeres). https://humana-ecuador.org/wp-content/uploads/2021/09/Manual-de-Uvilla_Final.pdf
- Regente, M., Pinedo, M., San Clemente, H., Balliau, T., Jamet, E., & de la Canal, L. (2017). Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5485-5495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx355>
- Revelo, J., Viteri D., P., Vásquez C., W., Valverde, F., León F., J., & Gallegos, P. (2010). Manual de cultivo Ecológico de la Naranja. INIAP. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2773/1/iniapscmt77c3.pdf>
- 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>
- Sang-Ngern, M., Youn, U. J., Park, E.-J., Kondratyuk, T. P., Simmons, C. J., Wall, M. M., Ruf, M., Lorch, S. E., Leong, E., Pezzuto, J. M., & Chang, L. C. (2016). Withanolides derived from *Physalis peruviana* (Poha) with potential anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2755-2759. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.077>
- Santa Cruz Biotechnology. (s. f.-a). Alix (1A12): Sc-53540. <https://datasheets.scbt.com/sc-53540.pdf>
- Santa Cruz Biotechnology. (s. f.-b). CD63 (MX-49.129.5): Sc-5275. <https://datasheets.scbt.com/sc-5275.pdf>
- Santa Cruz Biotechnology. (s. f.-c). CD81 (B-11): Sc-166029. <https://datasheets.scbt.com/sc-166029.pdf>
- Santiago-Silva, P., Labanca, R. A., & Gloria, M. B. A. (2011). Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International*, 44(5), 1264-1268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.026>
- Shao, H., Im, H., Castro, C. M., Breakefield, X., Weissleder, R., & Lee, H. (2018). New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chemical Reviews*, 118(4), 1917-1950. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00534>
- Sharma, M. (2014). RESEARCH AND REVIEWS: JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND NANOTECHNOLOGY. 2(1), 8.
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Silva, P., Bonifácio, B., Ramos, M., Negri, K., Maria Bauab, T., & Chorilli, M. (2013). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 1. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52634>
- Spínola, V., & Castilho, P. C. (2017). Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (in vitro). *Phytochemistry*, 143, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.07.006>
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925-937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- Suharta, S., Barlian, A., Hidajah, A. C., Notobroto, H. B., Ana, I. D., Indariani, S., Wungu, T. D. K., & Wijaya, C. H. (2021). Plant-derived exosome-like nanoparticles: A concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. *Journal of Food Science*, 86(7), 2838-2850. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15787>
- Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*, 2014, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/361590>
- Tene, V., Malagon, O., Vita-Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*, 111, 63-81. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A., Hutchins, E., Mu, J., Deng, Z., Luo, C., Sundaram, K., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Hsieh, M., Reiman, R., Haribabu, B., Yan, J., Jala, V. R., Miller, D. M., ... Zhang, H.-G. (2018). Plant-

- derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell host & microbe*, 24(5), 637-652.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.001>
- Thilakarathna, S., & Rupasinghe, H. (2013). Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367-3387. <https://doi.org/10.3390/nu5093367>
- Toro A., R. M., Aragón N., D. M., & Ospina G., L. F. (2013). HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF CALYCES EXTRACT OF *Physalis peruviana* ON HEPATOTOXICITY INDUCED BY CCl₄ IN WISTAR RATS. *Vitae*, 20(2), 125-132.
- Valverde, F., Espinosa, J., & Bastidas, F. (2010). Manejo de la nutrición del cultivo de Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) En las zonas de producción de la región amazónica y noroccidente de Pichincha. 10.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*, 21(4), 708-721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- Vasco, C., Avila, J., Ruales, J., Svanberg, U., & Kamal-Eldin, A. (2009). Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), 278-288. <https://doi.org/10.1080/09637480903099618>
- Viera, W., Samaniego, I., Camacho, D., Habibi, N., Ron, L., Sediqui, N., Álvarez, J., Viteri, P., Sotomayor, A., Merino, J., Vásquez-Castillo, W., & Brito, B. (2022). Phytochemical Characterization of a Tree Tomato (*Solanum betaceum* Cav.) Breeding Population Grown in the Inter-Andean Valley of Ecuador. *Plants*, 11(3), 268. <https://doi.org/10.3390/plants11030268>
- Wahdan, O., Aly Badr, S., & Abdelfattah, M. S. (2019). Phytochemical Analysis, Antibacterial and Anticancer Activities of the *Physalis Peruviana* Calyces Growing in Egypt. <https://doi.org/10.29011/2575-7091.100097>
- Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z.-B., Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H., Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2014). Targeted Drug Delivery to Intestinal Macrophages by Bioactive Nanovesicles Released from Grapefruit. *Molecular Therapy*, 22(3), 522-534. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.190>
- Wang, R., Paul, V. J., & Luesch, H. (2013). Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2–ARE pathway. *Free radical biology & medicine*, 57, 141-153. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.019>
- Wang, X., Devaiah, S., Zhang, W., & Welti, R. (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research*, 45(3), 250-278. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.005>
- Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 243S-255S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.243S>
- 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), E357. <https://doi.org/10.3390/ijms20020357>
- Wolfram, J., Zhu, M., Yang, Y., Shen, J., Gentile, E., Paolino, D., Fresta, M., Nie, G., Chen, C., Shen, H., Ferrari, M., & Zhao, Y. (2015). Safety of nanoparticles in medicine. *Current drug targets*, 16(14), 1671-1681.

- Wu, S. J., Tsai, J. Y., Chang, S. P., Lin, D. L., Wang, S. S., Huang, S. N., & Ng, L. T. (2006). Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.027>
- Wu, Y., Deng, W., & Klinke II, D. J. (2015). Exosomes: Improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *The Analyst*, 140(19), 6631-6642. <https://doi.org/10.1039/C5AN00688K>
- Xu, Y.-M., Wijeratne, E. M. K., Brooks, A. D., Tewary, P., Xuan, L.-J., Wang, W.-Q., Sayers, T. J., & Gunatilaka, A. A. L. (2018). Cytotoxic and other withanolides from aeroponically grown *Physalis philadelphica*. *Phytochemistry*, 152, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.04.018>
- Yang, C., Zhang, M., & Merlin, D. (2018). Advances in Plant-derived Edible Nanoparticle-based lipid Nano-drug Delivery Systems as Therapeutic Nanomedicines. *Journal of materials chemistry. B*, 6(9), 1312-1321. <https://doi.org/10.1039/C7TB03207B>
- Yang, W.-J., Chen, X.-M., Wang, S.-Q., Hu, H.-X., Cheng, X.-P., Xu, L.-T., Ren, D.-M., Wang, X.-N., Zhao, B.-B., Lou, H.-X., & Shen, T. (2020). 4 β -Hydroxywithanolide E from Goldenberry (Whole Fruits of *Physalis peruviana* L.) as a Promising Agent against Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1217-1228. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01265>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- You, J. Y., Kang, S. J., & Rhee, W. J. (2021). Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive Materials*, 6(12), 4321-4332. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.023>
- Zambrano Cabrera, R. W. (2011). "Estudio de factibilidad para la producción y exportación del tomate de árbol del cantón el chaco hacia España". <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/1400>
- Zelada, C. R. E., & Carrasco, R. R. de. (2008). Determinación De La Capacidad Antioxidante Y Compuestos Bioactivos De Frutas Nativas Peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(2), 108-124.
- Zhang, M., Collins, J. F., & Merlin, D. (2016). Do ginger-derived nanoparticles represent an attractive treatment strategy for inflammatory bowel diseases? *Nanomedicine*, 11(23), 3035-3037. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0353>
- Zhang, M., & Merlin, D. (2018). Nanoparticle-Based Oral Drug Delivery Systems Targeting the Colon for Treatment of Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(7), 1401-1415. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy123>
- 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, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917-6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>

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

Apéndices