

Obtención de exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae).

Van Ronzelen López, Víctor Augusto

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Torres Arias, Marbel PhD

29 de agosto de 2022

Resultado del análisis de Copyleaks



Van Ronzelen_UIC_copyleaks.pdf

Scanned on: 22:26 August 28, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	0
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Omitted Words	0



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Obtención de exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae)" fue realizado por el señor Van Ronzelen López, Víctor Augusto; 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 de 2022



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

C. C. 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Van Ronzelen López, Víctor Augusto**, con cédula de ciudadanía N° 1719990002, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Obtención de exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Polr, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae)" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.**

Sangolquí, 29 de agosto de 2022

Van Ronzelen López, Víctor Augusto

C. C. 1719990002



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Van Ronzelen López, Víctor Augusto, con cédula de ciudadanía N° 1719990002, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "Obtención de exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae)" en el repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 29 de agosto de 2022

Van Ronzelen López, Víctor Augusto

C. C. 1719990002

Dedicatoria

"We are star stuff. Keep looking up"

-Gerald D. Waxman

Al recuerdo de mi abuela, cuyo deseo siempre fue vernos graduados.

Lo logramos Abu!

Agradecimientos

A mi madre, Rocío, por querer siempre lo mejor para mí y por quien he llegado a donde estoy. A mi abuelo Antonio, por su apoyo incondicional a toda nuestra familia. A mi padre, Víctor, y hermanos, Felipe y Ana Belén, cuyo aliento ha sido fundamental en el camino de mi vida. A mi otra V, Vero, por estar siempre ahí, por todo lo vivido y todo lo que aún no.

A la Dra. Marbel Torres por su calidad humana y de investigadora, así como su apertura a la realización del proyecto y sus enseñanzas académicas y personales. A las técnicas del Laboratorio de Inmunología y Virología, Andre y Fer, por su paciencia y apoyo en todas las fases del proyecto. Al Dr. Alexis Debut, investigador del Laboratorio de Microscopia Electrónica, por su colaboración en la obtención de imágenes del proyecto.

A mis compañeras y compañeros de UIC, por todos los debates, consejos y enseñanzas que nos permitieron crecer personal y profesionalmente.

A todos mis amigos, porque con cada experiencia invaluable ha quedado un aprendizaje.

Índice de Contenido

Resultado del análisis de Copyleaks.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido	8
Listado de tablas	11
Listado de figuras	12
Listado de abreviaturas.....	13
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
Antecedentes	17
Justificación.....	19
Objetivos	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos.....	21
Hipótesis	21
Capítulo II: Marco teórico	22
Vesículas extracelulares de origen vegetal	22
Exosomas	23

Biogénesis	23
Cargamento exosomal	25
Función biológica	26
Aplicaciones	27
Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)	29
Descripción.....	29
Taxonomía.....	30
Origen y distribución, producción en Ecuador.....	30
Composición.....	31
Uso medicinal.....	35
Taxo (<i>Passiflora tripartita</i>)	36
Descripción.....	36
Taxonomía.....	37
Origen y distribución, producción en Ecuador.....	38
Composición.....	39
Uso medicinal.....	42
Lima (<i>Citrus x aurantifolia</i>).....	43
Descripción.....	43
Taxonomía.....	44
Origen y distribución, producción en Ecuador.....	44
Composición.....	45
Uso medicinal.....	47
Capítulo III: Metodología	48

	10
Obtención de las muestras de frutas	48
Centrifugación diferencial.....	48
Purificación por columna de exclusión de tamaño.....	48
Cuantificación proteica	48
Concentración de proteínas.....	49
Cuantificación proteica por ensayo de ácido bicinconínico (BCA).....	49
Visualización de muestras en TEM.....	50
Preparación de muestras para electroforesis vertical	50
Electroforesis vertical.....	51
Inmunoblot	51
Cultivo celular	53
Ensayo MTT.....	54
Viabilidad celular.....	54
Análisis estadístico	55
Capítulo IV: Resultados	56
Obtención y caracterización de exosomas de maracuyá, taxo y lima	56
Perfil proteico de exosomas de maracuyá, taxo y lima	58
Citotoxicidad de exosomas en líneas celulares.....	60
Capítulo V: Discusión	64
Capítulo VI: Conclusiones.....	69
Capítulo VII: Recomendaciones	70
Capítulo VIII: Referencias	71

Listado de tablas

Tabla 1	Investigaciones y aplicaciones de exosomas derivados de plantas.....	28
Tabla 2	Composición nutricional de maracuyá.....	31
Tabla 3	Compuestos aislados de maracuyá.....	36
Tabla 4	Composición nutricional de taxo.....	39
Tabla 5	Composición de carotenoides de taxo.....	41
Tabla 6	Composición nutricional de lima.....	45
Tabla 7	Anticuerpos y diluciones utilizadas.....	52
Tabla 8	Líneas celulares y medio completo utilizado.....	53

Listado de figuras

Figura 1 Esquema general de formación de exosomas mostrando alternativas a la secreción extracelular	24
Figura 2 Esquema de formación de ILVs y secreción como exosomas mediante vía dependiente de ESCRT	25
Figura 3 <i>Passiflora edulis</i>	29
Figura 4 Estructuras químicas de isoorientina y quercetina.....	33
Figura 5 Esquema de reacción para la eliminación de radicales libres por flavonoides	34
Figura 6 Estructura química de los ciclopasiflosidos.....	34
Figura 7 Estructura química de la passiflorina.....	35
Figura 8 <i>Passiflora tripartita</i>	37
Figura 9 Estructura de flavonoides encontrados en taxo	40
Figura 10 Reacciones de eliminación de radicales libres por carotenoides	42
Figura 11 <i>Citrus x aurantifolia</i>	43
Figura 12 Reacción del ensayo de BCA.	49
Figura 13 Absorbancia a 280 nm de las distintas fracciones de maracuyá, taxo y lima	56
Figura 14 Exosomas de maracuyá, taxo y lima observados por TEM.....	57
Figura 15 Frecuencias relativas de los exosomas de maracuyá, taxo y lima	58
Figura 16 Perfiles proteicos de muestras de exosomas y microvesículas de maracuyá, taxo y lima	59
Figura 17 Inmunoblot para detección de proteínas en exosomas y microvesículas de maracuyá, taxo y lima.....	60
Figura 18 Viabilidad celular de líneas HeLa al exponerse a exosomas de maracuyá, taxo y lima	61
Figura 19 Viabilidad celular de líneas HEK293 al exponerse a exosomas de maracuyá, taxo y lima	62
Figura 20 Viabilidad celular de líneas HFF al exponerse a exosomas de maracuyá, taxo y lima.....	63

Listado de abreviaturas

- ALIX:** Proteína X interactiva con ALG-2
- ARE:** Elemento de respuesta antioxidante
- BCA:** Ensayo de ácido bicinconínico
- CAT:** Catalasa
- CD:** Clúster de diferenciación
- COX:** Ciclooxygenasa
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- ESCRT:** Complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte
- EV:** Vesícula extracelular
- GPX:** Glutación peroxidasa
- HEK:** Células embrionarias de riñón
- HeLa:** Células de cáncer cérvico-uterino
- HFF:** Fibroblastos humanos de prepucio
- ILV:** Vesícula intraluminal
- iNOX:** Sintasa de óxido nítrico
- kDa:** kilodaltons
- miRNA:** Micro-RNA
- mRNA:** RNA mensajero
- MTT:** Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio
- MV:** Microvesículas
- MVB:** Cuerpo multivesicular
- Nrf2:** Factor nuclear eritroide derivado del 2
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PVDF:** Difluoruro de polivinilideno
- RIPA:** Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación
- RNA:** Ácido ribonucleico
- SEC:** Cromatografía de exclusión por tamaño

SOD: Superóxido dismutasa

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral

Tsg101: Gen 101 de susceptibilidad tumoral

VPS4: Proteína 4 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares

Resumen

Las vesículas extracelulares como los exosomas, han sido ampliamente estudiadas en mamíferos. Su interés es creciente en los últimos años debido al potencial que albergan como vehículos de comunicación intercelular efectores de cambios a nivel genético molecular. Las investigaciones en exosomas de frutas prometen aprovechar estas funcionalidades evitando problemas de disponibilidad y rendimiento comúnmente encontrados en exosomas derivados de células mamíferas. La producción de frutas durante todo el año sumado a la variedad de recursos biológicos de nuestro país, Ecuador, brinda la disponibilidad de materia prima para el desarrollo de productos biotecnológicos derivados. Por tanto, el presente proyecto tiene como objetivo obtener exosomas de maracuyá, taxo y lima. Se logró evidenciar la existencia de exosomas de estas frutas mediante el aislamiento de poblaciones heterogéneas, con un rango de tamaño de 30 a 83 nanómetros. La caracterización de proteínas exosomales identificó proteína ALIX en todas las muestras y tetraspaninas como CD63, CD81 y CD69 en dependencia del origen. Los ensayos de citotoxicidad revelaron efectos antiproliferativos de los exosomas en línea celular HeLa luego de 48 horas de exposición y de manera general no se observó reducción de la viabilidad celular en líneas celulares normales con excepción de los exosomas derivados de maracuyá aplicados a una mayor concentración. Las investigaciones concernientes a obtención de exosomas frutales actúan como el primer paso hacia el aprovechamiento de estas vesículas para su aplicación en ámbitos biomédicos de diagnóstico patológico y tratamiento de enfermedades de tipo oncológicas.

Palabras clave: vesículas extracelulares, exosomas, *Passiflora edulis*, *Passiflora tripartita*, *Citrus x aurantifolia*.

Abstract

Extracellular vesicles such as exosomes have been extensively studied in mammals. Their interest has been growing in recent years due to their potential as intercellular communication vehicles that effect changes at molecular and genetic levels. Research on fruit exosomes promises to take advantage of these functionalities while bypassing availability and performance limitations commonly found in exosomes derived from mammalian cells. The production of fruits throughout the year added to the variety of biological resources of our country, Ecuador, provides the availability of raw material for the development of derived biotechnological products. Therefore, this project aims to obtain exosomes from passion fruit, taxo and lime. It was possible to demonstrate the existence of exosomes of these fruits by isolating heterogeneous populations, with a size range of 30 to 83 nanometers.

Characterization of exosomal proteins identified ALIX protein in all samples and tetraspanins as CD63, CD81 and CD69 depending on the origin. Cytotoxicity assays revealed antiproliferative effects of exosomes in HeLa cell lines after 48 hours of exposure and, in general, no reduction in cell viability was observed in normal cell lines, with the exception of passion fruit-derived exosomes applied at higher concentrations. The investigations concerning the isolation of fruit exosomes act as the first step towards the use of these vesicles for their application in biomedical fields of pathological diagnosis and treatment of oncological diseases.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, *Passiflora edulis*, *Passiflora tripartita*, *Citrus x aurantifolia*.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

La descripción de vesículas extracelulares, con un tamaño dentro de la escala nanométrica (1-100 nm), se dio por primera vez en 1983 (Harding et al., 2013; Pan & Johnstone, 1983). Pero no fue hasta 1987 que Rose Johnston acuñó el término “exosoma”, para referirse a estas vesículas las cuales se liberan luego de la fusión de los denominados cuerpos multivesiculares (MVB's) con la membrana celular en un proceso de exocitosis (Shanmuganathan et al., 2018). Desde entonces, la investigación enfocada en los exosomas provenientes de distintos tipos de células ha aumentado gradualmente. Hoy en día, se conoce que estas vesículas son secretadas por todas las células vivas y que su contenido es complejo y diverso tanto interna como superficialmente abarcando: antígenos, proteínas, lípidos, integrinas, enzimas, vitaminas, metabolitos y hasta RNA (Yokoi & Ochiya, 2021). También, se ha descubierto que los exosomas participan como mediadores en interacciones celulares normales y patológicas (Harding et al., 2013). Por esto, las investigaciones no solo se han enfocado en dilucidar el proceso de formación de estas nano vesículas sino también en desarrollar y mejorar aplicaciones para las mismas debido a la variedad de cargas presentes y a su biocompatibilidad (Akuma et al., 2019).

La secreción y caracterización de exosomas ha sido ampliamente estudiada en células de mamíferos (Adem & Melo, 2017). Sin embargo, debido a que su secreción es inherente a todos los dominios de la vida, el estudio de exosomas en otros tipos de células ha aumentado gradualmente. Aunque el común denominador de los exosomas es la comunicación intercelular (Y. Zhang et al., 2019), se ha descrito exosomas en: bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, involucrados en procesos de virulencia, interacción con el huésped y transferencia horizontal de material genético (Y. Liu et al., 2018); en helmintos, jugando roles fundamentales en la infección del parásito para modular la respuesta inmune del huésped (L.-Q. Wang et al., 2020); en hongos, envueltos en procesos de formación de hifas y

de alteración morfológica de paredes celulares (Rizzo et al., 2020); y en plantas, implicados en procesos de señalización y de respuesta ante patógenos (Kim et al., 2022).

Actualmente existen investigaciones que resaltan el potencial de los exosomas en un abanico de aplicaciones. Por ejemplo, la regeneración de tejidos y curación de heridas mejora luego de la aplicación de exosomas derivados de células madre mesenquimales (Choi et al., 2019; Shi et al., 2020), esto debido a su rico contenido en factores de crecimiento o en micro-RNA (miRNA) envueltos específicamente en las distintas etapas de curación de la herida (Hade et al., 2021). De igual manera, se ha investigado los efectos de los exosomas en regeneración de tejido hepático, cardiovascular y óseo con resultados prometedores (Lazar et al., 2018; Y. Liu et al., 2019; Tan et al., 2014). En estas investigaciones, se resalta que el mecanismo de acción de los exosomas administrados depende principalmente de su carga. Las proteínas presentes en las membranas de los exosomas están involucradas en procesos como localización, adhesión y fusión de membranas, lo que sumado a su estabilidad y biocompatibilidad los hace candidatos ideales para el uso en carga y entrega de fármacos (Akuma et al., 2019). Los exosomas no solo han sido probados como terapéuticos sino también como potenciales biomarcadores de cuadros clínicos complejos, en donde la carga de estos varía dependiendo del estadio del paciente (Kalani et al., 2020). De allí que el monitoreo y caracterización temprana del contenido exosomal, proveniente de los tejidos involucrados en la enfermedad, puede suponer una preparación adecuada para el tratamiento de los pacientes. Debido a su rol natural en la comunicación intercelular, algunos estudios se han centrado en la caracterización y función de los exosomas en la progresión de distintos tipos de cáncer. Se ha encontrado que los exosomas son parte fundamental en la regulación del microambiente tumoral (Yokoi & Ochiya, 2021) y están involucrados en procesos de angiogénesis y metástasis (J. Dai et al., 2020). En estos casos, el estudio de los exosomas puede ser de utilidad para comprender los mecanismos en el avance del cáncer y posiblemente obtener nuevas dianas terapéuticas.

Justificación

En el año 2020 se presentaron 29 273 nuevos casos de cáncer en el Ecuador y las estadísticas poblacionales indican un riesgo del 15.2% de desarrollar algún tipo de cáncer antes de los 75 años, siendo los más frecuentes los cánceres de: mama, próstata, colorrectal, estómago y tiroides (*Ecuador - Population Fact Sheets*, 2021). Las terapias para el cáncer han aumentado considerablemente en los últimos 20 años; la detección temprana, la cirugía oncológica y el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos han supuesto una ganancia en la supervivencia de los pacientes diagnosticados (Lluch Hernández, 2016). Los estudios comprensivos sobre el cáncer han permitido descubrir nuevas áreas de interés con un potencial de mejorar las terapias existentes o desarrollar nuevas y más efectivas; entre estas áreas encontramos el estudio de microbiomas y exosomas (Ando et al., 2021). Al ser participantes en la comunicación intercelular, los exosomas juegan un papel fundamental en la progresión tumoral (Syn et al., 2017). El estudio de exosomas derivados de tumores se presenta como una herramienta importante para la prognosis de la enfermedad (Tai et al., 2018). Existe evidencia creciente que sugiere que los exosomas derivados de distintos tejidos tienen efectos inmunomoduladores y serían capaces de operar como agentes terapéuticos por sí solos (Xu et al., 2020). Además de ello, estudios en la utilización de exosomas exógenos han determinado que también son capaces de ingresar en células tumorales, por lo que tienen un potencial importante para ser utilizados como vectores para la entrega de fármacos (Antimisiaris et al., 2018; Luan et al., 2017).

Las investigaciones concernientes a las aplicaciones anti proliferativas de los exosomas se han basado en su mayoría en aquellos derivados de células de mamíferos (Xu et al., 2020). Y aunque algunos de estos estudios han tenido resultados prometedores, la producción de exosomas aún tiene limitantes como: rendimiento, procesos de producción lentos, y en general, dificultades para obtener calidad y uniformidad constante (P. Li et al., 2017). Es por ello que los exosomas derivados de plantas se presentan como una alternativa, manteniendo las características deseables de los exosomas de origen

natural y a su vez dando paso a la posibilidad de escalar la producción de manera menos complicada (Akuma et al., 2019; Kim et al., 2022).

La mayor parte de estudios en exosomas derivados de frutos se han concentrado en algunas especies entre las que se destacan: *Cocos nucifera*, *Zingiber officinale*, *Vitis vinifera*, *Citrus reticulata*, *Solanum lycopersicum*, *Citrus limon* y *Fragaria x ananassa* (Logozzi et al., 2021; Pérez-Bermúdez et al., 2017; Perut et al., 2021; Redman, 2021; Xiao et al., 2018). A pesar de que en Ecuador existen condiciones que favorecen el desarrollo de una variedad de frutos tanto nativos como introducidos (Cañizares & Jaramillo, 2015; Inlago, 2020; UTEPI, 2006), la búsqueda bibliográfica refleja escasos resultados de estudios que describan exosomas frutales dentro del país. Además de tener valor alimenticio, muchos de los frutos disponibles en el Ecuador poseen compuestos con propiedades beneficiosas que han sido explotadas en la medicina ancestral. Por ejemplo, dentro de la familia de las pasifloráceas (Passifloraceae) encontramos el taxo (*Passiflora tripartita* Poir) y la maracuyá (*Passiflora edulis* Sims), en el caso del fruto del primero se ha descrito la presencia de flavonoides y carotenoides antioxidantes (Simirgiotis et al., 2013), y pectinas con roles en la digestión de lípidos (Espinal et al., 2016); mientras que en la fruta de maracuyá existe evidencia de fenoles, carotenoides y ácidos grasos antiinflamatorios y antioxidantes (X. He et al., 2020; Silva et al., 2015). Por otro lado, en el fruto de lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle) se han descrito limonoides y flavonoides bioactivos capaces de inducir la apoptosis en células cancerígenas (Narang & Jiraungkoorskul, 2016; Patil et al., 2009). La disponibilidad y propiedades de estas frutas hacen que la investigación enfocada en ellas albergue el potencial de representar una fuente importante para el desarrollo de productos biotecnológicos en el país.

El presente estudio tiene la intención de obtener exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae) con la finalidad de caracterizar su perfil proteico y posteriormente determinar su citotoxicidad en líneas celulares humanas.

Objetivos

Objetivo General

Obtener exosomas a partir de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae).

Objetivos Específicos

Caracterizar exosomas a partir de frutos de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae).

Analizar el perfil proteico de exosomas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae) mediante electroforesis vertical.

Determinar la citotoxicidad de exosomas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), taxo (*Passiflora tripartita* Poir, Passifloraceae) y lima (*Citrus x aurantifolia* Swingle, Rutaceae) mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT).

Hipótesis

Las frutas de maracuyá, taxo y lima secretan exosomas con efectos citotóxicos en líneas celulares cancerígenas.

Capítulo II: Marco teórico

Vesículas extracelulares de origen vegetal

Se denomina como vesículas extracelulares (EV's) a la familia de estructuras lipoproteicas esféricas delimitadas por una membrana bilipídica que son liberadas por células procariontas y eucariotas al espacio extracelular (Urzi et al., 2021). La familia de EV's comprende un conjunto heterogéneo de vesículas con respecto a su origen, tamaño y contenido. Actualmente se encuentran categorizadas en exosomas, microvesículas y vesículas derivadas de la apoptosis (van Niel et al., 2018). El tamaño de las EV's se encuentra en un rango de 30-10000 nm (G. Liu et al., 2021), y aunque inicialmente se pensaba que su producción era un mecanismo celular para la remoción de desechos intracelulares, hoy en día se conoce que las EV's participan activamente en varios procesos como: respuesta inmune, comunicación intercelular, presentación de antígenos, entre otras (Colombo et al., 2014). Podría pensarse que la existencia de la pared celular en células vegetales previene la formación de EV's o interrumpe en las funciones antes mencionadas. Sin embargo, la evidencia existente sugiere que además de que las células vegetales son capaces de producir EV's, su función en estos organismos incluye la defensa ante patógenos, modulación del crecimiento e incluso en relaciones de simbiosis entre planta y microorganismo (Cui et al., 2020). Por ejemplo, en el estudio realizado por Meyer et al. (2009), luego de la infección por el hongo *Golovinomyces orontii* en *Arabidopsis thaliana*, se logró identificar proteínas con roles de defensa incorporadas en compartimentos inducidos por el patógeno las cuales eran transportadas por vesículas de tipo exosomas. De igual manera, se ha observado vesículas extracelulares en la interfase existente entre micorrizas arbusculares y su hospedero, lo que sugiere una función tanto de incrementar el área de contacto como de intercambio de señales y nutrientes entre los simbioses (Roth et al., 2019).

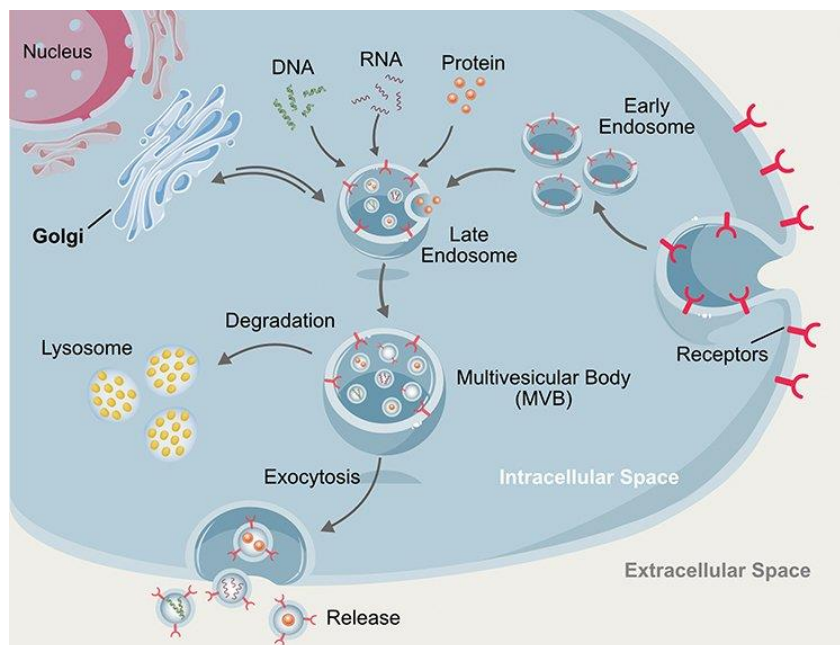
Exosomas

Biogénesis

La formación de exosomas ha sido estudiada en células animales (Juan & Fürthauer, 2018), sin embargo, Nematy et al. (2022) sugieren que la vía de biogénesis en células vegetales es similar. Este proceso se puede describir como uno de doble internalización que empieza con una primera invaginación de la membrana plasmática para la formación de un endosoma temprano, el cual puede contener cargamento del medio extracelular, así como de la membrana celular (G. Liu et al., 2021). La segunda invaginación ocurre en el endosoma temprano y forma vesículas intraluminales (ILV's) con cargamento proveniente del citoplasma o la red trans del aparato de Golgi. Las estructuras endosomales que contienen varias ILV's y son capaces de secuestrar proteínas, lípidos y varios tipos de cargamentos son los denominados MVB's o endosomas tardíos. Una vez formados los MVB's, estos son transportados hacia la membrana plasmática nuevamente, en donde la fusión de membranas ocasiona que las ILV's sean expulsadas al medio extracelular en forma de exosomas. De manera alternativa los MVB's pueden ser transportados hacia lisosomas para su posterior degradación o, su cargamento puede ser reciclado mediante la red trans del aparato de Golgi (Figura 1) (Y. Zhang et al., 2019).

Figura 1

Esquema general de formación de exosomas mostrando alternativas a la secreción extracelular



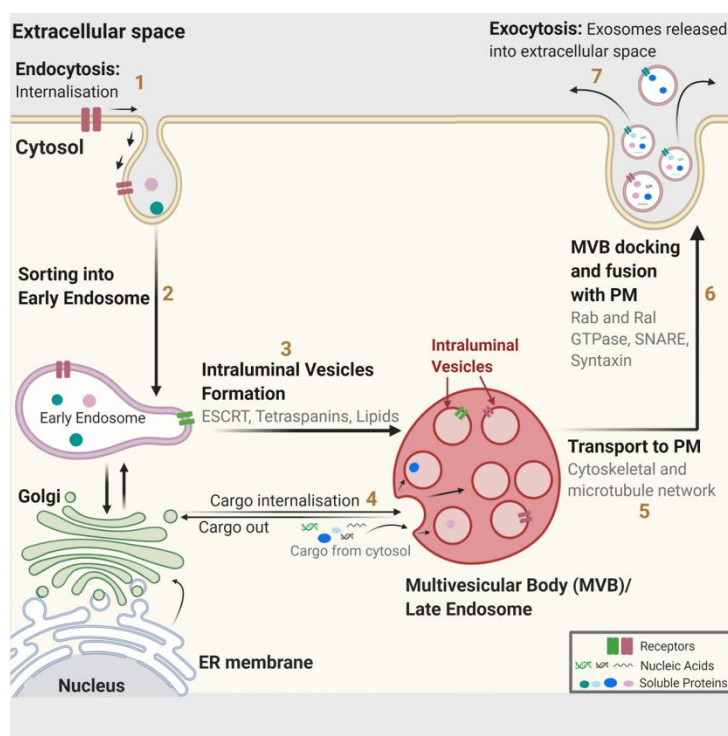
Nota. Los MVB's pueden sufrir degradación de sus componentes, o los mismos también pueden ser reciclados por la red trans del aparato de Golgi (Gurunathan et al., 2021).

Uno de los principales mecanismos en la formación de exosomas corresponde a la maquinaria del complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte (ESCRT) compuesto por 4 distintos núcleos (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III) y proteínas asociadas como ALIX, Tsg101 y VPS4 (Gurung et al., 2021; Y. Zhang et al., 2019). La función del complejo empieza con la acción de ESCRT-0 mediante el reconocimiento y posterior captura de proteínas ubiquitinadas hacia la membrana del endosoma, gracias a sus subunidades de unión a ubiquitina. Luego, tanto ESCRT-I y -II son reclutadas e interactúan para promover la invaginación del endosoma y formar un cuello de membrana. Finalmente, ESCRT-III es movilizada para la formación completa del complejo e iniciar con la ecisión del cuello de membrana y posterior producción de una ILV (Figura 2). El complejo ESCRT luego se separa del endosoma tardío mediante consumo de ATP y puede ser reciclado para la formación de otras ILV's (Gurung et al., 2021; G. Liu et al., 2021).

Se ha reportado también la existencia de vías independientes del complejo ESCRT para la formación de exosomas. En estas vías alternativas participan varios tipos de proteínas como intermediarios para la formación de ILV's, entre ellas se encuentra la sintenina y proteínas transmembranales pertenecientes a la familia de tetraspaninas (Tschuschke et al., 2020).

Figura 2

Esquema de formación de ILVs y secreción como exosomas mediante vía dependiente de ESCRT



Nota. La formación de exosomas se da mediante la formación de un MVB dentro del cual se forman decenas de ILVs que serán luego secretados por fusión de membranas (Gurung et al., 2021).

Cargamento exosomal

Al ser un grupo de vesículas heterogéneas, el cargamento exosomal es complejo y depende en gran parte de la célula parental. Por tanto, los constituyentes de los exosomas son variados y se han identificado proteínas, azúcares, lípidos, mRNAs y miRNAs (Y. Zhang et al., 2019). A pesar de esta variación, existe cierta similitud en perfiles proteicos y lipídicos debido a mecanismos de formación y de actividad biológica en común. Por ejemplo, las proteínas de tipo tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81) así

como aquellas asociadas al complejo ESCRT (Proteína X interactiva con ALG-2 (ALIX) y Tsg101) suelen utilizarse como marcadores exosomales en mamíferos (Wei et al., 2021). En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado 17 genes codificantes para tetraspaninas y aunque su similitud a nivel de aminoácidos es limitada, existen analogías conservadas a nivel estructural; específicamente TET8 y TET9 se pueden considerar como marcadores exosomales en plantas (B. He et al., 2021; Nemati et al., 2022). Por otro lado, lípidos como colesterol, esfingolípidos y ceramidas están involucrados en la estabilidad de la vesícula y también influyen en los procesos de reconocimiento e internalización (Wei et al., 2021). La caracterización de ácidos nucleicos en común en exosomas es más compleja puesto que este tipo de moléculas están involucradas en comunicación intercelular y, por tanto, dependen de manera más directa del tipo de célula y tejido (Urzi et al., 2021). A pesar de ello, se ha logrado encontrar miRNAs que actúan como marcadores tanto de procesos patológicos como normales (Harding et al., 2013; Yue et al., 2020).

Función biológica

La principal función de los exosomas es servir como vehículo de comunicación intercelular (Y. Zhang et al., 2019). Yang et al. (2020), mencionan que existen tres vías distintas en la que los exosomas transfieren información. La primera se refiere al contacto entre proteínas de membrana que ocasiona una cascada de señales en la célula diana. La segunda vía es la internalización del contenido exosomal mediante la fusión de membranas. Por último, la célula diana puede fagocitar directamente al exosoma y por tanto el cargamento también es internalizado. La comunicación intercelular mediada por exosomas no ocurre únicamente en tejidos localizados, los exosomas pueden ejercer efectos sistémicos e incluso, en mamíferos, se ha evidenciado que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y por tanto tener efectos sobre el sistema nervioso central (Isaac et al., 2021). Los exosomas también tienen funciones en el sistema inmune, específicamente en la regulación del mismo que incluye activación, supresión y presentación de antígenos (Y. Zhang et al., 2019). Los diferentes componentes de

los exosomas tienen efectos sobre el metabolismo. Por ejemplo, se ha encontrado que los exosomas, a través de cargamentos de enzimas o miRNAs, pueden regular el metabolismo lipídico en sus procesos de síntesis, transporte y degradación (W. Wang et al., 2020). El efecto de los exosomas sobre el metabolismo también ha sido estudiado en el microambiente tumoral, y se han observado los efectos de los exosomas provenientes de células cancerígenas para reprogramar el metabolismo y participar en procesos de proliferación e inmunosupresión (E. Yang et al., 2020). De manera general, los exosomas también poseen efectos regulatorios benéficos sobre el organismo. Entre los mecanismos antioxidantes de los exosomas encontramos supresión de inflamación, protección mitocondrial y eliminación de especies reactivas de oxígeno (Xia et al., 2021). Aunque aún no se han dilucidado por completo, algunos estudios han arrojado luces sobre el funcionamiento de esos mecanismos. Por ejemplo, el estudio de Wang et al. (2020), demostró que los exosomas son capaces de regular la vía de señalización del factor nuclear eritroide derivado del 2 (Nrf2), estimulando la expresión de enzimas antioxidantes y reparando los daños provocados por el estrés oxidativo. Incluso, se ha observado que la liberación de exosomas con efectos antioxidantes, ya sea por su contenido en moléculas bioactivas o en miRNAs de regulación, aumenta bajo escenarios de estrés oxidativo (Chiaradia et al., 2021).

Aplicaciones

Los mecanismos de interacción de las vesículas extracelulares con células diana, sumado a características como biocompatibilidad, estabilidad y variedad de cargas las han hecho blanco de varias investigaciones (Y. Zhang et al., 2019). Debido a sus características que reflejan procesos celulares de tejidos específicos, algunas investigaciones se han enfocado en usar los exosomas como biomarcadores usados en el diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, en casos de infarto cerebral isquémico, se ha encontrado que la cantidad de ciertos miRNAs en exosomas aumenta conforme a la severidad del cuadro (Hade et al., 2021), la recolección de exosomas a partir de fluidos corporales es menos invasiva y por tanto también supone ventajas en el momento de diagnosticar enfermedades complejas. Este

diagnóstico a través de exosomas podría trasladarse también al reino vegetal, en donde se ha identificado exosomas transportadores de RNA pequeño que actúan como silenciadores de genes virulencia en caso de infección con hongos (Cai et al., 2018).

Otra de las aplicaciones se enfoca en el área de terapéuticos, en donde se aprovecha la capacidad de exosomas como transportadores naturales. Por sí solos, el contenido de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos presentes en los exosomas de varios organismos han mostrado efectos anti inflamatorios, anti oxidantes y antiproliferativos (Nemati et al., 2022). Además, por sus propiedades de baja inmunogenicidad, baja toxicidad y de actuar sobre tejidos específicos, los exosomas están siendo estudiados como transportadores de agentes terapéuticos con capacidades mejoradas de permeabilidad, estabilidad, tiempo de circulación y efectividad de entrega de la carga (Liang et al., 2021). En este mismo ámbito, los exosomas están siendo investigados por su potencial para ser usados como vacunas terapéuticas, capaces de inducir la respuesta inmune hacia antígenos específicos de tumores que normalmente evaden el sistema inmunológico. Uno de los enfoques principales se basa en la formulación de vacunas autólogas de exosomas derivados de células dendríticas, los cuales son capaces de inducir la inmunocompetencia y presentan más resistencia a mecanismos supresores del ambiente tumoral (P. Santos & Almeida, 2021). Se ha encontrado que el uso de exosomas derivados de plantas tienen efectos biológicos en otros organismos (Kim et al., 2022), algunos de estos estudios junto con las funciones encontradas se presentan a continuación:

Tabla 1

Investigaciones y aplicaciones de exosomas derivados de plantas.

Planta de origen	Función	Referencia
<i>Vitis vinifera</i>	Tratamiento de colitis, promoción de la reparación de tejido intestinal	(Ju et al., 2013)

Planta de origen	Función	Referencia
<i>Citrus x paradisi</i>	Efectos antiproliferativos en líneas cancerígenas con la inclusión de agentes terapéuticos	(Q. Wang et al., 2013)
<i>Zingiber officinale</i>	Mejora la inhibición quimioterapéutica mediante la conjugación con agentes anticancerígenos	(M. Zhang et al., 2016)
<i>Citrus limon</i>	Promueve efectos apoptóticos en líneas cancerígenas	(Raimondo et al., 2015)

Nota. Los estudios presentados incluyen ensayos *in vitro*, *in vivo* o ambos.

Maracuyá (*Passiflora edulis*)

Descripción

Enredadera leñosa perenne perteneciente a la familia Passifloraceae. Sus hojas maduras miden de 7.5 a 20 cm de largo que crecen de forma alternada y trilobuladas, con color verde brillante en su haz y más opaco en el envés. Su flor mide de 5 a 7.5 cm de ancho y es reconocida por los radios blancos y morados con forma de corona, posee un androginóforo con un estilo central de tamaño prominente y ramificado en tres estigmas situado por encima de cinco estambres con grandes anteras (Figura 3) (Rodríguez-Amaya, 2012).

Figura 3

Passiflora edulis



Nota. Fruto de maracuyá maduro (A), fruto de maracuyá en planta (B), flor de maracuyá (C).

El fruto de maracuyá es de tipo baya con forma ovoide con un diámetro que va de los 4 a 7.5 cm y un rango de peso de 35 a 80 gramos. Posee una corteza lisa cuya tonalidad puede variar dependiendo

del cultivar desde púrpura oscuro a color amarillo claro (Morton, 1987). Una pulpa blanca de aproximadamente 6 mm de espesor protege a las numerosas semillas comestibles de su interior. Las semillas, que varían de color negro a marrón oscuro están envueltas por sacos membranosos llenos de pulpa color amarilla (Figura 3A), la cual posee una fragancia intensa de sabor atractivo con tonalidades que varían de ácido a sub-ácido (Schotsmans & Fischer, 2011).

Taxonomía

Descrita por primera vez por John Sims en el año 1818 (Bernacci et al., 2008) la fruta de *Passiflora edulis* es conocida con distintos nombres según el idioma y según cada país. Por ejemplo: parcha (Puerto Rico), mburucuyá (Uruguay, Paraguay), parchita (Venezuela), chinola (República Dominicana), maracuyá (Colombia, Ecuador), passion fruit (inglés) (Morton, 1987). Su taxonomía se detalla a continuación:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Passifloraceae

Género: *Passiflora*

Especie: *Passiflora edulis* (ITIS - Report: *Passiflora edulis*, 2011)

Origen y distribución, producción en Ecuador

El género *Passiflora* concentra su mayor diversidad genética en países andinos de Sudamérica, lo que según Ocampo et al. (2007), confirma que esta área dio origen al género. La especie *Passiflora edulis* Sims que domina los cultivos comerciales es nativa de la región brasileña. Actualmente se encuentra distribuida de manera global ya que se encuentran cultivos de esta especie en África, Australia, Asia y Sudamérica (Schotsmans & Fischer, 2011).

La enredadera se cultiva de mejor manera en climas tropicales y subtropicales, en donde la altitud dependerá de la variante cultivada, los registros muestran existencias de cultivares en elevaciones desde los 0 m.s.n.m. hasta los 2500 m.s.n.m. (Fischer et al., 2009). Su temperatura óptima de crecimiento es de 26.5 °C, aunque se desarrolla bien entre los 21 y 32 °C. Prefiere suelos franco arenosos con poca concentración de sales y un pH de entre 5.0 a 7.5 en regiones con precipitaciones anuales de entre 600 a 2500 mm. Los suelos deben poseer una buena capacidad de drenado para evitar el encharcamiento y posterior podredumbre de raíces (Morton, 1987).

El cultivo de maracuyá en el Ecuador se concentra en la región litoral del país destacando entre ellas la producción en la zona norte y centro (Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Los Ríos) (Valarezo et al., 2014). Su importancia tanto para consumo nacional como exportación se ve reflejada en la superficie sembrada que para el año de 2021 alcanzaba las 13922 ha y una productividad de 7 ton/ha (INEC, 2021). La exportación de maracuyá se puede dar en presentación de fruta fresca, pulpa, jugo o concentrado. En el 2018, Ecuador exportó maracuyá a Países Bajos, Estados Unidos, Canadá, Australia, Italia e Israel, países que concentran el 95% de las exportaciones totales, siendo Países Bajos el principal destino (Arias et al., 2019).

Composición

Los mayores componentes nutricionales del fruto de maracuyá incluyen lípidos, carbohidratos, fibra, azúcares y vitaminas (Tabla 1).

Tabla 2

Composición nutricional de maracuyá

Parámetro	Unidad	Valor
Agua	g	84.21
Energía	kcal	60
Proteína	g	0.67
Grasas totales	g	0.18

Parámetro	Unidad	Valor
Carbohidratos	g	14.45
Fibra	g	0.2
Azúcares totales	g	14.25
Calcio	mg	4
Magnesio	mg	17
Fósforo	mg	25
Potasio	mg	278
Sodio	mg	8
Ácido ascórbico	mg	18.2
Riboflavina	mg	0.101
Vitamina B-6	mg	0.060
Folato	µg	8

Nota. Valores mostrados por cada 100 gramos de fruta (X. He et al., 2020).

Además de su constitución nutricional en el maracuyá se han identificado más de 110 constituyentes fitoquímicos entre los que destacan grupos de compuestos fenólicos, flavonoides y triterpenos (X. He et al., 2020).

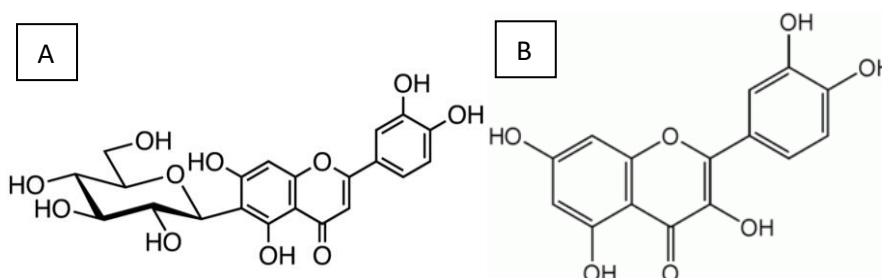
Flavonoides. El maracuyá representa una fuente importante de polifenoles de entre los que destacan los flavonoides, estudios han identificado 33 flavonoides de distintas partes de la planta que incluyen a la isoorientina, quercetina, luteolina, vitexina y apigenina. En la pulpa del fruto de maracuyá los flavonoides en mayor proporción corresponden a la isoorientina y a la quercetina con 158.0 y 16.2 µg/mL respectivamente (Deng et al., 2010; Rotta et al., 2019; Zeraik & Yariwake, 2010). Este tipo de metabolitos secundarios se subdividen en diferentes subgrupos en dependencia de la organización de sus átomos. Principalmente se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono en su esqueleto de forma C6-C3-C6 (E. L. Santos et al., 2017).

La isoorientina es una flavona C-glucósido, un tipo de flavonoide caracterizado por el doble enlace en las posiciones 2 y 3, y un grupo cetona en la posición 4 del anillo C. (Figura 4A). Por otro lado,

la quercetina es de tipo flavonol, con un grupo hidroxilo en la posición 3 y un grupo cetona en la posición 4 del anillo C (Figura 4B) (E. L. Santos et al., 2017).

Figura 4

Estructuras químicas de isoorientina y quercetina

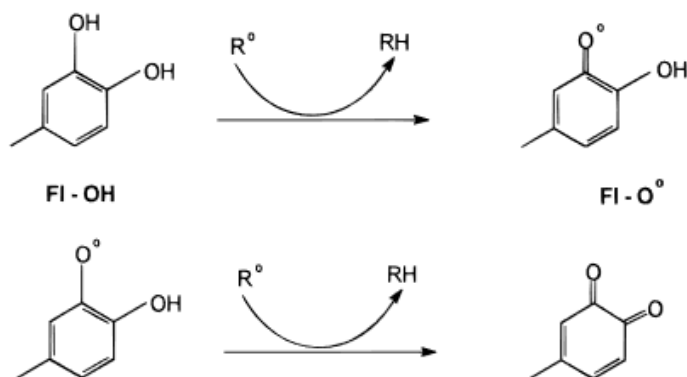


Nota. Isoorientina (A) y quercetina (B).

Los flavonoides, especialmente flavonas y catequinas, son capaces de actuar como antioxidantes mediante la protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Uno de los mecanismos involucrados en este efecto es la eliminación directa de radicales libres. Durante este proceso, los grupos hidroxilo de los flavonoides, que son altamente reactivos, son oxidados, y como consecuencia los radicales libres toman una forma estable e inactiva incapaz de causar daño celular (Figura 5). Algunos estudios han demostrado incluso la capacidad de ciertos flavonoides de eliminar el peroxinitrito (Panche et al., 2016) el cual es un oxidante fuerte capaz de inactivar enzimas y canales de iones e inhibir la respiración mitocondrial. Concentraciones bajas de peroxinitrito incluso detonan la muerte celular apoptótica y las concentraciones altas llegan a causar necrosis (Zaja-Milatovic & Gupta, 2015). Otro de los mecanismos antioxidantes de los flavonoides consiste en la inhibición de enzimas que actúan como fuente de radicales libres. Por ejemplo, la xantina deshidrogenasa (XO) es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular liberando radicales superóxido que causan estrés oxidativo en tejidos. Se ha encontrado que flavonoides como la quercetina, luteolina y la silibina pueden inhibir la actividad de esta enzima y por tanto reducen el daño oxidativo (Panche et al., 2016).

Figura 5

Esquema de reacción para la eliminación de radicales libres por flavonoides

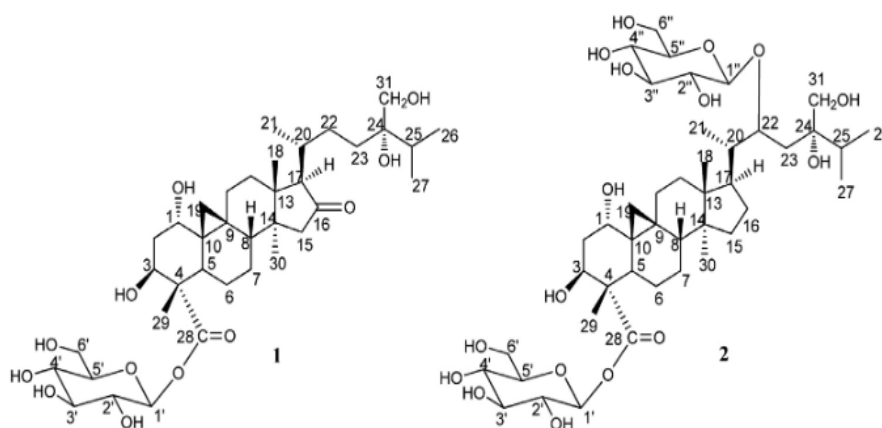


Nota. Fuente: Pietta (2000).

Triterpenos. En varias especies del género *Passiflora* se han descrito glucósidos triterpenoides de tipo cicloartano (Dhawan et al., 2004). En el maracuyá se reporta la existencia de ciclopasiflosidos II, VI, IX, XI, XII, XIII (Figura X) respectivamente, los cuales son triterpenos derivados del cicloartenol (C. Wang et al., 2013). Este tipo de moléculas también posee grupos hidroxilo que pueden reaccionar siguiendo el esquema de la figura 5, sin embargo, no existen estudios de sus posibles efectos antioxidantes.

Figura 6

Estructura química de los ciclopasiflosidos

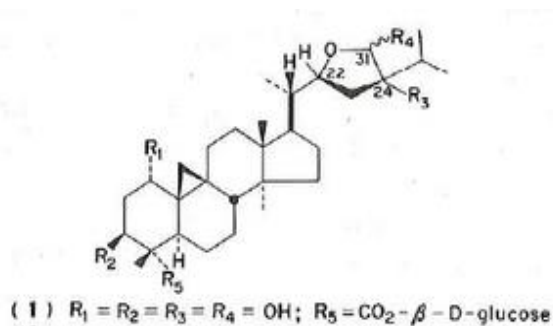


Nota. Ciclopasiflosidos XII (1) y XIII (2) (C. Wang et al., 2013).

La passiflorina (Figura 7) es un glucósido triterpenoide que ha sido investigado por sus efectos sedantes y ansiolíticos (Rojas et al., 2006; Sakalem et al., 2012). Su descubrimiento se dio en estudios fitoquímicos sobre varias especies del género *Passiflora* y el compuesto fue nombrado en honor a (Bombardelli et al., 1975).

Figura 7

Estructura química de la passiflorina



Nota. Fuente: Bombardelli et al. (1975).

Uso medicinal

La planta de maracuyá tiene principios activos que han sido explotados de manera empírica por la medicina tradicional. Se ha reportado su uso para tratar, ansiedad, asma, bronquitis, infecciones urinarias y desórdenes gastrointestinales (Zibadi & Watson, 2004). Sin embargo, los efectos específicos no han sido probados en su totalidad en estudios clínicos (Schotsmans & Fischer, 2011).

Se han usado extractos de hojas de maracuyá como sedantes leves y se han descrito efectos depresores no específicos sobre el sistema nervioso central en modelos animales (Maluf et al., 1991). De igual manera, extractos acuosos de la planta se han usado para bloquear parcialmente efectos estimulantes (Taiwe & Kuete, 2017). Extractos obtenidos de la cáscara de la fruta han logrado reducir la presión arterial y se han usado para disminuir los síntomas de asma (Zibadi & Watson, 2004). Además, extractos de la pulpa de fruta han demostrado efectos positivos en la curación de heridas del tejido gastrointestinal y de la vejiga de ratas (Gomes et al., 2006; Gonçalves Filho et al., 2006). Existe evidencia

de los efectos antiproliferativos de la proteína passiflina, que se encuentra en las semillas de maracuyá, evaluado en células de cáncer de mama y en línea MOLT-4 de leucemia linfoide. Igualmente, la passiflina posee efectos antifúngicos (Lam & Ng, 2009), extractos de maracuyá han demostrado estos mismos efectos contra hongos queratinofílicos (Dhawan et al., 2004). Los análisis bioquímicos y posteriores pruebas *in vitro* e *in vivo* han revelado la existencia de compuestos bioactivos (Tabla 2).

Tabla 3

Compuestos aislados de maracuyá

Efecto	Compuesto	Método/Modelo	Referencia
Anti-oxidante	Piceatannol	DPPH; ratones BALB/cByJ	Sano et al., 2011
	Scirpusina B	DPPH	Sano et al., 2011; Arai et al., 2016
Sedante	Isoorientina	Ratón albino suizo	Deng et al., 2010
Antiinflamatorio	Luteolina-8-C- β -digitoxopiranosido	Células RAW 264.7	Hu et al., 2018
	Orientina	Cáncer colorectal inducido en ratas	Thangaraj & Vaiyapuri, 2017

Nota. Se muestran los compuestos con efectos biológicos, métodos por el cual se analizó y respectivas referencias.

Taxo (*Passiflora tripartita*)

Descripción

Enredadera vigorosa de tipo leñosa, trepadora perenne perteneciente a la familia Passifloraceae. Sus hojas maduras son aserradas y miden de 7.5 a 10 cm de largo y crecen de forma alternada y trilobuladas, con color verde oscuro en su haz y opaco en el envés. Su flor posee una bráctea cilíndrica de color verde que puede medir hasta 10 cm de largo y sostiene una flor que mide de 5 a 7.5 cm de ancho con pétalos color rosado y un adrogínóforo con un largo estilo (Figura 8) (Morton, 1987).

Figura 8*Passiflora tripartita*

Nota. Flor (izq.) y fruto maduro (der.) de taxo.

El fruto de taxo es de tipo baya con forma oblonga-ovoide con un diámetro que va de los 3.2 a 4 cm y un largo de 8 a 15 cm. Tiene una corteza gruesa corácea ligeramente vellosa cuya tonalidad cuando está madura puede variar dependiendo del cultivar desde verde a amarillo/anaranjado. La pulpa gelatinosa es muy aromática de un color anaranjado salmón y envuelve a las semillas que son negras, planas y reticuladas (García-Ruiz et al., 2017).

Taxonomía

La primera descripción de la planta se le atribuye a Jean Louis Marie Poiret en el año de 1811, sin embargo, existe una confusión histórica debido a las distintas variantes (Ocampo Pérez & Coppens d'Eeckenbrugge, 2017; Primot et al., 2005). El sistema integrado de información taxonómica acepta a *Passiflora tripartita* como la especie madre de las variantes *mollissima* y *azuayensis* (ITIS - Report: *Passiflora tripartita*, 2011). La fruta de *Passiflora tripartita* es conocida con distintos nombres según el idioma y según cada país. Por ejemplo: curuba (Colombia), taxo (Ecuador), parcha (Venezuela), tumbo (Bolivia, Perú), banana passionfruit (inglés). Su taxonomía se detalla a continuación:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Passifloraceae

Género: Passiflora

Especie: *Passiflora tripartita* (ITIS - Report: *Passiflora tripartita*, 2011)

Origen y distribución, producción en Ecuador

Al igual que *Passiflora edulis*, la especie *Passiflora tripartita* tiene su origen en el continente sudamericano. Específicamente en la región andina y valles pertenecientes a lo largo desde lo que ahora es Venezuela hasta Perú (Morton, 1987). Cultivada ampliamente en Colombia, también cuenta con cultivos alrededor del mundo en países como Ecuador, Chile, México, Sudáfrica (Rodríguez et al., 2020) y Nueva Zelanda, país en el que es considerada una especie invasora (Popay, 2012).

La planta crece de manera óptima entre los 1800 y 3200 m.s.n.m pero también se ha adaptado a altitudes de 1200 a 1800 m.s.n.m. Aunque se encuentra en temperaturas promedio de 13 y 16 °C algunas variantes son capaces de soportar temperaturas de hasta -2 °C (Morton, 1987), sin embargo, estas temperaturas pueden afectar a las yemas reproductivas y los frutos (Rodríguez et al., 2020). Prefiere suelos franco arenosos o franco arcillosos con un pH de entre 5.5 a 6.5 en regiones con precipitaciones anuales de entre 1000 a 1500 mm. Los suelos deben poseer una buena capacidad de drenado pues el anegamiento afecta el crecimiento radicular y por ende la supervivencia de la planta (Rodríguez et al., 2020).

En Ecuador el cultivo de taxo se concentra en las regiones de la Sierra en las provincias de Pichincha, Imbabura, Tungurahua, Chimborazo, Azuay, Loja y Cañar. La producción de taxo no alcanza a niveles exportadores y en su mayoría se da por pequeños y medianos agricultores para satisfacer la demanda doméstica (Suntasi, 2010), por lo que los datos de cultivares no han sido representados en los censos de producción del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC, 2021).

Composición

La parte comestible del fruto de taxo es una fuente de vitaminas, calcio, fósforo, hierro y otros nutrientes (Tabla 3) (García-Ruiz et al., 2017). Además, se ha encontrado que presenta niveles altos de vitamina C cuando se compara con otro tipo de frutos tropicales y subtropicales (Moreno, 2014).

Tabla 4

Composición nutricional de taxo

Parámetro	Unidad	Valor
Agua	g	92
Proteína	g	0.6
Grasas totales	g	0.1
Carbohidratos	g	6.3
Fibra	g	0.3
Calcio	mg	4
Hierro	mg	0.4
Fósforo	mg	20
Ácido	mg	70
Riboflavina	mg	0.03
Vitamina A	IU	1700
Niacina	mg	2.5

Nota. Valores mostrados por cada 100 gramos de fruta (Cuaspud, 2015).

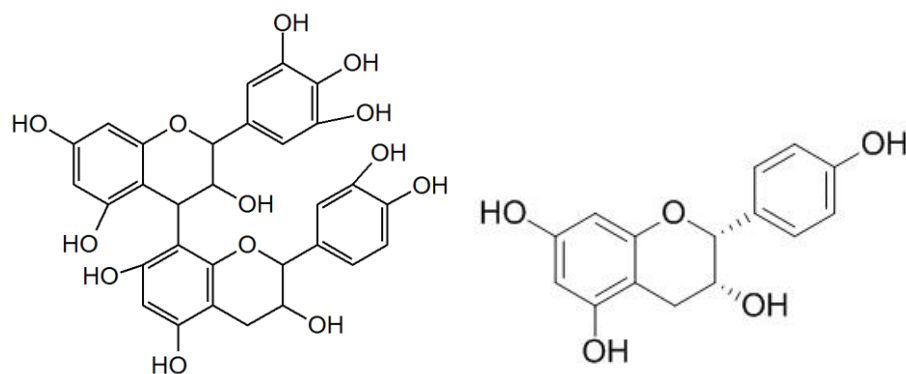
El taxo no solo es rico en compuestos con valor nutricional, los aromas propios de la fruta denotan la existencia de ésteres, terpenos y compuestos azufrados (Rojas Romaní et al., 2021). De igual manera, el contenido polifenólico es alto en donde destacan grupos flavonoides y carotenoides (García-Ruiz et al., 2017).

Flavonoides. Como se ha observado en el género *Passiflora*, sus especies se conocen por tener un contenido alto de flavonoides de tipo C-glicosilados (Simirgiotis et al., 2013). Estudios como el de García-Ruiz et al. (2017), han encontrado que la mayor parte de flavonoides existentes en el taxo son las

proantocianidinas y monómeros de flavan-3-ol, con sus principales representantes prodelfinidina B3 y epi-afzelequina respectivamente (Figura 9).

Figura 9

Estructura de flavonoides encontrados en taxo



Nota. Estructura de la prodelfinidina B3 (izq.) y epi-afzelequina (der.).

Al ser componentes polifenólicos, el contenido en flavonoides presente en el taxo se asocia con propiedades antioxidantes. Los iones metálicos como el hierro y cobre pueden actuar como catalizadores en las reacciones de producción de radicales libres dentro de un sistema biológico (Fraga et al., 2010). Por lo que además del mecanismo directo de eliminación de radicales libres presentado anteriormente, se ha descrito que los grupos hidroxilo adyacentes pueden actuar como queladores de iones metálicos y por tanto reducir la producción de estos radicales (Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018). Durante el estudio de N. Dai et al. (2014), se evidenció que el tratamiento con proantocianidinas, como es el caso de la pro delfinidina B3, tiene un efecto positivo en la regulación de esteatosis hepática inducida en modelos murinos. En este caso, se encontró que las proantocianidinas suprimen la acumulación de lípidos y el daño al DNA a la vez que restauran los niveles de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Además de prevenir cascadas de peroxidación, el tratamiento con proantocianidinas logró suprimir la expresión de enzima CYP2E1, involucrada en la formación de reactivos como el radical triclorometilo que están directamente

involucrados en los daños oxidativos observados en tejidos, aquí el efecto antioxidante se da de manera indirecta.

La inducción de enzimas antioxidantes no es el único efecto indirecto ejercido por los flavonoides, se ha encontrado que también son capaces de inhibir enzimas pro-oxidantes como la ciclooxigenasa (COX), sintasa de óxido nítrico (iNOX), lipoxigenasa, entre otras (Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018). Este tipo de efectos indirectos ha sido estudiado con catequinas, encontrando que hay una interacción con estas moléculas y factores involucrados en la activación de distintas rutas de señalización que promueven el estrés oxidativo. Por ejemplo, la activación y traslocación de NF-κB es un proceso normal, que se activa contra agentes patógenos, pero niveles muy altos de este factor amplifica el proceso inflamatorio corriendo el riesgo de dañar el tejido. Las catequinas actúan interrumpiendo la activación de NF-κB que a su vez disminuye la producción de citoquinas y quimioquinas, permitiendo regular las vías de señalización en pro de la homeostasis (Fan et al., 2017; L. Yang et al., 2018).

Carotenoides. El perfil de carotenoides de *taxo* se compone principalmente de tres compuestos (Tabla 4), siendo el B-caroteno aquel que se encuentra en mayor cantidad (García-Ruiz et al., 2017).

Tabla 5

*Composición de carotenoides de *taxo**

Compuesto	Concentración (µg/g de peso fresco)
α-caroteno	1.64
β-caroteno	79.74
zeaxantina	1.86

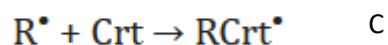
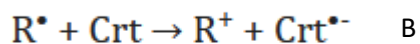
Nota. Fuente: García-Ruiz et al. (2017).

Algunos de estos pigmentos como la zeaxantina, además de conformar pigmentos en la mácula ocular (Bone et al., 1988), han sido asociados con la reducción en el riesgo de catarata y mejoras en las funciones cognitivas en pacientes de tercera edad (García-Ruiz et al., 2017). Fiedor & Burda (2014),

califican a los carotenoides como potentes antioxidantes naturales siendo uno de los extintores de oxígeno, tanto físico como químico, más eficientes en experimentos *in vitro* e *in vivo*. De manera general, los carotenoides son eliminadores de radicales libres mediante cuatro tipos de reacción: transferencia de electrones para formación de cationes o aniones (Figura 10A, 10B), formación de aductos (Figura 10C), y transferencia de hidrógeno (Figura 10D).

Figura 10

Reacciones de eliminación de radicales libres por carotenoides



Nota. R[•] representa el radical libre y Crt el carotenoide. Transferencia de electrones y formación de catión (A), transferencia de electrones y formación de anión (B), formación de aducto (C) y transferencia de hidrógeno (D). Fuente: Fiedor & Burda, (2014).

Aunque la formación de especies reactivas de carotenoides como resultado de su interacción con radicales libres puede afectar moléculas biológicas como las proteínas, en teoría, el reciclaje de estas especies reactivas con otros antioxidantes como la vitamina E y el ácido ascórbico es posible, resultando en radicales con menor potencial dañino (El-Agamey et al., 2004).

Uso medicinal

Los compuestos fitoquímicos identificados en varias partes de la planta de taxo tienen efectos antioxidantes, antimicrobianos y de estimulación del sistema inmune. Extractos obtenidos a partir de la hoja del taxo han tenido resultados positivos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (Canchanya &

Diestra, 2019) así como actividad cicatrizante en tejidos murinos (Solorzano & Diaz, 2021). La actividad antioxidante de los extractos del fruto también ha sido evaluada y se ha encontrado que el taxo posee una mayor actividad antioxidante que otras especies del género *Passiflora*. De manera empírica, las infusiones de hojas de taxo se suelen recetar para casos de insomnio por sus propiedades sedativas e hipnóticas (Costa et al., 2016; Moreno, 2014). De igual manera, al fruto se le atribuyen propiedades para el tratamiento del colesterol y complicaciones estomacales (Ruiz Reyes, 2018).

Lima (*Citrus x aurantifolia*)

Descripción

La lima, limero o limonero, es un árbol perenne perteneciente a la familia Rutaceae. Puede llegar a medir de 2 a 5 metros de altura, con un tronco torcido cuyas ramificaciones densas poseen espinas duras y pequeñas en las axilas. Las hojas, reconocidas por su aroma, son alternas de forma elíptica y miden de 5 a 7.5 cm de largo. Las flores de un color blanco amarillento pueden crecer de manera solitaria o en ramillete (Morton, 1987).

Figura 11

Citrus x aurantifolia



Nota. Árbol (izq.) y fruto (der.) de *Citrus x aurantifolia*.

El fruto, que mide de 2.5 a 5 cm de diámetro, también puede crecer solo o en ramillete es redondo y ligeramente elíptico (Figura 11). Posee un exocarpo áspero de color verde a amarillo según el grado de madurez. La jugosa pulpa es de color amarillo verdoso y se reconoce por su aroma y sabor ligeramente ácido, puede contener varias o muy pocas semillas dependiendo de la variedad y el estado de madurez (Morton, 1987).

Taxonomía

También denominada como *Citrus aurantiifolia*, esta especie conocida comúnmente como lima, lima ácida o limón según distintas regiones geográficas, es el resultado directo de una hibridación natural entre *Citrus micrantha* y *Citrus medica* (Rouiss et al., 2018). Su clasificación taxonómica se detalla a continuación:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: Citrus

Especie: *Citrus x aurantiifolia* (ITIS - Report: *Citrus X aurantiifolia*, 2011)

Origen y distribución, producción en Ecuador

Existe una variedad de especies e híbridos pertenecientes al género Citrus, los análisis con marcadores moleculares han determinado cuatro especies de las cuales se derivan el resto de especies cultivadas: *Citrus medica*, *Citrus reticulata*, *Citrus maxima* y *Citrus micrantha*. El origen geográfico de este género se centra en las regiones del sureste asiático y en Australia (Luro et al., 2018). Su cultivo se esparció hacia Europa a mediados del siglo 13, luego de lo cual las distintas especies fueron introducidas en América por los conquistadores (Morton, 1987).

Nativa de regiones tropicales, se ha encontrado que la lima también es capaz de crecer en altitudes mayores a los 1000 m.s.n.m. Soporta temperaturas mínimas de hasta 10 °C y prefiere suelos francos con un pH neutro con buena iluminación solar. Aunque la planta es capaz de soportar sequías leves, en los cultivos optimizados de lima se prefiere mantener suelos húmedos con un buen drenaje (UTEPI, 2006).

La ubicación geográfica de Ecuador favorece la producción de frutas del género *Citrus*, sin embargo, la mayor parte de la producción corresponde a materia prima como fruta fresca y no como producto procesado. Aunque los datos del INEC no reflejan específicamente la especie, la producción de limón a nivel nacional para el año 2021 fue de 22403 toneladas métricas con una superficie plantada de 5230 ha (INEC, 2021). Según Santistevan et al. (2018), en el Ecuador existen cultivos comerciales de *Citrus aurantifolia* y *Citrus latifolia* pero existe una diversidad de especies e híbridos lo que coincide con la descripción de Ojeda (2015), en la que se encontró especies como *Citrus limetta*, *Citrus limettioides*, entre otros.

Composición

Las frutas pertenecientes al género *Citrus* representan una rica fuente de vitaminas, minerales y micronutrientes esenciales (Jain et al., 2020). Los componentes nutricionales de *Citrus x aurantifolia* se presentan a continuación:

Tabla 6

Composición nutricional de lima

Parámetro	Unidad	Valor
Agua	g	89.2
Proteína	g	0.07-0.112
Grasas totales	g	0.04-0.17
Fibra	g	0.1-0.5
Calcio	mg	41.3
Hierro	mg	0.41

Parámetro	Unidad	Valor
Fósforo	mg	17.9
Ácido ascórbico	mg	30-48.7
Riboflavina	mg	0.011-0.023
Vitamina A	mg	0.003-0.040
Niacina	mg	0.14-0.25

Nota. Valores mostrados por cada 100 gramos de fruta (Czech et al., 2020; Morton, 1987).

Además de sus componentes nutricionales, la planta de lima es rica en compuestos fitoquímicos como flavonoides, triterpenos y limonoides (Narang & Jiraungkoorskul, 2016). En el extracto del fruto de lima se ha encontrado que el mayor constituyente fitoquímico pertenece a flavonoides, terpenoides y por último fenoles (Adebayo-Tayo et al., 2016). En ensayos de caracterización de aceites esenciales, la composición de terpenos en mayor proporción son el limoneno, γ -terpineno y β -pineno respectivamente (Spadaro et al., 2012).

Limonoides. Los limonoides se consideran como una subclase de triterpenos que se encuentran de manera abundante en especies pertenecientes al género Rutaceae y Meliaceae (Sato, 2013). Se ha descrito que los limonoides son compuestos bioactivos beneficiosos, con propiedades versátiles tanto promotoras de la salud como preventoras de enfermedades (Matheyambath et al., 2016). Aunque en menor proporción que los flavonoides, los limonoides también ejercen actividades antioxidantes, las cuales han sido demostradas mediante ensayos tipo DPPH y de oxidación de LDL (Yu et al., 2005). Por ejemplo, se ha estudiado los efectos antioxidantes de la limonina y se ha encontrado que es capaz de inducir la expresión de enzimas reductasas y transferasas. En este ámbito, ensayos *in vitro* han determinado que específicamente activa la ruta Nrf2-ARE en relación a la dosis aplicada, dicha ruta está involucrada en la activación de los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) por medio del Nrf (Qin et al., 2018). Se ha observado los efectos de moléculas como el limoneno en la eliminación de radicales libres y en la modulación de enzimas antioxidantes, encontrando que el tipo de enzima estimulada también depende de la concentración de limoneno aplicado. Los efectos antioxidantes no son los únicos

que dependen de la dosis y exposición, efectos anti proliferativos y de protección contra daños genéticos también han sido descritos en ensayos *in vitro* y en modelos murinos (Bacanli et al., 2015; Patil et al., 2009; Roberto et al., 2009).

Uso medicinal

Estudios enfocados en medicina ancestral del África central han encontrado que la lima se usa en forma de extracto crudo, infusiones o emplastos para tratar infecciones comunes. La investigación a nivel microbiológico del jugo de lima o en combinación con otras hierbas ha demostrado actividades antimicrobianas contra especies como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* y *Aspergillus niger* (Aibinu et al., 2006; Pathan et al., 2012). Por otra parte, se ha encontrado que los compuestos de tipo flavonoides presentes en la lima ejercen actividad moduladora de los niveles de glucosa en modelos animales insulino resistentes, esta actividad sumada a efectos homeostáticos de las concentraciones lipídicas en sangre sugieren que este tipo de moléculas tienen el potencial para ser estudiadas como terapéuticos en cuadros de hipertrigliceridemia y diabetes (Karimi & Nasab, 2014; R. W. Li et al., 2006). De igual manera se ha estudiado los efectos de los aceites esenciales de lima en dietas altas en grasas, los resultados denotan el potencial de estos extractos para reducir los niveles de colesterol, controlar cuadros de obesidad y sus patologías asociadas como enfermedades coronarias, hipertensión, osteoartritis, entre otras (Josephine & Ngozi, 2015; Oboh et al., 2015). También se ha descrito las propiedades antiparasitarias de los extractos de lima contra *Ascaridia galli* (Abdelqader et al., 2012). Igualmente, y de manera empírica, el uso del jugo de cítricos ha sido utilizado históricamente como insecticida casero. Los resultados de Sarma et al. (2019) atribuyen la base científica de este efecto a los componentes, específicamente el citral, del extracto de hoja y cáscara de lima usados en contra de *Aedes aegypti*.

Capítulo III: Metodología

Obtención de las muestras de frutas

Se extrajo la pulpa de maracuyá, taxo y lima, y se licuó hasta obtener aproximadamente 300 mL de extracto por cada fruta. El extracto fue filtrado y se colocó 25 mL en tubos falcon de 50 mL, se obtuvo 10 tubos por cada muestra frutal. A cada tubo se añadió 25 mL tampón fosfato salino (PBS) 1X para obtener una dilución 1:1. Finalmente, cada tubo se mezcló por inversión hasta obtener una mezcla homogénea.

Centrifugación diferencial

El proceso de centrifugado fue realizado en la centrífuga Universal 320R (Hettich 1406). En primer lugar, los tubos falcon de 50 mL fueron sometidos a 400 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recogido en tubos limpios y se centrifugó a 800 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue recogido nuevamente y se sometió a centrifuga a 7600 g durante 40 minutos a 4°C. Por último, se recogió el sobrenadante en otro tubo y el pellet fue re-suspendido en 1.5 mL de PBS 1X, ambos fueron almacenados a -20°C para posterior análisis.

Purificación por columna de exclusión de tamaño

La purificación de exosomas se realizó en la columna de exclusión por tamaño (SEC) iZON qEVoriginal (iZON Ref: SP1). Se recolectó alrededor de 25 fracciones de 0.5 mL luego de una pasada de 1 mL de muestra del sobrenadante almacenado previamente. Este proceso se realizó por triplicado por cada fruta, manteniendo la cadena de frío para evitar desnaturalización de proteínas.

Cuantificación proteica

La cuantificación inicial de proteínas se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific™ J999), utilizando 2 µL de las fracciones concentradas en la lectura para proteínas A280.

Concentración de proteínas

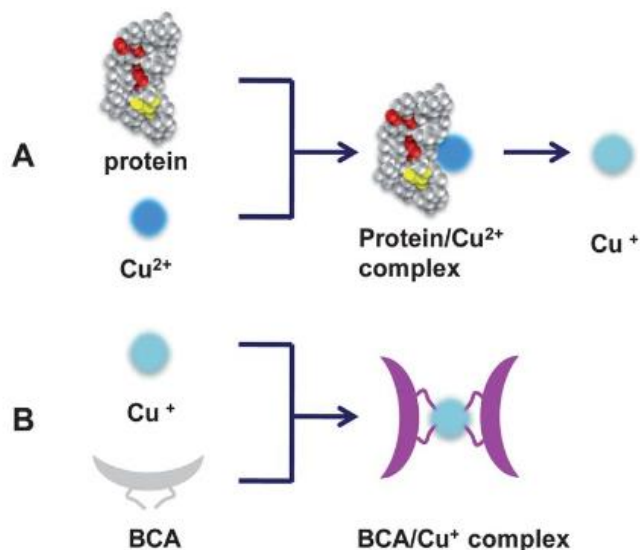
Se utilizaron fracciones cuya concentración inicial fue de 0.8 a 2 mg/mL y se concentró mediante tubos Amicon Ultra-4 100 K (Amicon® Ultra 10K device - 10,000 MWCO), los cuales fueron llenados con 4 mL y centrifugados a 5000 g por 10 minutos y 4 °C. El concentrado fue colocado en tubos de 0.6 mL mientras que el filtrado se colocó en tubos de 2 y 1.5 mL para su posterior lectura y almacenamiento.

Cuantificación proteica por ensayo de ácido bicinonónico (BCA)

El ensayo de ácido bicinonónico (BCA) permite cuantificar proteínas en una muestra basándose en la detección del catión cuproso Cu^+ que proviene de la reducción de Cu^{2+} en presencia de proteínas y medio alcalino (Smith et al., 1985). En el primer paso de la reacción, el cobre quelado con la proteína forma un complejo de color azul claro. El catión cuproso formado reacciona con el BCA formando un complejo soluble de color morado (Figura 12) el cual exhibe una fuerte relación lineal de absorbancia a 562 nm a medida que se incrementa la concentración proteica (Olson & Markwell, 2007).

Figura 12

Reacción del ensayo de BCA.



Nota. Obtenido de Chen et al. (2012).

Las muestras concentradas y fracciones recolectadas fueron cuantificadas mediante el ensayo de BCA (Sigma-Aldrich™ N°Cat: BCA1 y B9643) en una placa de 96 pocillos, se utilizó 5 µL de cada muestra y 20 µL de PBS 1X para obtener un factor de dilución de 5. La gamma de proteína estándar se realizó por duplicado con un rango de 0 - 1000 ug/mL y se utilizó PBS 1X como blanco. Luego se añadió 200 µL de la solución de trabajo a cada pocillo. La placa fue incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se utilizó el lector de placas iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad N° 16962) para medir la absorbancia a 550 nm. El análisis de los resultados obtenidos se realizó en el software Microsoft Excel, para la obtención de la concentración proteica se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$NET\ Abs_{550} = A_{550}muestra - A_{550}blanco \quad (1)$$

$$[Proteína] \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{NET\ Abs_{550} - b}{m} \cdot FD \quad (2)$$

Donde b y m representan el punto de corte en el eje de las ordenadas y la pendiente obtenidas de la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración con concentraciones conocidas en el ensayo BCA; y FD representa el factor de dilución utilizado en las muestras.

Visualización de muestras en TEM

La preparación de muestras se realizó sobre mesh de cobre TED PELLA INC (N° 01753-F) en la que se colocó 10 µL de muestra durante un minuto. Posteriormente el exceso de líquido fue retirado con papel filtro para luego añadir 10 µL de acetato de uranilo al 2% por cinco segundos. El exceso de acetato de uranilo fue retirado con papel filtro y luego se lavó el mesh por triplicado con 10 µL de agua destilada. Las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) (FEI Tecnai G2 Spirit Twin) a un voltaje de aceleración de 80 kV. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software Fiji (ImageJ 1.53q) para determinar la cantidad de exosomas y sus tamaños.

Preparación de muestras para electroforesis vertical

Se prepararon alícuotas de 50ug de proteína total para ser cargadas en los pocillos del gel utilizado en electroforesis. Las muestras fueron lisadas con buffer RIPA en proporción 1:5 e incubadas en

hielo por cinco minutos. Se preparó muestras en condiciones desnaturizantes, reductoras y no reductoras (sin 2-mercaptoetanol), para lo cual se añadió en proporción 1:2 buffer de carga 4X (SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0.4%, 2-mercaptoetanol 8% (opcional según la condición), Tris-HCl 250 mM, pH 6.8). La condición desnaturizante fue conseguida mediante la incubación de las muestras a 95°C por 5 minutos y luego un choque térmico en hielo por 5 minutos.

Electroforesis vertical

Se utilizó geles de separación al 8% y gel de concentración al 4%, los cuales fueron preparados con acrilamida/bisacrilamida líquida al 40% (Fisher Bioreagents™ BP1408-1). Los geles fueron ensamblados con el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad™ 1658004) utilizando tetrametiletilendiamina al 0.1% (Invitrogen™ 155240) para su polimerización. Se cargó las muestras de proteínas junto con 3 µL del marcador Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad 1610374).

La corrida se realizó mediante buffer de electroforesis 1X (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) con 120V constantes durante 120 minutos. La revelación de proteínas en gel se realizó utilizando tinción con solución de azul de Coomassie (Coomassie Blue R-250 0,5%, metanol 25% y ácido acético glacial 50%). La fotodocumentación se realizó con el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad 12003154) y las imágenes fueron analizadas con el software ImageLab 6.1 (Bio-Rad).

Inmunoblot

La transferencia a membrana se realizó en el equipo Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Model #1704150) utilizando membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm (General Electric 10600023). Los geles provenientes de la corrida electroforética fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH: 8,3) durante 10 minutos. Al mismo tiempo, las membranas PVDF fueron activadas con metanol al 98% durante 10 segundos y luego en buffer de transferencia por un minuto. Para la transferencia se utilizó piezas de papel Whatman

humedecidas con buffer. La transferencia se realizó con un protocolo de tres ciclos de 2.5 A y 25 V durante 7 minutos.

Posterior a la transferencia, las membranas fueron lavadas por 10 minutos con buffer TBS 1X (tris base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) para luego ser incubadas con 3 mL de solución de bloqueo (BSA 5%, TTBS (TBS 1X + Tween 20 al 0,1%)) a temperatura ambiente por 2 horas. Luego, se realizaron seis lavados de cinco minutos en agitación constante con buffer TTBS. Las membranas luego fueron incubadas por dos horas con 3 mL de anticuerpo primario, los cuales fueron preparados según lo descrito en la tabla 6.

Tabla 7

Anticuerpos y diluciones utilizadas

Anticuerpo	Dilución de trabajo	Casa comercial, N° catálogo
Anti-CD63	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-5275
Anti-CD69	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-373799
Anti-ALIX	1:500	Santa Cruz Biotechnology, sc-53540
Anti-CD81	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, sc-166029

Una vez incubado el anticuerpo primario, se procedió a lavar las membranas con buffer TTBS según lo descrito anteriormente. Para el anticuerpo secundario se utilizó 3 mL de anticuerpo de cabra anti ratón conjugado a peroxidasa GAM-HRP (Inmuno-Star Goat Anti-Mouse) en una concentración 1:15000. El proceso de incubación con el anticuerpo secundario duró 2 horas en agitación constante y

oscuridad. Luego, se volvió a lavar las membranas con buffer TTBS según el procedimiento descrito anteriormente. Finalmente, la membrana fue incubada por 5 minutos en oscuridad con una proporción 1:1 del sustrato Kit Clarity ECL Western Substrate (Bio-Rad 1705060) para su posterior revelación en el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad 12003154). El análisis de las imágenes y tamaños de bandas obtenidas fue realizado en el software ImageLab 6.1 (Bio-Rad) con la herramienta de análisis por carriles.

Cultivo celular

Las líneas celulares HEK293 (ATCC, CRL-1573), HFF (ATCC, SCRC-1041) y HeLa (ATCC, CRM-CCL-2) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Los pasajes celulares preservados a $-198\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron re-suspendidos en 1 mL de medio de cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. El pellet de células fue re-suspendido según el medio correspondiente (Tabla 7) y transferido a flask de cultivo celular de 25 mL (Thermo Scientific™ 156367) el cual fue incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 .

Tabla 8

Líneas celulares y medio completo utilizado

Línea celular	Medio completo
HFF	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco A14430-01) + 15% BSA.
HeLa	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Eurobio CM1MEM40-01) + 10% BSA.
HEK293	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Eurobio CM1MEM40-01) + 10% BSA.

Una vez en confluencia celular en el flask verificada mediante visualización en microscopio invertido Austria micros (MCX1600) se procedió con el plaqueo en placas de 96 pocillos. En primer lugar, los flasks fueron lavados dos veces consecutivas con PBS (Dulbecco CS3PBS0-01) con el fin de eliminar desechos celulares del medio. Luego, se levantó las células con 2 mL de tripsina (Gibco 2520-056) por cada flask por aproximadamente cinco minutos a 37 °C. Las células levantadas fueron recolectadas y centrifugadas a 1200 rpm por cinco minutos. El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer con el método de azul de tripán (Gibco 15250-061). Las placas P96 fueron sembradas con 10000 células por pocillo y 100 mL de medio de cultivo completo correspondiente para luego ser incubadas a 37 °C y 5% de CO₂.

Posteriormente las líneas celulares fueron tratadas por cuadruplicado con 5 y 20 ug de proteína según las distintas muestras. Se utilizó como controles negativos: cloruro de cobalto (CoCl₂) a una concentración de 400 µM y 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). La exposición de las líneas celulares a los distintos tratamientos se analizó por 24 y 48 horas en las condiciones de incubación previamente mencionadas.

Ensayo MTT

Se aplicó 10 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 5 mg/mL (Invitrogen M6494) por cada pocillo para la aplicación de los tratamientos durante 24 y 48 horas. El MTT fue incubado por 4 horas para luego añadir 10 µL de SDS al 10% por pocillo. Tras 24 horas de aplicación del reactivo MTT la absorbancia de los pocillos fue medida a 570 nm en espectrofotómetro para microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific™* Cat N° N10588).

Viabilidad celular

El análisis de viabilidad celular se realizó utilizando las lecturas de absorbancia del ensayo MTT y presentadas por % de viabilidad celular según las siguientes ecuaciones:

$$NET\ Abs_{570} = A_{570}muestra - A_{570}blanco \quad (3)$$

$$\%Viabilidad\ Celular = \frac{A_{570muestra}}{A_{570control}} \cdot 100 \quad (4)$$

En donde $A_{570\text{ control}}$ representa la viabilidad del 100% al no añadir ningún tratamiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con comparaciones múltiples entre los tratamientos frente al control y entre tiempos de exposición, utilizando el paquete de software estadístico Graphpad Prism 9 (GraphPad Software, EE. UU.) considerando diferencias significativas con un valor $p < 0.05$.

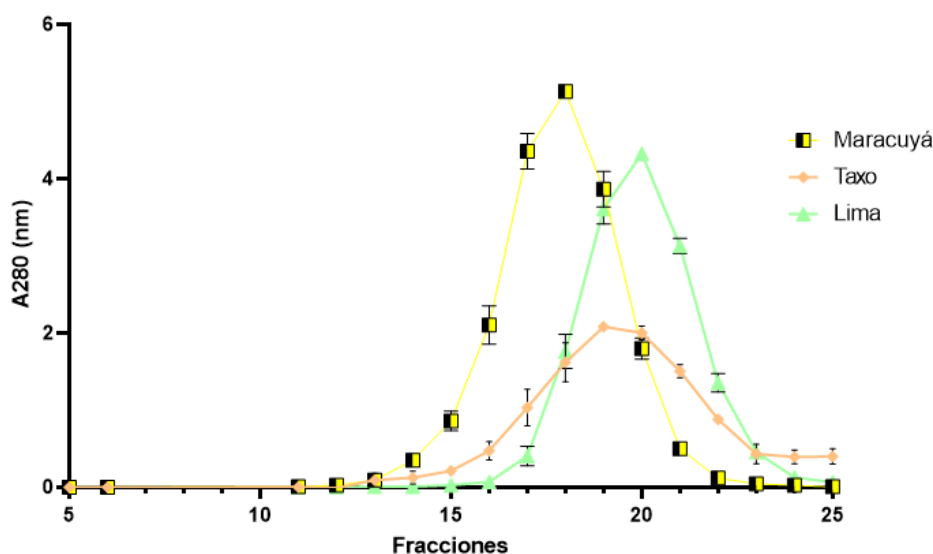
Capítulo IV: Resultados

Obtención y caracterización de exosomas de maracuyá, taxo y lima

Posterior al proceso de centrifugación y a la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se obtuvo 25 fracciones de 0.5 mL cada una por cada muestra. La absorbancia a 280 nm medida en cada fracción arrojó valores comprendidos entre 0 y 6 mg proteína/mL de muestra con un máximo variable dependiendo del tipo de muestra y de la fracción (Figura 13). Los tres tipos de muestras presentaron un comportamiento similar en cuanto a elución proteica, observándose una curva creciente que alcanza un pico máximo para luego descender.

Figura 13

Absorbancia a 280 nm de las distintas fracciones de maracuyá, taxo y lima.

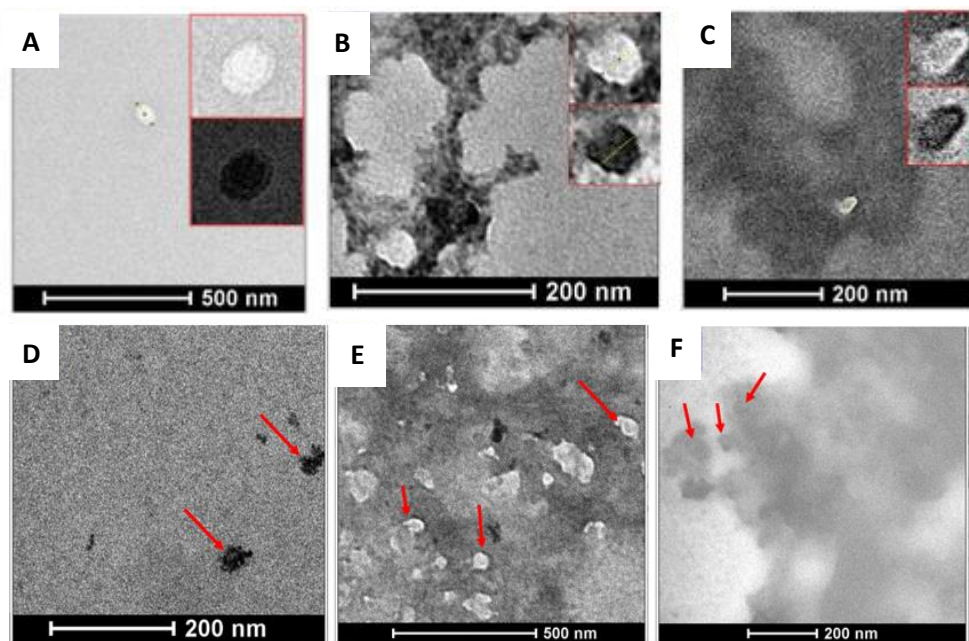


Nota. La absorbancia a 280 nm se relaciona con la concentración proteica de la fracción medida.

La visualización de fracciones obtenidas por medio de TEM reveló la existencia de exosomas, en las tres muestras, dentro de la escala nanométrica caracterizadas vesículas con forma de esférica ahuecada que se asemeja a la forma de un balón desinflado (Figura 14).

Figura 14

Exosomas de maracuyá, taxo y lima observados por TEM

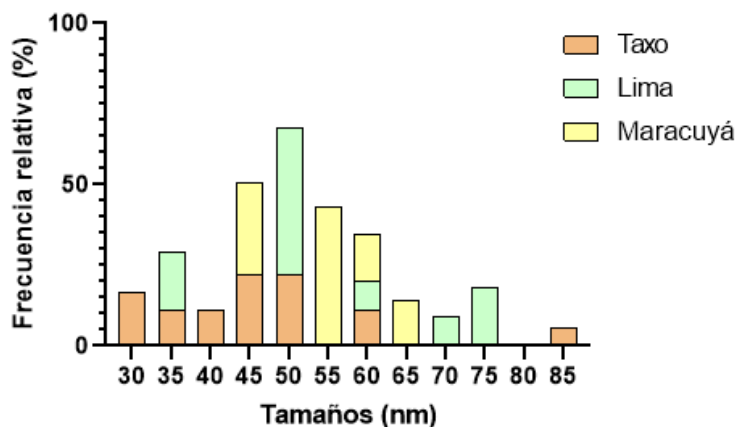


Nota. Se diferencia una capa rodeando a los exosomas con forma esférica ahuecada. Exosomas de taxo (A, D), lima (B, E) y maracuyá (C, F).

La población de exosomas encontradas es heterogénea, con un rango de diámetros que va desde los 30 a los 83 nm (Figura 15). La mayor parte de exosomas en las tres diferentes muestras se concentraron en tamaños que van desde los 45 a 60 nm.

Figura 15

Frecuencias relativas de los exosomas de maracuyá, taxo y lima



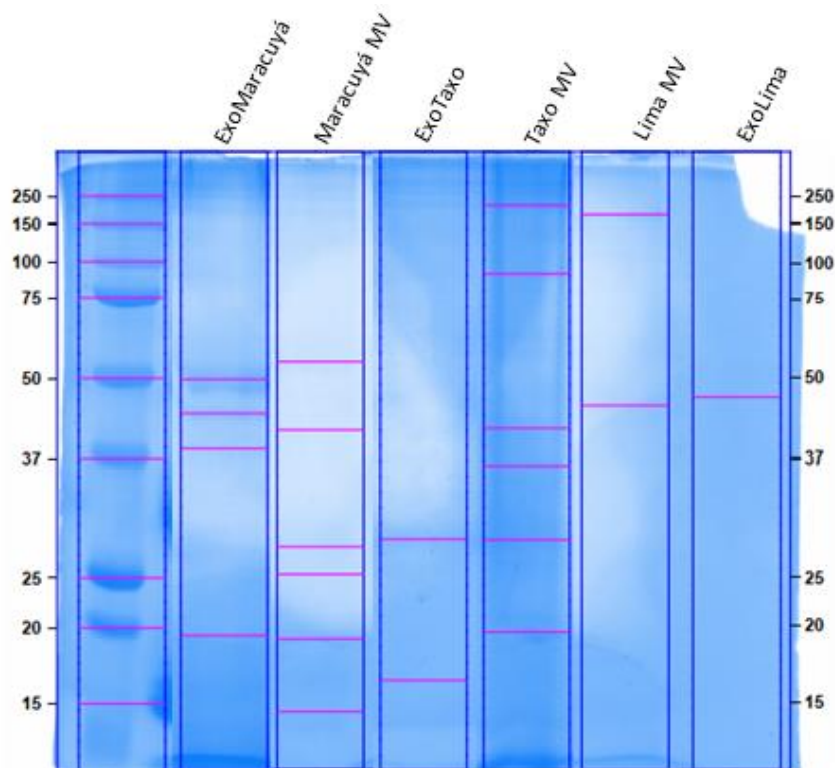
Nota. Población de exosomas desde los 30 a 85 nanómetros, con mayor cantidad en el rango de 45 a 60 nm.

Perfil proteico de exosomas de maracuyá, taxo y lima

El perfil proteico visualizado con tinción de azul de Coomassie, tanto de las muestras purificadas por columna, como de las del pellet re-suspendido con contenido de microvesículas fue variado para las tres muestras. La figura 16 muestra las bandas detectadas mediante el análisis de perfil de carriles del programa ImageLab 6.1. Se observaron proteínas de entre 15 a 250 kDa. La separación y distinción de bandas fue más clara en carriles cargados con muestras correspondientes al pellet re-suspendido. Sin embargo, se observaron bandas en común entre carriles pertenecientes a la misma muestra.

Figura 16

Perfiles proteicos de muestras de exosomas y microvesículas de maracuyá, taxo y lima



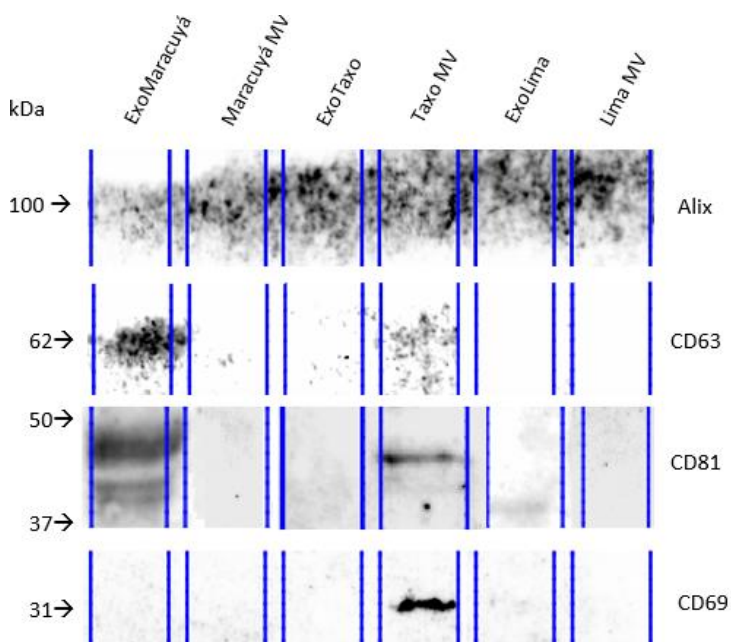
Nota. El prefijo Exo hace referencia a exosomas aislados y purificados. Los pellets re-suspendidos de cada muestra, que contienen microvesículas, se denotan con las siglas MV. Los tamaños se presentan en kDa, marcador de peso (carril 1), exosomas y microvesículas de maracuyá (carril 2 y 3), exosomas y microvesículas de taxo (carril 4 y 5), microvesículas y exosomas de lima (carril 6 y 7).

La muestra correspondiente a exosomas de maracuyá presentó 4 bandas de proteínas de 50, 44, 38 y 20 kDa, mientras que su contraparte de microvesículas presentó bandas similares con un tamaño de 53, 41 y 20 kDa respectivamente. Por otro lado, el perfil proteico de los exosomas de taxo mostró bandas de 28 y 16 kDa, en este caso, una banda de 28 kDa también se observó en su contraparte de microvesículas. Por último, las muestras de lima presentaron bandas más tenues en comparación al resto de muestras. Se logró distinguir una banda de 46 kDa en el carril correspondiente a exosomas y dos bandas de 177 y 45 kDa en el carril correspondiente a las microvesículas (Figura 16).

Los resultados de la detección de proteínas exosomales CD63, CD69, ALIX y CD81 se muestran en la figura 17. En la detección de ALIX, los resultados mostraron la presencia de una banda difusa alrededor de los 100 kDa en todas las muestras. Por otro lado, se detectó CD63 en las muestras correspondientes a exosomas de maracuyá y microvesículas de taxo, con un tamaño de 62 kDa. En la detección de CD81 se observó bandas entre 37 y 50 kDa en exosomas de maracuyá y lima; una banda visible dentro del mismo rango de tamaño se observó en la muestra de microvesículas de taxo. Por último, se detectó CD69 en microvesículas de taxo, a través de la visualización de una banda diferenciada con un tamaño de 31 kDa (Figura 17).

Figura 17

Inmunoblot para detección de proteínas en exosomas y microvesículas de maracuyá, taxo y lima.



Nota. Detección de ALIX (100 kDa), CD63 (62 kDa), CD81 (37-50 kDa) y CD69 (31 kDa) en distintas muestras de exosomas purificados y microvesículas.

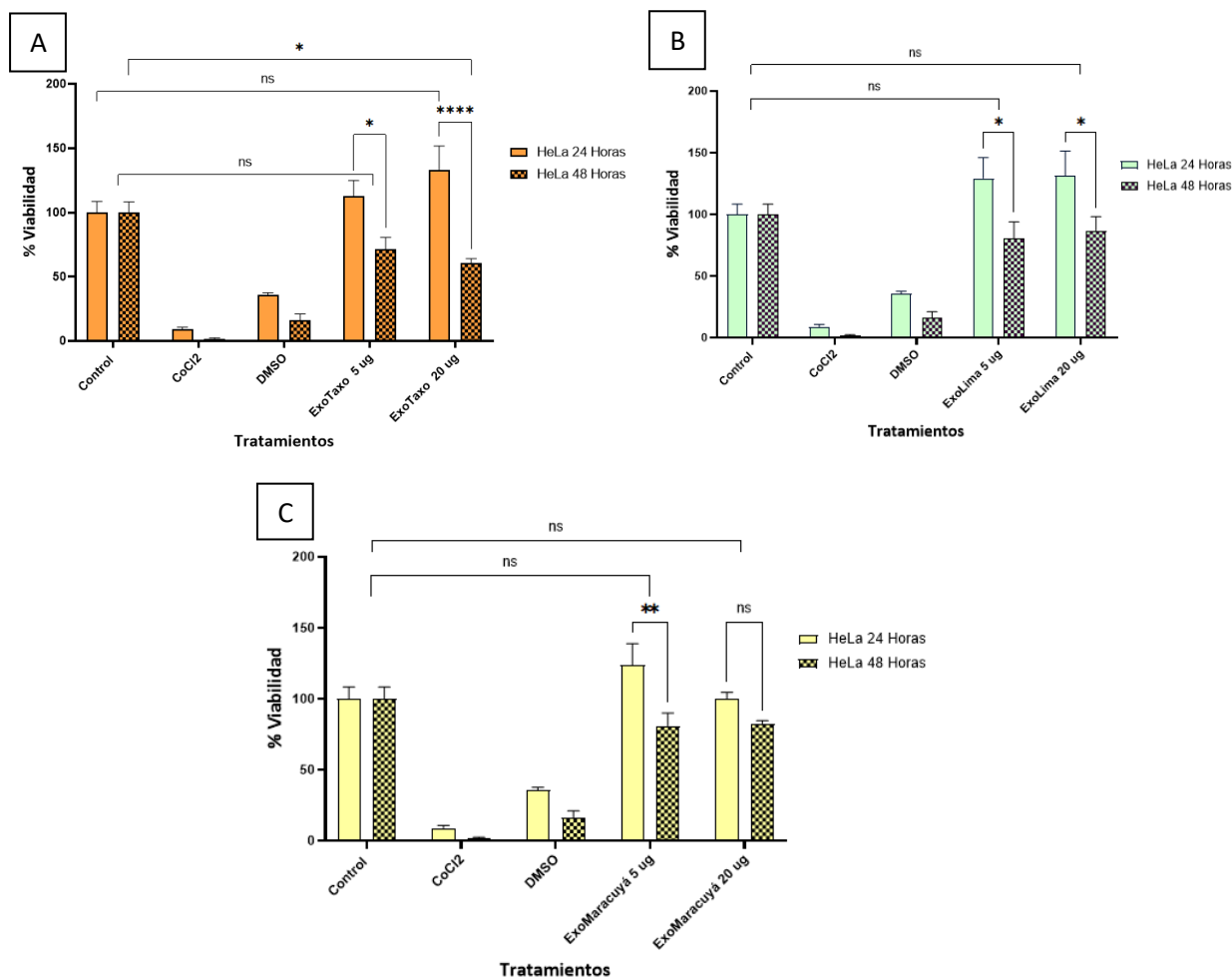
Citotoxicidad de exosomas en líneas celulares

La variación de la viabilidad celular luego de la exposición a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de los exosomas en tres líneas celulares se detallan a continuación. En la línea celular

HeLa, se observó el mismo patrón de comportamiento en los tratamientos con exosomas purificados de las tres muestras: la viabilidad celular se mantuvo constante o aumentó durante las primeras 24 horas y luego se observó una reducción por debajo del control a las 48 horas de exposición (Figura 18). La reducción de viabilidad a las 48 horas de exposición tuvo una variación del 15 al 20% con exosomas de lima y maracuyá, mientras que se observó una reducción del 30 al 40% con exosomas de taxo. La reducción observada en los exosomas de taxo a mayor concentración y mayor tiempo de exposición fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararse con el control (Figura 18A).

Figura 18

Viabilidad celular de líneas HeLa al exponerse a exosomas de maracuyá, taxo y lima



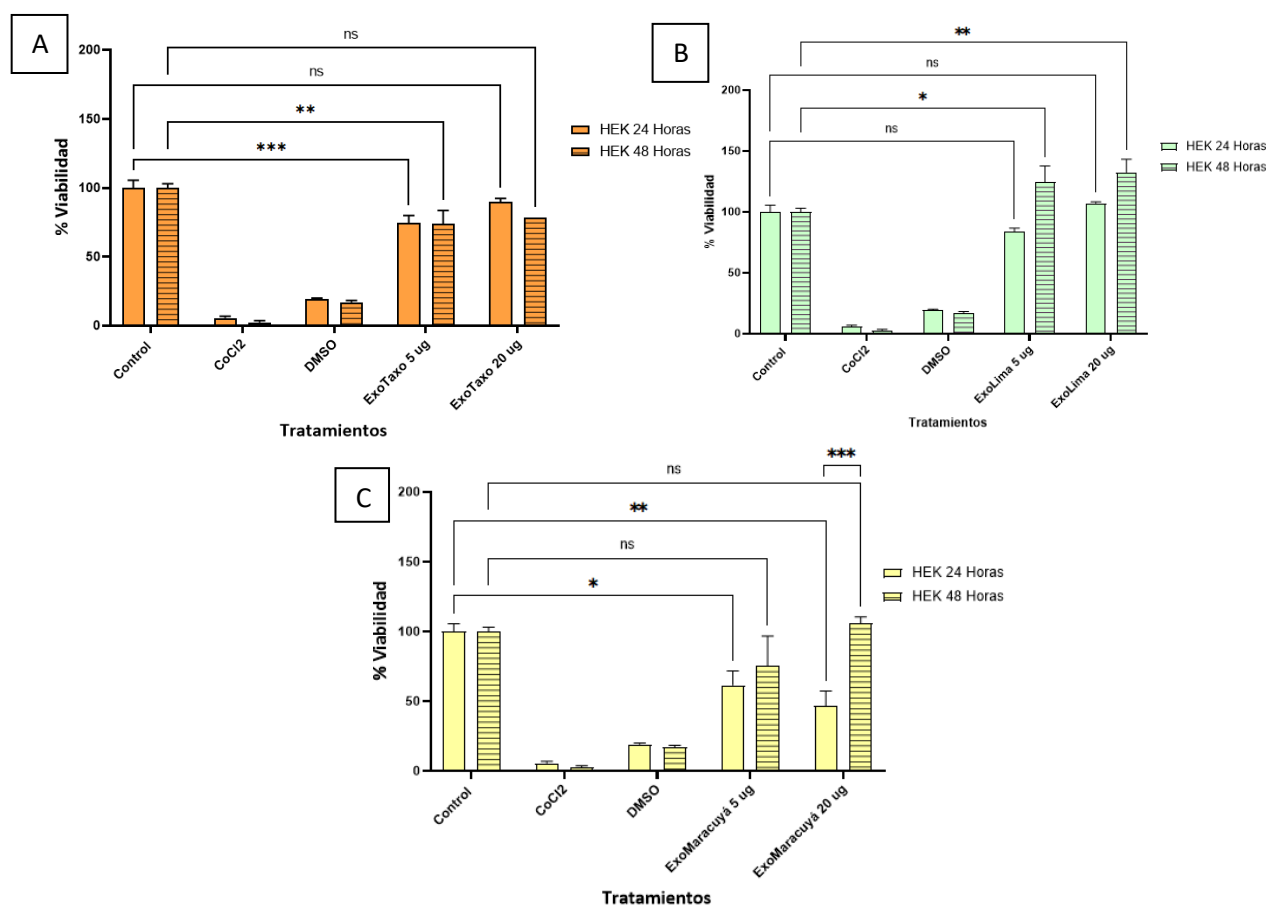
Nota. Tratamientos con 5 y 20 µg de exosomas de taxo (A), lima (B) y maracuyá (C). Diferencias

significativas presentadas con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Se observó una reducción de la viabilidad en células HEK293 luego de su exposición a exosomas de taxo a 24 y 48 horas. Dicha reducción es independiente del tiempo de exposición y resulta estadísticamente significativa ($p < 0.05$) cuando se trata de una menor concentración de exosomas (Figura 19A). También se evidenció un aumento significativo ($p < 0.05$) de la viabilidad de celular en la línea HEK293, independiente de la concentración aplicada, al ser tratados con exosomas de lima por 48 horas (Figura 19B). El tratamiento con exosomas de maracuyá por 24 horas tuvo un efecto de reducción significativo ($p < 0.05$) en la viabilidad celular de HEK293, se observa que esta reducción es dependiente de la concentración y cuando ésta aumenta la diferencia es más significativa ($p < 0.01$) (Figura 19C).

Figura 19

Viabilidad celular de líneas HEK293 al exponerse a exosomas de maracuyá, taxo y lima

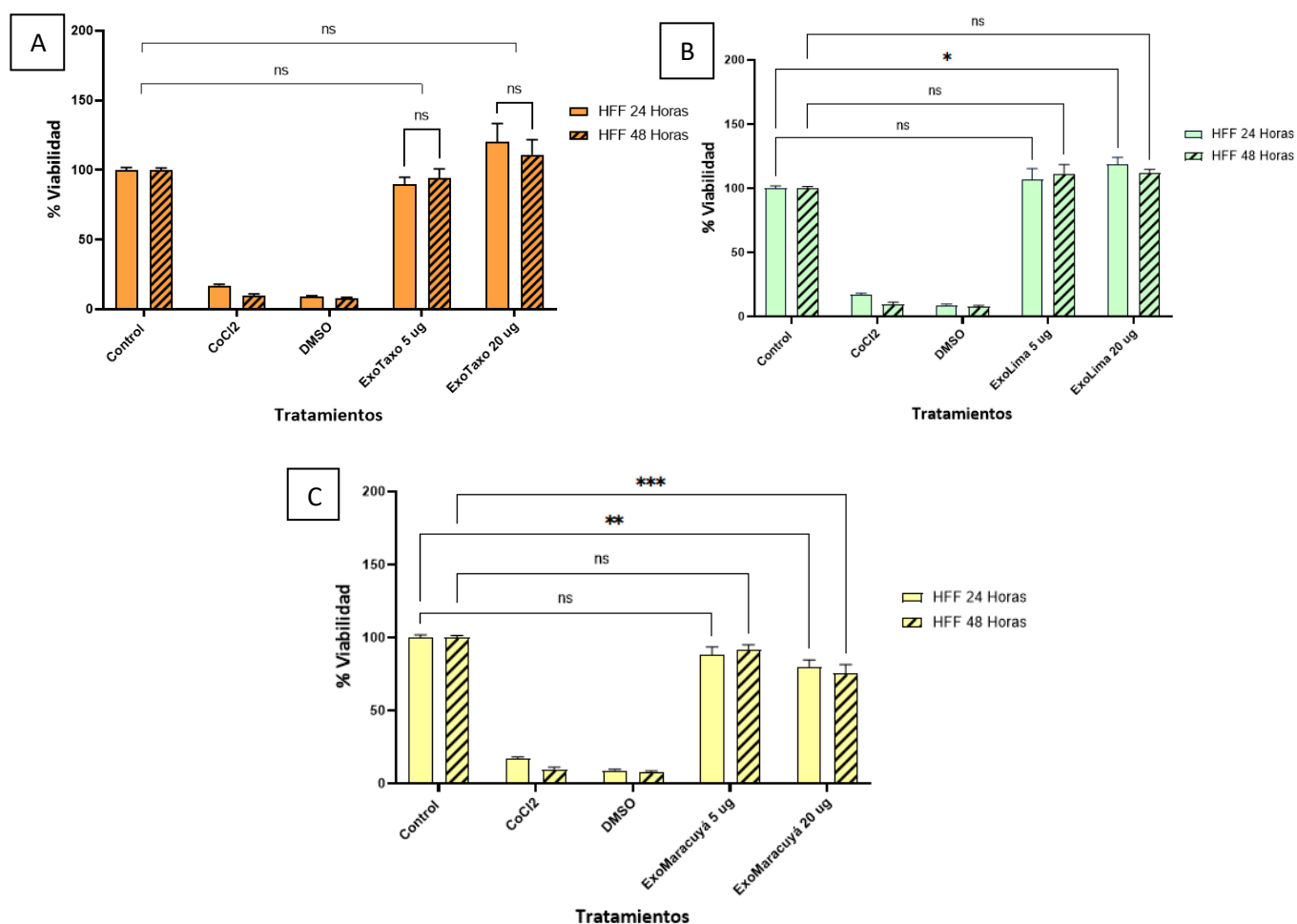


Nota. Tratamientos con 5 y 20 µg de exosomas de taxo (A), lima (B) y maracuyá (C). Diferencias significativas presentadas con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Por último, en la línea HFF se observaron cambios de reducción de viabilidad celular significativos ($p < 0.01$) únicamente en el tratamiento con 20 μg de exosomas de maracuyá (Figura 20C). Los tratamientos a mayor concentración de exosomas de taxo y lima tienen un efecto proliferativo en la línea HFF (Figura 20A, 20B), este efecto resulta significativo ($p < 0.05$) en la muestra de lima con 24 horas de exposición (Figura 20B).

Figura 20

Viabilidad celular de líneas HFF al exponerse a exosomas de maracuyá, taxo y lima.



Nota. Tratamientos con 5 y 20 μg de exosomas de taxo (A), lima (B) y maracuyá (C). Diferencias significativas presentadas con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Capítulo V: Discusión

La descripción de lo que hoy se considera como exosomas en plantas, se dio antes de su descripción en células de mamíferos. Halperin & Jensen (1967), en su estudio sobre embriogénesis en células de zanahoria, mencionan la presencia de vesículas secundarias dentro de MVB's los cuales se fusionan con la membrana celular para descargar su contenido. Más adelante, An et al. (2007) con métodos de visualización de células vivas describen la presencia de vesículas con funciones y estructuras similares a los exosomas ya descritos en mamíferos. El aislamiento e identificación de exosomas en una fruta comestible se dio por primera vez en 2013 mediante la técnica de centrifugación diferencial seguido de centrifugación con gradiente de densidad (Ju et al., 2013). De ahí en adelante, se ha logrado aislar exosomas de una variedad de frutos (Xiao et al., 2018), en donde la ultracentrifugación es la técnica utilizada como común denominador (Akuma et al., 2019). Sin embargo, técnicas de aislamiento como precipitación, captura por afinidad y SEC han emergido como alternativas según la necesidad de los investigadores (Kotmakçı & Akbaba, 2017). De estas alternativas, la SEC presenta ventajas para aislar exosomas intactos como: eficiencia, confianza, facilidad de uso y reproducibilidad (Sidhom et al., 2020). Incluso, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ya sea con columnas comerciales o preparadas, ha sido utilizada para aislar exosomas de material vegetal como en hojas de repollo o en jugo de tomate riñón; en ambos estudios los exosomas se encontraron en la mayor parte de fracciones, pero sus concentraciones máximas eluyeron en fracciones iniciales (Bokka et al., 2020; You et al., 2021). Dichos análisis corroboran que las columnas de exclusión de tamaño pueden utilizarse para aislar exosomas de fuentes vegetales como en el presente estudio.

El uso de TEM en muestras de vesículas extracelulares constituye la técnica principal para su visualización y análisis (Lötvall et al., 2014). La calidad de las imágenes obtenidas depende del protocolo utilizado y se ha observado que también es dependiente del operador y del equipo (Rikkert et al., 2019). El acetato de uranilo en soluciones del 2 al 5%, es considerado como la mejor opción para tinción de

muestras biológicas (Moscardini et al., 2020), esto pues genera contrastes debido a que los iones de uranilo se combinan con grupos fosfato, carboxilo y ácidos nucleicos presentes en membranas y contenido celular (Woods & Stirling, 2013). Los protocolos tradicionales de visualización de vesículas extracelulares usan el acetato de uranilo como tinción negativa (Jung & Mun, 2018). Se ha descrito la morfología característica de los exosomas mediante estos protocolos, la cual consta de una forma esférica ahuecada producto de la deshidratación que ocurre durante la preparación de las muestras (Chuo et al., 2018; Jung & Mun, 2018). A pesar de que no existen reportes de exosomas de ninguna de las especies en el presente estudio; esta misma característica fue observada en las muestras de maracuyá, taxo y lima (Figura 14), lo que sumado al análisis de tamaños coincide con la descripción de Chuo et al. (2018), que menciona que los exosomas son vesículas con tamaños de 30 a 100 nm. Se han logrado caracterizar exosomas de *Citrus limon*, pariente de *Citrus x aurantifolia* (Froelicher et al., 2011), en donde se describe que el análisis de tamaños tuvo como resultado vesículas de entre 50 a 70 nm (Raimondo et al., 2015). Este rango se solapa con el encontrado en este estudio para los exosomas de lima (Figura 15), el cual fue de 35 a 75 nm. Estas diferencias en tamaños pueden deberse a características propias de la muestra o bien al método de aislamiento utilizado (Doyle & Wang, 2019).

La compleja composición de proteínas en exosomas puede evidenciarse mediante técnicas de separación como la electroforesis vertical con geles de poliacrilamida (Antimisiaris et al., 2018). En el presente estudio se encontró proteínas en un rango de 15 a 250 kDa en las diferentes muestras correspondientes a exosomas y microvesículas (Figura 16). Estudios como el de Bokka et al. (2020), señalan que el perfil proteico de microvesículas y nanovesículas (exosomas) es similar pero no idéntico. No obstante, la presencia de bandas similares entre exosomas y microvesículas no purificadas también se puede deber a la existencia de poblaciones de exosomas de mayor tamaño que no fueron separados en la fase de centrifugación diferencial (Livshits et al., 2015). Para la caracterización de vesículas extracelulares se suele utilizar técnicas para detectar las proteínas que las componen. El inmunoblot o

western blot ha sido ampliamente utilizado para detectar proteínas específicas relacionadas con los tipos de vesículas extracelulares (Kowal et al., 2017). Entre las proteínas que funcionan como marcadores exosomales de mamíferos se encuentra la proteína ALIX, la cual está asociada con la biogénesis de los exosomas mediante el complejo ESCRT (Y. Zhang et al., 2019), y diferentes tipos de tetraspaninas ya que se ha descrito que las membranas exosomales son ricas en estas proteínas (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). A pesar de las pocas investigaciones concernientes a marcadores exosomales específicos en plantas (Kameli et al., 2021), se ha propuesto que la biogénesis de los exosomas en plantas puede ser análoga al proceso encontrado en células de mamíferos y por tanto las proteínas involucradas guardan regiones estructurales homólogas (Nemati et al., 2022). Al no ser considerados organismos modelo, la información proteómica de maracuyá, taxo y lima es escasa, sin embargo, estudios sobre especies del género *Citrus* han logrado determinar homología en tetraspaninas encontradas en *Arabidopsis thaliana* (Stanly et al., 2019), e incluso con proteínas de mamíferos a través de comparación en bases de datos para vesículas extracelulares (Raimondo et al., 2015). En el presente estudio la proteína ALIX fue detectada de manera difusa en todas las muestras (Figura 17). Además, el tamaño de la proteína se detectó dentro del rango esperado (100 kDa), lo que puede significar que la biogénesis exosomal de maracuyá, taxo y lima está mediada por ALIX o una proteína homóloga para células vegetales. Al comparar el tamaño de la proteína detectada con el gel de acrilamida (Figura 16) no se visualizan bandas en la misma región, esto puede deberse a la existencia de poca proteína en relación al resto de proteínas detectadas. A diferencia de ALIX, las diferentes tetraspaninas no fueron detectadas en todas las muestras. En este caso, CD81 fue detectada de manera clara en exosomas de maracuyá, lima y microvesículas de taxo en el mismo rango de tamaño, lo que sugiere la existencia de tetraspaninas como marcadores exosomales vegetales independientes del género y la especie. Por otro lado, la detección de tetraspaninas en muestras de microvesículas se puede deber a la presencia de exosomas no separados por centrifugación diferencial (Livshits et al., 2015). Las tetraspaninas son

glicoproteínas, y de manera general se ha encontrado que contienen varios sitios de glicosilación (Boucheix & Rubinstein, 2001). Los distintos niveles de glicosilación así como otras modificaciones post traduccionales, pueden alterar el peso molecular de la proteína (Szczesna, 2019). La existencia de isoformas o variantes por splicing alternativo son responsables de la detección de bandas múltiples en distintos pesos moleculares (Bicer & Reiser, 2013), fenómeno que se observó en el caso de la detección de CD81 en exosomas de maracuyá (Figura 17).

El efecto antiproliferativo de exosomas derivados de plantas ha sido estudiado en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Kim et al., 2022; Raimondo et al., 2015; L. Zhang et al., 2021). Los mecanismos envueltos en este efecto no han sido dilucidados en su totalidad, no obstante, la literatura relaciona el contenido exosomal (dependiente de la célula secretora) con los efectos ejercidos. Tanto la fruta de maracuyá, como la de taxo y de lima contienen polifenoles y otros compuestos que ejercen actividad antioxidante, la cual además de tener efectos beneficiosos en el organismo puede jugar un papel fundamental en la progresión del cáncer (Mendelsohn & Larrick, 2014). En el estudio de Matito et al. (2003), se concluye que los polifenoles antioxidantes derivados de la uva promueven la apoptosis en células cancerígenas. Además, Raimondo et al. (2015), confirmaron que exosomas derivadas de limón inducen la muerte celular a través del ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). La inducción de TRAIL inicia la ruta apoptótica extrínica y debido a que el ligando se sobreexpresa en células tumorales, las células normales se ven poco afectadas por su inducción (Ishibashi & Ohtsuki, 2008). En el presente estudio, se observó un efecto antiproliferativo en células de cáncer cervical HeLa a las 48 horas de exposición independientemente de la muestra y de la concentración utilizada. Una reducción estadísticamente significativa fue conseguida con la mayor concentración de exosomas derivados de taxo (Figura 18A). Por otro lado, los ensayos sobre la línea celular HEK293 no son uniformes para los exosomas de las diferentes muestras. El efecto antiproliferativo es significativo con exosomas de taxo a menor concentración, pero no es significativo al

aumentar la misma (Figura 19A). Los exosomas de lima a mayor tiempo de exposición ejercen un efecto proliferativo significativo (Figura 18B) y la reducción observada en el tratamiento con exosomas de maracuyá sólo es significativa a las 24 horas de exposición, luego de lo cual se observa un aumento de la viabilidad celular (Figura 19C). Estos resultados pueden deberse a que la línea HEK293 no se consideran como un modelo de células humanas normales (Kavsan et al., 2011), ya que la incorporación de genoma adenoviral, responsable de su inmortalidad, alteró los patrones de expresión génica (Lin et al., 2014). A pesar de que ha sido estudiada en investigaciones sobre el cáncer (Stepanenko & Dmitrenko, 2015), se usa preferentemente para el estudio de interacción de proteínas y producción rápida de proteínas a pequeña escala por transfección (Lin et al., 2014). Finalmente, el efecto antiproliferativo sobre la línea HFF no es estadísticamente significativos con excepción de los exosomas derivados de maracuyá aplicados a mayor concentración (Figura 20C). El mecanismo conocido de inducción de TRAIL deriva en que el efecto citotóxico de los exosomas sobre líneas celulares sanas sea mucho menor al observado en células cancerígenas (Ishibashi & Ohtsuki, 2008; Raimondo et al., 2015). De igual manera se ha encontrado que moléculas bioactivas polifenólicas participan en la regulación de los niveles de expresión de oncogenes involucrados en la progresión celular y angiogénesis (Pérez-Ortiz et al., 2019).

Capítulo VI: Conclusiones

Se logró obtener exosomas a partir de jugo de maracuyá, taxo y lima, las poblaciones obtenidas fueron heterogéneas con tamaños en un rango de 30 a 85 nm y con la mayor cantidad de exosomas concentrados en un rango de 40 a 60 nm. Al observar exosomas mediante TEM se logra distinguir su característica morfológica a manera de esfera o copa hueca.

El perfil proteico de exosomas aislados varía dependiendo de la muestra. Se logró detectar la presencia de proteína ALIX, en todas las muestras de exosomas y microvesículas. La tetraspanina CD63 fue detectada en muestras de exosomas de maracuyá y microvesículas de taxo. La tetraspanina CD81 fue detectada en exosomas de maracuyá, lima y microvesículas de taxo. El marcador CD69 fue detectado en microvesículas de taxo.

Los exosomas aislados de maracuyá, taxo y lima presentaron efectos citotóxicos en línea celular cancerígena HeLa a las 48 horas de exposición e independientemente de la concentración aplicada. No se observaron efectos citotóxicos en línea celular normal con excepción del tratamiento con exosomas derivados de maracuyá a mayor concentración. Los resultados obtenidos se plantean como precursores de futuras investigaciones con la finalidad de explotar las características de exosomas de origen vegetal como posibles terapéuticos en cuadros oncológicos.

Capítulo VII: Recomendaciones

La combinación de métodos de aislamiento y purificación puede mejorar el rendimiento de exosomas obtenidos de jugos de frutas. Se recomienda continuar las investigaciones con un paso de aislamiento que permita utilizar volúmenes más grandes antes del paso de purificación por SEC.

Técnicas de proteómica y transcriptómica pueden dilucidar de mejor manera la carga de exosomas derivados de frutas. Es necesario acoplar estas técnicas con análisis bioinformáticos y comparación en bases de datos. Este tipo de información permitirá esclarecer los mecanismos genético moleculares involucrados en biogénesis, función e interacción interespecies de los exosomas.

La caracterización de exosomas derivados de frutas puede explorarse mediante la síntesis de anticuerpos específicos para proteínas exosomales vegetales como las descritas en *A. thaliana*, TET8 y TET9. Futuros proyectos pueden abordar esta recomendación mediante la comparación de secuencias y búsqueda de regiones homólogas con las proteínas de mamíferos existentes.

Se recomienda comparar la actividad antioxidante de exosomas derivados de diferentes frutas a través de métodos como DPPH y ABTS. Estudios posteriores deben determinar la concentración inhibitoria media máxima de exosomas para determinar su posible potencial como terapéuticos.

Capítulo VIII: Referencias

- Abdelqader, A., Qarallah, B., Al-Ramamneh, D., & Daş, G. (2012). Anthelmintic effects of citrus peels ethanolic extracts against *Ascaridia galli*. *Veterinary Parasitology*, *188*(1-2), 78-84.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.003>
- Adebayo-Tayo, B. C., Akinsete, T. O., & Odeniyi, O. A. (2016). Phytochemical Composition and Comparative Evaluation of Antimicrobial Activities of the Juice Extract of *Citrus Aurantifolia* and its Silver Nanoparticles. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Research*, *12*(1), 59-64.
<https://doi.org/10.4314/njpr.v12i1>
- Adem, B., & Melo, S. A. (2017). Animal Models in Exosomes Research: What the Future Holds. En *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69449>
- Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T., & Odugbemi, T. (2006). Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, *4*(2), 185-190.
- Akuma, P., Okagu, O. D., & Udenigwe, C. C. (2019). Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *3*, 23.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00023>
- An, Q., van Bel, A. J. E., & Hüchelhoven, R. (2007). Do Plant Cells Secrete Exosomes Derived from Multivesicular Bodies? *Plant Signaling & Behavior*, *2*(1), 4-7.
<https://doi.org/10.4161/psb.2.1.3596>
- Ando, K., Hu, Q., Kasagi, Y., Oki, E., & Mori, M. (2021). Recent developments in cancer research: Expectations for a new remedy. *Annals of Gastroenterological Surgery*, *5*(4), 419-426.
<https://doi.org/10.1002/ags3.12440>

Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function.

Frontiers in Immunology, 5, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>

Antimisiaris, S., Mourtas, S., & Marazioti, A. (2018). Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for

Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 10(4), 218.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040218>

Arias, E., López, M., & Ponce, S. (2019). *Análisis de los flujos comerciales de maracuyá (fruta fresca y derivados) con incidencia hacia los mercados de Europa y Estado Unidos.*

<https://www.eumed.net/rev/oel/2019/12/flujos-comerciales-maracuya.html>

Bacanlı, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 160-170.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.015>

Bernacci, L. C., Soares-Scott, M. D., Junqueira, N. T. V., Passos, I. R. da S., & Meletti, L. M. M. (2008).

Passiflora edulis Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(2), 566-576. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000200053>

Bernatoniene, J., & Kopustinskiene, D. (2018). The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative

Stress. *Molecules*, 23(4), 965. <https://doi.org/10.3390/molecules23040965>

Bicer, S., & Reiser, P. J. (2013). Complex tropomyosin and troponin T isoform expression patterns in

orbital and global fibers of adult dog and rat extraocular muscles. *Journal of Muscle Research*

and Cell Motility, 34(3-4), 211-231. <https://doi.org/10.1007/s10974-013-9346-9>

Bokka, R., Ramos, A. P., Fiume, I., Manno, M., Raccosta, S., Turiák, L., Sugár, S., Adamo, G., Csizmadia, T., & Pocsfalvi, G. (2020). Biomanufacturing of Tomato-Derived Nanovesicles. *Foods*, 9(12), 1852.

<https://doi.org/10.3390/foods9121852>

- Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., Martinelli, E. M., Mustich, G., & Danieli, B. (1975). Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, *14*(12), 2661-2665.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85246-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85246-0)
- Bone, R. A., Landrum, J. T., Fernandez, L., & Tarsis, S. L. (1988). Analysis of the macular pigment by HPLC: Retinal distribution and age study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *29*(6), 843-849.
- Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins: *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(9), 1189-1205. <https://doi.org/10.1007/PL00000933>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M., Palmquist, J., Huang, S.-D., & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science (New York, N.Y.)*, *360*(6393), 1126-1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- Canchanya, Z., & Diestra, M. (2019). *Actividad antibacteriana de un jarabe elaborado con extracto hidroalcohólico de las hojas de passiflora tripartita(Tumbo) frente a cepas Staphylococcus aureus ATCC* [Universidad Inca Garcilaso de la Vega].
<http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5043>
- Cañizares, A., & Jaramillo, E. (2015). *El cultivo de la Maracuyá en Ecuador*. UTMACH.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6894>
- Chen, L., Yu, Z., Lee, Y., Wang, X., Zhao, B., & Jung, Y. M. (2012). Quantitative evaluation of proteins with bicinchoninic acid (BCA): Resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman scattering-based methods. *The Analyst*, *137*(24), 5834. <https://doi.org/10.1039/c2an35715a>
- Chiaradia, E., Tancini, B., Emiliani, C., Delo, F., Pellegrino, R. M., Tognoloni, A., Urbanelli, L., & Buratta, S. (2021). Extracellular Vesicles under Oxidative Stress Conditions: Biological Properties and Physiological Roles. *Cells*, *10*(7), 1763. <https://doi.org/10.3390/cells10071763>

- Choi, J. S., Cho, W. L., Choi, Y. J., Kim, J. D., Park, H.-A., Kim, S. Y., Park, J. H., Jo, D.-G., & Cho, Y. W. (2019). Functional recovery in photo-damaged human dermal fibroblasts by human adipose-derived stem cell extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *8*(1), 1565885. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1565885>
- Chuo, S. T.-Y., Chien, J. C.-Y., & Lai, C. P.-K. (2018). Imaging extracellular vesicles: Current and emerging methods. *Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0494-5>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *30*(1), 255-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Costa, G. M., Gazola, A. C., Zucolotto, S. M., Castellanos, L., Ramos, F. A., Reginatto, F. H., & Schenkel, E. P. (2016). Chemical profiles of traditional preparations of four South American Passiflora species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(4), 451-458. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.02.005>
- Cuaspu, Y. (2015). *Elaboración De Bebidas Naturales A Partir De Taxo (Passiflora Tripartita Var. Mollissima) Y Piña (Ananas Comosus) Enriquecidas Con Lactosuero* [Universidad Central Del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4771>
- Cui, Y., Gao, J., He, Y., & Jiang, L. (2020). Plant extracellular vesicles. *Protoplasma*, *257*(1), 3-12. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01435-6>
- Czech, A., Zarycka, E., Yanovych, D., Zasadna, Z., Grzegorzczak, I., & Kłys, S. (2020). Mineral Content of the Pulp and Peel of Various Citrus Fruit Cultivars. *Biological Trace Element Research*, *193*(2), 555-563. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01727-1>
- Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., Tao, Y., He, Z., Chen, C., & Jiang, Y. (2020). Exosomes: Key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 145. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>

- Dai, N., Zou, Y., Zhu, L., Wang, H.-F., & Dai, M.-G. (2014). Antioxidant Properties of Proanthocyanidins Attenuate Carbon Tetrachloride (CCl₄)–Induced Steatosis and Liver Injury in Rats via CYP2E1 Regulation. *Journal of Medicinal Food*, 17(6), 663-669. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2834>
- Deng, J., Zhou, Y., Bai, M., Li, H., & Li, L. (2010). Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 148-153.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.043>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (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>
- Ecuador—Population Fact Sheets*. (2021). Global Cancer Observatory.
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj4_N7H5MT4AhV9K0QIHRETDtEQFnoECAQQAQ&url=https%3A%2F%2Fgco.iarc.fr%2Ftoday%2Fdata%2Ffactsheets%2Fpopulations%2F218-ecuador-fact-sheets.pdf&usg=AOvVaw2FywvGlqojbe_-tE9YO3Ai
- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., & Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.007>
- Fan, F.-Y., Sang, L.-X., & Jiang, M. (2017). Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*, 22(3), 484. <https://doi.org/10.3390/molecules22030484>
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>

- Fischer, G., Casierra-Posada, F., & Piedrahíta, W. (2009). *Ecofisiología de las especies pasifloráceas cultivadas en Colombia* (pp. 45-67).
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 435-445. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>
- Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J.-B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Morillon, R., & Ollitrault, P. (2011). New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes*, 7(1), 49-61. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0314-x>
- García-Ruiz, A., Girones-Vilaplana, A., León, P., Moreno, D., Stinco, C., Meléndez-Martínez, A., & Ruales, J. (2017). Banana Passion Fruit (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey): Microencapsulation, Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity. *Molecules*, 22(1), 85. <https://doi.org/10.3390/molecules22010085>
- Gomes, C. S., Campos, A. C. L., Torres, O. J. M., Vasconcelos, P. R. L. de, Moreira, A. T. R., Tenório, S. B., Tâmbara, E. M., Sakata, K., Moraes Júnior, H., & Ferrer, A. L. S. (2006). Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: Estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21(suppl 2), 9-16. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502006000800003>
- Gonçalves Filho, A., Torres, O. J. M., Campos, A. C. L., Tâmbara Filho, R., Rocha, L. C. de A., Thiede, A., Lunedo, S. M. C., Barbosa, R. E. de A., Bernhardt, J. A., & Vasconcelos, P. R. L. de. (2006). Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: Estudo morfológico. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21(suppl 2), 3-8. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502006000800002>

- Gurunathan, S., Kang, M.-H., & Kim, J.-H. (2021). A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 1281-1312. <https://doi.org/10.2147/IJN.S291956>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
- Hade, M. D., Suire, C. N., & Suo, Z. (2021). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells*, *10*(8), 1959. <https://doi.org/10.3390/cells10081959>
- Halperin, W., & Jensen, W. A. (1967). Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *Journal of Ultrastructure Research*, *18*(3-4), 428-443. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80128-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80128-X)
- Harding, C. V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes: Looking back three decades and into the future. *Journal of Cell Biology*, *200*(4), 367-371. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>
- He, B., Hamby, R., & Jin, H. (2021). Plant extracellular vesicles: Trojan horses of cross-kingdom warfare. *FASEB BioAdvances*, *3*(9), 657-664. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00040>
- He, X., Luan, F., Yang, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Fang, J., Wang, M., Zuo, M., & Li, Y. (2020). *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 617. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>
- INEC. (2021). *Tabulados de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2021*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Tabulados%20ESPAC%202021.xlsx

- Inlago, C. (2020). *Evaluación de la variabilidad morfológica de taxo (passiflora tripartita juss) cultivado en chacras de agricultores de la provincia de Imbabura* [Universidad Técnica del Norte].
<http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/10467>
- Isaac, R., Reis, F. C. G., Ying, W., & Olefsky, J. M. (2021). Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism. *Cell Metabolism*, 33(9), 1744-1762. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.006>
- Ishibashi, M., & Ohtsuki, T. (2008). Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Medicinal Research Reviews*, 28(5), 688-714.
<https://doi.org/10.1002/med.20123>
- ITIS - Report: *Citrus X aurantiifolia*. (2011). Integrated Taxonomic Information System.
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=825203#null
|
- ITIS - Report: *Passiflora edulis*. (2011). Integrated Taxonomic Information System.
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22223#null
- ITIS - Report: *Passiflora tripartita*. (2011). Integrated Taxonomic Information System.
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=896790#null
|
- Jain, S., Arora, P., & Popli, H. (2020). A comprehensive review on Citrus aurantifolia essential oil: Its phytochemistry and pharmacological aspects. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, 3(2), 354.
<https://doi.org/10.31415/bjns.v3i2.101>
- Josephine, O. E. O., & Ngozi, C. G. (2015). Comparative effects of peel extract from Nigerian grown citrus on body weight, liver weight and serum lipids in rats fed a high-fat diet. *African Journal of Biochemistry Research*, 9(9), 110-116. <https://doi.org/10.5897/AJBR2015.0856>
- 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>
- Juan, T., & Fürthauer, M. (2018). Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 74, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.022>
- Jung, M. K., & Mun, J. Y. (2018). Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 131, 56482. <https://doi.org/10.3791/56482>
- Kalani, M. Y. S., Alsop, E., Meechoovet, B., Beecroft, T., Agrawal, K., Whitsett, T. G., Huentelman, M. J., Spetzler, R. F., Nakaji, P., Kim, S., & Van Keuren-Jensen, K. (2020). Extracellular microRNAs in blood differentiate between ischaemic and haemorrhagic stroke subtypes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1713540. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1713540>
- Kameli, N., Dragojlovic-Kerkache, A., Savelkoul, P., & Stassen, F. R. (2021). Plant-Derived Extracellular Vesicles: Current Findings, Challenges, and Future Applications. *Membranes*, 11(6), 411. <https://doi.org/10.3390/membranes11060411>
- Karimi, A., & Nasab, N. (2014). Effect of garlic Extract and Citrus aurantifolia (lime) juice and on Blood Glucose level and Activities of aminotransferase Enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(8), 821-827.
- Kavsan, V. M., Iershov, A. V., & Balynska, O. V. (2011). Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: Old insights on new explanation. *BMC Cell Biology*, 12, 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-23>
- 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>

- Kotmakçı, M., & Akbaba, G. E. (2017). Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? En J. Wang (Ed.), *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69407>
- Kowal, E. J. K., Ter-Ovanesyan, D., Regev, A., & Church, G. M. (2017). Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. En W. P. Kuo & S. Jia (Eds.), *Extracellular Vesicles* (Vol. 1660, pp. 143-152). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_12
- Lam, S. K., & Ng, T. B. (2009). Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. *Phytomedicine*, *16*(2-3), 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.025>
- Lazar, E., Benedek, T., Korodi, S., Rat, N., Lo, J., & Benedek, I. (2018). Stem cell-derived exosomes—An emerging tool for myocardial regeneration. *World Journal of Stem Cells*, *10*(8), 106-115. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i8.106>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, *7*(3), 789-804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Li, R. W., Theriault, A. G., Au, K., Douglas, T. D., Casaschi, A., Kurowska, E. M., & Mukherjee, R. (2006). Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life Sciences*, *79*(4), 365-373. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.023>
- Liang, Y., Duan, L., Lu, J., & Xia, J. (2021). Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, *11*(7), 3183-3195. <https://doi.org/10.7150/thno.52570>
- Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J., & Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications*, *5*(1), 4767. <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>

- Liu, G., Kang, G., Wang, S., Huang, Y., & Cai, Q. (2021). Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 757925.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.757925>
- Liu, Y., Defourny, K. A. Y., Smid, E. J., & Abee, T. (2018). Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, *9*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01502>
- Liu, Y., Ma, Y., Zhang, J., Yuan, Y., & Wang, J. (2019). Exosomes: A Novel Therapeutic Agent for Cartilage and Bone Tissue Regeneration. *Dose-Response*, *17*(4), 155932581989270.
<https://doi.org/10.1177/1559325819892702>
- Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., & Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*, *5*(1), 17319.
<https://doi.org/10.1038/srep17319>
- Lluch Hernández, A. (2016). Nuevos retos en el tratamiento y la investigación del cáncer de mama. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, *62*, 113-115.
- Logozzi, M., Di Raimo, R., Mizzoni, D., & Fais, S. (2021). Nanovesicles from Organic Agriculture-Derived Fruits and Vegetables: Characterization and Functional Antioxidant Content. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 8170. <https://doi.org/10.3390/ijms22158170>
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1), 26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>

- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(6), 754-763. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.12>
- Luro, F., Curk, F., Froelicher, Y., & Ollitrault, P. (2018). Recent insights on Citrus diversity and phylogeny. En G. Fiorentino & V. Zech-Matterne (Eds.), *AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: Acclimatization, diversifications, uses*. Publications du Centre Jean Bérard. <http://books.openedition.org/pcjb/2169>
- Maluf, E., Barros, H. M. T., Frochtengarten, M. L., Benti, R., & Leite, J. R. (1991). Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytotherapy Research*, 5(6), 262-266. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650050607>
- Matheyambath, A. C., Padmanabhan, P., & Paliyath, G. (2016). Citrus Fruits. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 136-140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00165-3>
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J. J., Torres, J. L., & Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 43-49. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0398-2>
- Mendelsohn, A. R., & Larrick, J. W. (2014). Paradoxical Effects of Antioxidants on Cancer. *Rejuvenation Research*, 17(3), 306-311. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1577>
- Meyer, D., Pajonk, S., Micali, C., O'Connell, R., & Schulze-Lefert, P. (2009). Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *The Plant Journal*, 57(6), 986-999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03743.x>
- Moreno, E. (2014). *Análisis nutricional y estudio de la actividad antioxidante de algunas frutas tropicales cultivadas en Colombia* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/53992>
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of warm climates*. J.F. Morton ; Distributed by Creative Resources Systems.

- Moscardini, A., Di Pietro, S., Signore, G., Parlanti, P., Santi, M., Gemmi, M., & Cappello, V. (2020). Uranium-free X solution: A new generation contrast agent for biological samples ultrastructure. *Scientific Reports*, *10*(1), 11540. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68405-4>
- Narang, N., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer activity of key lime, *Citrus aurantifolia*. *Pharmacognosy Reviews*, *10*(20), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194043>
- Nemati, M., Singh, B., Mir, R. A., Nemati, M., Babaei, A., Ahmadi, M., Rasmi, Y., Golezani, A. G., & Rezaie, J. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: A novel nanomedicine approach with advantages and challenges. *Cell Communication and Signaling*, *20*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00889-1>
- Oboh, G., Bello, F. O., Ademosun, A. O., Akinyemi, A. J., & Adewuni, T. M. (2015). Antioxidant, hypolipidemic, and anti-angiotensin-1-converting enzyme properties of lemon (*Citrus limon*) and lime (*Citrus aurantifolia*) juices. *Comparative Clinical Pathology*, *24*(6), 1395-1406. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2088-x>
- Ocampo Pérez, J., & Coppens d' Eeckenbrugge, G. (2017). Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: An approach to understanding its complex variability. *Plant Systematics and Evolution*, *303*(4), 531-558. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1390-2>
- Ocampo Pérez, J., Coppens d' Eeckenbrugge, G., Caetano, C., Restrepo, M., Salazar, M., & Jarvis, A. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: Biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, *8*(1), 1-45. Redalyc.
- Ojeda, L. (2015). *Inventario y Caracterización Agronómica de Especies y Variedades Frutícolas Introducidas en la Provincia de Loja* [Universidad Nacional de Loja]. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/11296>
- Olson, B. J. S. C., & Markwell, J. (2007). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*, *48*(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>

- Pan, B.-T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pathan, R. Khan, Gali, P. R., Pathan, P., Gowtham, T., & Pasupuleti, S. (2012). In vitro Antimicrobial Activity of Citrus aurantifolia and its Phytochemical screening. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S328-S331. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60176-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60176-5)
- Patil, J. R., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., Chetti, M. B., & Patil, B. S. (2009). Bioactive Compounds from Mexican Lime (Citrus aurantifolia) Juice Induce Apoptosis in Human Pancreatic Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10933-10942.
<https://doi.org/10.1021/jf901718u>
- Pérez-Bermúdez, P., Blesa, J., Soriano, J. M., & Marcilla, A. (2017). Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.022>
- Pérez-Ortiz, J. M., Alguacil, L. F., Salas, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., & González-Martín, C. (2019). Antiproliferative and cytotoxic effects of grape pomace and grape seed extracts on colorectal cancer cell lines. *Food Science & Nutrition*, 7(9), 2948-2957.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1150>
- Perut, F., Roncuzzi, L., Avnet, S., Massa, A., Zini, N., Sabbadini, S., Giampieri, F., Mezzetti, B., & Baldini, N. (2021). Strawberry-Derived Exosome-Like Nanoparticles Prevent Oxidative Stress in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Biomolecules*, 11(1), 87. <https://doi.org/10.3390/biom11010087>
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
<https://doi.org/10.1021/np9904509>

- Popay, I. (2012). *Passiflora tripartita* var *mollissima* (banana passionfruit). Invasive Species Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/38802>
- Primot, S., d'Eeckenbrugge, G. C., Rioux, V., Pérez, J. A. O., & Garcin, F. (2005). Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *Mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el Valle del Cauca (Colombia). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27(3), 467-471. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452005000300030>
- Qin, S., Lv, C., Wang, Q., Zheng, Z., Sun, X., Tang, M., & Deng, F. (2018). Extraction, identification, and antioxidant property evaluation of limonin from pummelo seeds. *Animal Nutrition*, 4(3), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.005>
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23), 19514-19527.
- Redman, R. (2021). *Edible Plant Exosome Ability to Prevent Oral Mucositis Associated With Chemoradiation Treatment of Head and Neck Cancer. Identifier NCT01668849*. Clinical Trials U.S. National Library of Medicine. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01668849>
- Rikkert, L. G., Nieuwland, R., Terstappen, L. W. M. M., & Coumans, F. A. W. (2019). Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1555419. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1555419>
- Rizzo, J., Rodrigues, M. L., & Janbon, G. (2020). Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00346>

- Roberto, D., Micucci, P., Sebastian, T., Graciela, F., & Anesini, C. (2009). Antioxidant Activity of Limonene on Normal Murine Lymphocytes: Relation to H₂O₂ Modulation and Cell Proliferation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00467.x>
- Rodríguez, A., Gelape, F., Parra, M., & Costa, A. (Eds.). (2020). *Pasifloras especies cultivadas en el mundo*. ProImpress.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2012). Passion Fruit. En M. Siddiq (Ed.), *Tropical and Subtropical Fruits* (1.^a ed., pp. 321-332). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118324097.ch17>
- Rojas, J., Ronceros, S., Palomino, R., Tomás, G., & Chenguayen, J. (2006). Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, *67*, 206-213.
- Rojas Romani, D., Calixto-Cotos, M. R., & Suca Apaza, F. (2021). Utilization of *Passiflora tripartita* fruit residues. *Scientia Agropecuaria*, *12*(3), 445-453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.049>
- Roth, R., Hillmer, S., Funaya, C., Chiapello, M., Schumacher, K., Lo Presti, L., Kahmann, R., & Paszkowski, U. (2019). Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules. *Nature Plants*, *5*(2), 204-211. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0365-4>
- Rotta, E. M., Rodrigues, C. A., Jardim, I. C. S. F., Maldaner, L., & Visentainer, J. V. (2019). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *LWT*, *100*, 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.052>
- Rouiss, H., Bakry, F., Froelicher, Y., Navarro, L., Aleza, P., & Ollitrault, P. (2018). Origin of *C. latifolia* and *C. aurantiifolia* triploid limes: The preferential disomic inheritance of doubled-diploid 'Mexican' lime is consistent with an interploid hybridization hypothesis. *Annals of Botany*, *121*(3), 571-585. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx179>

- Ruiz Reyes, S. G. (2018). Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante in vitro del zumo de “pur pur” *Passiflora tripartita* var. *Mollissima* (Passifloraceae). *Arnaldoa*, 25(3).
<https://doi.org/10.22497/arnaldoa.253.25312>
- Sakalem, M. E., Negri, G., & Tabach, R. (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 1219-1232.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000108>
- Santistevan, M., Borjas, R., Alvarado, L., Anzules, V., Castro, V., & Julca, A. (2018). Sustainability of lemon (*Citrus aurantifolia* Swingle) farms in the province of Santa Elena, Ecuador. *Peruvian Journal of Agronomy*, 2(3), 44. <https://doi.org/10.21704/pja.v2i3.1210>
- Santos, E. L., Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., & Teixeira, S. D. (2017). Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. En G. C. Justino (Ed.), *Flavonoids—From Biosynthesis to Human Health*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67861>
- Santos, P., & Almeida, F. (2021). Exosome-Based Vaccines: History, Current State, and Clinical Trials. *Frontiers in Immunology*, 12, 711565. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711565>
- Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., & Khanikor, B. (2019). Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxicology Reports*, 6, 1091-1096.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.009>
- Sato, R. (2013). Nomilin as an Anti-Obesity and Anti-Hyperglycemic Agent. En *Vitamins & Hormones* (Vol. 91, pp. 425-439). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00018-3>
- Schotsmans, W. C., & Fischer, G. (2011). Passion fruit (*Passiflora edulis* Sim.). En *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 125-143e). Elsevier.
<https://doi.org/10.1533/9780857092618.125>

- Shanmuganathan, M., Vughs, J., Nosedá, M., & Emanueli, C. (2018). Exosomes: Basic Biology and Technological Advancements Suggesting Their Potential as Ischemic Heart Disease Therapeutics. *Frontiers in Physiology, 9*, 1159. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01159>
- Shi, R., Jin, Y., Hu, W., Lian, W., Cao, C., Han, S., Zhao, S., Yuan, H., Yang, X., Shi, J., & Zhao, H. (2020). Exosomes derived from mmu_circ_0000250-modified adipose-derived mesenchymal stem cells promote wound healing in diabetic mice by inducing miR-128-3p/SIRT1-mediated autophagy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology, 318*(5), C848-C856. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00041.2020>
- 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, R. O., Damasceno, S. R. B., Brito, T. V., Dias, J. M., Fontenele, A. M., Braúna, I. S., Júnior, J. S. C., Maciel, J. S., de Paula, R. C. M., Ribeiro, R. A., Souza, M. H. L. P., Freitas, A. L. P., Medeiros, J.-V. R., Silva, D. C., & Barbosa, A. L. R. (2015). Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 67*(7), 1017-1027. <https://doi.org/10.1111/jphp.12399>
- Simirgiotis, M., Schmeda-Hirschmann, G., Bórquez, J., & Kennelly, E. (2013). The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Molecules, 18*(2), 1672-1692. <https://doi.org/10.3390/molecules18021672>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry, 150*(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

- Solorzano, K., & Diaz, C. (2021). *Actividad Cicatrizante De Una Crema Elaborada Con Extracto Hidroalcohólico De Las Hojas De Passiflora tripartita Hbk (Tumbo) En Lesiones Inducidas En Ratas Albinas Holtzman* [Universidad María Auxiliadora].
https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UMAI_82c86a6c31837898709985629114fab0
- Spadaro, F., Costa, R., Circosta, C., & Occhiuto, F. (2012). Volatile Composition and Biological Activity of Key Lime *Citrus aurantifolia* Essential Oil. *Natural Product Communications*, 7(11), 1934578X1200701. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701128>
- Stanly, C., Moubarak, M., Fiume, I., Turiák, L., & Pocsfalvi, G. (2019). Membrane Transporters in Citrus clementina Fruit Juice-Derived Nanovesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6205. <https://doi.org/10.3390/ijms20246205>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>
- Suntasi, V. (2010). *Estudio Investigativo del Taxo, Historia y Aplicación Gastronómica en la Ciudad de Quito* [Universidad Tecnológica Equinoccial].
<http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/11571>
- Syn, N. L., Wang, L., Chow, E. K.-H., Lim, C. T., & Goh, B.-C. (2017). Exosomes in Cancer Nanomedicine and Immunotherapy: Prospects and Challenges. *Trends in Biotechnology*, 35(7), 665-676.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.004>
- Szczesna, K. (2019). *Why Does the Molecular Weight of My Protein Differ From the Theoretically Expected Weight?* Proteomics & Metabolomics from Technology Networks.
<http://www.technologynetworks.com/proteomics/articles/why-does-the-molecular-weight-of-my-protein-differ-from-the-theoretically-expected-weight-322079>

- Tai, Y., Chen, K., Hsieh, J., & Shen, T. (2018). Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Science*, 109(8), 2364-2374. <https://doi.org/10.1111/cas.13697>
- Taiwe, G. S., & Kuete, V. (2017). *Passiflora edulis*. En *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 513-526). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00024-8>
- Tan, C. Y., Lai, R. C., Wong, W., Dan, Y. Y., Lim, S.-K., & Ho, H. K. (2014). Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(3), 76. <https://doi.org/10.1186/scrt465>
- Tschuschke, M., Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Angelova Volponi, A., Janowicz, K., Sibiak, R., Piotrowska-Kempisty, H., Iżycki, D., Bukowska, D., Antosik, P., Shibli, J., Dyszkiewicz-Konwińska, M., & Kempisty, B. (2020). Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 436. <https://doi.org/10.3390/jcm9020436>
- Urzi, O., Raimondo, S., & Alessandro, R. (2021). Extracellular Vesicles from Plants: Current Knowledge and Open Questions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5366. <https://doi.org/10.3390/ijms22105366>
- UTEPI. (2006). *Lima y Limón Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado*. Unidad Técnica de Estudios para la Industria.
- Valarezo, A., Valarezo, O., Mendoza, A., Álvarez, H., & Vásquez, W. (2014). *El Cultivo de Maracuyá: Manual Técnico para su manejo en el Litoral Ecuatoriano* [Manual Técnico No.100. INIAP].
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Wang, C., Xu, F.-Q., Shang, J.-H., Xiao, H., Fan, W.-W., Dong, F.-W., Hu, J.-M., & Zhou, J. (2013). Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their

- antidepressant-like effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(3), 812-817.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.010>
- Wang, L.-Q., Liu, T.-L., Liang, P.-H., Zhang, S.-H., Li, T.-S., Li, Y.-P., Liu, G.-X., Mao, L., & Luo, X.-N. (2020). Characterization of exosome-like vesicles derived from *Taenia pisiformis* cysticercus and their immunoregulatory role on macrophages. *Parasites & Vectors*, 13(1), 318.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04186-z>
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z.-B., Jiang, H., Zhang, L., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2013). Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4(1), 1867. <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>
- Wang, T., Jian, Z., Baskys, A., Yang, J., Li, J., Guo, H., Hei, Y., Xian, P., He, Z., Li, Z., Li, N., & Long, Q. (2020). MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*, 257.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120264>
- Wang, W., Zhu, N., Yan, T., Shi, Y.-N., Chen, J., Zhang, C.-J., Xie, X.-J., Liao, D.-F., & Qin, L. (2020). The crosstalk: Exosomes and lipid metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 119.
<https://doi.org/10.1186/s12964-020-00581-2>
- Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., Yin, X., Xu, Y., Chen, L., Gao, W., Li, Y., & Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences*, 17(1), 163-177. <https://doi.org/10.7150/ijbs.53671>
- Woods, A. E., & Stirling, J. W. (2013). 22—Transmission electron microscopy. En S. K. Suvarna, C. Layton, & J. D. Bancroft (Eds.), *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Seventh Edition)* (pp. 493-538). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00022-6>

- Xia, C., Dai, Z., Jin, Y., & Chen, P. (2021). Emerging Antioxidant Paradigm of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Therapy. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 727272.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.727272>
- Xiao, J., Feng, S., Wang, X., Long, K., Luo, Y., Wang, Y., Ma, J., Tang, Q., Jin, L., Li, X., & Li, M. (2018). Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ*, *6*, e5186. <https://doi.org/10.7717/peerj.5186>
- Xu, Z., Zeng, S., Gong, Z., & Yan, Y. (2020). Exosome-based immunotherapy: A promising approach for cancer treatment. *Molecular Cancer*, *19*(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01278-3>
- Yang, E., Wang, X., Gong, Z., Yu, M., Wu, H., & Zhang, D. (2020). Exosome-mediated metabolic reprogramming: The emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00359-5>
- Yang, L., Xian, D., Xiong, X., Lai, R., Song, J., & Zhong, J. (2018). Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *BioMed Research International*, *2018*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/8584136>
- Yokoi, A., & Ochiya, T. (2021). Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, *74*, 79-91.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.032>
- 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>
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M., & Patil, B. S. (2005). Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 2009-2014. <https://doi.org/10.1021/jf0484632>

- Yue, B., Yang, H., Wang, J., Ru, W., Wu, J., Huang, Y., Lan, X., Lei, C., & Chen, H. (2020). Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Proliferation*, 53(7), e12857. <https://doi.org/10.1111/cpr.12857>
- Zaja-Milatovic, S., & Gupta, R. C. (2015). Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Neuronal Injury. En *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 709-724). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00048-8>
- Zeraik, M. L., & Yariwake, J. H. (2010). Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. *Microchemical Journal*, 96(1), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.003>
- Zhang, L., He, F., Gao, L., Cong, M., Sun, J., Xu, J., Wang, Y., Hu, Y., Asghar, S., Hu, L., & Qiao, H. (2021). Engineering Exosome-Like Nanovesicles Derived from *Asparagus cochinchinensis* Can Inhibit the Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells with Better Safety Profile. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 1575-1586. <https://doi.org/10.2147/IJN.S293067>
- Zhang, M., Xiao, B., Wang, H., Han, M. K., Zhang, Z., Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D. (2016). Edible Ginger-derived Nano-lipids Loaded with Doxorubicin as a Novel Drug-delivery Approach for Colon Cancer Therapy. *Molecular Therapy*, 24(10), 1783-1796. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.159>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zibadi, S., & Watson, R. R. (2004). Passion Fruit (*Passiflora edulis*): Composition, Efficacy and Safety. *Evidence-Based Integrative Medicine*, 1(3), 183-187. <https://doi.org/10.2165/01197065-200401030-00005>