



**“Obtención de exosomas a partir de *Prunus salicifolia* Kunth, Rosacea (capulí) y
Vaccinium meridionale Sw. Ericaceae (mortiño)”**

Martínez Carrillo, Alexandra Michelle

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Ingeniera en Biotecnología

Torres Arias, Marbel Ph.D.

30 de agosto del 2022



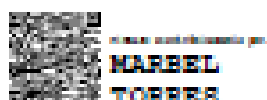
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de Integración curricular: "Obtención de exosomas a partir de *Prunus salicifolia* Kunth, Rosacea (capull) y *Vaccinium meridionale* Sw. Ericaceae (mortiño)" fue realizado por la señorita Martínez Carrillo, Alexandra Michelle; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 29 de agosto del 2022

Firma:



.....
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, **Martínez Carrillo, Alexandra Michelle**, con cédula de ciudadanía n° 171908698-3, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Obtención de exosomas a partir de *Prunus salicifolia* Kunth, Rosacea (capulí) y *Vaccinium meridionale* Sw. Ericaceae (mortiño)”** 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 del 2022

Firma

.....
Martínez Carrillo, Alexandra Michelle
C.C.: 171908698-3



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Martínez Carrillo, Alexandra Michelle**, con cédula de ciudadanía n° 171908698-3, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Obtención de exosomas a partir de *Prunus salicifolia* Kunth, Rosacea (capulí) y *Vaccinium meridionale* Sw. Ericaceae (mortiño)**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 29 de agosto del 2022

Firma

.....
Martínez Carrillo, Alexandra Michelle
C.C.: 171908698-3

DEDICATORIA

A mi madre, Jaqueline Carrillo

A mi madre, Anita Rueda

A mi hermano, Jean Pierre

Alexandra Michelle Martínez Carrillo

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Jaqueline y mi abuelita Anita, mi motor de vida, nada de esto habría sido posible sin su amor, apoyo incondicional, esfuerzo, paciencia y dedicación. Mi gratitud siempre a mis mujeres luchadoras, no me alcanzaría la vida para agradecerles y retribuir todo lo que han hecho y hacen por mí. ¡Infinitas gracias, esto es por y para ustedes! ¡Lo logramos juntas!

A mi hermano Jean Pierre, por llegar a mi vida a compartir momentos inolvidables, por su apoyo y levantarme el ánimo con su carisma inigualable.

A Josué, mi compañero, cómplice y apoyo incondicional en todo momento, sobre todo aquellos más difíciles. ¡Gracias por tanto!

A Emilia, Dulce, Noah, Nena y Kami por siempre estar.

A todos quienes hacen el Laboratorio de Inmunología y Virología (LABIV) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en especial a Marbel Torres Ph.D. por la oportunidad brindada para la ejecución de este trabajo de titulación, por la paciencia y conocimientos compartidos durante el desarrollo del mismo.

Alexandra Michelle Martínez Carrillo

	Índice de contenidos	8
Índice de contenidos		8
Índice de tablas		11
Índice de figuras		12
Lista de abreviaturas		13
Resumen		15
Abstract		15
Capítulo 1. Introducción		17
Antecedentes		17
Justificación		18
Objetivos		20
Objetivo general		20
Objetivos específicos		20
Capítulo 2. Revisión bibliográfica		21
Capulí (<i>Prunus salicifolia</i>)		21
Taxonomía de <i>Prunus salicifolia</i>		22
Producción del capulí en el Ecuador		22
Composición		23
Actividad biológica		25
Mortino (<i>Vaccinium meridionale</i>)		25
Taxonomía de <i>Vaccinium meridionale</i>		26
Producción del mortino en el Ecuador		27
Composición		28
Actividad biológica		29
Exosomas		30
Estructura y Composición		33
Métodos de aislamiento de exosomas		34
Caracterización de exosomas		36

	9
Exosomas obtenidos de plantas	36
Aplicaciones de exosomas	37
Cultivo celular	38
Líneas celulares	38
Ensayo de viabilidad celular MTT	41
Capítulo 3. Materiales y métodos	43
Obtención de exosomas	43
Aislamiento de exosomas	43
Aislamiento mediante columna de exclusión por tamaño	44
Aislamiento mediante kit comercial	45
Cuantificación de proteínas	46
Caracterización de proteínas exosomales	47
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	47
Western Blot	47
Cultivo celular	51
Preparación de medios de cultivo	51
Descongelamiento de líneas celulares	51
Plaqueo de líneas celulares en P96	51
Tratamientos	51
Ensayo MTT	52
Análisis estadístico	52
Capítulo 4. Resultados	54
Obtención de exosomas	54
Aislamiento mediante columna de exclusión por tamaño	54
Caracterización de proteínas exosomales	55
Microscopía Electrónica de Transmisión	55
Electroforesis vertical	57
Western Blot	60

Toxicidad celular	10
	61
Capítulo 5. Discusión	66
Capítulo 6. Conclusiones	71
Capítulo 7. Recomendaciones	72
Bibliografía	73

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Prunus salicifolia</i> (capulí)	222
Tabla 2. Composición del fruto de capulí	233
Tabla 3. Taxonomía de <i>Vaccinium meridionale</i> (mortiño)	27
Tabla 4. Composición del fruto de mortiño	288
Tabla 5. Preparación de gel de poliacrilamida al 10%	488
Tabla 6. Anticuerpos empleados en el marcaje durante Western Blot	50
Tabla 7. Resultados de evaluación de citotoxicidad de exosomas sobre HeLa	62
Tabla 8. Resultados de evaluación de citotoxicidad de exosomas sobre HEK	62
Tabla 9. Resultados de evaluación de citotoxicidad de exosomas sobre HFF	63

	12
Índice de figuras	
Figura 1. <i>Prunus spp.</i> (capulí)	20
Figura 2. Variedades de capulí producidas en Ecuador	23
Figura 3. <i>Vaccinium meridionale</i> (mortiño)	26
Figura 4. Esquema de vesículas extracelulares	31
Figura 5. Biogénesis de exosomas	32
Figura 6. Estructura y composición de un exosoma	34
Figura 7. Línea celular HeLa	39
Figura 8. Línea celular HEK-293	40
Figura 9. Línea celular HFF	41
Figura 10. Mecanismo del ensayo de MTT	41
Figura 11. Centrifugaciones seriadas	44
Figura 12. Aislamiento de exosomas	45
Figura 13. Electroforesis vertical de proteínas en gel de poliacrilamida	49
Figura 14. Cuantificación de proteínas por BCA	54
Figura 15. Caracterización de exosomas de capulí mediante TEM	56
Figura 16. Caracterización de exosomas de mortiño mediante TEM	57
Figura 17. Perfil proteico de exosomas de capulí y mortiño	58
Figura 18. Caracterización de exosomas mediante Western Blot	60
Figura 19. Evaluación de citotoxicidad de exosomas de capulí sobre HeLa, HEK y HFF	64

Lista de abreviaturas

ALIX:	<i>ALG-2-interacting protein X.</i>
Anti - ALIX:	Anticuerpo monoclonal producido en ratón producido contra Alix origen humano.
Anti - CD63:	Anticuerpo monoclonal producido en ratón contra CD63 de origen humano.
Anti - CD69:	Anticuerpo monoclonal producido en ratón contra los aminoácidos 1-199 que representan CD69 de origen humano
Anti - CD81:	Anticuerpo monoclonal producido en ratón contra los aminoácidos 90-210 de CD81 de origen humano.
APS:	Persulfato de amonio, agente oxidante para catalizar la polimerización de acrilamida, actúa en conjunto con TEMED.
BCA:	Ácido bicinconínico, reactivo empleado en ensayo de cuantificación de proteínas totales en una muestra.
CD:	<i>Clusters of differentiation</i> , grupo de diferenciación.
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , medio empleado en cultivo celular.
EMEM:	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> , medio empleado en cultivo celular.
ESCRT:	Complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte (<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>).
GAM-HRP:	<i>Goat anti-mouse</i> , anti-ratón de cabra conjugado con <i>horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano.
HEK:	Línea celular tumoral <i>Human Embryonic Kidney</i> .
HeLa:	Línea celular tumoral <i>Henrietta Lacks cells</i> .
HFF:	Línea celular no tumoral <i>Human Foreskin Fibroblasts</i> .
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, reactivo utilizado para evaluar la viabilidad celular en función del potencial redox.
NET <small>Abs 562:</small>	Absorbancia neta a 562 nm.

- NET** _{Abs 570}: Absorbancia neta a 570 nm.
- PBS:** Solución tampón isotónica, permite mantener un pH constante; compuesta por cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato sódico y fosfato de potasio.
- PVDF:** Fluoruro de polivinilideno, material de membrana para transferencia de proteínas en *Western Blot*.
- RIPA:** Solución tampón de lisis que se utiliza para la lisis celular y solubilización rápidas y eficientes de proteínas de células.
- SDS-PAGE** *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
- TEM:** Microscopía electrónica de transmisión
- TEMED:** *Tetramethylethylenediamine*, tetrametiletilendiamina, reacciona con el APS dividiéndolo en el radical libre de sulfato para dar inicio la polimerización de acrilamida.

Resumen

Los exosomas son vesículas extracelulares, de tamaños nanométrico y morfología esferoide con presencia de bicapa, estudiados recientemente como posibles portadores de fármacos para terapias génicas dirigidos y otras aplicaciones en el campo de la Nanomedicina. Es posible el aislamiento de exosomas a partir de cualquier célula viva; sin embargo, la mayoría de investigaciones hasta el momento se han enfocado en exosomas de células provenientes de biofluidos de mamíferos. Los exosomas aislados de especies vegetales han demostrado un gran potencial para el tratamiento de ciertas afecciones, este potencial mediado por los componentes bioactivos inocuos propios de la célula vegetal de origen. Los exosomas de plantas son capaces de transportar en su interior el contenido de compuestos presentes en las células de las cuales provienen, por ejemplo polifenoles, involucrados en prevención del daño por radicales libres y potentes antioxidantes; y actividad antiproliferativa sobre líneas tumorales. Ecuador posee especies vegetales con propiedades aún por describir; frutos andinos como el capulí y mortiño poseen actividad antioxidante, antibacteriana, antiproliferativa sobre células tumorales, entre otras, que actualmente son escasamente aprovechadas. Esta investigación pretende el aislamiento y la caracterización de exosomas derivados de mortiño y capulí; además, evaluar el efecto biológico de estos exosomas sobre líneas celulares sanas y tumorales.

Palabras claves: exosomas, capulí, mortiño, TEM, citotoxicidad

Abstract

Exosomes are extracellular vesicles, of nanometric size and spheroid morphology with bilayer presence, recently studied as potential drug carriers for targeted gene therapies and other applications in the field of Nanomedicine. Isolation of exosomes from any living cell is possible; however, most research to date has focused on exosomes from mammalian biofluidic cells. Exosomes isolated from plant species have shown great potential for the treatment of certain conditions, this potential being mediated by the innocuous bioactive components of the plant cell of origin. Plant exosomes are capable of transporting in their interior the content of compounds present in the cells from which they originate, for example polyphenols, involved in the prevention of free radical damage and potent antioxidants; and antiproliferative activity on tumor lines. Ecuador has plant species with properties yet to be described. Andean fruits such as black cherry (capulí) and andean berry (mortiño) have antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activity on tumor cells, among others, which are currently scarcely exploited. This research aims to isolate and characterize exosomes derived from mortino and capulí and to evaluate the biological effect of these exosomes on healthy and tumor cell lines.

Keywords: exosomes, black cherry, andean berry, TEM, cytotoxicity

Capítulo 1. Introducción

Antecedentes

Mortiño, uva de los andes, uva de monte o arándano andino (*Vaccinium meridionale*) es una especie originaria de los Andes tropicales de Ecuador, Colombia y Perú. Crece entre los 3000 y 4500 msnm en suelos fríos, escasos de nutrientes, húmedos, poco profundos y ácidos (Lilivisaca *et al.*, 2022). Su fruto es de tipo globoso de 5 a 10 mm de diámetro y toma una coloración púrpura en su estado maduro (Zapata *et al.*, 2019). Ha sido empleado durante años por las comunidades andinas como parte de su alimentación, medicina tradicional, colorante natural, leña y ornamentación. Sin embargo, este fruto ha sido catalogado como un potencial alimento funcional por su composición rica en compuestos fenólicos y antocianinas que contribuyen a su potencial antioxidante (Gaviria *et al.*, 2009).

Capulí (*Prunus salicifolia*) es una especie que se desarrolla en el callejón interandino de los Andes del Ecuador. Es rica en nutrientes y antioxidantes, ha sido empleada en la alimentación y medicina tradicional de los pobladores de las comunidades locales. Se ha descrito la presencia de antocianinas y polifenoles en el extracto de este fruto lo que confiere una elevada actividad antioxidante (73,47%) y propiedades antimicrobianas (contra bacterias como *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y algunas levaduras) (Jiménez *et al.*, 2011). Escribano y colaboradores (2004), reportan que la actividad antioxidante está estrechamente relacionada con la actividad antimicrobiana y su actividad biológica.

Los exosomas son estructuras nanométricas, secretadas por las células animales y vegetales y células fúngicas, están directamente involucrados en la comunicación inter e intracelular. Se han identificado numerosas aplicaciones de exosomas como biomarcadores de diagnóstico y agentes terapéuticos, -entre otras (Kumar *et al.*, 2018). Se han identificado y reportado la presencia de nanovesículas de tipo exosoma en mamíferos, hongos (Liu *et al.*, 2020), plantas (Iravani *et al.*, 2019) y frutas (Pérez *et al.*, 2017). Por otro lado, estudios

previos en modelos animales señalan que los fenoles ejercen un papel protector contra el estrés oxidativo y los daños generados por radicales libres. De Robertis y colaboradores (2020), reportan que exosomas obtenidos de bayas pertenecientes a los géneros *Vaccinium* y *Prunus* (Luna *et al.*, 2013) pueden ser candidatos como portadores terapéuticos de compuestos bioactivos para proteger el sistema vascular frente a factores de estrés; este beneficio atribuido en gran medida a la elevada capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en los frutos tipo baya de las especies pertenecientes a estos géneros.

Adicionalmente, Maldonado *et al.*, (2014), confirman la capacidad antioxidante del extracto de mortiño, además de describir actividad citotóxica e inhibitoria contra células tumorales de adenocarcinoma de colon. Estudios enfocados en los efectos proliferativos y proapoptóticos del extracto de mortiño, evidencian un mecanismo de acción de apoptosis inducida por el extracto sobre células de adenocarcinoma de colon humano; además, se reporta una relación directa entre la muerte celular y aumento de ROS intracelulares que justifican la actividad antiproliferativa mediada por *Vaccinium meridionale* en esta línea tumoral (Agudelo *et al.*, 2017). Estudios enfocados en sobrepeso y obesidad determinaron el efecto del consumo de mortiño osmodeshidratado en biomarcadores proinflamatorios: TNF- α (factor de necrosis tumoral, citoquina proinflamatoria), IL-6 (interleucina-6, estimuladora de proteínas en fase aguda), IL-1 β (interleucina-1- β , citoquina proinflamatoria); se evidenció una disminución de estos biomarcadores y estimulación de la adiponectina (adipocitocina, estimulante de la oxidación de ácidos grasos), adicionalmente se observó una mejora en la capacidad antioxidante sérica en adultos con sobrepeso y obesidad (Gallego *et al.*, 2021).

Justificación

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas y radicales libres derivados del oxígeno (Banerjee *et al.*, 2017). Pueden ser de origen exógeno debido a la exposición por ejemplo a radiaciones o contaminantes del entorno; o pueden ser endógenos, como resultado del propio metabolismo celular (Bodega *et al.*, 2019). La producción y eliminación de ROS es equilibrado en condiciones normales, no obstante, al desencadenarse un estrés

oxidativo se genera un desequilibrio debido al aumento de ROS (Sies, 2018). De manera general, la elevada producción de ROS está directamente relacionada con el envejecimiento celular (Davalli *et al.*, 2016); sin embargo, estudios recientes han asociado una sobreproducción de ROS a condiciones de estrés y se ha demostrado que es agente causal de patologías de diferente índole como trastornos neurodegenerativos (Kim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017), enfermedades cardiovasculares (Sugamura *et al.*, 2011; Panth *et al.*, 2016) y carcinogénesis (Liou *et al.*, 2011).

Los polifenoles naturales son los antioxidantes más abundantes en la dieta humana, y sus actividades de captación de radicales están relacionadas con la sustitución de grupos hidroxilo en los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos (Rokayya *et al.*, 2013). La variedad de plantas, la región geográfica, la temporada de crecimiento y el almacenamiento pueden influir en las concentraciones de polifenoles en los alimentos (Hyson *et al.*, 2011). Los polifenoles de la dieta se pueden clasificar en cinco clases: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos y cumarinas. Los flavonoides se pueden clasificar además como flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (Yang *et al.*, 2009). El contenido fenólico total y la actividad antioxidante total en extractos fitoquímicos de diferentes frutas pueden tener una relación directa. Por su parte, Lujan y colaboradores (2020), afirman que los compuestos antioxidantes presentes en el fruto de ciertas especies vegetales, retardan la oxidación de ROS en el cuerpo humano.

La sobreproducción de oxidantes como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el cuerpo humano genera daños oxidativos en biomoléculas como lípidos, ADN y proteínas, desencadenando un desequilibrio. Se ha reportado que el consumo de fitoquímicos antioxidantes, como compuestos fenólicos, disminuye la producción de estas especies reactivas (Zhang *et al.*, 2015). Los fitoquímicos antioxidantes están ampliamente distribuidos en muchos alimentos y plantas medicinales; y juegan un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas causadas por el estrés oxidativo.

Polifenoles y carotenoides son los principales fitoquímicos antioxidantes que contribuyen a la capacidad antioxidante de las plantas. Frutos como el capulí, mortiño, arándano, ciruela entre otros son ricos en fitoquímicos antioxidantes (Manganaris *et al.*, 2013). Las frutas con contenidos fenólicos totales más altos, poseen una actividad antioxidante más fuerte.

Especies vegetales tienen la capacidad de producir vesículas extracelulares como exosomas y microvesículas que encapsulan componentes naturales de la especie donde se originan por ejemplo polifenoles (Soleti *et al.*, 2018). Además, la biocompatibilidad y estructura de tamaño nanométrico de los exosomas, los hacen posibles candidatos para aplicaciones terapéuticas como portadores de fármacos.

Esta investigación pretende aislar y caracterizar exosomas derivados de mortiño y capulí; además, evaluar el efecto biológico de estos exosomas sobre líneas celulares sanas y tumorales.

Objetivos

Objetivo general

Obtener exosomas a partir de capulí (*Prunus salicifolia* Kunth, Rosaceae) y mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw., Ericaceae).

Objetivos específicos

1. Caracterizar exosomas de dos frutos andinos mediante microscopía electrónica
2. Analizar el perfil proteico de exosomas de dos frutos andinos mediante electroforesis vertical.
3. Determinar la citotoxicidad de exosomas de dos frutos andinos mediante ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT).

Hipótesis

Prunus salicifolia Kunth, Rosacea (capulí) y *Vaccinium meridionale* Sw., Ericaceae (mortiño) secretan exosomas con actividad antioxidante.

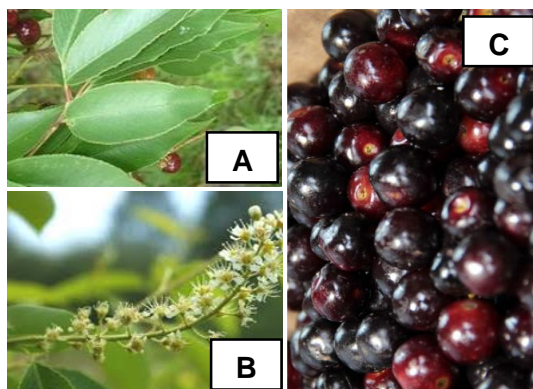
Capítulo 2. Revisión bibliográfica

Capulí (*Prunus salicifolia*)

Prunus salicifolia Kunth (figura 1) perteneciente a la familia Rosácea, es una especie introducida en el Ecuador desde Norteamérica, comúnmente conocida como capulí, habita a lo largo del callejón interandino desde la provincia del Carchi hasta Loja a 2500 msnm (Moncayo, 2017). Es un árbol con follaje frondoso y tolerante a la sequía y suelos pobres, alcanzando los 15 m de altura; sus hojas son ovaladas y brillantes de aproximadamente 18 cm de largo (Guzmán *et al.*, 2020). Los frutos globosos tipo baya de coloración rojo - negruzco de esta especie (8 - 20 mm de diámetro) son ricos en antioxidantes y su composición refleja un alto contenido de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos (Mendoza *et al.*, 2017); incluso superiores a los presentes en fresas y ciruelas (Vasco *et al.*, 2009). Evaluaciones del valor nutracéutico del fruto señalaron que sus principales compuestos vasodilatadores son el ácido ursólico y el uvaol (Luna *et al.*, 2016) y el ácido α -eleostearico presente en la semilla inhibe la proliferación de células cancerígenas (Aguerreberre *et al.*, 2011). Hernández y colaboradores (2018), señalan que la capacidad antioxidante de los frutos se relaciona con el contenido de flavonoides totales y antocianinas que aumentan cuando el fruto alcanza su color púrpura característico de maduración y óptimo para su consumo.

Figura 1.

Prunus spp. (capulí)



Nota: **A)** Hojas ovaladas. **B)** Inflorescencias. **C)** Fruto tipo baya.

Taxonomía de *Prunus salicifolia*

Prunus salicifolia es comúnmente conocida en Ecuador como capulí aunque varía según la zona geográfica, derivándose así denominaciones como ussun (en kichwa), yasaanshipijcha (chaapalachi) o piyoculi (en tsáchila) (Tamayo *et al.*, 2022). En Colombia es conocido como cerezo criollo, guinda en Perú, capulín en México y *black cherry* o *capulín cherry* en zonas estadounidenses. Independientemente del nombre local que cada zona le da a esta especie, la taxonomía es única y se encuentra detallada a continuación en la tabla 1:

Tabla 1.

Taxonomía del capulí

Información Taxonómica	
Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Prunus
Especie	<i>P. salicifolia</i> Kunth

(Jorgensen, 2013)

Producción del capulí en el Ecuador

En Ecuador se pueden distinguir dos variedades durante la producción de capulí: coral y negro (figura 2). Independientemente de la variedad, el capulí se desarrolla en las zonas secas andinas de la Serranía ecuatoriana de manera silvestre, donde es recolectado rústicamente por familias locales, durante 3 a 4 meses de producción, que comercializan este fruto para su subsistencia (Carrasco *et al.*, 2022). Sin embargo, existen plantas establecidas dedicadas a la producción masiva de este fruto en Guano en la provincia de Chimborazo, Nagsiche ubicado en Cotopaxi y en la provincia de Tungurahua laboran tres plantas en las zonas de Tamboloma, Quero y Salasaca. Otras plantas pequeñas se han

implementado recientemente en cantones de Azuay y Pichincha (Flores, 2008). La capacidad de producción de capulíes es directamente proporcional al volumen y tamaño del árbol; así, mientras más racimos posea, mayor serán las drupas por cada racimo (Deckers *et al.*, 2008). Carrasco y colaboradores (2022), señalan que en Ecuador el capulí es una especie de interés comercial por las características y propiedades de su fruto. En este sentido, la producción y comercialización del capulí consta de cinco etapas: cosecha del fruto, selección, almacenamiento, distribución y transporte a otras provincias. Este proceso implica ingresos económicos por la venta de capulí a productores, en la tabla 2 se detalla brevemente los costos del balde de capulí en las provincias con mayor producción (Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo).

Figura 2.

Variedades de capulí producidas en Ecuador



Nota: Variedades de capulí producidas en Tungurahua – Ecuador **A)** coral y **B)** negro (Tamayo *et al.*, 2022)

Composición

Tabla 2.

Composición del fruto de capulí

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
Proteína	2,10	g/100 g	Luna <i>et al.</i> , 2013

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
Carbohidratos	12,23	g/100 g	Luna <i>et al.</i> , 2013
Grasas totales	3,58	g/100 g	Luna <i>et al.</i> , 2013
Agua	75	%	Jiménez <i>et al.</i> , 2011
Fibra	60	%	Santacruz, 2011
pH	3.96	N/A	Jiménez <i>et al.</i> , 2011
Hierro	9,49	mg/100 g	García <i>et al.</i> 2015
Sodio	22,40	mg/100 g	Luna <i>et al.</i> , 2013
Potasio	813, 22	mg/100 g	García <i>et al.</i> 2015
Calcio	12,90	mg/100 g	Luna <i>et al.</i> , 2013
Magnesio	249,15	mg/100 g	García <i>et al.</i> 2015
Zinc	3,40	mg/100 g	García <i>et al.</i> 2015
Polifenoles totales	1732 ± 43.40	mg GAE/100 g	Jiménez <i>et al.</i> , 2011
Fenoles totales	362,2	mg GAE/g	Hernández <i>et al.</i> , 2018 Luna <i>et al.</i> , 2013
Antocianinas totales	10,71	mg/100 g	Jiménez <i>et al.</i> , 2011
Proantocianidinas	3,247	%	Hernández <i>et al.</i> , 2018
Flavonoides totales	16,56	mg EC/g	Hernández <i>et al.</i> , 2018
Vitamina C	18	mg/100 g	Antolovich, 2002
Riboflavina	0,04	mg/100 g	Calero, 2011
Tiamina	0,04	mg/100 g	Calero, 2011
Niacina	1,10	mg/100 g	Calero, 2011

*GAE = Equivalente de ácido gálico; TAEq = Equivalente de ácido tánico; EC: Equivalentes de catequina

Actividad biológica

Los frutos de *Prunus spp.*, son considerados como potencial fuente de antioxidantes por su composición rica componentes fitoquímicos antioxidantes. La capacidad natural antioxidante de estos frutos está relacionada directamente con el contenido de flavonoides totales y fenoles; siendo esta capacidad mucho mayor cuando el fruto no ha tomado su tonalidad púrpura característica (Hernández *et al.*, 2019). Se ha reportado que el consumo de antioxidantes fitoquímicos naturales como los presentes en el capulí, es inversamente proporcional a la aparición de enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2015). Se ha evaluado el efecto de los compuestos bioactivos como antocianinas, vitamina C y β -caroteno presentes en el fruto y la propiedad antioxidante del extracto crudo sobre la producción de ROS y se evidenció una actividad reductora y depuradora de radicales libres (Álvarez *et al.*, 2017). Por otro lado, se reportó que fenoles, proantocianidinas y antocianinas presentes en *Prunus avium* y *Prunus serotina* suprimieron el crecimiento tumoral de xenoinjertos de células de cáncer de mama MDA-MB-453 y células de adenocarcinoma colorrectal humano respectivamente, esto mediado por la inducción de apoptosis; no se evidenció signos de toxicidad en tejido sano (Noratto *et al.*, 2020).

Mortiño (*Vaccinium meridionale*)

Vaccinium meridionale Swartz (figura 3) perteneciente a la familia Ericaceae, se conoce en el Ecuador como mortiño o arándano andino; es un arbusto silvestre endémico de la zona tropical andina de Ecuador, Perú y Colombia (Coba *et al.*, 2012). Esta especie crece en temperaturas entre 3 y 17°C, y aproximadamente a 4000 msnm; este arbusto ramificado crece sobre superficies rocosas y alcanza aproximadamente los 2,5 m de altura (Medina *et al.*, 2019). Sus hojas poseen nervadura pinada y posee flores pequeñas blanquecinas de aproximadamente 1 cm de largo (Meléndez *et al.*, 2021). Posee frutos tipo baya color púrpura – azul (5 - 8 mm de diámetro) en cuyo interior poseen entre 15 y 60 semillas de alrededor de 0,84 mm; a estos se les atribuyen un alto contenido de ácidos

fenólicos, cumarinas, taninos hidrolizables, carotenoides, proantocianidinas, flavonoides, antocianinas, quercetina, miricetina, ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, neoclorogénico y derivados del ácido cafeico/ferúlico), fibra, azúcares y antioxidantes (Vasco *et al.*, 2009; Alarcón *et al.*, 2018). Las antocianinas representan hasta el 67% de sus compuestos fenólicos totales, siendo la delfinidina-3-arabinosa y la cianidina-3-arabinosa las antocianinas más abundantes en el mortiño (Vasco *et al.*, 2009; Schreckinger *et al.*, 2010).

Figura 3.

Vaccinium meridionale (mortiño)



Nota: **A)** Hojas con nervadura pinada. **B)** Inflorescencias. **C)** Maduración del fruto. (Peña *et al.*, 2020).

Taxonomía de Vaccinium meridionale

Vaccinium meridionale comúnmente conocido en Ecuador como mortiño, recibe otras denominaciones dependiendo de la zona donde se desarrolle, así toma el nombre de arándano agraz, arándano andino, uva de monte, uva de los Andes, *andean berry*, entre otros. Independientemente de la denominación local que cada zona le otorgue a esta especie, la taxonomía es única y se encuentra detallada a continuación en la tabla 3:

Tabla 3.*Taxonomía del mortiño*

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

(Ligarreto *et al.*, 2011; Meléndez *et al.*, 2021)

Producción del mortiño en el Ecuador

Lilivisaca y colaboradores (2018), señalan que existe una variabilidad en la composición y genotipo de especies del género *Vaccinium* influenciada por factores climáticos y geográficos. En este contexto, se ha observado que los niveles de polifenoles y otros compuestos bioactivos varían significativamente dependiendo de la ubicación geográfica, altitud y temperatura donde se desarrollan los arbustos de mortiño. En Ecuador se producen las especies *V. meridionale*, *V. floribundum* y *V. creatum* (Coba *et al.*, 2012); se consigue una única cosecha al año entre octubre y noviembre. Al ser un fruto del páramo ecuatoriano, es posible conseguirlo en comunidades de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi; donde los pobladores locales recolectan los frutos rústicamente en canastas y los comercializan en mercados populares. Hasta el momento no se conoce de establecimiento dedicados al cultivo de esta especie con fines comerciales (Muñoz, 2004).

Composición**Tabla 4.***Composición del fruto de mortiño*

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
Proteína	0.6 - 0.7	g/100 g	Coba <i>et al.</i> , 2012
Carbohidratos	14.5 - 18.1	g/100 g	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2022
Grasas totales	0.6 - 1	g/100 g	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2022
Calorías	84 - 75	kcal/100 g	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2022
Agua	80	%	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2022
Fibra	7.6 ± 2,2	%	Garzón <i>et al.</i> , 2014
pH	3.8	N/A	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2022
Hierro	0.64 ± 0.2	mg/100 g	Vasco <i>et al.</i> , 2009
Potasio	607 ± 73	mg/100 g	Vasco <i>et al.</i> , 2009
Calcio	17.0 ± 2.3	mg/100 g	Vasco <i>et al.</i> , 2009
Magnesio	10.2 ± 1.1	mg/100 g	Vasco <i>et al.</i> , 2009
Cobre	0.12 ± 0.02	mg/100 g	Vasco <i>et al.</i> , 2009
Zinc	0.13 ± 0.02	mg/100 g	Vasco <i>et al.</i> , 2009
Polifenoles totales	107.4 ± 6.7	mg GAE/100 g	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2018
Fenoles totales	608.05 - 882	mg GAE/100 g	Ligarreto, 2011 Garzón <i>et al.</i> , 2014
Antocianinas totales	1095.4 ± 19.2	mg/100 g	Lilivisaca <i>et al.</i> , 2018
Proantocianidinas	4.6 ± 0.3	%	Schreckinger <i>et al.</i> , 2010
Flavonoides totales	6.5 ± 0.7	mg EC/g	Alarcón <i>et al.</i> , 2018

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
Flavonoles totales	41.6 ± 10.2	mg/100 g	Prencipe <i>et al.</i> , 2014
Taninos totales	4.2 ± 0.8	mg TAEq/g	Alarcón <i>et al.</i> , 2018
Vitamina C	45.9 ± 6.7	mg/100 g	Alarcón <i>et al.</i> , 2018
β-carotenos	70.6 ± 2.0	μg/100 g	Alarcón <i>et al.</i> , 2018
Tiamina	0,05	mg/100 g	USDA, 2010
Luteína	866.6 ± 7.5	μg/100 g	Alarcón <i>et al.</i> , 2018
Ácido neoclorogénico	1,5 ± 0,5	N/A	Prencipe <i>et al.</i> , 2014
Ácido clorogénico	9,5 ± 2,9	N/A	Prencipe <i>et al.</i> , 2014
Ácido pantoténico	0.09	mg/100 g	USDA, 2010

*GAE = Equivalente de ácido gálico; TAEq = equivalente de ácido tánico

Actividad biológica

Al mortiño se le atribuyen principalmente propiedades antioxidantes. Su capacidad antioxidante tiene el potencial de proteger a las células humanas contra el estrés oxidativo (Alarcón *et al.*, 2018). Los polifenoles naturales son los antioxidantes más abundantes en la dieta humana y su capacidad de captación de radicales está relacionadas con la sustitución de grupos hidroxilo en los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos (Quiñones *et al.*, 2012). Se evaluó la citotoxicidad de extractos crudos de hojas de especies de género *Vaccinium* sobre el metabolismo y proliferación de queratinocitos y fibroblastos a nivel *in vitro*; así, se evidenció que los extractos muestran una capacidad significativa para eliminar los radicales libres productos del metabolismo propio de las células al ser sometidas a estrés (Ziemlewska *et al.*, 2021). En este contexto, se ha reportado que las antocianinas presentes en las hojas y frutos inhiben en gran medida el impacto negativo de la radiación solar sobre los fibroblastos humanos, retardando así el fotoenvejecimiento de la piel (Finkel

et al., 2000; Bae *et al.*, 2007). En otra línea de investigación, se reportó actividad antioxidante y antiproliferativa del extracto crudo de mortiño sobre células de adenocarcinoma de colón humano (Arango *et al.*, 2021). Se atribuye esta actividad antiproliferativa del mortiño contra este tipo de células tumorales a mecanismos apoptóticos estimulados por *Vaccinium meridionale* (Agudelo *et al.*, 2017). Por otro lado, se evaluó los efectos antioxidantes de los frutos de *Vaccinium myrtillus* en isquemia – reperfusión (condición inflamatoria que activa leucocitos y ROS, y conduce al daño de DNA); se observó una supresión significativa de la lesión por estrés oxidativo causado por la isquemia – reperfusión (Jakešević *et al.*, 2011). Estudios enfocados en el síndrome metabólico (condición caracterizada aumento del estrés oxidativo y estado proinflamatorio) asociado a una mayor propensión de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en mujeres; demostraron que el consumo de mortiño está asociado a una reducción significativa en los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (2-OHdG), un marcador de daño en el DNA (Espinosa *et al.*, 2018). En la misma línea de investigación, Marín y colaboradores (2021), evaluaron el efecto del consumo de una dosis diaria de mortiño fresco (200 g) sobre marcadores de estrés oxidativo y antioxidante en mujeres con síndrome metabólico; se evidenció una reducción significativa de estos marcadores (Marín *et al.*, 2021). Por otro lado, investigaciones de toxicidad del extracto liofilizado de mortiño en peces cebra, reportan una viabilidad del 100% de los huevecillos de este modelo animal; esto sugiere que el mortiño es no es tóxico y podría considerarse un ingrediente natural seguro para el desarrollo de alimentos nutracéutico o fármacos (Baenas *et al.*, 2020).

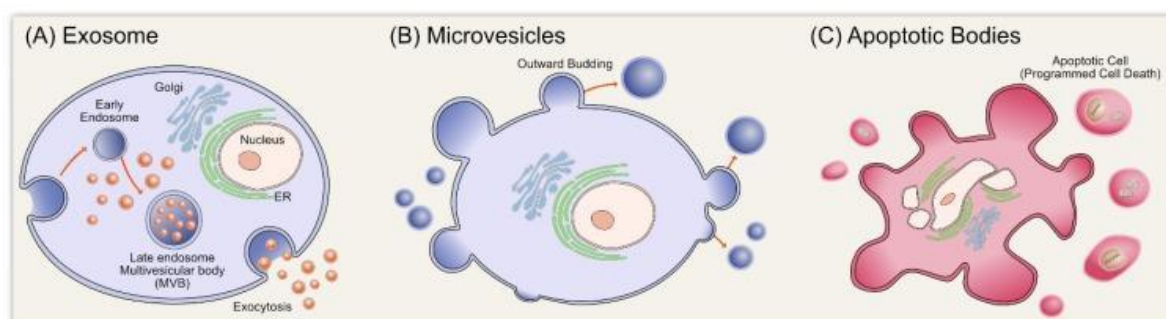
Exosomas

Las vesículas extracelulares son heterogéneas de tamaños nanométricos en cuyo interior transportan metabolitos, lípidos, proteínas, RNA, miRNA, mRNA y DNA (López *et al.*, 2013; Perut *et al.*, 2021). Acorde a su sitio de origen, tamaño, expresión de marcadores, se han descrito principalmente tres tipos de vesículas extracelulares: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (figura 4) (Sidhom *et al.*, 2020). Los cuerpos apoptóticos

resultan de la formación de ampollas en una membrana celular apoptótica, el tamaño de este tipo de vesículas extracelulares oscila entre 500 a 5000 nm; las microvesículas son liberadas tras un proceso de gemación externa de la membrana plasmática, su tamaño está entre 100 a 1000 nm; finalmente, los exosomas se forman cuando cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática y liberan vesículas intraluminales de 30 a 150 nm (Lee *et al.*, 2012; Battistelli *et al.*, 2020).

Figura 4.

Esquema de vesículas extracelulares



Nota: Representación esquemática de vesícula extracelulares: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (Guranathan *et al.*, 2019).

Los exosomas son vesículas extracelulares de dimensiones nanométricas, de 30 a 150 nm de diámetro, liberados tras la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Zhang *et al.*, 2019). Los primeros exosomas fueron descritos por primera vez en 1983, se describieron inicialmente como vesículas endosomales en cuyo interior transportaban receptores de transferrina secretados a partir de reticulocitos en proceso de maduración (Harding *et al.*, 1983; Pan *et al.*, 1983). Son un vehículo de comunicación intercelular libre de células; estudios recientes los han descrito como vehículos funcionales transportadores de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Simpson *et al.*, 2014). Así, las capacidades de transporte y comunicación intercelular, les permite participar en varios procesos celulares como la respuesta inmune, presentación de antígenos y transducción de señales (Gangoda *et al.*, 2015; Greening *et al.*, 2015; Mittelbrunn *et al.*, 2011). En este

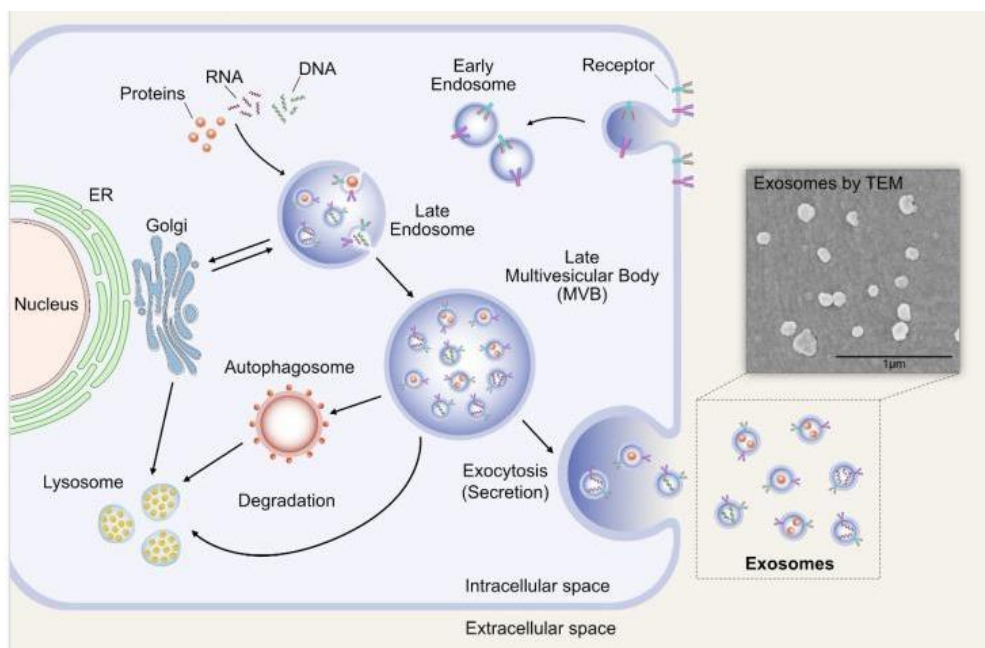
sentido, los cargamentos biológicamente activos de los exosomas, pueden ofrecer variedad de pronósticos en enfermedades de tipo cardiovascular, renal, neurodegenerativas, enfermedades metabólicas lipídicas, incluso inflamaciones crónicas y tumores (Gonzales *et al.*, 2014; Howitt *et al.*, 2016; Kishore *et al.*, 2016; Lässer *et al.*, 2016; Record *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2016).

Biogénesis

Los exosomas, un subtipo de vesículas extracelulares (EV), son liberados por la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática de la célula (Sidhom *et al.*, 2020). Se forman por exocitosis de cuerpos multivesiculares (MVB) que liberan vesículas intraluminales al fusionarse con la membrana plasmática (Perut *et al.*, 2021).

Figura 5

Biogénesis de exosomas



Nota: Biogénesis de exosomas (Guranathan *et al.*, 2019)

Guranathan y colaboradores (2019), describen tres etapas de biogénesis: formación de vesículas endocíticas por invaginación de la membrana plasmática, formación de MVB

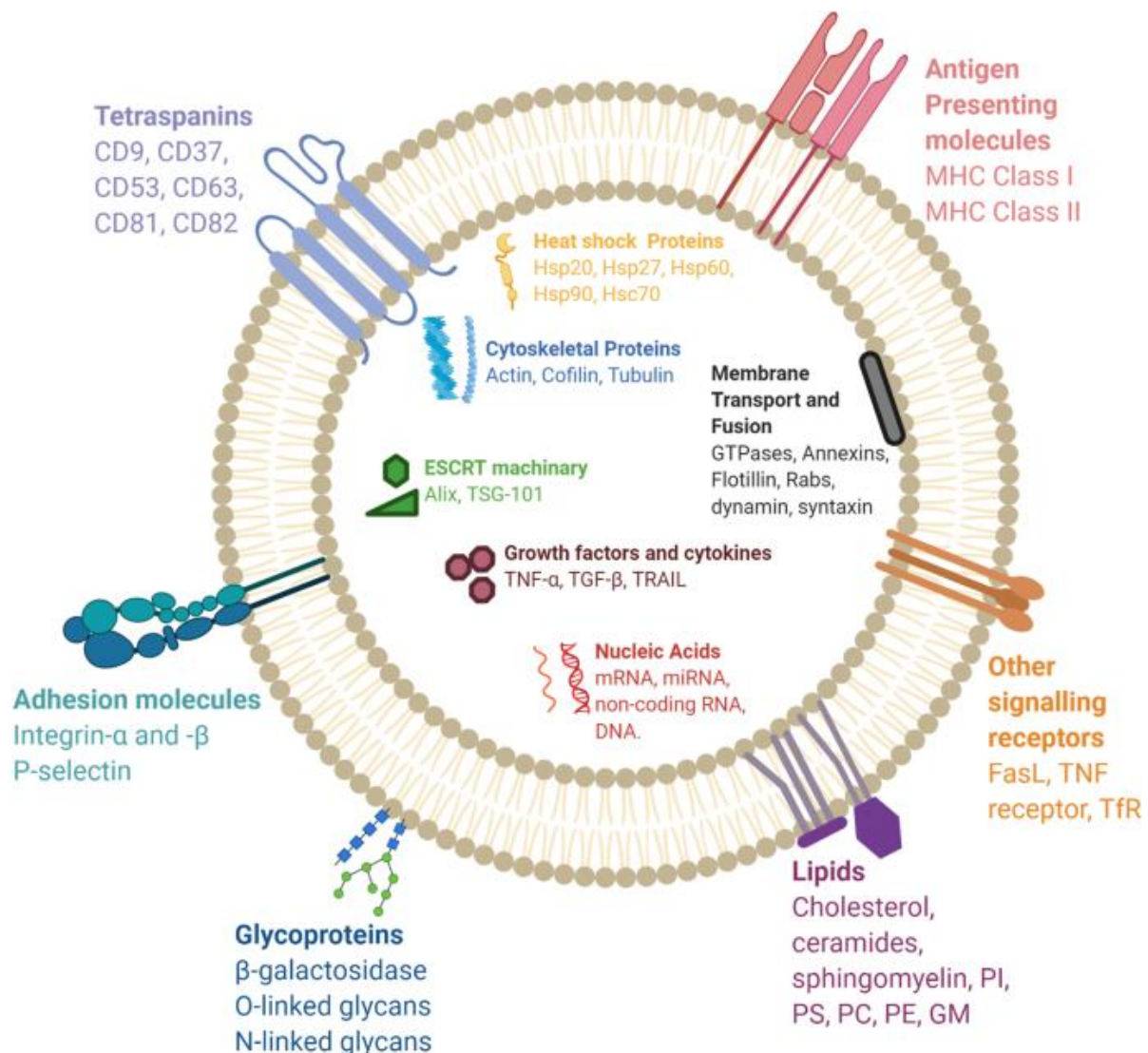
con la membrana y liberación del contenido vesicular, exosoma (figura 5). La biogénesis de estas vesículas intraluminales se produce a través de los complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte (ESCRT) o un sistema basado en el receptor de la proteína de unión (SNARE) del factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF) soluble. En la endocitosis, se forman vesículas endocíticas en la membrana plasmática y se fusionan para formar endosomas tempranos. Estos maduran y se convierten en endosomas tardíos donde las vesículas intraluminales brotan en un lumen intracitoplasmático. En lugar de fusionarse con el lisosoma, estos cuerpos multivesiculares se fusionan directamente con la membrana plasmática y liberan exosomas en el espacio extracelular (Pant *et al.*, 2012).

Estructura y Composición

Los exosomas (figura 6) tienen estructura ovoide, doble capa y un diámetro entre 30 y 150 nanómetros (nm). Se han descrito tres tipos de perfiles en las vesículas extracelulares anteriormente descritas: perfil de expresión de proteínas, perfil lipídico y perfil de carga luminal genómica y transcriptómica. Los exosomas específicamente, poseen un perfil de expresión de proteínas (flotillina-1, ALIX, TSG101, CD81, CD63, CD9) y perfil lipídico (esfingomielina, fosfatidilserina y ceramida) (Sidhom *et al.*, 2020). Hay una variedad de marcadores de superficie exosomales comunes (por ejemplo, tetraspaninas como CD9, CD81 y CD63 y proteínas asociadas a lípidos como la flotillina-1), así como marcadores internos como Alix y Tsg101. Cada exosoma también contiene y transfiere pequeños ARN y otras proteínas citoplasmáticas y receptores específicos de células que pueden transferirse a las células receptoras (Lee *et al.*, 2012). La carga exosomal puede cambiar según el medio celular, la célula de origen e incluso la técnica de preparación del exosoma (Rivero, 2020).

Figura 6.

Estructura y composición de un exosoma



Nota: Estructura típica de un exosoma (Gurung *et al.*, 2021)

Métodos de aislamiento de exosomas

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC separa las moléculas acorde a su tamaño y/o peso molecular. Es comúnmente utilizada para aislar moléculas grandes o complejos macromoleculares como proteínas (Sidhom *et al.*, 2020). Permite extraer exosomas con alto rendimiento y pureza; los exosomas se separan de contaminantes de proteínas y ácidos nucleicos más pequeños (Guan *et al.*, 2020). Esta técnica utiliza biofluidos como fase móvil contra una fase estacionaria porosa para eluir

diferencialmente las moléculas con una relación de velocidad inversa a su tamaño. Así, las partículas más grandes eluyen primero, seguidas de las vesículas más pequeñas que fluyen a través de los poros, tomando un mayor tiempo de elución. Las partículas más grandes eluyen antes, ya que no pueden entrar en los poros y, por lo tanto, fluyen rápidamente alrededor de la fase estacionaria. Por el contrario, las partículas más pequeñas que el rango de aislamiento (35 o 70 nm) ingresan en los poros de la resina y eluyen más tarde.

Ultracentrifugación diferencial (dUC). Se basa en la separación de las subpoblaciones de vesículas extracelulares a través de tasas de aceleración gradualmente más altas. Se considera la técnica estándar de oro para el aislamiento de exosomas (Sidhom *et al.*, 2020). Aunque la contaminación de proteínas no relacionadas con exosomas en el sedimento aislado de dUC es baja, las partículas de lipoproteínas de densidad similar tienden a precipitar con el sedimento final (González *et al.*, 2011).

Ultrafiltración (UF). Esta técnica combinada con SEC permite aislar exosomas con un rendimiento y pureza similar o superior a la dUC; la ultrafiltración depende de un filtro de tamaño de poro específico que crea un filtrado rico en vesículas específico para el tamaño de nanovesículas deseado (Benedikter *et al.*, 2017).

Agentes precipitantes como polietilenglicol (PEG). Utiliza una solución para facilitar un agregado de vesículas atrapadas en polímeros en grandes cantidades, en base a este principio de aislamiento, se han desarrollado kits comerciales que contienen polímeros como PEG, dextranos o polivinilos como agentes precipitantes para el aislamiento de exosomas de manera simple, rápida y económica (Rider *et al.*, 2016).

Captura por inmunofinidad (IA). Utiliza anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la superficie exosomal para aislar una población específica de vesículas; ya se han reportado inmunoislamientos de exosomas para células presentadoras de antígeno (Tauro *et al.*, 2012).

Recientemente, se han utilizado técnicas nuevas en combinación con SEC para mejorar la pureza de los exosomas. Se utilizó con éxito la cromatografía de modo dual (DMC) para reducir la contaminación de las partículas de lipoproteínas (LPP) en las preparaciones de exosomas de plasma. Esta técnica integra dos pasos de separación: la eliminación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) por SEC y el uso de intercambio catiónico para separar las LPP con carga positiva de los exosomas con carga negativa (Van *et al.*, 2020). Otra técnica combina SEC con detección de fluorescencia y se conoce como Flu-SEC o F-SEC. Aquí, SEC se combina con la detección de exosomas marcados con fluorescencia mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y un detector de fluorescencia para optimizar el aislamiento de exosomas (Sidhom *et al.*, 2020).

Caracterización de exosomas

Se han desarrollado métodos y técnicas para la caracterización, análisis y cuantificación de la carga exosomal. Estos métodos incluyen microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), dispersión de luz dinámica (DLS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo, biosensores electroquímicos, entre otros (Gurunathan *et al.*, 2019). Los exosomas comparten proteínas estructurales y funcionales como Alix, Tsg101 y tetraspaninas; y moléculas como flotillina que permiten la inmunodetección de exosomas mediante Western Blot (Van Niel *et al.*, 2006; Zöller *et al.*, 2009).

Exosomas obtenidos de plantas

Estudios recientes han demostrado la presencia de nanopartículas derivadas de plantas cuyas características son semejantes a exosomas mamíferos (Perut *et al.*, 2021). Ju y colaboradores (2013), señalan que estas nanopartículas similares a exosomas derivados de plantas evolucionaron como un medio de comunicación intercelular y como moduladores de las defensas inmunitarias innatas que las plantas despliegan en presencia de fitopatógenos. En este sentido, cada vez más investigaciones sugieren que las exosomas

similares a exosomas derivadas de plantas pueden mediar la comunicación intercelular entre plantas y animales al ser absorbidas por diferentes tejidos en el organismo de los mamíferos (Ju *et al.*, 2013; Raimondo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015, Zhuang *et al.*, 2015). Así, exosomas presentes en uva, pomelo, zanahoria y jengibre evidencian propiedades antiinflamatorias (Mu *et al.*, 2014). Baldini y colaboradores (2018), reportan una inhibición en el estrés oxidativo en células humanas mediante exosomas de *Citrus lemon*. Forbes y colaboradores (2018), reportaron una atenuación en el estrés oxidativo en células humanas al ser tratadas con exosomas de *Fragaria x ananassa* (fresa) a diferentes concentraciones. En el género *Vaccinium* se ha reportado que exosomas obtenidos del extracto del fruto tienen la capacidad de afectar la respuesta en células endoteliales al TNF- α y modular la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y liberación de citocinas (De Robertis *et al.*, 2020).

Aplicaciones de exosomas

Los exosomas son vectores de administración de terapia génica potencialmente ideales, ya que están compuestos por componentes naturales, no sintéticos y no virales. Además, su pequeño tamaño y flexibilidad les permite atravesar las principales membranas biológicas, mientras que su estructura bilipídica protege la carga de ARN y proteínas de la degradación, lo que facilita la entrega a su objetivo (Vickers *et al.*, 2012). Están emergiendo como potentes fuentes de transferencia de información genética entre células y tejidos de mamíferos, lo que tiene como resultado resultados tanto beneficiosos (comunicación celular, plasticidad de células madre y reparación de tejidos lesionados) como potencialmente perjudiciales (propagación de enfermedades) (Lee *et al.*, 2012).

Los exosomas al encontrarse en numerosos fluidos biológicos y liberarse de una variedad de células; cumplen ciertas funciones biológicas que dependerán de la célula de origen y estado de la célula o tejido al momento del aislamiento del exosoma. Así, se ha demostrado que, debido a su capacidad de transferir ARN, proteínas, enzimas y lípidos, los

exosomas desempeñan funciones importantes en procesos biológicos como angiogénesis, presentación de antígenos, apoptosis, coagulación, homeostasis celular, inflamación y señalización intercelular (Théry *et al.*, 2002; Guranathan *et al.*, 2019).

Cultivo celular

El cultivo celular es el crecimiento *in vitro* de células eucariotas o procariontes en un entorno artificial, aséptico y controlado. Dichas células son extraídas del organismo y las condiciones de su crecimiento dependerán del tipo de célula; para su desarrollo se estandarizan condiciones como nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, antibióticos, gases, pH, temperatura, entre otros que favorezcan el crecimiento celular. La homogeneidad y reproducibilidad hace de las líneas celulares un modelo para detección de enfermedades, toxicidad de nuevos fármacos, investigaciones metabólicas, producción de vacunas, regeneración y trasplante de tejidos, ingeniería genética, entre otros (Segeritz & Vallier, 2017).

La determinación de la viabilidad celular es clave previo al inicio de un ensayo con líneas celulares. Para ello, las células se resuspenden en un medio adecuado, se extrae una alícuota para homogenizarla con azul de tripán y evaluar células viables y no viables. El azul de tripán se impregna únicamente en células no viables que toman una coloración azul/negro; así, mediante un conteo en un hematocitómetro es posible definir el porcentaje de viabilidad correspondiente, un cultivo sano alcanza un 95% de viabilidad celular (Strober, 2001).

Líneas celulares

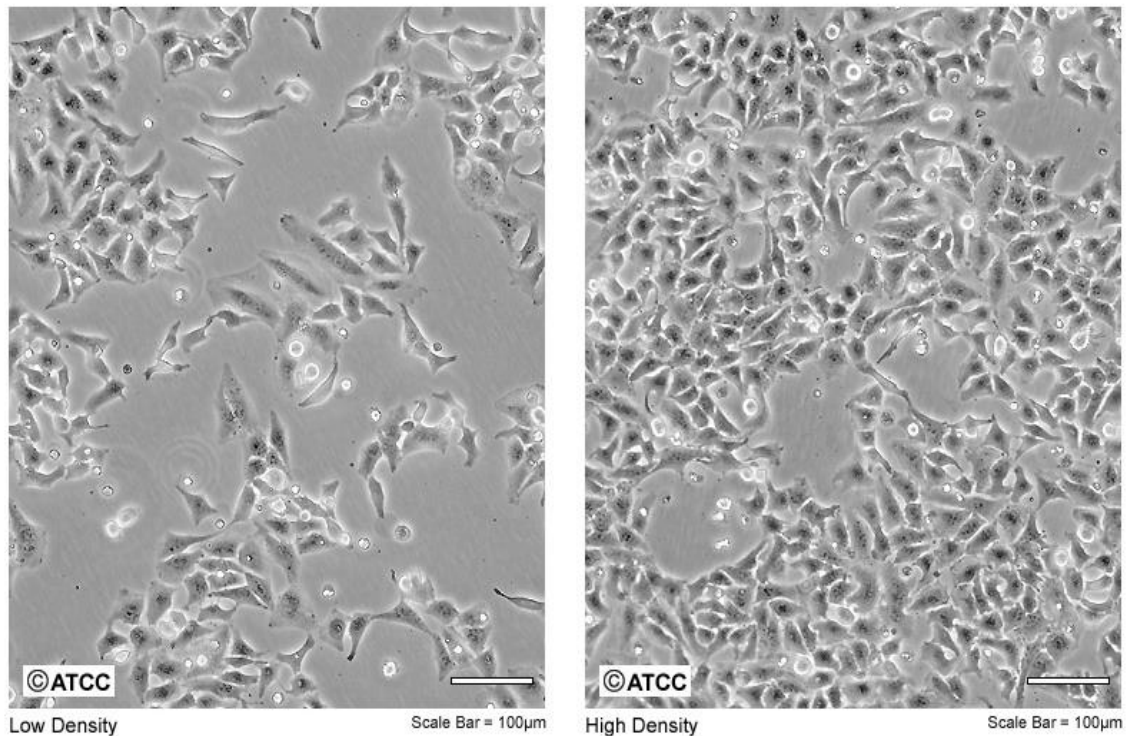
HeLa. La línea celular HeLa fue la primera línea celular inmortal de origen humano. Fue aislada por primera vez en 1951 por George Otto Gey, Margaret Gey y Mary Kucibek de un carcinoma cervical derivado de Henrietta Lacks, paciente femenina de 31 años (Nott, 2020). Estas células de tipo adherente tienen una talla de 20 – 40 μm , su morfología dependerá del medio de cultivo que se utilice, sin embargo se las puede describir con una

forma irregular con borde delgado e hipermovilidad (Boatman *et al.*, 1976; Chen *et al.*, 2013). Durante décadas, esta línea celular ha contribuido en investigaciones que han arrojado importantes avances médicos, por ejemplo: investigaciones sobre los efectos de la gravedad cero en el espacio exterior, efectos antioxidantes y citotóxicos, desarrollo de vacunas (poliomielitis, COVID-19), leucemia, VIH y sobretodo cáncer alrededor del mundo (Universidad Johns Hopkins, 2022).

Figura 7.

Línea celular HeLa

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



Nota. Línea celular tumoral HeLa (ATCC, 2022)

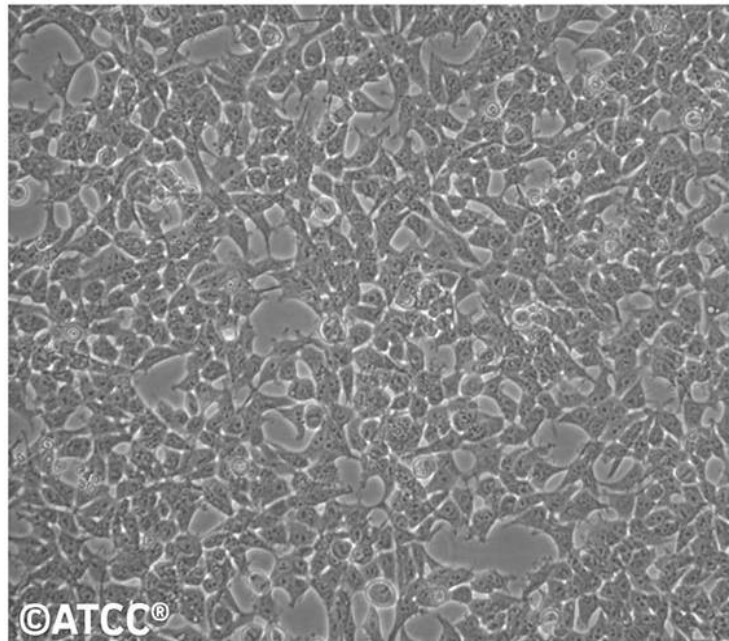
HEK-293. Línea celular de tipo epitelial aislada de riñón embrionario humano. La línea celular de riñón embrionario humano (HEK-293) surgió mediante la transformación de células de riñón embrionario humano (HEK) con fragmentos cortados de ADN de adenovirus tipo 5 (Ad5) haciéndola inmortal (Shiloaj, 2021). Cada célula tiene un tamaño aproximado de 11 a 15 µm y su diámetro dependerá de las condiciones de cultivo. Esta

línea celular de tipo adherente se utiliza comúnmente en investigación porque son fáciles de cultivar y mantener, tienen un alto índice de reproducibilidad. Se utilizan para analizar el efecto de fármacos; adicionalmente, son accesibles para transfecciones y eficientes para la producción de proteínas. Mediante plásmidos, es posible manipular la maquinaria de proteínas sintéticas de esta célula y producir proteínas transfectadas con la información genética del plásmido (Thomas *et al.*, 2005).

Figura 8.

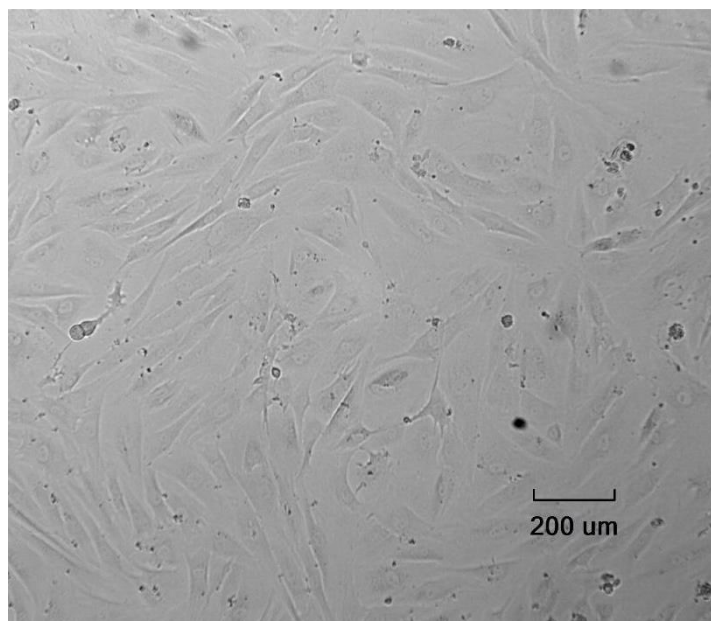
Línea celular HEK-293

ATCC Number: **CRL-3216**
Designation: **293/T**



Nota: Línea celular tumoral HEK-293T (ATCC, 2022)

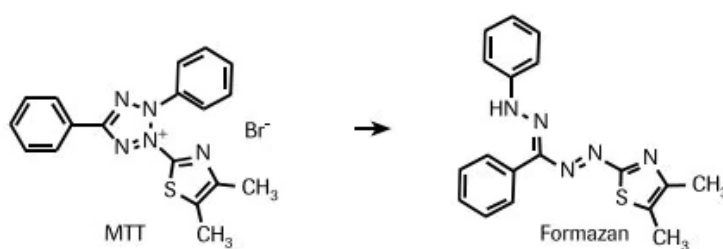
HFF. La línea celular fue establecida en 2003 a partir del prepucio humano normal de dos individuos (ATCC, 2022). Esta línea celular, al ser una línea sana, es comúnmente empleada como control en la evaluación de efecto de fármacos sobre líneas celulares. Son células de tipo adherente.

Figura 9.*Línea celular HFF*

Nota: Línea celular no tumoral HFF, fotografía tomada en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (LABIV, 2022).

Ensayo de viabilidad celular MTT

Es un ensayo colorimétrico rápido basado en la escisión del anillo de tetrazolio de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) mediada por enzimas oxidorreductasas dependientes de NADPH que reducen el MTT a cristales de formazán (figura 10).

Figura 10.*Mecanismo del ensayo de MTT*

Nota: Metabolismo de MTT a sales de formazán mediado por células viables (Buranaamnuay, 2021).

Este ensayo permite medir la actividad metabólica como un indicador de viabilidad, proliferación y/o citotoxicidad celular. El MTT está cargado positivamente y penetra con facilidad en las células eucariotas viables, entonces las células viables con el metabolismo activo convierten el MTT en sales de formazán de color púrpura, que se utiliza como marcador cualitativo de viabilidad celular (Buranaamnuay, 2021). Los cristales formados se disuelven en una solución de solubilización como SDS o DMSO y la solución coloreada resultante se lee a una absorbancia entre 500 y 600 nm. La intensidad de coloración púrpura es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas viables (Riss *et al.*, 2016). El ensayo de MTT mide la proliferación en función de la actividad metabólica de las células y se utiliza con frecuencia en condiciones de cultivo celular; permite determinar si ciertos compuestos a los cuales las células están expuestas, tienen efectos proliferativos, citotóxicos directos o eventualmente conducen a una muerte celular (Huyck *et al.*, 2012).

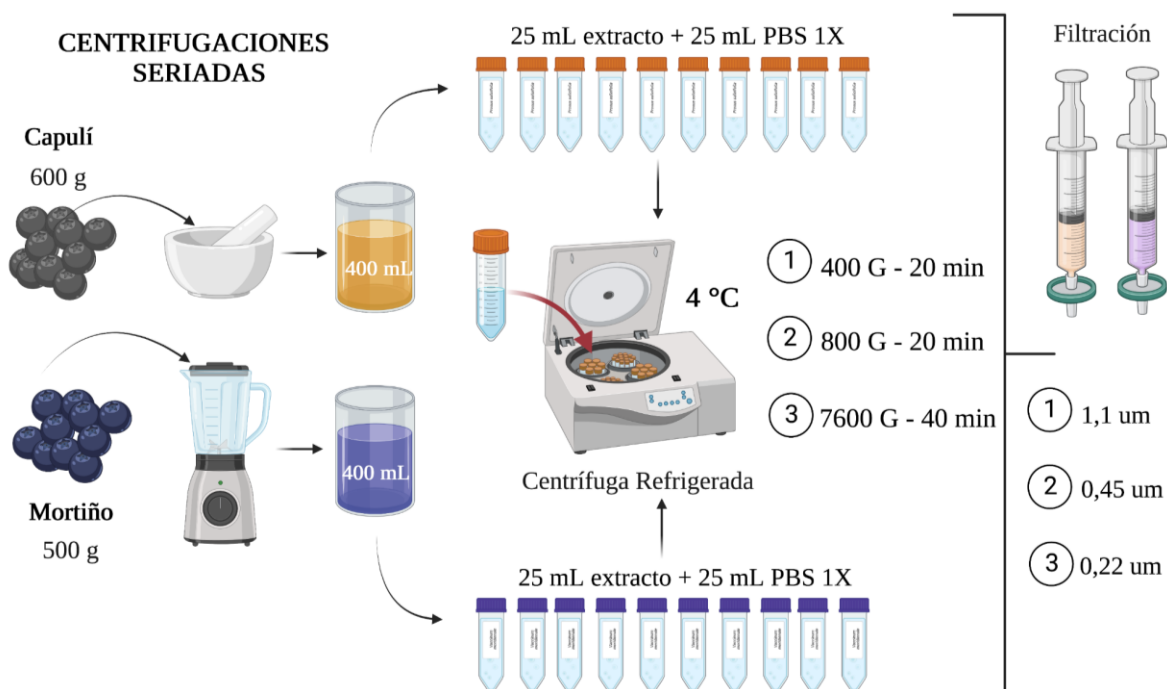
Capítulo 3. Materiales y métodos

Obtención de exosomas

Aislamiento de exosomas

Preparación de extractos de muestras de origen vegetal. Para la pulpa de capulí se trituró aproximadamente 600 g de fruto sobre un tamiz reteniendo las semillas y cáscaras, extrayendo únicamente la pulpa. En el caso del mortiño, se trituró alrededor de 500 g de fruto y se tamizó separando la pulpa. Se extrajo aproximadamente 500 g de pulpa de capulí y 450 g mortiño. Las pulpas obtenidas se almacenaron a 4°C hasta su centrifugación.

Centrifugación seriada. En tubos de 50 mL, se distribuyeron 25 mL de pulpa con 25 mL de PBS 1X en proporción 1:1 y se homogeneizó mediante vortex. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron en tres etapas, manteniendo una temperatura de 4°C en cada una de ellas. Inicialmente se centrifugó a 400 G durante 20 minutos. Los sobrenadantes recuperados en la primera etapa se centrifugaron a 800 G durante 20 minutos. Finalmente, los sobrenadantes obtenidos en la segunda etapa, se centrifugaron a 7600 G durante 40 minutos tantas veces como sean necesarias hasta eliminar totalmente el pellet. De la última etapa se recuperaron y almacenaron los sobrenadantes en tubos estériles a 4°C y los pellet obtenidos (microvesículas) se resuspendieron en 500 uL de agua destilada y se almacenaron a -20°C. La misma secuencia de centrifugaciones se ejecutó tanto para capulí como para mortiño. Durante todo el proceso de centrifugación seriada se mantuvo una cadena de frío para evitar la degradación de proteínas. Finalmente, los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de un gradiente de filtros de 1,1 uM (*Thermo Scientific*TM, Ref.: 722-2000) y 0,45 um (*Cytiva*, Ref.: 9909-2504). Los sobrenadantes filtrados se utilizaron para el aislamiento mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Figura 11.*Centrifugaciones seriadas*

Nota: Proceso detallado de centrifugación seriada previa al aislamiento de exosomas de capulí y mortiño, esquema elaborado en *BioRender*.

Aislamiento mediante columna de exclusión por tamaño

Se purificó las muestras por cromatografía de exclusión por tamaño mediante la columna *iZON qEVOoriginal* (Ref.: Sp1). Se equilibró la columna con 10 mL de PBS 1x. Sin dejar que la columna se seque, se pasó 3 mL del sobrenadante recuperado (capulí o mortiño). Cuando la muestra alcanzó aproximadamente 1 cm del final de la columna (se diferenció mediante el color del sobrenadante) se inició la recolección de 20 fracciones (cada fracción de 500 µL). Se realizó el mismo procedimiento dos veces para cada fruta. Antes de iniciar un nuevo pasaje, se limpió la columna pasando alrededor de 5 mL de NaOH 0,5 N y se lavó con aproximadamente 25 mL de PBS 1X. Las fracciones recolectadas se cuantificaron mediante espectrofotometría en *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*™ J999) y ensayos BCA (ácido bicinconínico) (*Sigma Aldrich*, Ref.: B9643-1L).

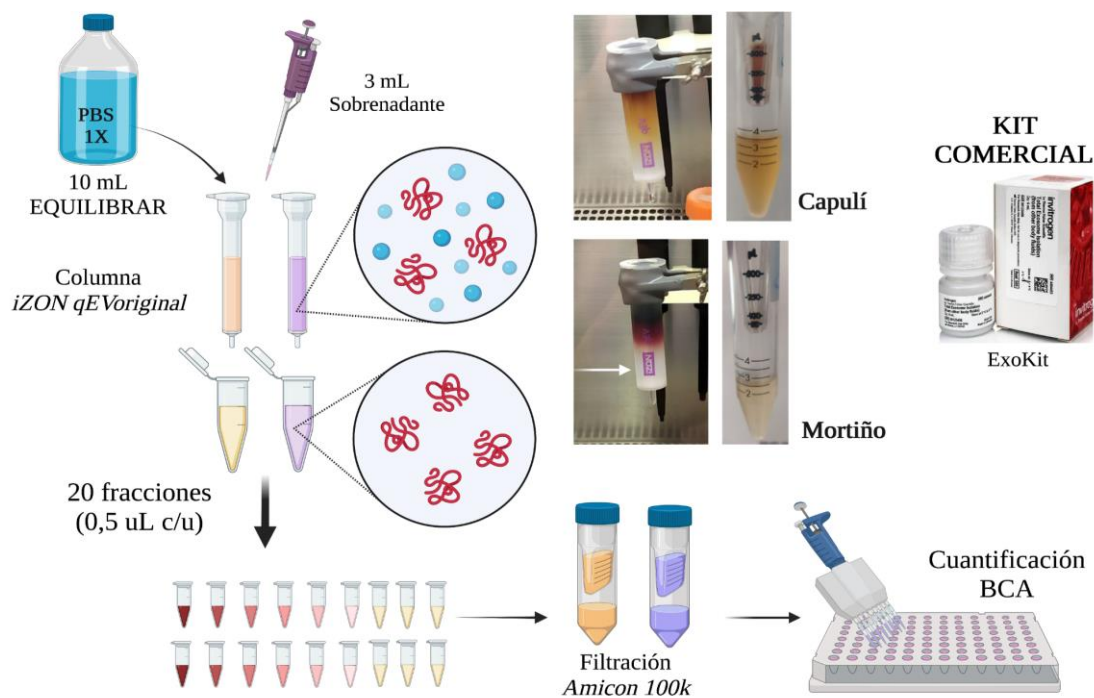
Las muestras con concentraciones superiores o iguales a 3,999 mg/mL se concentraron entre similares mediante filtro *Amicon Ultra-4 100K* (*Amicon® Ultra 10K device - 10,000 MWCO*) a 5000 G durante 10 minutos manteniendo una temperatura de 4°C. Finalizada la centrifugación se recuperó y cuantificó la fase superior e inferior mediante espectrofotometría en *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific™ J999*) y ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Aquellas muestras con concentraciones iguales o superiores a 6 mg/mL se almacenaron a -20°C.

Aislamiento mediante kit comercial

Se obtuvo una alícuota de 100 µL de extracto de exosomas de capulí y mortiño mediante el kit *Total exosome isolation from other body fluids* (*Invitrogen, Ref.: 4484453*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura 12.

Aislamiento de exosomas



Nota: Proceso detallado de aislamiento de exosomas de capulí y mortiño mediante cromatografía de exclusión por tamaño y kit comercial, esquema elaborado en *BioRender*.

Cuantificación de proteínas

Cuantificación de proteínas mediante ensayo de BCA: Las fracciones recogidas en el aislamiento por SEC y los concentrados de proteínas se cuantificaron mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (*Sigma-Aldrich*, Ref.: B9643-1L). Para ello, se preparó una placa de 96 pocillos con la gama de proteína estándar y 25 uL de cada una de las muestras a cuantificar. Se utilizó como blanco PBS 1x y albúmina de suero bovino (BSA a 1 mg/mL) como proteína estándar. Cargados los pocillos, se preparó la solución de trabajo en proporción 50:1 (Reactivo A: solución de ácido bicinconínico y Reactivo B: solución de sulfato -de cobre (II) pentahidratado al 4%, respectivamente) y se añadieron 200 uL de la solución de trabajo sobre cada uno de los pocillo, homogenizando por pipeteo. Finalmente, la placa se incubó a 37°C durante 30 minutos, finalizada la incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos y se midió la absorbancia a 562 nm en espectrofotómetro para microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific*™, Ref.: N10588).

El cálculo de la absorbancia neta ($NET\ Abs_{562}$) se realizó mediante la ecuación 1 (Ec.1):

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

Posteriormente, se generó una curva de calibración con el fin de obtener una ecuación mediante la cual se calculó la concentración final de proteína en las muestras en mg/mL. La ecuación generada para el cálculo final de la proteína es de tipo:

$$Y = mX + b \quad (Ec.2)$$

Siendo:

Y = Absorbancia neta obtenida a 562 nm

X = Concentración final de proteína en mg/mL

m y b = Valores constantes generados en la ecuación

Entonces, se tiene la siguiente ecuación (Ec.3) para el cálculo final de concentración de proteína:

$$[Proteína](mg/mL) = \frac{NET\ Abs_{562} - b}{m} \times 1000 \quad (Ec.3)$$

Caracterización de proteínas exosomales

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Preparación de la muestra. Sobre el mesh 300 de cobre (*TED PELLA INC*, Ref.: 01753-F) se colocó 10 uL de muestra (fracciones 6 a 11 obtenidas mediante purificación por exclusión de tamaño y kit comercial) dejando absorber durante 1 minuto. Posteriormente, se retiró el exceso de muestra con papel filtro y tiñó negativamente con 10 uL de acetato de uranilo al 2% durante 10 segundos. Finalmente, se retiró el excedente de la solución de acetato, se lavó tres veces con agua destilada y se observó en microscopio electrónico de transmisión (*FEI – Tecnai Spirit Twin* (120 kV)). Las imágenes obtenidas se analizaron con *ImageJ*.

Western Blot

Electroforesis vertical (SDS-PAGE). Se prepararon alícuotas de 500 ug de proteína total mediante la ecuación 7 (Ec.7):

$$V_{muestra} = \frac{\text{Cantidad de proteína (ug)}}{\text{Concentración } (\frac{ug}{mL})} \times \frac{1\ 000\ uL}{1\ mL} \quad (\text{Ec.4})$$

Las muestras se prepararon bajo condiciones desnaturizantes. Los volúmenes calculados con la ecuación 4, se homogenizaron por vórtex con *RIPA-Lysis Buffer system* (*Santa Cruz Biotechnology*, Ref.: SC24948) en proporción 1:1 y a continuación se homogeneizó por vórtex con aproximadamente 15 uL de buffer de carga 4x (SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0.4%, 2-mercaptoetanol 8%, Tris- HCl 250 mM, pH 6.8). Las muestras homogeneizadas con buffer RIPA ref y buffer de carga se desnaturizaron a 95°C durante 5 minutos. Se sometió a la muestra a un shock térmico en hielo durante 5 minutos y se cargaron 25 uL en el gel de poliacrilamida preparado al 10% de separación (acorde al protocolo establecido en el LABIV). Se utilizó como marcador *Precision Plus Protein Dual Color Standard* (*Bio-Rad*, Ref.:1610374). Se prepararon dos geles al 4% de concentración y 10% de separación (tabla 5). Se corrieron los geles idénticos, uno de ellos para verificación con azul de *Comassie* y otro para transferencia de proteínas a membrana de PVDF

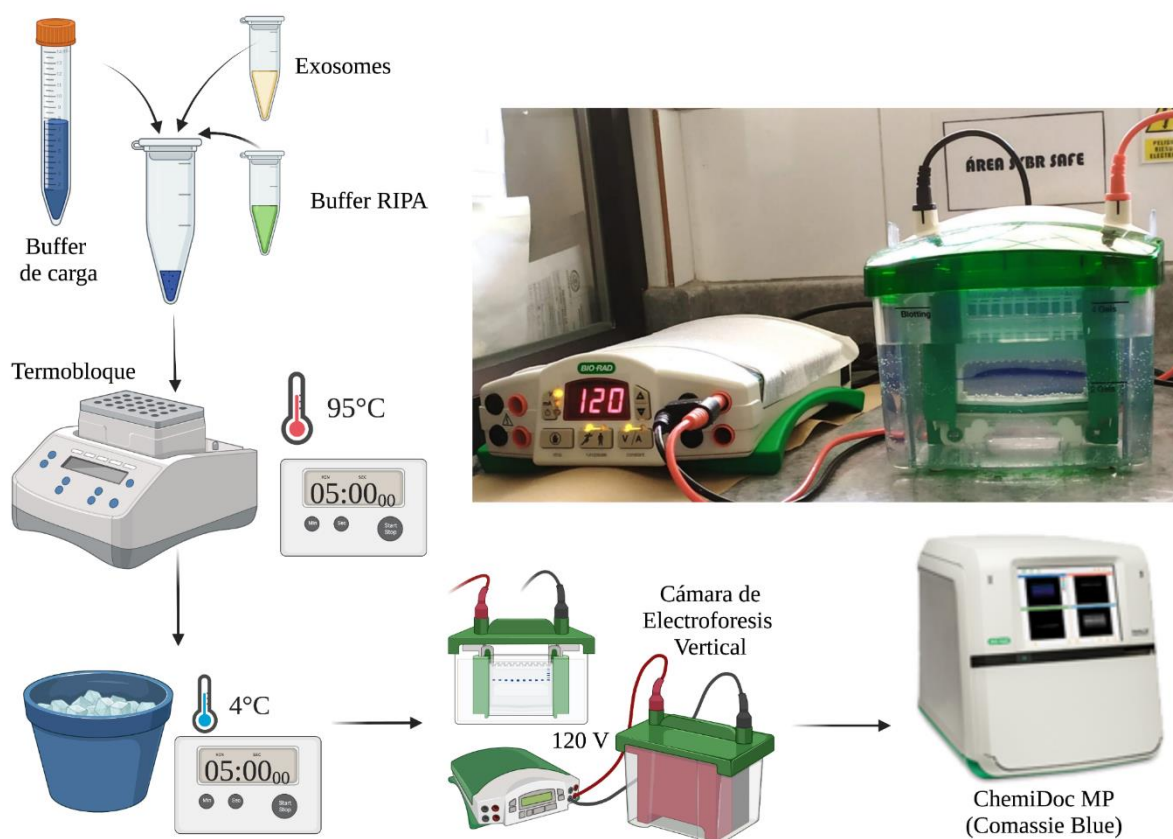
(Amersham™ Hybond® P Western blotting membranes, Ref.: GE10600023) en medio semi-seco. La corrida electroforética fue ejecutada a 120 V durante aproximadamente 90 minutos con el sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell for Mini Precast Gels* (Bio-Rad Ref.:1658004).

Tabla 5.

Preparación de gel de poliacrilamida al 10%

Componente	Gel de concentración al 4%	Gel de separación al 10%
Agua destilada	3,2 mL	4,9 mL
Acrilamida/bis 40%	0,5 mL	2,5 mL
Buffer* <i>upper</i> : gel de concentración, <i>lower</i> : gel de separación	1,25 mL	2,5 mL
APS 10%	25 uL	50 uL
TEMED	5 uL	15 uL

Verificación de presencia de proteínas en gel de poliacrilamida. Finalizada la corrida electroforética, se colocó uno de los geles en solución de tinción (azul de Comassie R-250 0,5%, metanol 25%, ácido acético glacial 50%) durante 30 minutos en agitación constante. Al finalizar, se retiró el exceso de colorante y se lavó con solución de lavado (metanol 10% y ácido acético glacial 10%) hasta observar bandas. Se foto documentó las proteínas en gel utilizando el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System* (Bio-Rad Ref.:12003154) y se analizaron los perfiles obtenidos con el software *Image Lab*.

Figura 13.*Electroforesis vertical de proteínas en gel de poliacrilamida*

Nota: Electroforesis vertical de proteínas de capulí y mortiño en gel de poliacrilamida al 10%, condiciones reductoras y desnaturizantes, esquema elaborado en *BioRender*.

Transferencia de proteínas a membrana en medio semi-seco. Para la transferencia de proteínas en medio semi-seco se utilizó el equipo *Trans Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Ref.: 1704155). Concluida la corrida electroforética se colocó el segundo gel en buffer de transferencia *Towbin* (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH: 8,3) durante 10 minutos. A continuación, se ensambló el sánduche de transferencia sobre la base del cassette (polo positivo), colocando una pieza de papel Whatman de 0,8 mm (previamente humedecida en buffer de transferencia), la membrana de PVDF (dimensiones: 5,5 x 8,5 cm), el gel y nuevamente una pieza de papel Whatman. Se removieron las burbujas del sánduche con un rodillo y se cerró el cassette colocando la tapa (polo negativo). Se colocó el cassette en el *Trans Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Ref.:

1704155) y se programaron 3 ciclos de 7 minutos a 2,5 A y 25 V. Finalizados los ciclos del *Trans Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, Ref.: 1704155), se verificaron las proteínas tiñendo la membrana con solución de Rojo Ponceau (Ponceau S 0.5%, ácido acético glacial 1%) durante 5 minutos en agitación constante. Posteriormente se lavó la membrana con solución de ácido acético glacial al 0,1% hasta eliminar el exceso de colorante y sea posible visualizar las bandas en la membrana. Se foto documentó las proteínas en membrana utilizando el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System* (Bio-Rad Ref.:12003154).

Inmunomarcaje de proteínas. Se incubó la membrana en 3 mL de solución de bloqueo (BSA 5%, buffer TTBS (buffer TBS + Tween 20 al 0,1%)) a temperatura ambiente durante 2 horas en homogeneización constante. Finalizada la incubación, se realizaron seis lavados consecutivos con buffer TTBS. Posterior al último lavado se incubó la membrana en anticuerpo primario (Ac 1°) durante toda la noche en homogeneización constante a 4°C, los anticuerpos empleados se describen en la tabla 6. Posterior a la incubación con Ac 1°, se lavó cinco veces con buffer TTBS. Seguidamente, se realizó inmunomarcaje incubando durante 2 horas en oscuridad en homogeneización constante con anticuerpo secundario (Ac 2°); el anticuerpo utilizado fue GAM-HRP (*Inmuno-Star Goat Anti-Mouse*) se diluyó en buffer TTBS en proporción 1:15000. Finalmente, se lavó seis veces con buffer TTBS. Cada lavado se realizó en agitación constante durante 10 minutos.

Tabla 6.

Anticuerpos empleados en el marcaje durante Western Blot

Anticuerpo Primario	Dilución	Catálogo
anti-CD63	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-5275</i>
anti-CD69	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-373799</i>
anti-CD81	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-166029</i>
anti-Alix	1:500	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-53540</i>

Se reveló la membrana por quimioluminiscencia con el sustrato *Kit Clarity ECL Western*

Substrate (Bio-Rad, Ref.: 1705060) preparado en proporción 1:1. Se incubó durante 5

minutos en oscuridad y agitación manual, y se foto documentó la membrana utilizando el sistema de imagen *ChemiDoc MP Imaging System* (Bio-Rad Ref.:12003154).

Cultivo celular

Preparación de medios de cultivo

Se preparó medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Ref.: A14430-01) adicionado con 15% de BSA para las células HFF (ATCC, SCRC-1041) y *Minimum Essential Medium Eagle* (EMEM) (Gibco, Ref.: M5650) adicionado con 10% de BSA para las células HEK (ATCC, CRL-3216) y HeLa (ATCC, CRM-CCL-2).

Descongelamiento de líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares: HEK293, HFF y HeLa almacenadas a -196°C en tanque de nitrógeno (*Thermo Scientific*™, Ref.: CY509106). Se extrajo el pasaje celular correspondiente y se resuspendió en 1 mL de medio previamente atemperado a 37°C y se transfirió a un tubo Falcon estéril (*Thermo Scientific*™, Ref.:339650) con 1 mL de medio y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido en la centrifugación se resuspendió con 1 mL de medio de cultivo y se transfirió a un flask 25 (*Thermo Scientific*™, Ref.:156367) para incubar a 37°C y un requerimiento de dióxido de carbono (CO₂) del 5%.

Plaqueo de líneas celulares en P96

Acondicionados previamente los medios de cultivo correspondientes para cada línea celular, se levantó las células con tripsina y se preparó una placa de 96 pocillos (P96) con 10 000 células por pocillo. Se incubó a 37°C con un requerimiento de CO₂ del 5%, durante 24 horas.

Tratamientos

Se trataron las tres líneas celulares con cloruro de cobalto (CoCl₂) a 400 uM (control de citotoxicidad), dimetilsulfóxido (DMSO) (control de citotoxicidad), exosomas (5 ug y 20 ug), microvesículas y el sobrenadante obtenido en la centrifugación seriada. Como control de viabilidad celular se empleó únicamente el medio correspondiente para cada línea

celular. Se realizaron dos repeticiones por tratamiento. Los tratamientos se colocaron posterior a las 24 horas de adherencia de las células y se incubó por 24 horas.

Ensayo MTT

Se colocó el reactivo de MTT a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos. Se dispensó 10 uL de MTT a 5 mg/mL (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (*Invitrogen, Ref.: M6494*) y se incubó durante 4 horas; posteriormente se añadió SDS al 10% para disolver los cristales de formazán. Tras 24 horas de incubación se midió la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro para microplacas *Multiskan Go* (*Thermo Scientific™, Ref.: N10588*) y se evaluó estadísticamente la viabilidad celular mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{NET_{Abs\ 570} \times 100}{Media [NET_{Abs\ 570} (\text{Control de viabilidad})]} \quad (\text{Ec. 5})$$

Análisis estadístico

Se analizó y graficó los resultados de cuantificación de proteínas y ensayo de MTT con el software estadístico *GraphPad Prism*. Todos los datos se presentaron como medias conjuntamente con desviación estándar de la media (SEM) para mayor precisión (Media \pm SEM).

Diseño experimental del ensayo MTT:

Para el ensayo MTT se planteó las siguientes condiciones:

- Líneas celulares: 3 (HFF, HeLa y HEK)
- Número de tratamientos: 3 (exosomas, microvesículas y sobrenadante)
- Cantidad de proteína para cada tratamiento: 2 (5 ug y 20 ug)
- Tiempos evaluados: 2 (24h y 48h)
- Repeticiones: 2
- Variable dependiente: porcentaje de viabilidad celular
- Variables independientes: exosomas, microvesículas, sobrenadante

Los resultados del ensayo MTT se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, realizando comparaciones entre cada uno de los tratamientos frente al control de citotoxicidad (cloruro de cobalto). El análisis estadístico en *GraphPad Prism* generó las respectivas barras de error para cada caso y calculó el valor de p de significancia tras las comparaciones anteriormente mencionadas.

Capítulo 4. Resultados

Obtención de exosomas

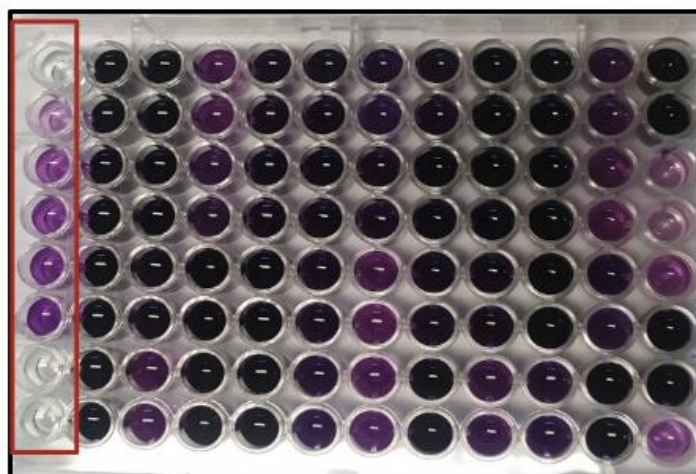
Aislamiento mediante columna de exclusión por tamaño

Las fracciones recogidas fueron cuantificadas mediante ensayo BCA para determinar la concentración de proteínas en mg/mL. En la figura 14, se observa la placa de cuantificación, resaltando en el recuadro la gama utilizada para la generación de la curva de calibración. La intensidad de coloración púrpura es proporcional a la concentración de proteínas presente en la muestra. Las absorbancias medidas a 562 nm y el cálculo correspondiente con las ecuaciones 1, 2 y 3; arrojaron las siguientes concentraciones:

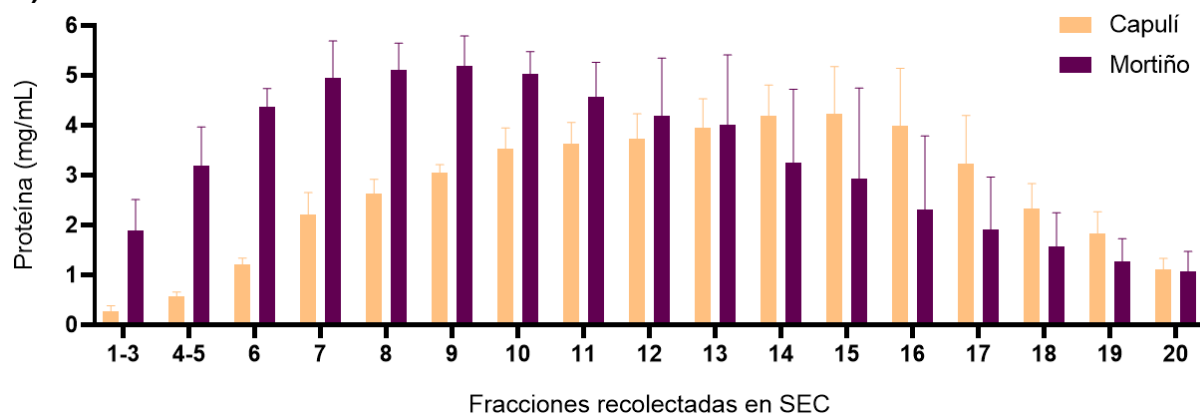
Figura 14.

Cuantificación de proteínas por BCA

A)



B)



Nota: A) Placa de la cuantificación de proteínas mediante ensayo de ácido bicinónico (BCA), se resalta la gama en el recuadro. B) Resultados de la cuantificación mediante BCA representados mediante concentraciones de proteínas en mg/mL de las fracciones recolectadas mediante SEC a partir de sobrenadantes de capulí y mortiño (esquema elaborado con *GraphPad Prism*).

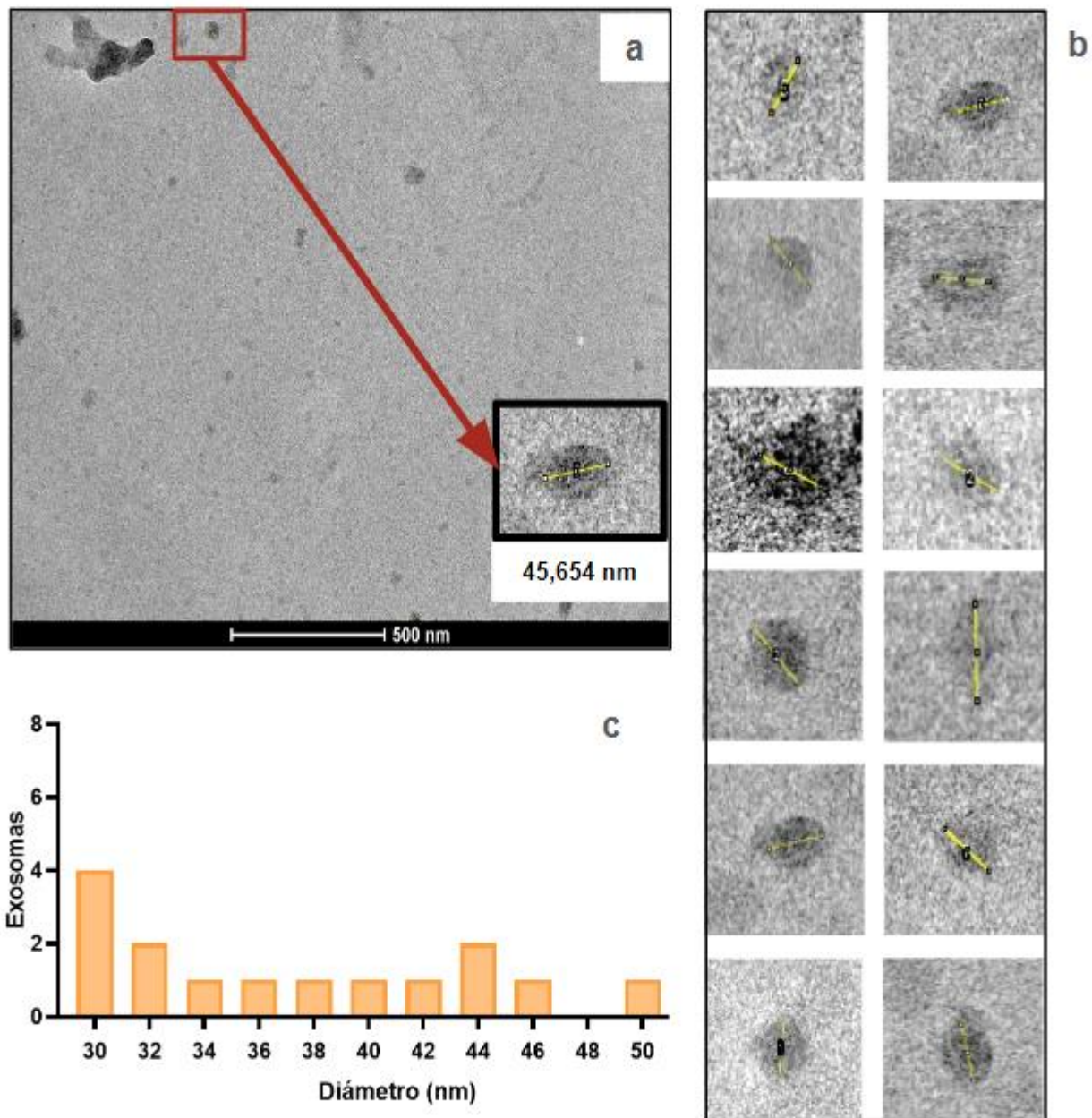
Caracterización de proteínas exosomales

Microscopía Electrónica de Transmisión

La caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión y el correspondiente análisis con el software *ImageJ* de las muestras de exosomas de dos frutos andinos previamente obtenidas mediante SEC y kit comercial, reveló estructuras ovoides, bicóncavas y con doble membrana, morfología característica de un exosoma. En cuanto al tamaño de las estructuras identificadas, las mediciones correspondientes evidencian un diámetro que oscila entre los 30 y 50 nm para los exosomas aislados mediante SEC (figura 15.A y figura 16.A) y por otro lado aquellos aislados mediante kit comercial (figura 15.C y figura 16.C) mantienen un diámetro entre 30 y 70 nm. Cabe recalcar que independientemente del método de aislamiento del cual provenía cada muestra, se analizó una alícuota de 20 uL tanto para capulí como para mortiño. En este sentido, se logró la identificación de aproximadamente 15 estructuras exosomales en las muestras obtenidas a partir de extracto de capulí (figura 15.C) y cerca de 37 exosomas en muestras obtenidas a partir del extracto de mortiño (figura 16.C); los histograma de frecuencia correspondientes a cada fruta detallan el número de exosomas relacionados con sus diámetros resultantes a escala nanométrica.

Figura 15.

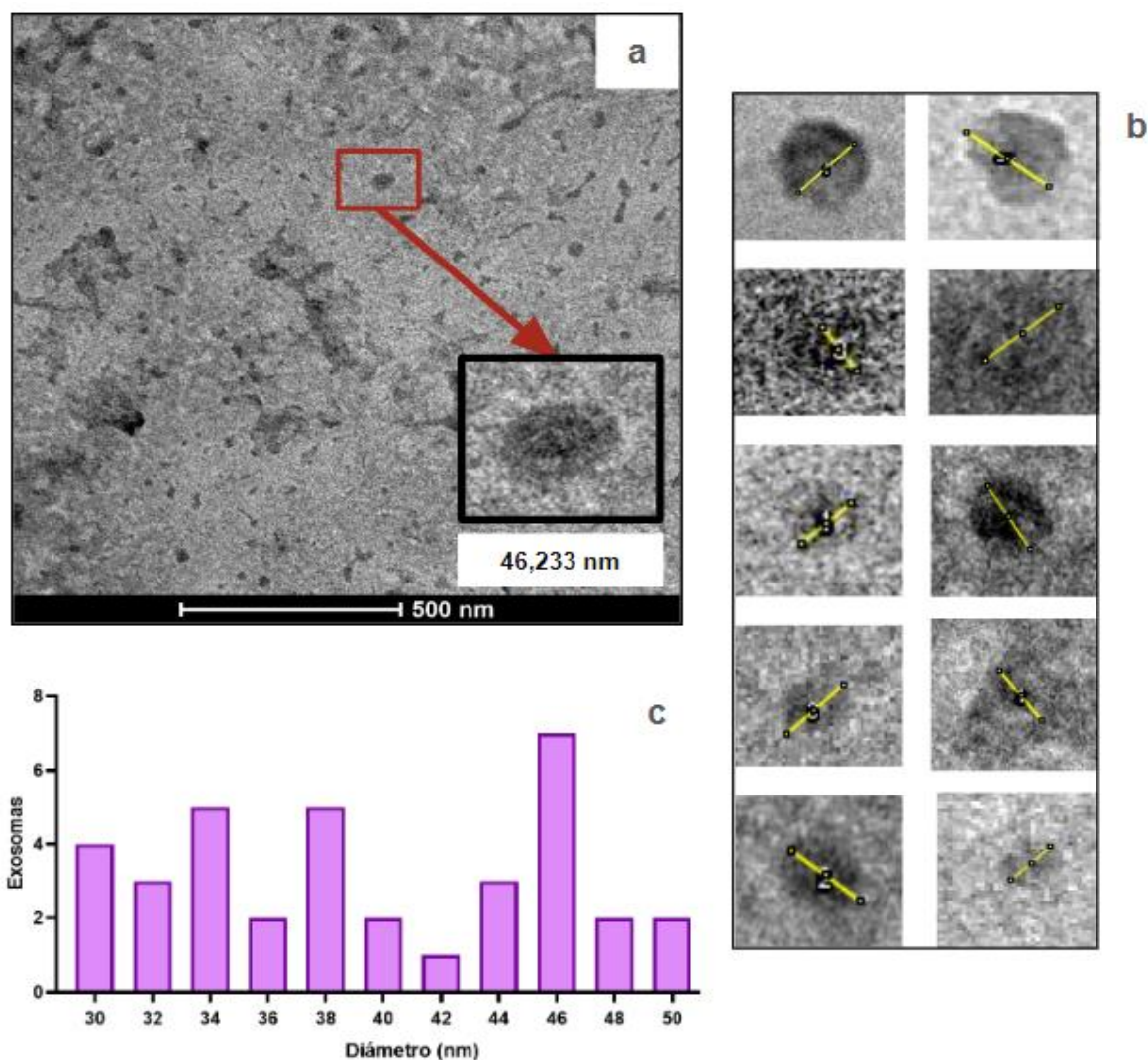
Caracterización de exosomas de capulí mediante TEM



Nota: **a)** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de exosomas derivados de capulí aislados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con tinción negativa de acetato de uranilo al 2%. **b)** Análisis de diámetros de exosomas aislados por kit con software *ImageJ*. **c)** Histograma de frecuencia de los diámetros de exosomas aislados por SEC y kit.

Figura 16.

Caracterización de exosomas de mortiño mediante TEM



Nota: **a)** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de exosomas derivados de mortiño aislados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con tinción negativa de acetato de uranilo al 2%. **b)** Análisis de diámetros de exosomas aislados por kit con software *ImageJ*. **c)** Histograma de frecuencia de los diámetros de exosomas aislados por SEC y kit.

Electroforesis vertical

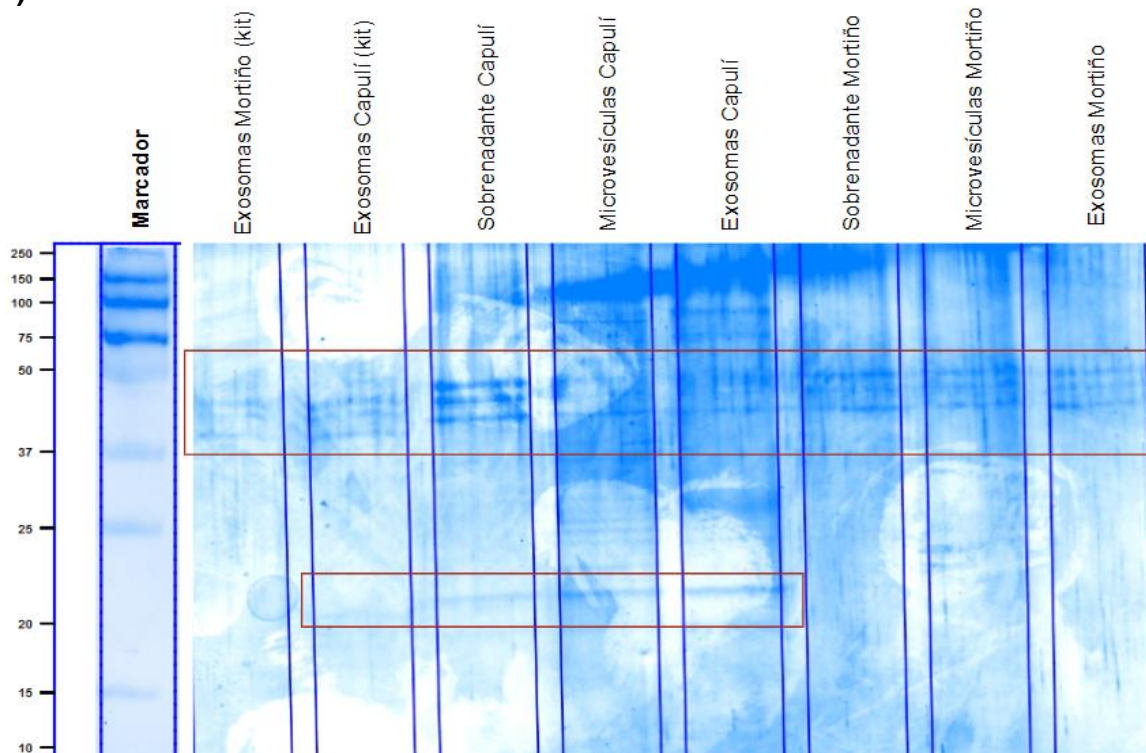
Se obtuvo el perfil proteico de muestras de exosomas obtenidos mediante SEC y kit comercial, microvesículas y sobrenadante de capulí y mortiño mediante electroforesis

vertical (SDS-PAGE); haciendo uso de un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras y desnaturizantes.

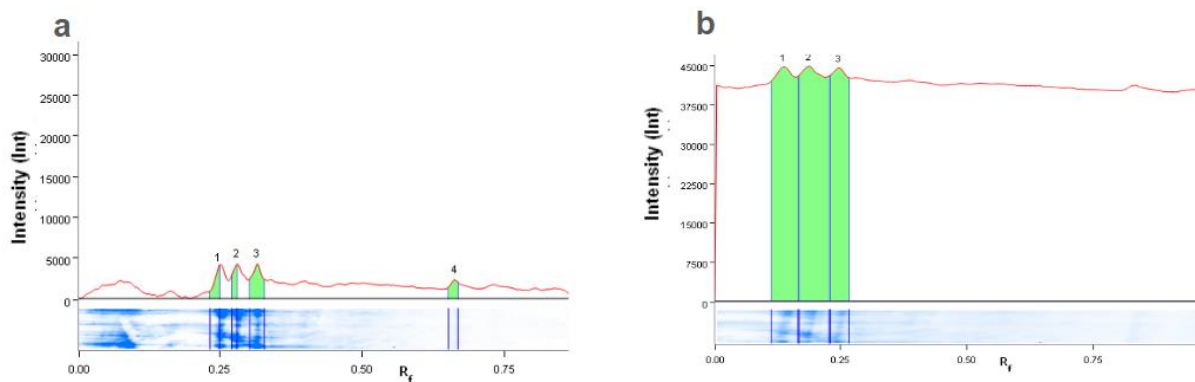
Figura 17.

Perfil proteico de exosomas de capulí y mortiño

A)



B)



Nota: **A)** Perfil proteico de capulí y mortiño en gel de poliacrilamida al 10%, condiciones desnaturizantes y reductoras, teñido con *Comassie Blue* para analizar la purificación de la

proteína, análisis realizado en *Image Lab*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular con 10 bandas (entre 10 y 250 kDa). Las bandas observadas representan a proteínas teñidas incrustadas en el gel, a medida que las proteínas migran se separan acorde a su peso molecular, así cada banda representa proteínas de un peso específico. Los carriles 2 y 3 corresponden a muestras exosomales obtenidas mediante kit comercial descrito anteriormente, se observan proteínas de 37 a 50 kDa en mortiño y adicionalmente proteínas de 23 kDa para capulí. A partir del carril 4 se ilustran los perfiles proteicos de muestras de sobrenadante, microvesículas y exosomas (SEC) correspondientes a capulí y mortiño. La intensidad de las bandas estima que tan abundante se encuentra la proteína en el gel, así la cantidad de colorante es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la banda. **B)** Electroferogramas, generados en *Image Lab*, derivados de los perfiles proteicos de exosomas de **a)** capulí y **b)** mortiño.

Los perfiles proteicos de exosomas, microvesículas y sobrenadante de capulí y mortiño, analizados con *Image Lab*, presentaron múltiples bandas; tres bandas son similares en todas las muestras y se ubican en un rango de 37 a 50 kDa según el marcador de peso utilizado. Específicamente en las muestras correspondientes al capulí se observan bandas adicionales de aproximadamente 23 kDa y otras bandas adicionales muy tenues (que refiere una cantidad relativamente pequeña de la proteína presente) a lo largo de su perfil (figura 17.A). Tanto para muestras de capulí y mortiño se visualiza que las proteínas se conservan desde el sobrenadante obtenido en las centrifugaciones seriadas hasta las muestras de exosomas aislados mediante SEC y kit comercial. Adicionalmente, los trazados densitométrico (figura 17.B) de los perfiles de exosomas muestran la distribución del tamaño de las proteínas y la intensidad de fluorescencia cada banda generada en cada perfil. El electroferograma arrojó valores de Rf por debajo de 0,25 y aproximadamente 0,60 para la muestra exosomal de capulí; y un Rf sobre 0,25 en el caso del mortiño.

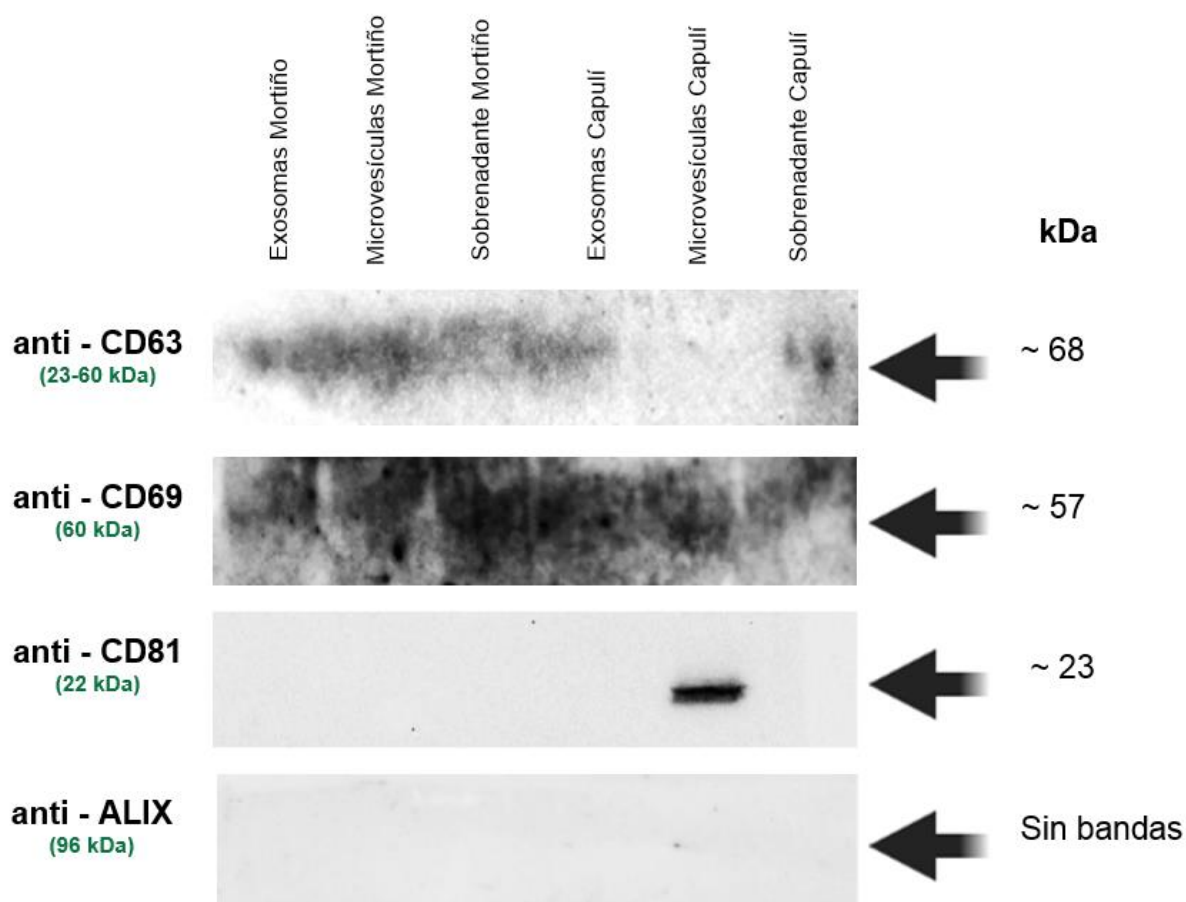
Western Blot

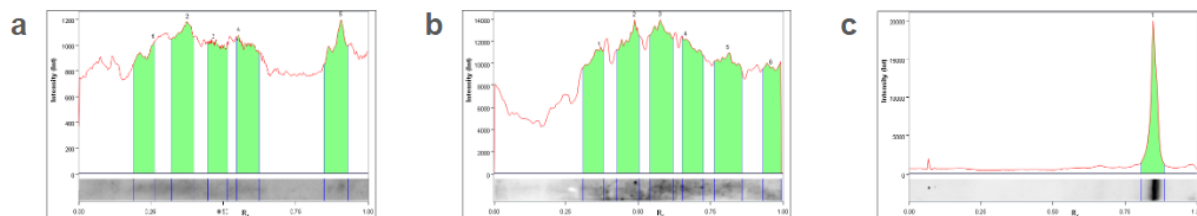
Las muestras de exosomas, microvesículas y sobrenadante de mortiño y capulí se analizaron mediante *Western Blot* (figura 18) para inmunodetección de proteínas exosomales con anti-CD63, anti-CD69, anti-CD81 y anti-ALIX (tabla 6) como anticuerpos primarios para el marcaje. La inmunodetección de CD63 ilustra bandas tenues y difusas de un peso estimado de 68 kDa en todas las muestras excepto microvesículas de capulí. En cuanto a la detección de CD69 se observan bandas de aproximadamente 57 kDa en todas las muestras. Por otro lado, en el caso de CD81 se visualizó una única banda bien definida correspondiente a microvesículas de capulí con un peso alrededor de los 23 kDa. En el caso de ALIX no se reportan bandas para ninguna muestra.

Figura 18.

Caracterización de exosomas mediante Western Blot

A)



B)

Nota: **A)** Caracterización de exosomas mediante *Western Blot* de proteínas de capulí y mortiño. **B)** Análisis densitométrico en *Image Lab* de picos de las bandas generadas del marcaje con **a)** CD63, **b)** CD69 y **c)** CD81.

Toxicidad celular

Se evaluó la citotoxicidad de exosomas sobre líneas celulares mediante el ensayo MTT, dos tumorales (HeLa y HEK) y una línea celular no tumoral como control (HFF). Tras 24 y 48 horas de exposición (figura 19.A) y dos repeticiones del ensayo se obtuvieron los datos de viabilidad para cada tratamiento. Los resultados de viabilidad celular de las tres líneas celulares expuestas a tratamientos de exosomas, microvesículas y sobrenadante a 5 ug y 20 ug (definidos posterior a investigación bibliográfica para exosomas), están representados en gráficos de barras (figura 19) y analizados con *GraphPad Prism* considerando el control de citotoxicidad (cloruro de cobalto) para los análisis estadísticos correspondientes de viabilidad celular en cada tratamiento. Adicionalmente se presentan las medias de viabilidad de cada caso como media \pm SEM en la tabla 7.

La línea celular HeLa (figura 19.B) mostró una disminución significativa de la viabilidad en función del tratamiento, concentración y tiempo de exposición. Se pudo observar una tendencia clara de disminución de células viables posterior a las 24 y 48 horas. Así, después de los cálculos correspondientes, se obtuvieron los siguientes porcentajes de viabilidad de para exosomas, microvesículas y sobrenadante de capulí y mortiño (tabla 7):

Tabla 7.*Resultados de citotoxicidad sobre HeLa*

Tratamiento	Media de % viabilidad celular \pm SEM			
	Capulí		Mortiño	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Control de viabilidad celular</i>	100 \pm 8.416	100 \pm 8.266	100 \pm 8.416	100 \pm 8.266
<i>Control de citotoxicidad</i>	9 \pm 1,472	1,5 \pm 0,866	9 \pm 1,472	1,5 \pm 0,866
Sobrenadante 5 ug	122 \pm 4.854	73 \pm 6.136	130 \pm 3,069	16 \pm 4.916
Sobrenadante 20 ug	136 \pm 5.006	64 \pm 8.956	137 \pm 6.394	77 \pm 3.726
Microvesículas 5 ug	117 \pm 1.732	74 \pm 6,600	108 \pm 5,893	63 \pm 7.284
Microvesículas 20 ug	123 \pm 3,464	79 \pm 11,116	126 \pm 3,391	70 \pm 9.856
Exosomas 5 ug	83 \pm 1,543	50 \pm 5,186	99 \pm 5,553	40 \pm 9,071
Exosomas 20 ug	110 \pm 6.640	75 \pm 1,000	93 \pm 6,129	67 \pm 5.953

Por otro lado en la línea celular HEK (figura 19.C) no muestra una tendencia clara de la viabilidad en función de la concentración, tratamiento y tiempo de exposición; posterior a los cálculos correspondientes, se obtuvieron porcentajes de viabilidad de para exosomas, microvesículas y sobrenadante (tabla 8):

Tabla 8.*Resultados de citotoxicidad de sobre HEK*

Tratamiento	Media de % viabilidad celular \pm SEM			
	Capulí		Mortiño	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Control de viabilidad celular</i>	100 \pm 5,307	100 \pm 2,972	100 \pm 5,307	100 \pm 2,972
<i>Control de citotoxicidad</i>	6 \pm 1,190	2,3 \pm 1,315	6 \pm 1,190	2,3 \pm 1,315

Sobrenadante 5 ug	94,3 ± 3,351	86 ± 10,136	96 ± 5,212	116 ± 12,261
Sobrenadante 20 ug	86 ± 4,123	98 ± 1,696	118 ± 9,578	125 ± 15,572
Microvesículas 5 ug	74 ± 1,732	66,8 ± 1,031	101 ± 7,487	100,3 ± 4,479
Microvesículas 20 ug	98,3 ± 3,562	66,8 ± 6,787	116 ± 3,841	107 ± 4,491
Exosomas 5 ug	74,3 ± 0,479	102 ± 5,186	90,3 ± 7,718	87 ± 15,634
Exosomas 20 ug	105 ± 1,472	123 ± 1,000	97 ± 85.	77 ± 6,124

Finalmente, en la línea celular HFF (figura 19.D) no se observa una disminución significativa que indique citotoxicidad celular de exosomas sobre la línea celular control; así, posterior a los cálculos correspondientes, se obtuvieron porcentajes de viabilidad para cada caso (tabla 9):

Tabla 9.

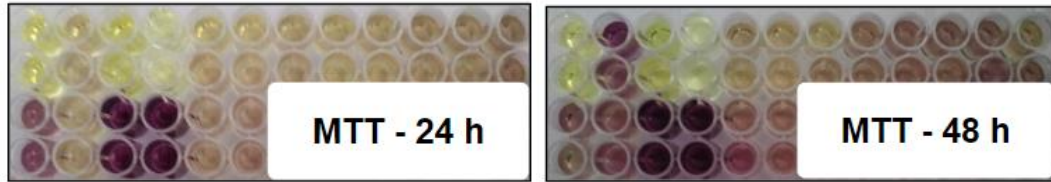
Resultados de citotoxicidad de exosomas sobre HFF

Tratamiento	Media de % viabilidad celular ± SEM			
	Capulí		Mortiño	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Control de viabilidad celular</i>	100 ± 1,732	100 ± 1,291	100 ± 1,732	100 ± 1,291
<i>Control de citotoxicidad</i>	16,5 ± 0,645	9,5 ± 1,500	16,5 ± 0,645	9,5 ± 1,500
Sobrenadante 5 ug	102 ± 4,021	102 ± 5,779	95 ± 8,230	102 ± 8,026
Sobrenadante 20 ug	94,8 ± 4,049	91,2 ± 3,119	110 ± 12,443	111 ± 8,892
Microvesículas 5 ug	99 ± 2,887	95 ± 2,887	95,8 ± 1,750	96 ± 3,065
Microvesículas 20 ug	93,5 ± 4,330	77,5 ± 2,598	95 ± 3,082	95 ± 2,614
Exosomas 5 ug	96,5 ± 4,133	102 ± 6,652	100 ± 5,234	86 ± 4,143
Exosomas 20 ug	87,8 ± 0,479	88,5 ± 1,500	90,5 ± 3,304	90 ± 0,500

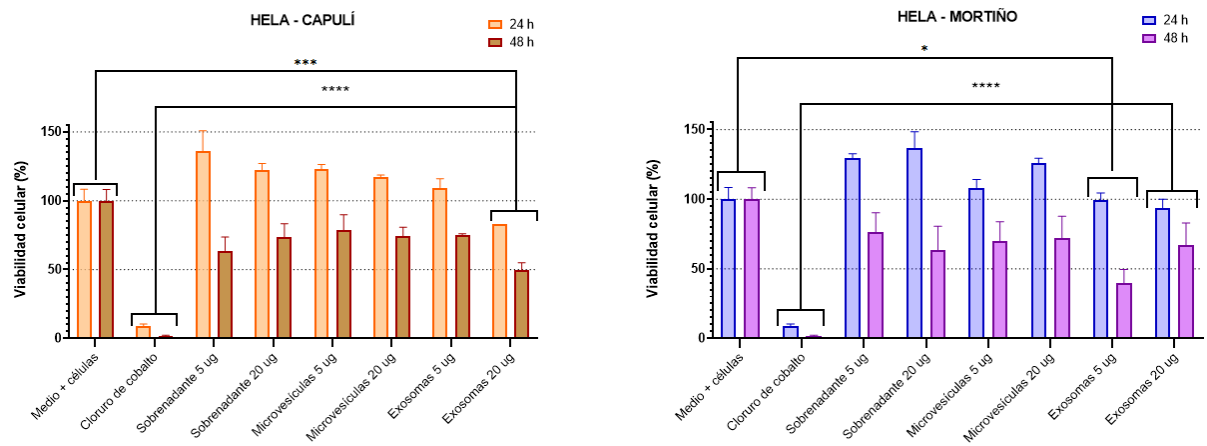
Figura 19.

Evaluación de citotoxicidad de exosomas de capulí sobre HeLa, HEK y HFF

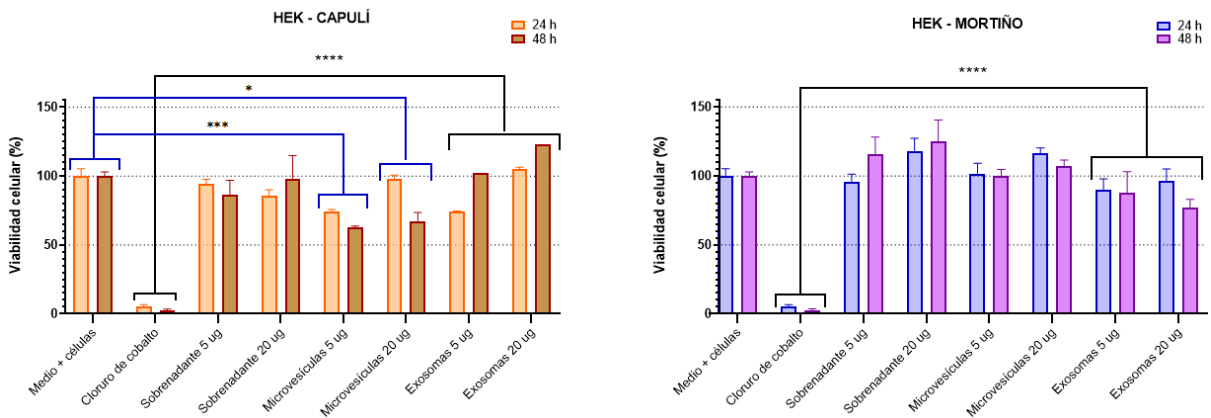
A)



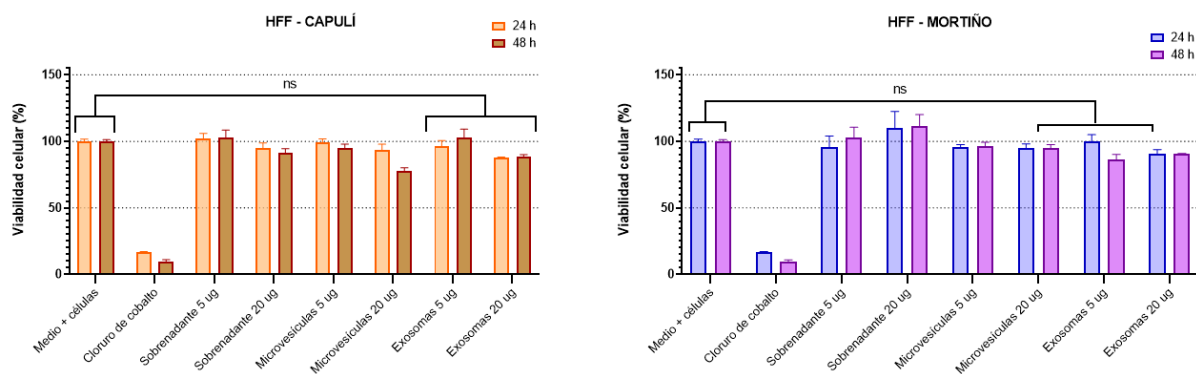
B)



C)



D)



Nota. A) Ensayo colorimétrico MTT para evaluación de la viabilidad celular. Viabilidad celular para evaluar la citotoxicidad de exosomas, microvesículas y sobrenadante derivados de capulí y mortiño sobre líneas celulares **A)** HeLa, **B)** HEK, **C)** HFF. Esquemas y estadística generados con *GraphPad Prism*. En todos los casos se realizó la comparación de los tratamientos aplicados frente al control de citotoxicidad (cloruro de cobalto) obteniendo un valor de $p < 0,0001$ (****). En el caso de HeLa – Capulí (figura 19.B) se observa una diferencia significativa frente al control de viabilidad con un $p = 0,0002$ (**); en el resto de tratamientos no existe diferencia significativa. En cuanto a HeLa – Mortino (figura 19.B) se evidencia una diferencia significativa del tratamiento de exosomas a 5ug frente al control de viabilidad con un $p = 0,0246$ (*). Al analizar HEK – Capulí (figura 19.C) no se observa una diferencia significativa del control de viabilidad frente al tratamiento de exosomas en general; sin embargo sí se evidencia una diferencia significativa frente a microvesículas a 5 ug con un valor $p < 0,0001$ (***) y 20 ug con un valor $p = 0,0199$ (*). Por otro lado en HEK – Mortino (figura 19.C) no se evidenció significancia alguna para el control de viabilidad frente a los tratamientos. Finalmente, en HFF no se observó una diferencia significativa de los tratamientos aplicados frente al control de viabilidad, es decir no se evidencia citotoxicidad de los tratamientos de capulí y mortiño en la línea celular control.

Capítulo 5. Discusión

El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los exosomas aislados de capulí y mortiño, reveló la morfología y tamaño de estas nanovesículas. La morfología y tamaño analizados mediante TEM son similares a las descripciones previamente informadas para exosomas. Yellon y colaboradores (2014), describen a los exosomas como estructuras esféricas y bicóncavas o en forma de copa (Yellon *et al.*, 2021). Por otro lado, Zhang y colaboradores (2018), han identificado subpoblaciones de exosomas acorde a su tamaño y densidad; considerando exosomas grandes aquellos cuyo tamaño oscila entre los 90 y 120 nm, y pequeños aquellos entre 30 y 80 nm. Acorde al análisis ejecutado con *ImageJ*, el diámetro de los exosomas caracterizados en esta investigación oscila entre los 30 y 50 nm aquellos aislados por SEC y de 30 a 70 nm los obtenidos mediante kit comercial, entonces es posible clasificarlos dentro de la categoría de exosomas pequeños. Es importante recalcar que el tamaño de los exosomas aislados depende asimismo del método de aislamiento empleado. El fabricante de las columnas de exclusión, empleadas en esta investigación, advierte que las vesículas recuperadas tendrán un tamaño máximo de 70 nm. Un estudio reportó que la extracción mediante la columna *qEV* de *Izon Science Company* extrajo exosomas (40 a 60 nm) con una pureza superior y una tasa de recuperación mayor que la UC combinada con la purificación por gradiente de densidad (Lobb *et al.*, 2015). Por otro lado, no se ha reportado un tamaño estándar del diámetro de exosomas obtenidos mediante *Total Exosome Isolation* pero se ha evidenciado una mayor recuperación exosomal sobre la ultracentrifugación (Tang *et al.*, 2017).

En cuanto a la cuantificación de exosomas, Lobb y colaboradores (2015), señalan que se debe considerar la concentración de proteínas y el número total de partículas aisladas y analizadas mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). No se dispone de este equipo en LABIV, por lo cual el cálculo total de exosomas obtenido es superficial. Entonces, partiendo de 600 y 400 g de fruto de capulí y mortiño respectivamente, se obtuvieron cerca de 500 g de pulpa; esta pulpa sometida a

centrifugaciones seriadas y gradientes de filtración generó un aproximado de 300 ml de sobrenadante por cada fruto. De este sobrenadante se tomó únicamente 3 mL para cada proceso de aislamiento mediante SEC (se realizaron cinco aislamientos para cada fruta) y 750 uL para aislamiento por kit. Independientemente del número de fracciones recolectadas en SEC y la muestra exosomal obtenida mediante kit comercial, se analizó un total de 30 uL de muestra (de cada fruta) mediante TEM. El análisis de las imágenes adquiridas por TEM y un conteo manual con la ayuda de *ImageJ* arrojó un aproximado de 15 exosomas en capulí y 35 exosomas en mortiño. No es posible un estimar con precisión la cantidad de exosomas aislados únicamente mediante TEM, es necesario otros métodos como NTA para ello.

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) mencionan que es imprescindible la disponibilidad de cierta información mínima como: tamaño (pequeños o grandes), densidad (alta, baja), composiciones bioquímicas, marcadores específicos de superficie y origen (Lötvall et al., 2014) para optimizar los métodos de aislamiento y purificación. Por otro lado, Lötvall y colaboradores (2014), sugieren que se deben usar al menos dos tecnologías diferentes para caracterizar exosomas, las técnicas comúnmente utilizadas para ello son TEM, NTA y WB. Independientemente de un rendimiento alto o bajo de aislamiento, se debe considerar que las nanovesículas pueden sufrir daños estructurales durante las repetidas secuencias de centrifugación, ciclos de congelamiento – descongelamiento, entre otros factores que influyen en la tasa de recuperación de exosomas. Por otro lado, Lamparski y colaboradores (2022) señalan que mediante el aislamiento con kits comerciales, como el empleado en esta investigación, se obtiene un exopellet en el cual no estarán presentes únicamente exosomas sino también agregados de proteína de alta densidad; estas contaminaciones proteicas podrían visualizarse en el perfil proteico de SDS-PAGE pero mediante WB se puede diferenciar de proteínas exosomales. En esta investigación, para complementar el análisis por TEM de los exosomas obtenidos, se ejecutó Western Blot para validar la caracterización.

La inmunodetección mediante Western Blot (WB) detecta la presencia de ciertas proteínas contenidas en el interior o en la superficie de los exosomas, no es posible la cuantificación total de exosomas mediante esta técnica. Las principales proteínas comunes en todos los exosomas unidas a la membrana y presentes en el citosol de los exosomas son tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 y proteínas del ESCRT como Alix y TSG101 (García et al., 2015; Zhang et al., 2019). Las tetraspaninas son proteínas integrales de membrana altamente conservadas, CD63 y CD81 tienen una presencia significativa en los exosomas influyendo en la biogénesis y composición de los mismos (Escola et al., 1998) esto les permite emplearse como biomarcadores de exosomas. Recientemente CD69 (37 kDa) ha reportado una expresión significativamente alta en caracterización de exosomas mediante WB (Safakheil et al; 2020) considerándolo como un biomarcador exosomal más. En esta investigación, la proteína transmembrana (CD63) se identificó en muestras de exosomas de capulí y mortiño con bandas detectadas a aproximadamente 68 kDa. Por otro lado, la inmunodetección de CD69 arrojó un resultado positivo para muestras exosomales, microvesiculares y sobrenadante de capulí y mortiño. En el caso de CD81 se visualizó una única banda en muestra microvesicular de capulí, coincide con los pesos de proteína obtenidos en el perfil proteico obtenido mediante SDS-PAGE en el cual se observó bandas a nivel de 23 kDa aproximadamente en muestras de capulí; en muestras exosomales de mortiño no se visualizaron bandas con este marcador. No se detectó la presencia de ALIX en las muestras analizadas de capulí y mortiño. Así como la carga exosomal es variable en los exosomas, análisis proteómicos han revelado que no todas las proteínas exosomales se comparten en todos los exosomas independientemente de la célula de origen (Chiang et al., 2019). Adicionalmente, Gurung y colaboradores (2021), recalcan la heterogeneidad de los exosomas en tamaño, composición, función y origen celular que hace compleja su caracterización. Por otro lado, la falta de estandarización de métodos de aislamiento y caracterización para exosomas de origen vegetal, conduce a la suposición en los perfiles de caracterización (Doyle et al., 2019), por ejemplo, con los preexistentes de exosomas de

células de mamíferos. Son escasos los estudios enfocados en caracterización de exosomas específicos de extractos de origen vegetal, la mayoría de investigaciones están enfocadas en exosomas extraídos de células de mamíferos y sus fluidos biológicos. Asimismo, la escasa disponibilidad de marcadores exosomales totalmente universales complica aún más la caracterización de exosomas (Doyle et al., 2019), especialmente aquellos obtenidos de plantas. En conjunto, estos resultados de caracterización por TEM y WB demuestran que se logró el aislamiento de exosomas de muestras capulí y mortiño.

Los ensayos de citotoxicidad evidencian un efecto significativo de los exosomas de mortiño sobre la HeLa, este efecto se ve dependiente de la concentración (5 y 20 ug) y del tiempo de exposición. Una disminución significativa de la viabilidad se observa al tratar HeLa con exosomas a 20 ug durante 48 horas. En HEK se observa una ligera disminución en la viabilidad celular, sin embargo no se evidencia una tendencia clara del efecto de los exosomas sobre esta línea celular. Los exosomas reflejan la naturaleza de la célula de origen y su estado fisiológico (Zamani *et al.*, 2019). Es indiscutible la presencia de compuestos fenólicos, en capulí y mortiño, que le confieren una capacidad antioxidante a estos frutos y por ende a los exosomas provenientes de ellos. Soleti y colaboradores (2018), mencionan que las plantas son capaces de producir exosomas que encapsulan componentes naturales de la especie de la cual provienen, por ejemplo polifenoles. Se ha descrito un mecanismo de entrada de los exosomas específicamente en fibroblastos, este modo de entrada se denomina filopodial. Los filopodios son protuberancias del citoplasma ricas en actina que permiten sondear a las células su entorno. Así los exosomas navegan sobre los filopodios facilitando la internalización específica de los fibroblastos (Heusermann *et al.*, 2016; Mattila *et al.*, 2008; Lehmann *et al.*, 2005). Gurung y colaboradores (2021), señalan que este mecanismo de captación de exosomas podría no ser única para fibroblastos. Así, los exosomas son internalizados por la célula receptora y a continuación se libera la carga contenida (Joshi *et al.*, 2020) generando un efecto sobre la célula diana. En este sentido es posible presumir que los efectos de los exosomas sobre las líneas

empleadas son consecuencia de una carga de polifenoles y/o la internalización de las células y la consecuente liberación polifenólica en estas. Se evaluó la citotoxicidad de extractos crudos de hojas de especies de género *Vaccinium* sobre el metabolismo y proliferación de queratinocitos y fibroblastos a nivel *in vitro*; así, se evidenció que los extractos muestran una capacidad significativa para eliminar los radicales libres productos del metabolismo propio de las células al ser sometidas a estrés (Ziemlewska *et al.*, 2021). Por otro lado, extracto crudo de la corteza del fruto de *Prunus serotina* indujo apoptosis y suprimió significativamente el crecimiento de células de cáncer colorrectal humano; específicamente disminuyó la expresión de ciclina D1 (proteína que permite el paso de G1 a S durante el ciclo celular) y promovió la expresión del gen proapoptótico NAG-1 en líneas celulares HCT-116 (adenocarcinoma colorrectal humano) exhibiendo un efecto citotóxico sobre HCT-116 (Yamaguchi *et al.*, 2006). En cuanto al tratamiento de HFF con exosomas, la viabilidad celular no varía, manteniéndose constante y en el mismo nivel que el control de viabilidad, evidenciando que no existe un efecto citotóxico del tratamiento con exosomas de capulí y mortiño sobre células sanas. Estudios enfocados en el efecto de extracto de capulí sobre células de cáncer de mama reportaron una disminución de la viabilidad de células tumorales sin afectar células sanas (Noratto *et al.*, 2020). Por otro lado, investigaciones de toxicidad del extracto liofilizado de mortiño en peces cebra, reportan una viabilidad del 100% de los huevecillos de este modelo animal; esto sugiere que el mortiño es no es tóxico y podría considerarse un ingrediente natural seguro para el desarrollo de alimentos nutracéuticos o fármacos (Baenas *et al.*, 2020).

Profundizar en la fisiología de los exosomas, especialmente provenientes de frutos nativos del Ecuador, es clave para el desarrollo de aplicaciones clínicas y caracterización de los exosomas provenientes de estos frutos con importante actividad antioxidante. La comprensión de la biología y fisiología de los exosomas facilitaría el desarrollo y mejora de la ingeniería terapéutica que hace uso de exosomas para su fin.

Capítulo 6. Conclusiones

Los exosomas aislados mediante cromatografía de exclusión por tamaño y kit comercial; y caracterizados por microscopía electrónica de transmisión, están acorde en morfología y diámetro a los reportados en bibliografía para exosomas. Sin embargo, la heterogeneidad de los exosomas, la variabilidad en los tipos de células de origen, falta de métodos estandarizados de aislamiento de exosomas y caracterización afectan la reproducibilidad experimental de investigaciones enfocadas a exosomas.

El perfil proteico de capulí y mortiño se mantienen desde sobrenadante hasta el aislamiento de exosomas, evidenciando que las proteínas se están conservando a lo largo del proceso de extracción de exosomas.

Los exosomas aislados de capulí y mortiño presentaron efectos citotóxicos sobre líneas tumorales como HeLa y HEK, presuntamente mediado por la carga de polifenoles propios de los frutos de origen potenciando la actividad antioxidante de capulí y mortiño. Por otro lado, no se evidencia citotoxicidad sobre células sanas no tumorales (HFF), haciendo de estos frutos seguros y prometedores para fines terapéuticos frente al estrés oxidativo específicamente.

Capítulo 7. Recomendaciones

Se requieren estudios de proteómica e investigaciones más profundas haciendo uso de técnicas como DLS, TEM de alta definición, citometría de flujo o NTA para una caracterización más específica y precisa de exosomas en especies vegetales.

Hacer uso de anticuerpos primarios y secundarios específicos para especies vegetales en el marcaje en *Western Blot* para una mayor especificidad en la caracterización de exosomas. Exosomas de origen vegetal sugieren la presencia de proteínas como anexinas, patelinas, syntaxinas, proteínas de choque térmico (HSP60, 70, 80 y 90); involucradas en estrés ambiental, estrés por patógenos, señalización metabólica, expansión de la pared celular entre otros factores propios de especies vegetales.

Ejecutar ensayos de detección de microARN (MiR), mRNA, RNA de exosomas complementarían la caracterización y diferenciación de muestras exosomales debido a la abundancia de estos en exosomas.

Bibliografía

- Agudelo, C., Arango, S., Corts, F., Rojano, B., & Maldonado, M. (2017). Antiproliferative and pro-apoptotic effects of Andean berry juice (*Vaccinium meridionale* Swartz) on human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(24), 393-402. doi:<https://doi.org/10.5897/JMPR2017.6401>
- Aguerrebere, I., Rojas, A., Oomah, B., & Drover, J. (2011). Characteristics of Prunus serotina seed oil. *Food Chemistry*, 124, 983-990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.040>
- Alarcón, K., Armijos, D., García, M., Iturralde, G., Jaramillo, T., Granda, M., Giampieri, F., & Álvarez, J. (2018). Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium meridionale* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. *Journal of Berry Research*, 8(3), 223–236. <https://doi.org/10.3233/jbr-180316>
- Alarcón, M., Lagares, O., Abello, E., Méndez, G., Conde, C, Pajaro, N., & Soto, M. (2016). Evaluation of the antioxidant activity of pulps from *Rubus glaucus* B., *Vaccinium floribundum* K. and *Beta vulgaris* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1-8.
- Álvarez, J., Carrillo, E., Aller, G., Gasparrini, M., González, L., Beltrán, P., & Battino, M. (2017). Anti-inflammatory effect of Capuli cherry against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.024>.
- Arango, S., Torres, D., Reyes, C., Zapata, M., & Maldonado, M. (2021). Aqueous extract of andean berry induces apoptosis in human colon cancer cells without mitochondrial damage. *Journal of Berry Research*, 11(3), 377–393. <https://doi.org/10.3233/jbr-200684>

- Bae, J. T., Sim, G., Kim, J., Pyo, H., Yun, J., & Lee, B. (2007). Antioxidative activity of the hydrolytic enzyme treated *Sorbus commixta* Hedl and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 in UV irradiated human dermal fibroblasts. *Archives of Pharmacal Research*, 30(9), 1116-1123.
- Baenas, N., Ruales, J., Moreno, D., Barrio, D., Stinco, C., Martínez, G., Meléndez, A., & García, A. (2020). Characterization of Andean Blueberry in Bioactive Compounds, Evaluation of Biological Properties, and In Vitro Bioaccessibility. *Foods*, 9(10), 1483. <https://doi.org/10.3390/foods9101483>
- Baldini, N., Torreggiani, E., Roncuzzi, L., Perut, F., Zini, N., & Avnet, S. (2018). Exosome-like Nanovesicles Isolated from Citrus limon L. Exert Antioxidative Effect. *Current pharmaceutical biotechnology*, 19(11), 877–885. [10.2174/1389201019666181017115755](https://doi.org/10.2174/1389201019666181017115755)
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Banerjee, J., Khanna, S., & Bhattacharya, A. (2017). MicroRNA Regulation of Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 2872156. <https://doi.org/10.1155/2017/2872156>
- Benedikter, B., Bouwman, F., Vajen, T., Heinzmann, A., Grauls, G., Mariman, E., Wouters, E., Savelkoul, P., Lopez, C., Koenen, R., Rohde, G., & Stassen, F. (2017). Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Scientific Reports* 7, 15297. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15717-7>

- Boatman E., Cartwright, F., & Kenny, G. (1976). Morphology, morphometry and electron microscopy of HeLa Cells Infected with bovine micoplasma. *Cell and Tissue Research* 16(170).
- Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J., & Ramírez, R. M. (2019). Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1626654. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654>
- Buranaamnuay, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open veterinary journal*, 11(2), 251–269. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9>
- Carrasco, J., Lema, L., Caballero, L., Acosta, A., Chávez, C., & Chávez, C. (2022), Producción y comercialización de capulí (*Prunus serotina* Subs. Capulí): un caso de estudio en las zonas rurales de los Andes Centrales del Ecuador. *Revista Científica Dominio de las Ciencias* 8 (2): 920-937. ISSN: 2477-8818.
- Chang, H. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187–214. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802823-0.00008-0>
- Chen, Y., Ma, J., Wang, F., Hu, J., Cui, A., Wei, C., Yang, Q., & Li, F. (2013). Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35(1), 43–51. <https://doi.org/10.3109/08923973.2012.738688>
- Chen, C., , Zong, S., , Wang, Z., , Lu, J., , Zhu, D., , Zhang, Y., , Zhang, R., & Cui, Y., (2018). Visualization and intracellular dynamic tracking of exosomes and exosomal miRNAs using single molecule localization microscopy. *Nanoscale*, 10(11), 5154–5162. <https://doi.org/10.1039/c7nr08800k>

- Chiang, C., & Chen, C. (2019). Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level. *Journal of biomedical science*, 26(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0502-4>
- Coba, P., Coronel D., Verdugo K., Paredes M., Yugsi E., & Huachi L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium meridionale*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*, 16(2): 5-13. ISSN: 1390-3799.
- Cobo, M., Gutiérrez, B., Torres, A., & De Lourdes Torres, M. (2016). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical systematics and ecology*, 64, 14-21.
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 3565127. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>
- De Robertis, M., Sarra, A., D'Oria, V., Mura, F., Bordi, F., Postorino, P., & Fratantonio, D. (2020). Blueberry-Derived Exosome-Like Nanoparticles Counter the Response to TNF- α -Induced Change on Gene Expression in EA.hy926 Cells. *Biomolecules*, 10(5), 742. <https://doi.org/10.3390/biom10050742>
- Deckers, B., Verheyen, K., Vanhellemont, M., Maddens, E., Muys, B., & Hermy, M. (2008). Impact of avian frugivores on dispersal and recruitment of the invasive *Prunus serotina* in an agricultural landscape. *Biological Invasions*. 10(5):717-727.
- Ding, X., Wang, Z., Xia, D., Wang, R., Pan, X., & Tong, J. (2020). Proteomic Profiling of Serum Exosomes From Patients With Metastatic Gastric Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01113>

- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Escribano, M., Santos, C., & Rivas, J. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 129-141. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.152>
- Escola, J., Kleijmeer, M., Stoorvogel, W., Griffith, J., Yoshie, O., & Geuze, H. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(32), 20121–20127. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20121>
- Espinosa, J., Marín, C., Galvis, Y., Ciro, G., Aristizábal, J., Blesso, C., Fernandez, M., & Barona, J. (2018). Evaluation of Agraz Consumption on Adipocytokines, Inflammation, and Oxidative Stress Markers in Women with Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 10(11), 1639. <https://doi.org/10.3390/nu10111639>
- Finkel, T., & Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Flores, J. 2008. Estudio de capulí e introducción en la cocina de la sierra Ecuatoriana. Tesis de Administrador Gastronómico. Universidad Tecnológica Equinoccial Escuela de Gastronomía. Quito. Ecuador, pp. 6-34
- Forbes, T., Afrin, S., Cianciosi, D., Manna, P. P., Zhang, J., Gasparri, M., & Reboredo, P. (2018). Strawberry extract attenuates oxidative stress in 3T3-L1 cells. *Journal of Berry Research*, 8(3), 193-203.
- Gallego, E., Maldonado, M., Posada, L., Gómez, A., & Torres, D. (2021). Consumption of osmo-dehydrated Andean Berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) decreases levels of

pro-inflammatory biomarkers of overweight and obese adults. *Vitae*, 28(2).

<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v28n2a343810>

Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., & Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics*, 15(2-3), 260–271.

<https://doi.org/10.1002/pmic.201400234>

García, L., Rojas, A., Ibarra, C., Rojasa, J., Vázquez, P., Luna, F., & Zavala, M. (2015). Nutritional value and volatile compounds of black cherry (*Prunus serotina*) seeds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(2), 3479–3495.

<https://doi.org/10.3390/molecules20023479>

García, N., Ontoria, I., González, H., Diez, A., & Sepúlveda, P. (2015). Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *PLoS one*, 10(9), e0138849.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138849>

García, D., Babiy, B., Lerma, M., Casado, M., Martínez, J., Lasunción, M., Pastor, Ó., & Busto, R. (2020). Curcumin stimulates exosome/microvesicle release in an in vitro model of intracellular lipid accumulation by increasing ceramide synthesis.

Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids, 1865(5), 158638.

<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158638>

González, L., Martín, M., & Álvarez, G. (2014). Exosomes: a potential key target in cardiovascular syndrome. *Frontiers in immunology*, 5, 465.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00465>

Greening, D., Gopal, K., Xu, R., Simpson, J., & Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 40, 72–

81. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.009>

- Guan, S., Yu, H., Yan, G., Gao, M., Sun, W., & Zhang, X. (2020). Characterization of Urinary Exosomes Purified with Size Exclusion Chromatography and Ultracentrifugation. *Journal of Proteome Research*, 19(6), 2217–2225.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00693>
- Gurunathan, S., Kang, M., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*, 19(47).
<https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
- Guzmán, F., Segura, S., & Almaguer, G. (2020). El capulín (*Prunus serotina* Ehrh.): árbol multipropósito con potencial forestal en México. *Madera y Bosques*, 26(1), e2611866. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2611866>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-101: e44*.
[10.21769/BioProtoc.44](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.44).
- Heusermann, W., Hean, J., Trojer, D., Steib, E., Von Bueren, S., Graff, A., Genoud, C., Martin, K., Pizzato, N., Voshol, J., Morrissey, D., Andaloussi, S., Wood, M., & Meisner, N. (2016). Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *The Journal of cell biology*, 213(2), 173–184. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506084>
- Hernández, G., Espinosa, T., Pérez, A., Salgado, I., Guerra, D. (2019). Antioxidant capacity of capulin (*Prunus serotina* subsp. capuli (Cav). McVaugh) fruit at different stages of

ripening. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 6 (16), 35-44.

10.19136/era.a6n16.1947

Howitt, J., & Hill, A. (2016). Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *The Journal of biological chemistry*, 291(52), 26589–26597.

<https://doi.org/10.1074/jbc.R116.757955>

Huyck, L., Ampe, C., & Van Troys, M. (2012). The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. *Assay and drug development technologies*, 10(4), 382–392. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.391>

Hyson D. A. (2011). A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 2(5), 408–420.

<https://doi.org/10.3945/an.111.000513>

Jakesevic, M., Aaby, K., Borge, G., Jeppsson, B., Ahrné, S., & Molin, G. (2011) Antioxidative protection of dietary bilberry, chokeberry and *Lactobacillus plantarum* HEAL19 in mice subjected to intestinal oxidative stress by ischemia-reperfusion. *BMC Complement Altern Med* 11(8). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-8>

Jeppesen, D., Fenix, A., Franklin, J., Higginbotham, J., Zhang, Q., Zimmerman, L., Liebler, D., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W., Patton, J., Rome, L., Burnette, D., & Coffey, R. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>

Jiménez, M., Castillo, I., Azuara, E., & Beristain, C. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus salicifolia* subsp capuli) extracts. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(1), 29-37.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000100004&lng=es&tlng=en.

- Joshi, B., De Beer, M., Giepmans, B., & Zuhorn, I. (2020). Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS nano*, *14*(4), 4444–4455. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10033>
- Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z., Wang, B., Zhang, L., Roth, M., Welti, R., Mobley, J., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. (2013). Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, *21*(7), 1345–1357. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.64>
- Kim, G., Kim, J., Rhie, S., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, *24*(4), 325–340. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
- Kishore, R., Garikipati, V., & Gumpert, A. (2016). Tiny Shuttles for Information Transfer: Exosomes in Cardiac Health and Disease. *Journal of cardiovascular translational research*, *9*(3), 169–175. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9682-4>
- Lamparski, H., Metha., A., Yao, J., Patel, S., Hsu, D., Ruegg, C., & Le Pecq, J. (2002). Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *Journal of immunological methods*, *270*(2), 211–226. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00330-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00330-7)
- Lässer, C., O'Neil, S., Shelke, G., Sihlbom, C., Hansson, S., Gho, Y., Lundbäck, B., & Lötvall, J. (2016). Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *Journal of translational medicine*, *14*(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0927-4>
- Lee, Y., EL Andaloussi, S., Wood, M. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics*, *21*(1), 125–134. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc317>

- Lehmann, M., Sherer, N., Marks, C., Pypaert, M., & Mothes, W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *The Journal of cell biology*, *170*(2), 317–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503059>
- Li, D., Luo, H., Ruan, H., Chen, Z., Chen, S., Wang, B., & Xie, Y. (2021). Isolation and identification of exosomes from feline plasma, urine and adipose-derived mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02960-4>
- Lilivisaca, S., León, F., Manzano, P., Ruales, J., Naranjo, J., Serrano, L., Chica, E., & Cevallos, J. (2022). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): An Underutilized Superplant from the Andes. *Horticulturae*, *8*(5), 358–374; <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050358>
- Llvisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food science & nutrition*, *6*(4), 934–942. <https://doi.org/10.1002/fsn3.638>
- Liou, G., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*, *44*(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., & Zuo, L. (2017). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2017*, 2525967. <https://doi.org/10.1155/2017/2525967>
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S., Wong, C., Wiegmans, A., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of extracellular vesicles*, *4*, 27031. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>

Lopez, M., & Court, F. (2013). Exosomes: mediators of communication in eukaryotes.

Biological research, 46(1), 5–11. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000100001>

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, 26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>

Luna, F., Ibarra, C., Rojas, A., Rojas, J., Yahia, E., Rivera, D., Rojas, A., & Zavala, M. (2013). Nutraceutical value of black cherry *Prunus serotina* Ehrh. Fruits: antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(12), 14597–14612. <https://doi.org/10.3390/molecules181214597>

Lujan, M., Ayala, C., Castillo, E., Pinedo, C., & Durand, C. (2018). Desarrollo de un gel de fruto de *Vaccinium corymbosum* L. (Ericaceae) con actividad regeneradora de tejido dérmico. *Arnaldoa*, 25(2), 529-538.

Maldonado, M., Arango, S., & Rojano, B. (2014). Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw. against colon cancer cell lines. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 172-184.
Recuperado en 16 de agosto de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S10287962014000200006&lng=es&tlng=en.

Manganaris, G., Goulas, V., Vicente, A., Terry, L. (2014). Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 825–833. <https://doi:10.1002/jsfa.6432>

- Marín, C., Piedrahita, M., Galvis, Y., Blesso, C., Fernández, M., Nuñez, V., & Barona, J. (2021). Improvements in antioxidant status after agraz consumption was associated to reductions in cardiovascular risk factors in women with metabolic syndrome. *CyTA - Journal of Food*, 19(1), 238–246. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1884606>
- Mattila, P., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(6), 446–454. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>
- Medina, I., Martínez, E., & López, C. (2019). Phenological scale for the mortiño or agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) in the high Colombian Andean area. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8897–8908. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n3.74460>
- Meléndez, M., Flor, L., Sandoval, M., Vasquez, W., & Racines, M. (2021). *Vaccinium* spp.: Características cariotípicas y filogenéticas, composición nutricional, condiciones edafoclimáticas, factores bióticos y microorganismos benéficos en la rizosfera. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109-120. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.013>
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez, C., Villarroja, C., González, S., Sánchez, F., González, M., Bernad, A., & Sánchez, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications*, 2, 282. <https://doi.org/10.1038/ncomms1285>
- Moncayo, O. (2017). Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus salicifolia*), en la región andina del Ecuador, utilizando marcadores moleculares AFLP. [Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito USFQ]. Repositorio Institucional – Universidad San Francisco de Quito USFQ].

- Muñoz, V. (2004). Determinación de métodos para producción de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), con fines de propagación y producción comercial. [Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito USFQ]. Repositorio Institucional – Universidad San Francisco de Quito USFQ].
- Noratto, G., Layosa, M., Lage, N., Atienza, L., Ivanov, I., Mertens, S., & Chew, B. (2020). Antitumor potential of dark sweet cherry sweet (*Prunus avium*) phenolics in suppressing xenograft tumor growth of MDA-MB-453 breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, (64), 108437.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108437>
- Pan, B., & Johnstone, R. (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)
- Pant, S., Hilton, H., & Burczynski, M. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical pharmacology*, 83(11), 1484–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.037>
- Panth, N., Paudel, K., & Parajuli, K. (2016). Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Advances in medicine*, 2016, 9152732.
<https://doi.org/10.1155/2016/9152732>
- Peña-, F., Chaparro, H., Orjuela, H., & Romero, G. (2020). Respuesta en poscosecha de frutos de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) a almacenamiento en dos tipos de plástico. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 23(2), e1730. Epub July 30, 2020.<https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n2.2020.1730>
- 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>

Prencipe, F., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in Vaccinium berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 89, 257-267.

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es.

Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, 6(23), 19514–19527. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4004>

Record, M., Poirot, M., & Silvente, S. (2014). Emerging concepts on the role of exosomes in lipid metabolic diseases. *Biochimie*, 96, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.016>

Rider, M., Hurwitz, S. & Meckes, D. (2016). ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports* 6, 23978. <https://doi.org/10.1038/srep23978>

Riss T., Moravec R., & Niles A. (2016). Cell Viability Assays. *National Center for Advancing Translational Sciences*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

- Rokayya, S., Li, C., Zhao, Y., Li, Y., & Sun, C. (2014). Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) phytochemicals with antioxidant and anti-inflammatory potential. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *14*(11), 6657–6662.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6657>
- Safakheil, M., & Safakheil, H. (2020). The Effect of Exosomes Derived from Bone Marrow Stem Cells in Combination with Rosuvastatin on Functional Recovery and Neuroprotection in Rats After Ischemic Stroke. *Journal of Molecular Neuroscience*.
<https://doi:10.1007/s12031-020-01483-1>
- Salem, K., Moschetta, M., Sacco, A., Imberti, L., Rossi, G., Ghobrial, I., Manier, S., & Roccaro, A. (2016). Exosomes in Tumor Angiogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 25–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3999-2_3
- Schreckinger, M., Wang, J., Yousef, G., Lila, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2010). Antioxidant capacity and in vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(16), 8966-8976.
- Segeritz, C., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 151–172.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Sidhom, K., Obi, P., & 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>
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, *7*, 122-126.

- Simpson, R., Lim, J., Moritz, R., & Mathivanan, S. (2009). Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Review of Proteomics*, 6(3), 267–283.
<https://doi.org/10.1586/epr.09.17>
- Soleti, R., Andriantsitohaina, R., & Martinez, M. C. (2018). Impact of polyphenols on extracellular vesicle levels and effects and their properties as tools for drug delivery for nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 644, 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.004>
- Strober W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, Appendix 3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Sugamura, K., & Keaney, J. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*, 51(5), 978–992.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>
- Tamayo, C., Mena, L., & Dilas, J. (2022). Usos y conocimientos tradicionales asociados al capulí (*Prunus serotina*) en una zona interandina de Ecuador. *Llamkasun*, 3(1), 56–65. <https://doi.org/10.47797/llamkasun.v3i1.83>
- Tang, Y., Huang, Y., Zheng, L., Qin, S., Xu, X., An, T., Xu, Y., Wu, Y., Hu, X., Ping, B., & Wang, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 834–844. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>
- Tauro, B., Greening, D., Mathias, R., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A., & Simpson, R. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 56(2), 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002>

- Tian, T., Zhu, Y. L., Hu, F., Wang, Y., Huang, N., & Xiao, Z. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology*, 228(7), 1487–1495. <https://doi.org/10.1002/jcp.24304>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2(8), 569-579.
- Thomas, P., & Smart, T. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Universidad Johns Hopkins. (2022). The importance of HeLa Cells. Obtenido de: <https://www.hopkinsmedicine.org/henrietalacks/importance-of-HeLa-cells.html>
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Van Deun, J., Jo, A., Li, H., Lin, H. Y., Weissleder, R., Im, H., & Lee, H. (2020). Integrated Dual-Mode Chromatography to Enrich Extracellular Vesicles from Plasma. *Advanced biosystems*, 4(12), e1900310. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900310>
- Van Niel, G., Porto, I., Simoes, S., & Raposo, G. (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of biochemistry*, 140(1), 13-21.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Phenolic compounds in Rosaceae fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1204-1212. <https://doi.org/10.1021/jf802656r>
- Wang, Q., Ren, Y., Mu, J., Egilmez, N., Zhuang, X., Deng, Z., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. (2015). Grapefruit-Derived Nanovectors Use an Activated Leukocyte Trafficking Pathway to Deliver Therapeutic Agents to Inflammatory Tumor Sites.

Cancer research, 75(12), 2520–2529. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3095>

Yamaguchi, K., Liggett, J., Kim, N., & Baek, S. (2006). Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. *Oncology reports*, 15(1), 275–281.

Yang, J. (2009). Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT-Food science and technology*, 42(10), 1573-1580. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.019>

Yellon, D., & Davidson, S. (2014). Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? *Circulation research*, 114(2), 325–332.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300636>

Zamani, P., Fereydouni, N., Butler, A., Navashenaq, J., & Sahebkar, A. (2019). The therapeutic and diagnostic role of exosomes in cardiovascular diseases. *Trends in cardiovascular medicine*, 29(6), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.10.010>

Zhang, Y., Gan, R., Li, S., Zhou, Y., Li, A., Xu, D., & Li, H. (2015). Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(12), 21138–21156.
<https://doi.org/10.3390/molecules201219753>

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

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

- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M., Molina, H., Martin, A., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C. M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., Wang, H., ... Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature cell biology*, *20*(3), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, *9*, (19). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zapata, I., Ochoa, S., Alzate, A., Zapata, A., & Rojano, B. (2019). Vinegar of andean berries (*Vaccinium meridionale* Sw.): antioxidant and antiproliferative activity in colon cancer cells SW80. *Vitae*, *26*(3), e2. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v26n3a02>
- Ziemlewska, A., Zagórska-Dziok, M. & Nizioł-Łukaszewska, Z. (2021). Assessment of cytotoxicity and antioxidant properties of berry leaves as by-products with potential application in cosmetic and pharmaceutical products. *Science Reports*, *11*(3240). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82207-2>
- Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *9*(1), 40-55.