

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

## **Uso de vesículas extracelulares procedentes de células madre mesenquimales en el tratamiento de isquemias cardíacas: una revisión bibliográfica.**

Trabajo de Fin de Grado de Biotecnología

Curso académico 2020-2021

Alumna: Clara Palacios Ferrando

Tutora externa (IIS La Fe): Pilar Sepúlveda Sanchis

Tutora académica: María Belén Picó Sirvent

En Valencia, a Junio de 2021.

# USO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PROCEDENTES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN EL TRATAMIENTO DE ISQUEMIAS CARDÍACAS: UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Autora: Dña. Clara Palacios Ferrando

Tutora externa: Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis

Tutora académica: Prof. Dña. María Belén Picó Sirvent

En Valencia, a Junio de 2021.

## Resumen:

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países occidentales y el infarto agudo de miocardio (IAM) es, en muchos casos, el origen de estas patologías. Este se produce cuando, debido a la falta de flujo sanguíneo, no se oxigena correctamente el corazón y mueren los cardiomiocitos, es decir, cuando se produce una isquemia cardiaca. En este contexto, la medicina regenerativa se sitúa como una buena opción para el tratamiento ya que su objetivo es restaurar el tejido dañado y, en este campo, destaca la aplicación de células madre mesenquimales (MSC), por sus buenos resultados en la regeneración de diversos tipos de tejidos. Estas células llevan a cabo su efecto terapéutico mediante la liberación de factores paracrinos, entre ellos las vesículas extracelulares (EVs), cuya función principal es la de participar en la comunicación intercelular. Pese a sus enormes ventajas por su capacidad de almacenamiento del contenido de sus células progenitoras, el uso de vesículas extracelulares en terapia clínica se ve limitado por su falta de caracterización, la ausencia de técnicas de aislamiento más sensibles y su gran heterogeneidad. Sin embargo, si se consiguen solventar estos problemas, las EVs derivadas de MSC tienen mucho potencial como terapia y como biomarcadores de patologías cardiacas, como se ha demostrado en multitud de ensayos *in vitro* y en modelos animales, aunque habrá que esperar para ver su puesta en marcha como terapia clínica convencional.

**Palabras clave:** vesículas extracelulares; células madre mesenquimales; medicina regenerativa; enfermedad cardiovascular; isquemia cardiaca

**Abstract:**

Cardiovascular diseases are the main cause of death in western countries and acute myocardial infarction (AMI) is, in many cases, the origin of these pathologies. AMI occurs when, because of lack of blood flow, the heart is not oxygenated properly, in other words, when cardiac ischemia occurs, and cardiomyocytes die. In this context, regenerative medicine stands as a good option for treatment since its objective is to restore damaged tissue and, in this field, the application of mesenchymal stem cells (MSC) stands out, due to its good results in the regeneration of various types of tissues. These cells carry out their therapeutic effect by releasing paracrine factors, including extracellular vesicles (EVs), whose main function is to participate in intercellular communication. Despite their enormous advantages of using EVs in cell free based therapies, the use of extracellular vesicles in clinical therapy is limited by their lack of characterization, the absence of more sensitive isolation techniques and their huge heterogeneity. However, if these problems can be solved, EVs derived from MSC have great potential as cell-free therapy and as a biomarker of cardiac pathologies, as it has been shown in many *in vitro* essays and in animal models. In this sense, we will have to wait to see their set up as conventional clinical therapy.

**Keywords:** extracellular vesicles; mesenchymal stem cells; regenerative medicine; cardiovascular disease; cardiac ischemia

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis compañeros, sin vuestro apoyo y ayuda no habría podido terminar la carrera. Lo conseguimos.

# ÍNDICES

<i>ÍNDICE DE CONTENIDO</i> .....	<i>I</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....	<i>III</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i> .....	<i>IV</i>

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS EVs.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. BIOGÉNESIS.....</b>	<b>8</b>
3.2.1. Exosomas .....	8
3.2.2. Microvesículas.....	11
3.2.3. Cuerpos apoptóticos .....	12
<b>3.3. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN .....</b>	<b>12</b>
3.3.1. Ultracentrifugación .....	13
3.3.2. Ultrafiltración.....	14
3.3.3. Inmunoafinidad .....	14
3.3.4. Precipitación .....	15
<b>3.4. CONTENIDO DE LAS EVs .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. CARACTERIZACIÓN .....</b>	<b>17</b>
3.5.1. Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).....	18
3.5.2. Análisis de dispersión de la luz dinámica (DLS) .....	19
3.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	19
3.5.4. Detección de pulso resistivo sintonizable (tRPS).....	20
3.5.5. Citometría de flujo .....	20
3.5.6. Western blot .....	21
3.5.7. Análisis proteómico .....	21
3.5.8. Análisis por secuenciación de RNA .....	22
<b>4. FUENTES CELULARES PRODUCTORAS DE EVs EN EL CORAZÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. CARDIOMIOCITOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. FIBROBLASTOS CARDIACOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3. CÉLULAS ENDOTELIALES.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. CÉLULAS PROGENITORAS CARDIACAS .....</b>	<b>25</b>
<b>5. LAS EVs EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR .....</b>	<b>26</b>
<b>6. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS EVs DERIVADAS DE MSCs .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA AUTOINMUNE Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>6.2. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA CARDIACA.....</b>	<b>31</b>
<b>6.3. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA RENAL.....</b>	<b>33</b>
<b>6.4. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA PULMONAR .....</b>	<b>34</b>
<b>6.5. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA NERVIOSA.....</b>	<b>35</b>
<b>7. ENSAYOS CLÍNICOS CON LAS EVs PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ISQUÉMICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>8. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>40</b>

**10. ANEXOS.....62**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Mecanismos de comunicación entre las EVs y la célula diana.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Diferentes tipos de morfología encontrados en EVs en diversos estudios.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3. Mecanismos moleculares de la biogénesis de exosomas.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Composición de las vesículas extracelulares: exosomas y microvesículas.....</i>	<i>17</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

***Tabla 1. Comparación entre las técnicas de aislamiento de exosomas o vesículas extracelulares pequeñas más utilizadas.....13***

***Tabla 2. Comparación entre las técnicas de caracterización de vesículas extracelulares más usadas.....18***

## ABREVIATURAS

AAA	ATPasa asociada a varias actividades celulares distintas
ADP	adenosín monofosfato
Akt	proteína quinasa B
AMI, IAM	infarto agudo de miocardio
AMPK	quinasa activada por adenosín monofosfato
APOC3	apoproteína C-III
APOD	apoproteína D
APP	proteína precursora amiloide
ARF6	factor 6 de ribosilación de ADP
ATP	adenosín trifosfato
CD	cluster designation
CDC	cardioesfera
CF	fibroblasto cardiaco
cfDNA	DNA libre en circulación
Chmp4	proteína cargada de cuerpo multivesicular 4
COL	colágeno
CPC	célula progenitora cardiaca
CXCR4	recetor de quimiocina CXC 4
DLS	análisis de dispersión de luz dinámica
ELISA	enzimoinmunoanálisis de adsorción
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
ESCRT	complejo de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte
EV	vesícula extracelular
ExoTENPO	Exosome Track-Etched Magnetic Nanopore
ExoTIC	exosome total isolation kit
FCS	suero fetal bovino
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GP1BA	glicoproteína de plaquetas Ib subunidad $\alpha$
GTP	guanosín trifosfato
HGF	factor de crecimiento hepático
HIF	factor inducible de hipoxia
HLA	antígeno leucocitario humano
Hrs	tirosina quinasa regulada por HGF
HSP	heat-shock protein
HSPG	proteoglicano heparán sulfato
ICAM-1	proteína de adhesión intercelular 1

IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL	interleucina
ILV	vesícula intraluminal
INF- $\gamma$	interferón $\gamma$
ISEV	sociedad internacional de vesículas extracelulares
lncRNA	RNA no codificante largo
MET	microscopía electrónica de transmisión
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	inhibidor de la migración de macrófagos
miRNA/miR	micro RNA
MLCK	quinasa de la cadena ligera de la miosina
mRNA	RNA mensajero
MSC	célula madre estromal/mesenquimal
MSC-EV	vesícula extracelular derivada de célula madre mesenquimal
MT1MMP	metaloproteinasas de matriz de membrana tipo 1
MV	microvesícula
MVB	cuerpo multivesicular
MVE	endosoma multivesicular
MWCO	límite de peso molecular
NGF	factor de crecimiento neuronal
NK	natural killer
nSMase	esfingomielinasa neutra
NTA	análisis de rastreo de nanopartículas
PDCD4	proteína de la muerte celular programada 4
PECAM1	molécula de adhesión endotelial de plaquetas 1
PEG	polietilenglicol
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinasa
PLD	fosfolipasa D
PPBP	proteína básica pro-plaquetaria
PrP	proteína de priones
ROCK	proteína-quinasa asociada a RHO
S1PR1	receptor esfingosina-1-fosfato 1
SIMPLE	proteína pequeña integral de membrana del endosoma tardío
SKD1	defecto de crecimiento 1 del supresor del transporte de K <sup>+</sup>
SNARE	receptor de proteínas de fijación solubles al factor sensible a la N-etilmaleimida
STAM	molécula adaptadora transmisora de señal
TCR	receptor de célula T
TDP	proteína de unión al DNA TAR

TFR	receptor de transferrina
TGF- $\beta$ 1	factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
TIM4	proteína 4 de membrana de célula T
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral
tRPS	detección de pulso resistivo sintonizable
TSG101	gen de susceptibilidad tumoral 101
VAMP3	vesícula asociada a proteínas de membrana 3
VPS4	proteína 4 asociada a la clasificación de proteínas de la vacuola
VTA1	proteína transportadora de vesículas 1

# 1. INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías siguen siendo a día de hoy la principal causa de muerte en el mundo (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2020). En España, la enfermedad isquémica del corazón es la cardiopatía más mortal, con un 31% del total de las muertes por enfermedades del corazón. Esta enfermedad es notablemente más letal en hombres que en mujeres, ya que supone un 40% de las muertes en ellos, mientras que es un 24% de las de ellas. Dentro de este conjunto de patologías, el infarto agudo de miocardio (IAM) es la enfermedad más prevalente siendo un 64% del total, 67% en hombres y 60% en mujeres (MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD, 2011).

Las isquemias cardíacas se producen principalmente por la obstrucción de las arterias, que reducen el flujo sanguíneo que llega al corazón. El metabolismo del miocardio es casi exclusivamente aerobio ya que las células del corazón, los cardiomiocitos, tienen muy pocas reservas de glucógeno (Pagliaro *et al.*, 2020). Así, si el corazón no recibe el suficiente flujo de sangre, los cardiomiocitos no obtienen el oxígeno necesario para sobrevivir, y ocurre la isquemia ya que las células mueren (Lujan *et al.*, 2012). Los cardiomiocitos tienen una baja tasa de regeneración, que suele ser insuficiente para reparar por sí mismo los daños producidos. Por esta razón, la medicina regenerativa surge como una alternativa potencial a los tratamientos actuales.

La medicina regenerativa es un campo de la medicina que se centra en la restitución de tejidos que han sido dañados, por causas naturales o externas, por lo que se está aplicando para la regeneración de estos cardiomiocitos que han muerto durante la isquemia, disminuyendo así el daño producido en el corazón. En este campo, las células madre mesenquimales (MSCs) han destacado sobre el resto de células estudiadas, por su potencial para diferenciarse a distintos tipos celulares, como pueden ser células del tejido adiposo u osteoblastos (Crapnell *et al.*, 2013). Además, se pueden aislar de muchos tejidos adultos, y crecen en adherencia fácilmente. Su efecto terapéutico viene dado, al menos en parte, por su capacidad de secreción, ya que liberan al medio extracelular factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas (Keshtkar *et al.*, 2018). Estas moléculas tienen efectos regenerativos de tejidos, inmunomoduladores y antiinflamatorios, aunque algunos de estos mecanismos aún no se conocen al completo (Griffin *et al.*, 2013).

Además de la liberación de factores paracrinos, parte del poder terapéutico de las MSCs proviene de la liberación de vesículas extracelulares (EVs). Esto se debe a que su contenido está influenciado por el tipo celular del que provienen, y refleja sus funciones,

lo que les da el potencial de ser usadas en lugar de sus células progenitoras. Se diferencian tres tipos, según su tamaño y biogénesis: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. De entre los tres, exosomas y microvesículas, las más pequeñas, son las que han demostrado efectos terapéuticos. Su menor tamaño las hace muy útiles para la administración terapéutica, y también para el diagnóstico gracias a los marcadores que contienen (Rani *et al.*, 2015).

Durante la isquemia, los cardiomiocitos y otras células cardiacas secretan dichas vesículas extracelulares, por lo que podrían ser utilizadas como biomarcadores de la enfermedad. Además, ya se ha demostrado que las EVs derivadas de MSCs tienen efectos beneficiosos sobre las células cardiacas dañadas, haciéndolas una potencial alternativa para el tratamiento de cardiopatías.

Pese a su enorme potencial, las EVs derivadas de MSCs (MSC-EVs) aún no son una realidad en la práctica clínica. Actualmente, aunque hay muchos ensayos preclínicos que demuestran su efectividad en regeneración de tejidos, solo hay un ensayo clínico en el que se utilicen para el tratamiento de una enfermedad isquémica del corazón, el infarto agudo de miocardio (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, NCT04327635).

Para llevar esta herramienta potencial a la aplicación real, todavía son necesarias una mejor caracterización de las EVs, su contenido y la estandarización de las técnicas de aislamiento, además de más ensayos clínicos que prueben su eficacia y seguridad en pacientes humanos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este Trabajo de Fin de Grado, se llevó a cabo una revisión de la literatura actual sobre vesículas extracelulares y su aplicación al tratamiento y diagnóstico de enfermedades isquémicas del corazón. Se utilizó PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) como buscador de bibliografía, por lo que las búsquedas se llevaron a cabo en inglés, siendo las únicas excepciones el uso de una página gubernamental española (el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad), y la web de la Organización Mundial de la Salud. En ningún momento se filtró por año de publicación, aunque sí por revistas, siendo estas todas del primer cuartil. Esto se corroboró mediante el uso de la Herramienta de Consulta del Factor de Impacto y Otras Métricas de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es/factor/>).

La búsqueda se llevó a cabo, primero, filtrando por revisiones anteriores para conocer el estado del arte actual en este tema concreto, y después, mediante la búsqueda individualizada de artículos de estudios experimentales u otras revisiones más especializadas en cada tema. La información recogida se dividió en los siguientes apartados (puntos 3 al 8, ambos inclusive) del Trabajo de Fin de Grado, según su temática. Toda la bibliografía está convenientemente citada en formato de la *American Psychological Association (APA) 7th Edition*.

### 3. LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

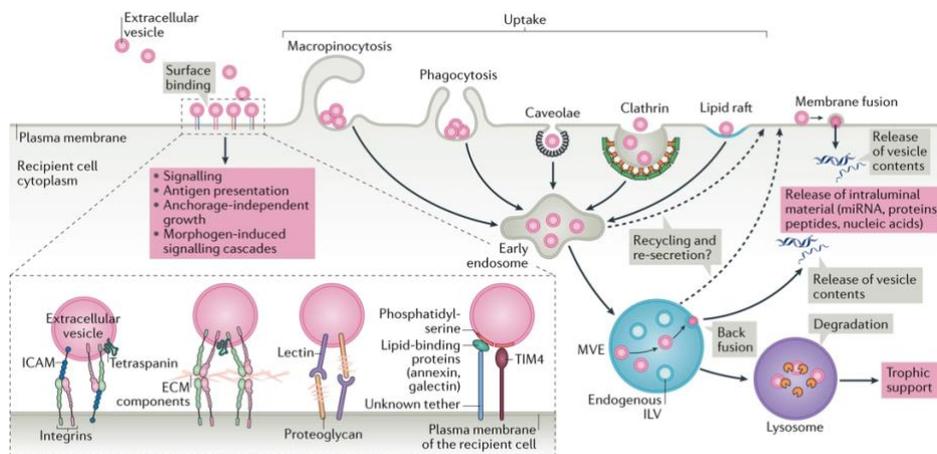
Las EVs son un grupo muy heterogéneo de vesículas con membrana de distintos orígenes, como células B y T, dendríticas, plaquetas, mastocitos células epiteliales, endoteliales, neuronales, cancerosas, oligodendrocitos, células de Schwann, embrionarias y MSCs (Raposo & Stoorvogel, 2013). A su vez, también se pueden encontrar en diversos fluidos biológicos como orina, sangre, líquido amniótico, cerebroespinal, saliva y leche materna. Su tamaño es muy variado, y puede ir desde los 10nm hasta 1µm. Tienen una envuelta similar a una membrana que encierra moléculas como proteínas, ácidos nucleicos (DNA, mRNA, miRNA, lncRNA), lípidos y metabolitos activos. Tienen marcadores de la familia de las tetraspaninas, y los más utilizados son para su identificación son CD63, CD9 y CD81.

Debido a esta gran heterogeneidad, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) dio unas normas generales en 2018 que la comunidad científica debe seguir sobre la nomenclatura, separación, caracterización y estudios de las EVs, que se va actualizando periódicamente (Théry *et al.*, 2018). Según esta normativa, se define vesícula extracelular como “partículas liberadas de forma natural por la célula delimitadas por una bicapa lipídica y que no se pueden replicar”.

En las primeras investigaciones sobre EVs (Johnstone *et al.*, 1987), se pensaba que la liberación de EVs era un mecanismo celular para la eliminación de componentes no deseados de su espacio intracelular. Sin embargo, actualmente se conocen muchas más funciones de estas vesículas, como la angiogénesis (Ma *et al.*, 2018), apoptosis (Yang *et al.*, 2013), presentación de antígenos (Lindenbergh *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2017), inflamación (Console *et al.*, 2019), proliferación (Shabbir *et al.*, 2015) y diferenciación celular (Sharma *et al.*, 2020). Pueden llevar a cabo estas funciones gracias a que participan en la comunicación intracelular, incluso cuando son liberadas a bajas concentraciones. Las EVs pueden activar directamente receptores de la superficie celular a través de proteínas y ligandos lipídicos bioactivos, y también pueden liberar efectores como factores de transcripción, oncogenes, mRNAs, RNAs regulatorios no codificantes o microRNA (miRNA). Su función depende de del fenotipo de la célula de origen y su contenido imita, en parte, al de esta.

Lo que diferencia a las EVs del resto de mecanismos de comunicación intercelulares es que, al estar envueltas por una bicapa lipídica, su contenido no es degradado por proteasas o nucleasas del espacio extracelular, y llega intacto a su diana. Esta capacidad es la que las ha puesto en el punto de mira para la creación de nuevas terapias sin el uso de células.

Una vez liberadas, las EVs pueden llegar a las células diana y promover cambios fenotípicos que afectarán a su estado fisiológico. Al igual que en otros mecanismos de comunicación intercelular, las EVs deben unirse a los receptores de membrana extracelulares de la célula diana para comenzar la cascada de señalización. También pueden ser internalizadas por la célula mediante diversos mecanismos, como macropinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por clatrina. Por último, como tienen una bicapa lipídica al igual que la membrana plasmática celular, pueden fusionar membranas y liberar su contenido directamente al espacio intracelular (Mulcahy *et al.*, 2014). En la figura 1 se puede observar un resumen de todos los mecanismos de comunicación mencionados. Algunos de ellos todavía no están completamente estudiados.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura 1. Mecanismos de comunicación entre las EVs y la célula diana.** De izquierda a derecha, se observa primero la unión a la membrana, que puede llevar a una cascada de señalización, presentación antigénica, crecimiento independiente del anclaje o cascadas de señalización inducidas por morfógeno. Esta unión puede ser producida por integrinas ancladas a la membrana junto con moléculas de adhesión intercelular (ICAM), unión a componentes de la matriz extracelular (ECM), proteoglicanos y lectinas y proteínas de unión a lípidos junto como la proteína 4 de membrana de célula T (TIM4), que reconocen fosfatidilserina de la membrana de la EV. Los siguientes mecanismos son de internalización de las EVs, y son macropinocitosis, fagocitosis, endocitosis mediada por caveolas o clatrina y balsas lipídicas, y todos ellos forman endosomas tempranos, que pueden pasar a formar un endosoma multivesicular (MVE) y liberar su contenido al citoplasma, o formar un lisosoma y degradar su contenido. Tanto endosomas tempranos como MVEs pueden reciclar el contenido y volver a secretarlo, ya que aún no hay pruebas de que esto no

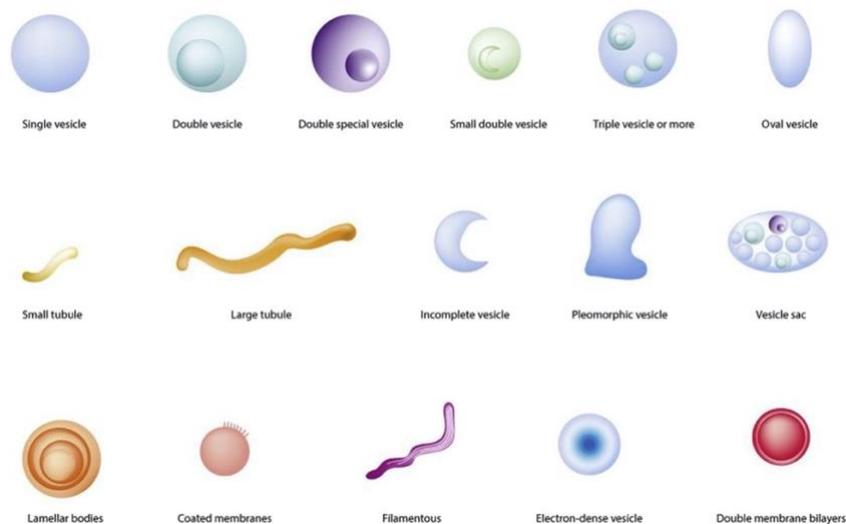
sucedan. Por último, las EVs pueden fusionar membranas y liberar su contenido directamente al citoplasma. (Van Niel et al., 2018)

La forma de entrada de las EVs depende de su origen y de la célula diana, distintas EVs pueden tener como diana la misma célula, y viceversa (Mulcahy et al., 2014). Aún son necesarios más estudios en la materia para poder dilucidar cómo y por qué ocurre cada uno de estos mecanismos.

### 3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS EVs

Las EVs se pueden clasificar según diversos criterios, como su biogénesis, tamaño morfológico, o contenido.

En cuanto a la morfología, en un principio se pensaba que todas las EVs eran esféricas o en forma de copa. Sin embargo, en 2013, se descubrió que esta forma de copa era consecuencia de la fijación usada para la tinción negativa, ya que se había usado microscopía electrónica de transmisión (MET) (Gould & Raposo, 2013), por lo que la morfología de las vesículas debía de ser mucho más amplia de lo que se pensaba hasta el momento. Hasta el momento se han encontrado dieciséis categorías distintas de EVs en cuanto a morfología, que describen tanto la forma externa (redonda, ovalada, tubular...) como el tipo de membrana (puede ser simple, doble, triple, y más), su contenido, etc., como se muestra en la figura 2.



**Figura 2. Diferentes tipos de morfología encontrados en EVs en diversos estudios.** (Arraud et al., 2014; Höög & Lötval, 2015; Poliakov et al., 2009; Zabeo et al., 2017)

Además, ahora se conoce que un tipo celular puede liberar EVs con distintas morfologías y que incluso dentro de un mismo cuerpo multivesicular pueden variar

(Zabeo *et al.*, 2017).

La clasificación más común para las vesículas extracelulares se da por su mecanismo de liberación y su tamaño, y distingue tres tipos: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.

Los exosomas son los más pequeños, y contienen familias de proteínas muy comunes, como chaperonas, proteínas del citoesqueleto, o proteínas que participan en el transporte y la fusión. Se forman como vesículas intraluminales (ILVs) durante la maduración de endosomas multivesiculares (MVEs) y se secretan cuando los estos se fusionan con la superficie celular. También pueden fusionarse con lisosomas si el contenido está destinado a la degradación (Abels & Breakefield, 2016). Los exosomas contienen proteínas funcionales de endosomas, la membrana plasmática y el citosol, además de mRNA y miRNA. También pueden contener componentes del núcleo, mitocondrias, retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Su contenido proteico depende del tipo celular del que sean secretados.

Las siguientes en tamaño son las microvesículas (MVs), que se forman a partir de la gemación de la membrana plasmática y contienen proteínas citoplasmáticas específicas de la célula de origen, como proteína de unión a GTP, metaloproteinasas de matriz, glicoproteínas, integrinas, etc. Tienen funciones en la coagulación sanguínea y también en la comunicación intercelular en algunos tipos celulares como en células cancerosas (Van Niel *et al.*, 2018).

Exosomas y microvesículas contienen gran número de moléculas de las que se desconoce la función actualmente. Son estos dos tipos de vesículas en los que se han centrado las investigaciones actuales para su uso terapéutico.

Los cuerpos apoptóticos son los de mayor tamaño (1-5  $\mu\text{m}$ ) y son funcionalmente distintos a los dos anteriores, ya que se forman como resultado de la muerte celular programada, y contienen DNA, histonas y restos celulares. Su formación esta altamente controlada para prevenir la pérdida de componentes tóxicos, enzimas activos o componentes inmunogénicos. Son una potente vía de señalización para el microambiente que rodea a células muertas (Doyle & Wang, 2019).

A pesar de que la clasificación por tamaño y biogénesis es la más ampliamente utilizada por los científicos, la ISEV (Théry *et al.*, 2018) considera que, al no haber consenso sobre los biomarcadores específicos de cada tipo de EVs, no se deben usar los términos “exosomas”, “microvesículas” o “cuerpos apoptóticos”, a no ser que se observe la vesícula durante su biogénesis mediante técnicas de imagen. En lugar de esos términos, se prefieren otros relacionados con: sus características físicas, como “EVs

pequeñas”, “EVs medianas”, “EVs de alta densidad” o “EVs de poca densidad”; su composición bioquímica, como “EVs CD63+” o “EVs con anexina A5”; o que describan su condición o su origen celular, como “EVs de podocitos” o “EVs derivados de hipoxia”. Sin embargo, la mayor parte de bibliografía sigue usando los términos no aceptados, y en este Trabajo Final de Grado se usarán estos términos si así lo hacen los autores de los artículos.

## **3.2. BIOGÉNESIS**

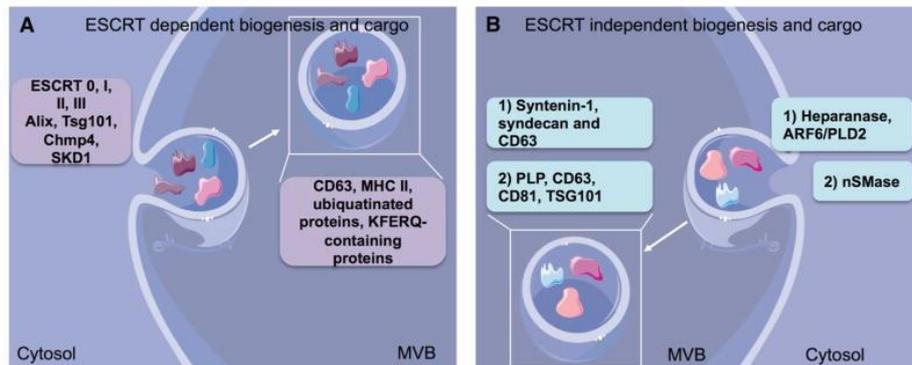
### **3.2.1. Exosomas**

Pese a que el primer estudio que demostraba la existencia de las EVs fue publicado por Chargaff y West (1946), no fue hasta 1987 que Rose Johnstone acuñó el término exosoma a las EVs (Johnstone *et al.*, 1987). Sin embargo, esta no solo se refería a lo que actualmente conocemos como exosoma, sino también a otros fragmentos de membrana conocidos como complejos de exosomas que se aislaron de fluidos biológicos y que servían como unidades de eliminación de residuos que mediaban un nuevo mecanismo de comunicación intercelular.

La biogénesis de los exosomas consiste en tres pasos o estadios: el primero, la formación de endosomas por invaginación de la membrana plasmática; el segundo, la formación de vesículas intraluminales (ILVs), a partir de la gemación de la membrana endosomal, formando así cuerpos multivesiculares (MVBs); el tercero y último, la fusión de los MVBs con la membrana plasmática y liberación del contenido vesicular, es decir, las ILVs, que al ser liberadas pasan a ser exosomas (Gurunathan *et al.*, 2019). Este proceso está altamente regulado. Los exosomas sirven como mensajeros, ya que comunican células mediante un proceso de corte y fusión con la ayuda de complejos de receptores de proteínas de fijación solubles al factor sensible a la N-etilmaleimida (SNAREs) y complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte (ESCRT). El complejo ESCRT consiste en cuatro complejos de proteínas distintos: ESCRT-0, -I, -II y -III (Henne *et al.*, 2013).

El segundo paso, la formación de las ILVs, requiere dos procesos distintos. El primero, la reorganización de la membrana endosomal, que pasa a ser rica en tetraspaninas, principalmente CD9 y CD63. El segundo, el ensamblaje de los ESCRTs con las proteínas Alix, el gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101), la proteína cargada de cuerpo multivesicular 4 (Chmp4) y el defecto del crecimiento 1 de la proteína transportadora de K<sup>+</sup> (SKD1) (Abels & Breakefield, 2016).

Por otro lado, también se ha demostrado que la biogénesis de MVBs también se puede llevar a cabo sin los ESCRTs, dado que las ILVs se pueden formar en ausencia de estos complejos (Stuffers *et al.*, 2009). En esta ruta participan el factor 6 de ribosilación de ADP (ARF6), fosfolipasa D2 y sintenina. En la figura 3 se puede ver un resumen de los mecanismos explicados.



**Figura 3. Mecanismos moleculares de la biogénesis de exosomas.** A) Biogénesis dependiente de ESCRT, en la que participan este complejo junto con Alix, TSG101, Chmp4 y SKD1. Estos exosomas contienen, a su vez, CD63, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II, proteínas ubiquitinadas y proteínas que contienen la secuencia KFERQ. B) Biogénesis independiente de ESCRT. Esta puede estar controlada por distintas proteínas, por lo que los exosomas tendrán distinto contenido. Si está controlada por heparanasa y ARF6, contendrán sintenina 1, sindecano y CD63, mientras que si está controlada por nSMase, contendrán CD63, CD81 y TSG101. (Abels & Breakefield, 2016)

El agotamiento de las proteínas tirosina quinasa regulada por HGF (Hrs) y TSG101 (pertenecientes al ESCRT-0) y molécula adaptadora transmisora de señal (STAM) (del ESCRT-I), disminuye la secreción de los exosomas. Por otro lado, la inhibición de las proteínas Chmp4C, proteína 4B asociada a la clasificación de proteínas vacuolares (VPS4B), proteína transportadora de vesículas 1 (VTA1) y Alix (del ESCRT-III), aumentan su secreción (Henne *et al.*, 2013). Se ha observado un incremento en la secreción de exosomas tras la transfección con la proteína pequeña integral de membrana del endosoma tardío (SIMPLE), mientras que una forma mutada de la proteína interfiere con la formación de exosomas (Zhu *et al.*, 2013).

Los lípidos también juegan un papel importante en la biogénesis de exosomas, como es el caso de la ceramida, ya que la inhibición del enzima que la sintetiza a partir de esfingomielina (la esfingomielinasa 2) reduce la liberación de exosomas al espacio extracelular (Trajkovic *et al.*, 2008).

Otro modelo de biogénesis de exosomas, también demostrado al igual que el anterior aunque menos tenido en cuenta, es por gemación de la membrana plasmática sin formación de endosomas (Pegtel & Gould, 2019). Este modelo ocurre en un ratio similar al anterior, como se ha demostrado mediante microscopía de fuerza atómica (Casado *et al.*, 2017). Mediante la misma técnica se ha estudiado la presencia de intermediarios de gemación de exosomas en leucocitos humanos, que aparecen en dominios discretos de su membrana (Booth *et al.*, 2006). También se ha observado esta forma de biogénesis en glioblastomas y en organismos como *Caenorhabditis elegans* (Wehman *et al.*, 2011).

Las diversas formas de biogénesis de los exosomas influyen en el contenido estos. Un ejemplo es que las proteínas asociadas a los distintos complejos ESCRT, es decir, Alix y TSG101, se encuentran en los exosomas, independientemente de su origen celular. Estas proteínas se usan como marcadores de la biogénesis exosomal (Colombo *et al.*, 2013).

La liberación de exosomas, por otro lado, ocurre por fusión del MVB con la membrana celular. Para que esto suceda, el exosoma debe ser transportado a la membrana plasmática, gracias a la interacción con el citoesqueleto de actina y microtúbulos (Sinha *et al.*, 2016). Otras proteínas que también participan en este proceso son las GTPasas Rab, como Rab11 (Savina *et al.*, 2002), Rab35 (Hsu *et al.*, 2010) y Rab27 (Ostrowski *et al.*, 2010). El mecanismo de fusión de los MVBs con la membrana aún no se ha dilucidado del todo, pero sí se sabe que en él participan la proteína de shock térmico 90 (HSP90) (Lauwers *et al.*, 2018) y que está regulado negativamente por mTORC1 (Zou *et al.*, 2019).

En cuanto a factores que influyen en los niveles de secreción de exosomas, los principales son el tipo celular, la confluencia del cultivo y la presencia o ausencia de estimulantes y suero. Por ejemplo, las MSCs los liberan en grandes cantidades (Yeo *et al.*, 2013), mientras que las células dendríticas inmaduras lo hacen de forma mucho más limitada (Tian *et al.*, 2014). Por otro lado, la confluencia de los cultivos celulares también es un factor importante, dado que cultivos en confluencia producen más exosomas que aquellos que no han llegado a la confluencia, hecho que podría estar relacionado con el metabolismo del colesterol (Gal *et al.*, 1981). Sin embargo, la inhibición por contacto que se produce cuando se llega a la confluencia puede reducir la producción de exosomas, a causa de su entrada en quiescencia y consecuente bloqueo de la división celular. El nivel óptimo de confluencia varía entre investigaciones y no existe un proceso estandarizado de medición, por lo que no se puede afirmar cuál es el óptimo (Gudbergsson *et al.*, 2016). Existen algunos estimulantes de la secreción de EVs, como

ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Savina *et al.*, 2003), hipoxia (Kucharzewska *et al.*, 2013; Svensson *et al.*, 2011) o desprendimiento celular (Koumangoye *et al.*, 2011). Por último, la presencia o ausencia de sueros influye directamente en la formación de una monocapa celular y, en consecuencia, la formación correcta de estructuras celulares que participan en la biogénesis de exosomas. El suero fetal bovino (FCS) influye en la diferenciación celular de los cultivos (Lund *et al.*, 2009). La ausencia de suero provoca estrés sobre el cultivo, resultando en alteraciones fenotípicas que se reflejan en el contenido de los exosomas. No obstante, la ausencia de suero incrementa la formación de exosomas (Li *et al.*, 2015), por lo que muchos investigadores optan por reducir el contenido de EVs del FCS (contiene altas cantidades) o directamente usar un medio sin suero. Ambos métodos conllevan problemas, por ejemplo el primero reduce la proliferación celular y depende mucho del cuánto se reduzca el contenido de EVs del medio (Shelke *et al.*, 2014), y el segundo provoca estrés. Por estas razones aún no está claro cuál es la mejor alternativa, lo que sí se sabe con certeza es que cambios abruptos de los medios tienen impacto sobre el fenotipo celular, por lo que se debe ser cuidadoso al realizarlo.

### **3.2.2. Microvesículas**

La biogénesis de microvesículas está mucho menos estudiada que la de exosomas. Por regla general, se piensa que se forman por la gemación hacia el exterior de la membrana plasmática, y que es el resultado de la interacción entre una redistribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática y la contracción de las proteínas del citoesqueleto (Akers *et al.*, 2013). La distribución de fosfolípidos y las proteínas de membrana es asimétrica, y está regulada por las translocasas de aminofosfolípidos (las flipasas los transfieren del exterior al interior, mientras que las flopasas lo hacen al revés). La gemación de la membrana comienza cuando se trasloca fosfatidilserina al exterior celular (Akers *et al.*, 2013). El proceso se completa cuando el citoesqueleto se contrae por las interacciones entre actina y miosina. Posteriormente, el factor 6 de ADP-ribosilación (ARF6) inicia una cascada que activa la fosfolipasa D (PLD). Se recluta a la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) a la membrana plasmática, que fosforila a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), activándola. La MLCK activada es la responsable de liberar las MVs. Estas MVs contienen ARF6, MHC-I, integrina  $\beta 1$ , vesícula asociada a proteínas de membrana 3 (VAMP3), y metaloproteinasas de matriz de membrana tipo 1 (MT1MMP) (Abels & Breakefield, 2016). Aún no se conocen bien los mecanismos que conducen a la liberación de las MVs, aunque sí se sabe que hay diversos factores externos que pueden inducir su liberación. Por ejemplo, el calcio activa la calpaína cistein proteasa, que induce la redistribución de los fosfolípidos de forma que aumenta la liberación de MVs (Taylor *et al.*, 2020), y las

condiciones de hipoxia aumentan la producción de MVs gracias al gen dependiente de HIF Rab22A (Guo *et al.*, 2019). Además, se ha encontrado que algunos de los mecanismos de liberación de las MVs son similares a los de los retrovirus (Caobi *et al.*, 2020).

### **3.2.3. Cuerpos apoptóticos**

Los cuerpos apoptóticos únicamente se forman durante el proceso de muerte celular programada conocido como apoptosis. Durante el desarrollo normal de un individuo, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos, que reconocen cambios en la membrana, como la exposición de fosfatidilserina a la cara exterior de la membrana, al igual que ocurre en microvesículas. Esta molécula se une a la anexina V, que es reconocida por los macrófagos (Xu *et al.*, 2019). Otro cambio reconocido por macrófagos es la oxidación de moléculas de superficie, que crea un sitio de unión para la trombospondina (Friedl *et al.*, 2002) y la proteína del complemento C3b (Gavin *et al.*, 2019).

Debido a su gran tamaño y a que los cuerpos apoptóticos solo se forman durante la apoptosis y sus funciones siempre están relacionadas con ella, no se emplean para aproximaciones terapéuticas (Doyle & Wang, 2019). Por tanto, habrá que tener en cuenta cuando se hable de terapias con EVs que solo se refiere a microvesículas y exosomas.

## **3.3. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN**

El tipo de vesículas extracelulares con mayor dificultad de aislamiento son los exosomas. Para su ello, nos encontramos ante diversos problemas: el primero, su tamaño; el segundo, la complejidad de componentes de los fluidos de los que se aíslan; el tercero, el solapamiento de las propiedades físicoquímicas y bioquímicas entre ellos y otras EVs; y el último, la heterogeneidad entre exosomas. Por todas estas razones, además del uso de técnicas de ultracentrifugación que actualmente ha demostrado su utilidad, se están estudiando nuevas técnicas de purificación. En la tabla 1 se recoge una comparación de las técnicas explicadas a continuación.

**Tabla 1. Comparación entre las técnicas de aislamiento de exosomas o vesículas extracelulares pequeñas más utilizadas.**

Técnica	Método de separación	Ventajas	Desventajas
<b>Ultracentrifugación diferencial</b>	Separación por tamaño y densidad	Rápido, barato, no requiere equipamiento especializado, poco pretratamiento, no requiere expertos	Su velocidad produce daños en las EVs, mucha cantidad de partida, imposibilidad de tratamiento de varias muestras en paralelo, tasas de recuperación bajas y poca pureza
<b>Ultracentrifugación por gradiente de densidad</b>	Separación por tamaño y densidad en un gradiente preconstruído	Buena separación de las EVs de otros componentes (alta pureza)	Equipamiento caro, necesita expertos en la técnica, lentitud
<b>Ultrafiltración</b>	Separación por tamaño y peso mediante membranas filtrantes	Más rápida que las anteriores, no requiere instrumentación especializada, alta pureza	Taponamiento u obstrucción de la membrana, su velocidad produce daños en las EVs
<b>Inmunoafinidad</b>	Interacción específica entre proteínas y anticuerpos	Alta pureza, rápida, sencilla, no requiere instrumentación especializada	Alto precio de los reactivos, solo separa EVs entre ellos, no de las células
<b>Precipitación</b>	Captura y precipitación por tamaño	Sencilla, rápida, no requiere altas velocidades, no necesita instrumentación especializada	Mucha probabilidad de contaminaciones por otros componentes

### 3.3.1. Ultracentrifugación

La ultracentrifugación diferencial fue el primer método usado para el aislamiento de exosomas y, a día de hoy, es el método más comúnmente usado para la purificación de exosomas de fluidos biológicos, como sangre, orina, saliva y fluido cerebroespinal, y también de cultivos celulares. Se basa en la separación por tamaño y densidad de las partículas, ya que aquellas que sean más grandes y densas sedimentarán antes que el resto. Su principal ventaja es que es más rápido y barato que otros métodos (como la centrifugación por gradiente de densidad), no requiere de un experto para ser empleada y necesita poco pretratamiento de las muestras para su utilización. Sin embargo, su alta velocidad produce daños mecánicos sobre la muestra y por eso requiere de mucha cantidad de partida (cientos de mililitros), lo que también imposibilita el poder tratar varias muestras distintas a la vez (Helwa *et al.*, 2017). Además, debido a la heterogeneidad de los exosomas, se obtienen bajas tasas de pureza (Zhang *et al.*, 2018). En el anexo I se recoge un protocolo de ultracentrifugación diferencial de exosomas (Coughlan *et al.*, 2020).

Por otro lado, la centrifugación por gradiente de densidad es otro método de ultracentrifugación que se basa, al igual que el anterior, en la separación por tamaño y densidad de las partículas pero, a diferencia de la ultracentrifugación diferencial, se da en presencia de un gradiente de densidad ya construido en el tubo de centrifuga, normalmente hecho de sacarosa o iodixanol. La muestra se sitúa sobre el gradiente y se centrifuga, y las partículas pasan por el gradiente. Esta técnica es muy útil separando EVs de agregados de proteínas y otras partículas (Onódi *et al.*, 2018). Sin embargo, requiere equipos caros de centrifugación y técnicos altamente cualificados. En el anexo I se ha descrito un protocolo de aislamiento de exosomas por centrifugación por gradiente de densidad con iodixanol (Greening *et al.*, 2015).

Existen dos tipos de centrifugación por gradiente de densidad: centrifugación zonal y centrifugación isopícnica. La primera separa por la tasa de sedimentación, ya que la muestra se sitúa sobre el gradiente, que va de más denso en la parte inferior, a menos denso en la parte superior, y las partículas se separan en distintas zonas según la densidad. Cuanto más densa y grande sea la partícula, más rápido viajará al final del tubo, por lo que es importante controlar la duración de la centrifugación, ya que si se deja mucho tiempo todas las partículas podrían sedimentar. Por otro lado, en la centrifugación isopícnica, las partículas sedimentan hasta que su densidad iguala la del medio circulante, conocido como punto isopícnico, y se mantienen en esa posición sin importar el tiempo de centrifugación, al contrario que con la centrifugación zonal. Estos métodos pueden mejorar la pureza de la separación, pero requieren tiempo adicional (Doyle & Wang, 2019).

### **3.3.2. Ultrafiltración**

La ultrafiltración es el segundo método más común de aislamiento de EVs. Este se basa en una separación por tamaño y peso (MWCO) de las partículas, mediante el uso de membranas filtrantes. Es decir, si las partículas son más grandes que el tamaño de poro de la membrana, serán retenidas, y las más pequeñas pasarán. El principal problema de esta técnica es el taponamiento u obstrucción de la membrana, aunque esto se puede solucionar usando varias membranas de distintos tamaños, disminuyendo el tamaño de los filtros paulatinamente, lo que disminuye la eficiencia de la filtración ya que se podrían perder exosomas en esos bloqueos. Por otro lado, es más rápida y no requiere instrumentación especializada, aunque puede llevar a la rotura de exosomas por fuerza mecánica, al igual que en ultracentrifugación (Doyle & Wang, 2019).

Existe un kit de ultracentrifugación conocido como ExoTIC Kit (THERMOFISHER, s.f.), diseñado específicamente para simplificar el aislamiento de exosomas entre 30-200 nm de tamaño (Liu *et al.*, 2017). En el anexo I se incluye un protocolo de ultrafiltración con ExoTIC Kit (Liu *et al.*, 2017).

### **3.3.3. Inmunoafinidad**

Este método se basa en la interacción específica entre proteínas y anticuerpos. Algunas de estas proteínas que caracterizan los exosomas y que se pueden usar para capturarlos son CD63, CD81, CD82, CD9, Alix o anexina, presentes en la cara externa de la membrana lipídica. De esta forma, permite aislar exosomas específicos según sus marcadores de superficie. Es una técnica rápida, sencilla y compatible con la instrumentación normal de un laboratorio (Tauro *et al.*, 2012). Los anticuerpos se pueden unir a partículas magnéticas (Li *et al.*, 2017), a una placa ELISA (Hosseini *et al.*,

2018), o a sistemas de microfluídica (Li *et al.*, 2017), aunque el método más común es el primero. En este método, las partículas magnéticas unidas a anticuerpos se suelen separar por citometría de flujo, de forma que, pese a que las EVs son demasiado pequeñas para ser detectadas, las partículas sí tienen el tamaño suficiente y pueden ser separadas (Lässer *et al.*, 2012). Los métodos que usan partículas magnéticas tienen mayor eficiencia en la captura, mejor sensibilidad que los otros métodos y no tienen limitación de volumen (Li *et al.*, 2017).

Con el fin de poder analizar volúmenes más pequeños con una mejor tasa de recuperación, se han creado aparatos con chips de microfluídica, como el ExoTENPO (Exosome Track-Etched Magnetic Nanopore) Chip. Este aísla exosomas usando nanoporos magnéticos unidos a anticuerpos específicos, y aplicando un campo magnético externo justo debajo del aparato. Los poros son tan pequeños que solo caben partículas del tamaño de los exosomas, y se unen en dos pasos, de forma que no se dan uniones inespecíficas (Ko *et al.*, 2017). Un protocolo del uso de este chip se incluye en el anexo I.

#### **3.3.4. Precipitación**

Los métodos de precipitación consisten en capturar y aislar exosomas de un determinado tamaño. Son técnicas fáciles de utilizar, simples, que requieren bajas velocidades y no necesitan instrumentación especializada. Utilizan polímeros hidrofóbicos, inocuos e inertes, es decir, que no produzcan respuesta inmunogénica ni *ex vivo* ni *in vivo*. Tienen una gran desventaja, y es que no distinguen entre exosomas y otros componentes, por lo que en el aislamiento se pueden contaminar (Gurunathan *et al.*, 2019). Se deben utilizar pretratamientos, como ultracentrifugación o ultrafiltración para evitar dichas contaminaciones. Un ejemplo de polímero utilizado con este fin es el polietilenglicol (PEG), que ya se usa de manera normal para la precipitación de virus y otras partículas. Rider y colaboradores (2016) diseñaron un protocolo de purificación de exosomas conocido como ExtraPEG, adaptando protocolos de purificación de virus. Consiguieron aislar exosomas de grandes volúmenes de medio rápidamente y de forma barata, de buena calidad y cantidad. Este protocolo está incluido en el anexo I.

Hay muchos kits comerciales, como ExoQuick, que separan exosomas rápidamente, pero cuentan con la desventaja de que los precipitados tienen muchas contaminaciones (Tang *et al.*, 2017).

### 3.4. CONTENIDO DE LAS EVs

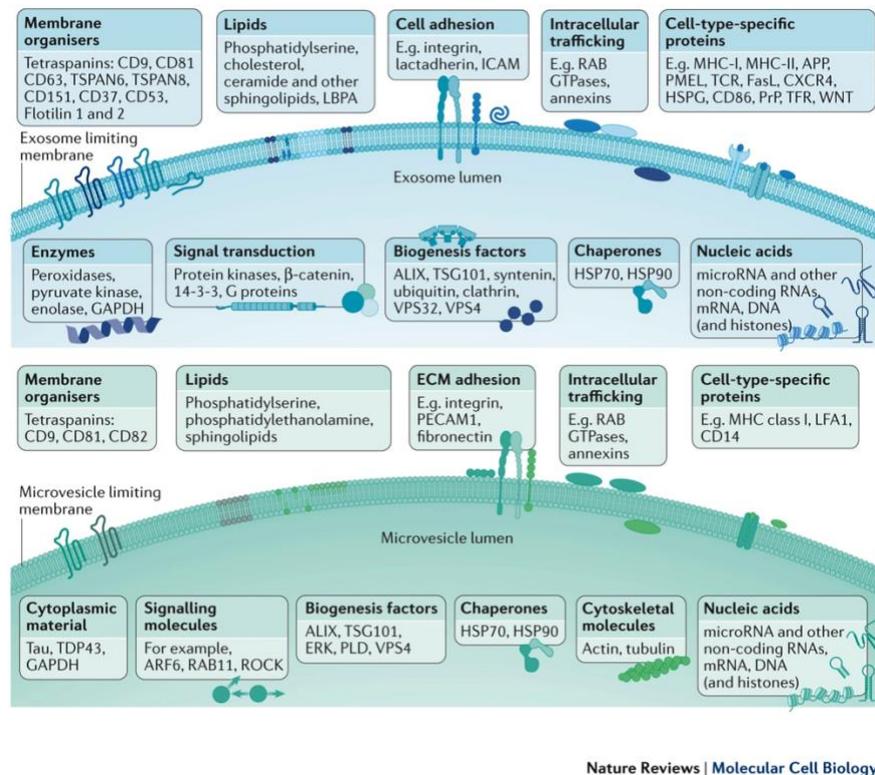
El contenido de las distintas EVs está directamente relacionado con el mecanismo de biogénesis, tipo celular y las condiciones fisiológicas de la célula progenitora. Además, las distintas técnicas de aislamiento y obtención pueden dar lugar a resultados distintos al estudiar el contenido. Todos estos factores provocan que el contenido de las vesículas sea altamente heterogéneo. Por esta razón, se han creado bases de datos que incluyen el contenido en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de distintas clases de EVs. También se muestra las técnicas de purificación y aislamiento usadas. Estas bases de datos son Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/>), ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) y EVpedia (<http://evpedia.info/>).

Los exosomas y las microvesículas comparten algunas moléculas en su cara exterior: ambas tienen tetraspaninas CD9 y CD81, lípidos (fosfatidilserina y esfingolípidos), integrinas para la adhesión celular, moléculas para el tráfico intracelular Rab, GTPasas, anexinas y, según el tipo celular del que procedan, ambas pueden tener MHC I (Van Niel *et al.*, 2018). También comparten contenido citoplasmático, como Alix, TSG101, VPS4, chaperonas HSP70 y 90, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), ácidos nucleicos (como miRNA y otros RNAs no codificantes, mRNA y DNA) e histonas (Van Niel *et al.*, 2018).

Sin embargo, también hay muchas otras moléculas que permiten diferenciarlas. En la cara exterior de la membrana, los exosomas son ricos en las tetraspaninas CD37, CD53 y CD63, lípidos como colesterol y ceramida, y moléculas de adhesión celular como lactadherinas o ICAM. También pueden contener MHC II, proteína precursora amiloide (APP), receptor de célula T (TCR), ligando Fas (FasL), receptor de quimiocina CXCR4 (CXCR4), proteoglicano heparán sulfato (HSPG), CD86, proteína de priones (PrP), receptor de transferrina (TFR), WNT, etc., pero la presencia de estas moléculas dependerá de la célula progenitora de la que se originen. En su interior contienen enzimas (peroxidasa, piruvato quinasa y enolasa), proteínas transductoras de señales (proteína-quinasa,  $\beta$ .cateninas, 14-3-3 $\sigma$  y proteínas G), factores de biogénesis (sintetina, ubiquitina, clatrina, y vacuolar protein sorting 32 o VPS32) (Van Niel *et al.*, 2018).

Por otro lado, el contenido de las microvesículas es ligeramente distinto. Estas tienen, en su cara exterior: tetraspanina CD82, fosfatidiletanolamina, molécula de adhesión endotelial de plaquetas 1 (PECAM1), fibronectina y, según su célula progenitora, CD14. En su interior, contienen Tau, proteína de unión al DNA TAR (TDP43), ARF6, proteína-quinasa asociada a RHO (ROCK), quinasa regulada por señales extracelulares (ERK),

PLD, tubulina y actina (Van Niel *et al.*, 2018). En la figura 4 se puede observar un esquema de los distintos componentes tanto del exterior como del interior de las EVs mencionadas.



**Figura 4. Composición de las vesículas extracelulares: exosomas y microvesículas.** El esquema muestra, en la parte superior, los componentes de los exosomas y, en la parte inferior, los componentes de las vesículas extracelulares. (Van Niel *et al.*, 2018)

El contenido de los cuerpos apoptóticos es completamente distinto al de microvesículas y exosomas, ya que contienen orgánulos enteros, cromatina y proteínas glicosiladas.

### 3.5. CARACTERIZACIÓN

Actualmente se pueden clasificar las técnicas de caracterización de las EVs en dos tipos: análisis físicos, y análisis químicos, bioquímicos y de composición. Los análisis físicos dan información sobre el tamaño de las EVs y su concentración, y son el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA), análisis de dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de transmisión (MET) y detección de pulso resistivo sintonizable (tRPS). Los análisis químicos, bioquímicos y de composición dan información sobre el contenido de las EVs, y encontramos el Western Blot, el análisis proteómico y el de secuenciación de RNA (Doyle & Wang, 2019). La citometría de flujo se considera de

ambos tipos. El principal reto que se encuentra sobre la caracterización de EVs es que son muy heterogéneas, y su composición cambia según la técnica de aislamiento y de caracterización usadas, así como por los factores mencionados en el punto 1. Así, hay una falta de estandarización importante a la hora de caracterizar EVs, que es uno de los mayores retos para su utilización en clínica. En la tabla 2 se recoge una comparación entre las técnicas mencionadas.

**Tabla 2. Comparación entre las técnicas de caracterización de vesículas extracelulares más usadas.**

Técnica de análisis	Tipo de análisis	Caracterización	Ventajas	Desventajas
Análisis de rastreo de nanopartículas	Físico de tamaño (10 - 100 nm) y densidad	A partir de la dispersión de la luz	Preparación de muestras sencilla y rápida, permite recuperar las EVs	Requiere la preparación de diluciones de las que pueden surgir contaminaciones, necesita grandes volúmenes (unos 0,5 ml)
Análisis de dispersión de la luz dinámica	Físico de tamaño (1nm - 6 µm)	A partir de las fluctuaciones de la intensidad de la luz	Requiere poca muestra (70 µl), detecta gran rango de tamaños	Si la diversidad de tamaños de la muestra es muy grande, no detecta las partículas más pequeñas
Microscopía electrónica de transmisión	Físico de tamaño (hasta 1 nm) y morfología	A partir de la dispersión de electrones	Muy buena resolución	Los tratamientos previos son costosos y modifican la morfología original de la muestra
Detección de pulso resistivo sintonizable	Físico de tamaño (100 nm - 100 µm)	Alteración de la corriente base al atravesar una membrana	Caracterización individualizada de las partículas	Se requiere una calibración previa y las partículas grandes pueden obstruir el poro
Citometría de flujo	Físico de tamaño y de composición	A partir de la dispersión de la luz en distintos ángulos sobre la muestra	Caracterización individualizada de las partículas, permite recuperar las EVs	Su rango de tamaño no detecta EVs y en ocasiones solo las detecta en conjunto, por lo que hay que combinarlo con otras técnicas
Western blot	Composición	Detección de biomarcadores proteicos por anticuerpos	Técnica ampliamente usada en laboratorios	Destruye la muestra
Análisis proteómico (espectrometría de masas)	Composición	Relación masa/carga	Muy específica, sensible y rápida	Destruye la muestra y necesita personal especializado
Análisis por secuenciación de RNA	Composición	Secuenciación de RNA	Específica y sensible	Costoso y destruye la muestra

### 3.5.1. Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

Esta técnica es la más utilizada para la caracterización de EVs. En ella, se iluminan con una luz láser las EVs, que siguen un movimiento Browniano debido a que están en el seno de un líquido. Cuando la luz choca con las EVs, se dispersa en la cámara, y una cámara situada sobre un microscopio captura en vídeo del movimiento de las partículas. El software sigue el movimiento de las EVs y, mediante la ecuación Stokes-Einstein, estima el tamaño y la densidad a partir de dicho movimiento. El NTA es capaz de determinar tamaños de entre 10 y 1000 nm de diámetro, por lo que es capaz de detectar todos los tipos de EVs (Dragovic *et al.*, 2011). También es capaz de analizar muestras marcadas con anticuerpos fluorescentes con mayor resolución (Carnell-Morris *et al.*, 2017).

Entre sus ventajas, se encuentra que la preparación de las muestras es muy sencilla y rápida, y se obtienen medidas en pocos minutos. Además, no modifica las partículas y

permite recuperarlas. Sin embargo, requiere de la preparación de diluciones para poder llegar al factor de dilución correcto, de las que muchas veces surgen contaminaciones, y necesita volúmenes de unos 0,5ml (Doyle & Wang, 2019; Gurunathan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). Es muy importante que la preparación de la muestra y que el factor de dilución sea el correcto para la optimización de la técnica.

### **3.5.2. Análisis de dispersión de la luz dinámica (DLS)**

El análisis de dispersión de la luz dinámica o espectroscopía de correlación de fotones, es una técnica alternativa a la anterior para la medición del tamaño de EVs. Se basa en la aplicación de un haz de luz monocromática sobre una solución de partículas que siguen un movimiento Browniano. Esta luz sufrirá fluctuaciones en la intensidad de la dispersión debido al movimiento de las partículas, y estas fluctuaciones pueden ser medidas (Stetefeld *et al.*, 2016). Es decir, esta técnica de análisis es muy similar a la anterior, pero se diferencia en que en este caso se miden las fluctuaciones, y en el anterior se medía directamente la dispersión de la luz.

Esta técnica requiere mucha menos cantidad de muestra que la anterior, unos 70  $\mu$ l, y permite medir el tamaño de las EVs en un mayor rango, entre 1 nm y 6  $\mu$ m de diámetro. Por otro lado, tiene problemas al analizar muestras heterogéneas, y si la solución tiene partículas con tamaños muy diversos no detecta los más pequeños (Zhang *et al.*, 2018).

### **3.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Este tipo de microscopía ya se utiliza comúnmente en los laboratorios para caracterizar la estructura, morfología y tamaño de muchos componentes biológicos. Se basa en utilizar un haz de electrones que colisionan con una muestra, y se dispersan. Después, son recogidos por unas lentes especiales y se procesan para formar una imagen de la muestra (Gurunathan *et al.*, 2019).

Esta tecnología permite visualizar y caracterizar EVs individualmente con una resolución de cerca de 1 nm, lo que con microscopía convencional sería imposible. Su principal problema es que la preparación de las muestras es costosa, ya que para poder utilizar MET la muestra debe ser muy fina, estar deshidratada y sufrir fijación química o un marcaje (Cizmar & Yuana, 2017). Estos tratamientos pueden cambiar la morfología original de la muestra y darles forma de copa, tal y como ya se ha comentado (ver punto 3.1. de este trabajo), por lo que MET se suele utilizar par confirmar lo visto mediante NTA o DLS y visualizar la calidad de las preparaciones (Zhang *et al.*, 2018). Estas desventajas se pueden solventar utilizando microscopía electrónica de crio-transmisión (crio-MET), que no requiere de esta preparación previa sino que las muestras se mantienen en nitrógeno líquido, por lo que se mantiene la forma original de las EVs

(Cizmar & Yuana, 2017). La crio-MET es considerada la mejor técnica para visualizar nanopartículas sin necesidad de deshidratación (Gurunathan *et al.*, 2019).

MET solo da información sobre la morfología y el tamaño de las partículas, por lo que se le puede añadir un marcaje inmunogold para recoger información sobre las propiedades bioquímicas y de composición de las EVs (Jung & Mun, 2018).

#### **3.5.4. Detección de pulso resistivo sintonizable (tRPS)**

La detección de pulso resistivo sintonizable es una técnica de caracterización de EVs en la que un fluido situado en una celda se divide en dos partes por una membrana porosa no conductora: una mitad contiene la solución de partículas, y la otra una solución solo de electrolitos. Al aplicar un voltaje, las partículas se mueven y atraviesan la membrana, alterando la corriente base. Esta alteración se observa desde que la partícula se acerca a la membrana, cuando comienza a disminuir y, cuando la atraviesa, la alteración es máxima, creando un pico de disminución de la línea base. Cuando ya ha atravesado la membrana, se recupera la corriente base (Maas *et al.*, 2017). Esta técnica permite la caracterización de las EVs de forma individualizada (Maas *et al.*, 2017).

Para poder relacionar el pico de corriente con el tamaño, primero se debe calibrar con un material del que se conozca la concentración y volumen, como una solución de partículas de poliestireno, y después se relaciona con la muestra. Es capaz de medir partículas en un rango de 100 nm a 100  $\mu\text{m}$  (Maas *et al.*, 2017).

Uno de los grandes problemas de esta técnica es que, si las partículas son más grandes que el poro, pueden obstruirlo. Además, el tampón utilizado para la solución de calibración debe ser el mismo que el de la muestra, y esto no siempre es posible debido a que la solución de EVs suele provenir de una muestra biológica de la que se desconocen los componentes (Maas *et al.*, 2017). Para solucionar este problema, se ha ideado una alternativa para las muestras biológicas, que consiste en añadir las partículas del calibrado directamente con la muestra, y medirlos a la vez, de forma que ya no existe el problema del tampón utilizado (Maas *et al.*, 2017).

#### **3.5.5. Citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica ampliamente usada en los laboratorios, que permite el análisis individualizado de células en una disolución (Nolan & Duggan, 2018). Esta utiliza la dispersión de la luz visible en dos direcciones para caracterizar las células: en un ángulo de 90° se observa la presencia de gránulos en la célula y la integridad, y en un ángulo de 180° se observa el tamaño. Además, utiliza luz fluorescente para conocer

la composición exterior de la membrana, ya que la muestra se trata para que exprese proteínas fluorescentes como la GFP, se marca con marcajes fluorescentes o con anticuerpos conjugados a un marcaje fluorescente (McKinnon, 2018).

El reto al utilizar citometría de flujo para caracterizar EVs, es que esta técnica detecta rangos de tamaño superiores a los de estas vesículas (300 – 500 nm), es decir, que no puede medirlas directamente. Además, cuando la solución de EVs está muy concentrada, puede identificar varias como una sola (Szatanek *et al.*, 2017). Con el fin de solucionar estos problemas, se han ideado diversas estrategias. Una de ellas es añadir un anticuerpo específico de un marcador de membrana de las EVs que se quieran caracterizar conjugado con un fluorocromo, por lo que podrían ser identificadas por dicho marcador (Orozco & Lewis, 2010). Otra opción para las EVs más pequeñas es inmovilizarlas en la superficie de partículas y después añadir un anticuerpo conjugado como en el caso anterior, de forma que pueden ser detectadas (Szatanek *et al.*, 2017). Por último, también se ha diseñado una nueva técnica de citometría de flujo conocida como citometría de flujo de imagen, que combina la citometría de flujo convencional con un análisis mediante ImagestreamX, con muy buenos resultados en la caracterización de micropartículas de pequeño tamaño (Erdbrügger *et al.*, 2014).

### **3.5.6. Western blot**

El Western blot es una de las técnicas más utilizadas diariamente en cualquier tipo de laboratorio, por lo que también es muy empleada para la caracterización de EVs. Esta técnica se lleva a cabo realizando una electroforesis en un gel, seguida de una transferencia a una membrana. Después se añade un anticuerpo primario que detecta la proteína de interés, y finalmente un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo. Las EVs, antes de llevar a cabo la electroforesis, deben ser lisadas y sus proteínas desnaturalizadas (Kowal *et al.*, 2017).

Esta técnica detecta proteínas específicas que se espera encontrar en la muestra, que deben servir para identificar las EVs. Sin embargo, tiene reproducibilidad y especificidad limitadas a las del anticuerpo usado y solo se puede llevar a cabo una vez con cada muestra (Doyle & Wang, 2019).

### **3.5.7. Análisis proteómico**

En un análisis proteómico se busca dilucidar tantas proteínas como sea posible. Estos suelen realizarse utilizando espectrometría de masas, una técnica que está basada en la utilización de los efectos de los campos eléctricos y magnéticos sobre los iones que los atraviesan. Estudia la materia mediante la formación de iones en fase gaseosa y

determina su relación masa/carga (m/z). Permite obtener información cuantitativa y cualitativa de la muestra, por lo que es muy útil para detectar la composición de las EVs.

La espectrometría de masas es una técnica es ampliamente utilizada para análisis proteómicos de todo tipo, y es la que más se utiliza al llevar a cabo estudios de la composición de las EVs. Por ejemplo, se ha utilizado para estudiar en las EVs posibles marcadores de cáncer (Wu *et al.*, 2019) y de trastornos neurológicos (Wang *et al.*, 2019), y también su papel en el mecanismo patogénico de *Mycobacterium tuberculosis* (Lee *et al.*, 2015) y de hongos (Bleackley *et al.*, 2019).

Tiene muchas ventajas, como que tiene una gran capacidad de identificación y puede analizar mezclas complejas, su elevada sensibilidad y especificidad y su rapidez. Por otro lado, es una técnica destructiva que necesita operarios especializados.

### **3.5.8. Análisis por secuenciación de RNA**

Como ya se ha mencionado anteriormente, las EVs contienen RNA procedente de sus células progenitoras, por lo que también se pueden caracterizar por su contenido en ácidos nucleicos. Hay múltiples plataformas de secuenciación de RNA que utilizan secuenciación de RNA pequeño, total o exosomal como Illumina, SOLiD o Ion Torrent, que ya han sido empleadas para dilucidar el contenido de las EVs (Bellingham *et al.*, 2012; L. Cheng *et al.*, 2014; Conley *et al.*, 2017; Jenjaroenpun *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2014). Gracias a estos y más estudios, se ha podido crear una base de datos de miRNA de vesículas extracelulares, conocida como EVmiRNA (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/EVmiRNA#!/>), en la que se recogen perfiles de expresión, funciones y vías en las que participan distintos miRNAs de EVs (Liu *et al.*, 2019). También se indica el método de aislamiento seguido.

El análisis por secuenciación de RNA de EVs cuenta con la ventaja de que es muy específico y sensible, pero, sin embargo, requiere la destrucción de la muestra para la extracción del RNA y requiere de aparatos caros.

## **4. FUENTES CELULARES PRODUCTORAS DE EVs EN EL CORAZÓN**

Las EVs son liberadas por la mayor parte de las diferentes células del corazón, como cardiomiocitos, fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células progenitoras cardiacas. Esto sugiere que hay una gran cantidad de comunicación intercelular entre las distintas células, y conocer la funcionalidad exacta de dichas EVs puede ayudar en el diagnóstico y en la creación de tratamientos para defectos en este órgano.

### **4.1. CARDIOMIOCITOS**

Los cardiomiocitos son las células mononucleadas que forman el músculo cardiaco, y tienen la capacidad de contraerse espontáneamente, por lo que son las células responsables de la contracción del músculo cardiaco.

El primer estudio demostró que los cardiomiocitos secretan EVs fue publicado por Gupta y Knowlton (2007). Demostraron que secretan exosomas tanto en condiciones fisiológicas como en hipoxia, y que en el segundo caso liberan más HSP60. También vieron que las EVs producidas tras la hipoxia producían más tropomiosina  $\alpha$ , GAPDH, miomesina, proteína C de unión a la miosina, proteína que contiene valosina, mientras que HSP27 y 90 únicamente estaban en aquellas producida tras la hipoxia. En otro estudio realizado por Yu *et al.* (2012) se demostró que los cardiomiocitos que han sufrido hipoxia contienen TNF- $\alpha$  debido al factor inducible por hipoxia (HIF) 1 $\alpha$ , por lo que promueven la apoptosis de otros cardiomiocitos cercanos.

Los EVs derivados de cardiomiocitos, además de proteínas, pueden contener miRNA, como el miRNA-30a, que promueve la autofagia (Yang *et al.*, 2016), miRNA-214a, que es anti-apoptótico (Eguchi *et al.*, 2019), o miRNA-210, que promueve la angiogénesis (Fan *et al.*, 2018).

### **4.2. FIBROBLASTOS CARDIACOS**

Los fibroblastos cardiacos (CFs) son los principales responsables de la síntesis de la matriz extracelular debido a su actividad secretora, pero también de los cambios en la misma. Los factores secretados por los CFs protegen a los cardiomiocitos de la hipoxia (Nakazato *et al.*, 2010), isquemia (Abrial *et al.*, 2014), hipertrofia (Bang *et al.*, 2014), y pueden afectar a las propiedades electrofisiológicas de los cardiomiocitos durante estos

procesos (Pedrotty *et al.*, 2009). En general, los CFs parecen usar los exosomas para la comunicación con los cardiomiocitos (Bellin *et al.*, 2019).

En un estudio publicado por Cosme y colaboradores (2017), se estudió el perfil proteómico de los CFs cultivados en hipoxia, en comparación con condiciones normales de oxígeno. En ausencia de oxígeno, los CFs se diferencian a un fenotipo de fibroblasto (Watson *et al.*, 2014) y, asociado a este cambio, se incrementa la secreción de matriz extracelular. Se encontró un incremento en la síntesis de muchos tipos de colágeno (COL1A1, COL3A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2, COL12A1, COL15A1), perlecán y fibronectina. También se descubrió una sobrerrepresentación de proteínas asociadas a la mitocondria, como aconitasa 2, ATP sintasa, transportadores de H<sup>+</sup>, o NADH deshidrogenasa, lo que sugiere que la hipoxia induce un malfuncionamiento de la mitocondria. Los exosomas pueden jugar un papel importante en la eliminación de estas mitocondrias disfuncionales en condiciones de estrés.

Los exosomas derivados de CFs también contienen miRNA. Por ejemplo, pueden contener rno-miR-21 (Bang *et al.*, 2014), rno-miRNA-27a, rno-miRNA-28a y rno-miRNA34a (Zhang *et al.*, 2017), todos ellos relacionados con la hipertrofia del músculo cardíaco.

### **4.3. CÉLULAS ENDOTELIALES**

Las células endoteliales vasculares forman la barrera entre la sangre y otros tejidos, y tienen una importante función en el mantenimiento de la homeostasis, especialmente tras señales de estrés como puede ser la hipoxia. Esta respuesta se da mediante la liberación de factores de crecimiento, citoquinas y exosomas.

En un estudio llevado a cabo por de Jong *et al.* (2012), se demostró que células endoteliales expuestas a TNF- $\alpha$  mostraban cambios típicos en la activación de estas células, como la liberación de exosomas con altos niveles de proteína de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Además, se dieron cuenta de que la composición de mRNA de estas EVs también se veía afectada. En otro ensayo (Balkom *et al.*, 2013), se demostró que las células endoteliales secretan exosomas con miR-214 para estimular la angiogénesis. Estos descubrimientos demuestran el potencial de los exosomas derivados de células endoteliales como marcadores de estrés y daño (Sluijter *et al.*, 2018).

#### 4.4. CÉLULAS PROGENITORAS CARDIACAS

Las células progenitoras cardíacas (CPCs) son un grupo heterogéneo de células en el corazón con capacidad de diferenciarse a miocitos u otras células vasculares tras un daño. Si se cultivan en suspensión, tienden a formar agregados esféricos, denominados cardioesferas (CDCs) (Barile *et al.*, 2007). Tanto los agregados como las células individuales son capaces de liberar exosomas. Al estudiar el contenido de dichos exosomas, se observó que contiene mayores cantidades de hsa-miR-210, hsa-miR-132, hsa-miR-146a-3p, y hsa-miR-181 que las EVs derivadas de CFs, siendo el primero responsable del efecto antiapoptótico de dichos exosomas (ya que disminuye la actividad de la efrina A3 y la proteína tirosina fosfatasa 1), y el segundo con sus efectos angiogénicos (porque disminuye la actividad de RasGap-p120) (Barile *et al.*, 2014).

Se ha estudiado cómo estas CPCs son capaces de proteger a los cardiomiocitos de la apoptosis, y se ha encontrado que mmu-miR-21 disminuye la expresión de la proteína de la muerte celular programada 4 (PDCD4), y que este factor participa en el eje miR-21/PDCD4, que media la apoptosis de los cardiomiocitos por estrés oxidativo (Xiao *et al.*, 2016). Además, presentan en su superficie la proteína del plasma asociada al embarazo A (PAPP-A), que promueve la liberación del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) (Barile *et al.*, 2018). En un estudio publicado por Nie *et al.* (2018), se demostró que los exosomas liberados por CPCs contienen muchos miRNAs que estimulan la supervivencia celular, proliferación y angiogénesis como hsa-miR-3615, hsa-miR-6087, hsa-miR-1244, y hsa-miR-3687, y que contienen tanto proteínas como sus respectivos mRNAs.

Los CDCs también tienen efecto cardioprotector, ya que contienen grandes cantidades de hsa-miR-146, que se une a Irak1 y Traff6, dos mediadores de la vía del receptor tipo Toll-NK- $\kappa$ B (Ibrahim *et al.*, 2014).

## 5. LAS EVs EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Dado que las EVs son liberadas a los fluidos extracelulares, como la sangre, la linfa o la orina, éstas son una herramienta potencial de diagnóstico de enfermedades cardiovasculares. De hecho, se ha observado que los niveles de EVs se incrementan en pacientes con riesgo o que ya padecen este tipo de enfermedades (Walenta *et al.*, 2012). Durante su biogénesis, las EVs almacenan marcadores de superficie y moléculas citosólicas de las células progenitoras. De entre estas moléculas, los ácidos nucleicos, sobre todo miRNAs, destacan como buenos marcadores de diagnóstico y pronóstico. La caracterización de EVs y células circulando por fluidos biológicos con este fin se conoce como biopsia líquida (Zhou *et al.*, 2020). Esta presenta diversas ventajas, siendo la principal que la toma de muestra no es invasiva, por lo que reduce la cantidad de cirugías necesarias, sin embargo, aún es necesario seguir avanzando en el desarrollo de esta técnica para incrementar su precisión.

Las EVs presentan a su vez ventajas respecto a otras partículas que se pueden detectar mediante biopsia líquida. La primera, que circulan por gran parte de los fluidos biológicos, además, la bicapa lipídica que las forma les da una alta estabilidad ante la degradación, por lo que su contenido se mantiene intacto y pueden ser almacenadas y transportadas *ex vivo*, además de que su contenido en ácidos nucleicos no se ve alterado como sí ocurre al estudiar el DNA libre en circulación (cfDNA) (Möhrmann *et al.*, 2018). La mayor parte de los ácidos nucleicos de fluidos biológicos se encuentra, en realidad, en exosomas (Fernando *et al.*, 2017). Por otro lado, dan mucha información sobre las células progenitoras, ya que contienen moléculas procedentes de ellas. Por último, expresan marcadores de superficie específicos, tanto de EVs como de células progenitoras, por lo que su identificación es sencilla (Cai *et al.*, 2015; R. Xu *et al.*, 2016).

En cuanto a los miRNAs de EVs, se dice que son los biomarcadores ideales para diagnóstico clínico ya que son protegidos de la degradación por RNasas, por lo que son mucho más estables. Hay diversos miRNAs que han sido identificados como buenos biomarcadores, para diversas patologías cardíacas. Un ejemplo es que se ha descubierto que, tras un infarto agudo de miocardio, los niveles de miR-1a, 208a y 499-5p se incrementan  $10^4$  -  $10^5$  veces (Cheng *et al.*, 2019). En el mismo estudio también se observó que miR-133a aumentaba significativamente, pero en este caso predominantemente fuera de las EVs. Todos estos miRNAs suprimen la expresión de CXCR4 en células mononucleares de médula ósea y, por tanto, median la movilización de células progenitoras de médula ósea a la circulación para la reparación isquémica

(Jujo *et al.*, 2013). En aquellos pacientes que sufren y sobreviven un infarto agudo de miocardio, hay una alta incidencia de fallo cardiaco por isquemia posterior (Ezekowitz *et al.*, 2009), por lo que la identificación de biomarcadores para este tipo de fallos podría ayudar a reducirla. Actualmente, se usan como biomarcadores el péptido natriurético tipo B (BNP) y el propéptido natriurético tipo B N-terminal (NT-proBNP) (Bettencourt, 2004), pero tienen una baja especificidad ya que se ven influidos por otros factores como la edad o fallos renales, por lo que se ha continuado la investigación para encontrar otros mejores marcadores. En un estudio llevado a cabo por Matsumoto *et al.* (2013), identificaron miR-192, 194 y 34a, tres miRNAs localizados en exosomas y sintetizados por la vía p53, como moléculas cuyos niveles incrementaban tras el fallo cardiaco por isquemia en pacientes que previamente habían sufrido un infarto agudo de miocardio. También se han buscado biomarcadores de insuficiencia cardiaca sistólica crónica en un estudio realizado por Goren y colaboradores (2012). Se encontró que los niveles de miR-423-5p, 320a, 22 y 92b, incrementaban significativamente entre pacientes y control, con una especificidad del 90% y una sensibilidad del 87%.

Por otro lado, también se han encontrado un biomarcador de miRNA exosomal para las miocardiopatías periparto: miR-146a (Halkein *et al.*, 2013). En ese ensayo se demuestra que, además de sus funciones ya conocidas sobre la inmunidad innata (Taganov *et al.*, 2006), esta molécula también participa en la angiogénesis reduciendo la proliferación y viabilidad de células endoteliales.

Algunas proteínas han sido estudiadas como biomarcadores del daño cardiaco. Como ya se ha mencionado antes, BNP y NT-proBNP son los más usados actualmente, pero hay algunas proteínas exosomales que son prometedoras como biomarcadores de diagnóstico. En un estudio llevado a cabo por Cheow *et al.* (2016), encontraron seis nuevas proteínas exosomales con potencial para el diagnóstico, de tres rutas distintas que se activan tras daño miocárdico. La primera ruta son las proteínas del complemento C1Q1A y C5. La segunda vía es el metabolismo de lípidos, habiendo identificado la apoproteína D (APOD) y C-III (APOC3). La última, proteínas de la activación de plaquetas, la glicoproteína de plaquetas Ib subunidad  $\alpha$  (GP1BA) y la proteína básica pro-plaquetaria (PPBP).

En otro estudio realizado por de Jong *et al.* (2012), se demostró que los cardiomiocitos, en condiciones de hipoxia, liberan TNF- $\alpha$  mediante VEs debido a la expresión de la subunidad  $1\alpha$  del factor inducible de hipoxia (HIF- $1\alpha$ ). El TNF- $\alpha$ , a su vez, actúa sobre células endoteliales, haciendo que activen moléculas de protección de superóxidos (como la superóxido dismutasa 2), la respuesta inmune (el ligando de citoquinas 2, IL-8 y 32), y la vía NF- $\kappa$ B (NF-kappa B, NF-kappa BIA y TN1P1). También se vio que las EVs

son capaces de modificar la matriz extracelular gracias a proteínas como LOLX2, fibronectina y colágeno. Por último, se identificaron genes relacionados con la respuesta al estrés (como NDRG1 o CIRBP) y con la apoptosis (como Bcl2). En conjunto, estas proteínas distinguen a las células en hipoxia de las células control.

## 6. POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS EVs DERIVADAS DE MSCs

Las MSCs son células adultas multipotentes de origen mesodérmico que son progenitoras de todos los tejidos estromales, por lo que tienen un gran potencial en el campo de la medicina regenerativa. Actualmente no se han encontrado marcadores que identifiquen MSCs humanas, aunque en 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Genética propuso un conjunto de marcadores y características celulares para su identificación como criterios mínimos para poder definir a una célula como MSC (Dominici *et al.*, 2006). Las tres características mínimas para que una célula pueda ser definida como MSC son: la primera, tener adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar usando matraces de cultivo tisular; la segunda, deben tener marcadores de superficie; la tercera y última, mantener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*. Los marcadores que deben expresar al menos un 95% de las MSCs son CD73 (también conocido como ecto-5'-nucleotidasa), CD90 (también conocido como Thy-1) y CD105 (también conocido como endoglina), mientras que otros que no deben expresar, o expresar en una proporción menor al 2% para evitar contaminaciones de otros tipos celulares son CD14 o CD11b (marcador de macrófagos o monocitos, los tipos de células hematopoyéticas que es más probable que contaminen un cultivo de MSCs), CD34 (marcador de progenitores hematopoyéticos y de células endoteliales), CD45 (marcador panleucocitario), CD79 $\alpha$  o CD19 (marcadores de células B que se podrían adherir al cultivo de MSCs) y el antígeno leucocitario humano de tipo II DR o HLA-DR (no es expresado a no ser que la MSC sea estimulada). Esta carencia de HLA-DR es una de las razones por la que se cree que las MSC tienen una baja inmunogenicidad al ser transplantadas (Ryan *et al.*, 2005), ya que de esta forma no son reconocidas por las células T CD4<sup>+</sup>.

Se ha sugerido que la actividad biológica de las MSCs reside en su capacidad de actuar a nivel paracrino mediante la liberación de factores bioactivos o a través de mecanismos indirectos que involucran a fagocitos (Ryan *et al.*, 2005) y, por tanto, el potencial terapéutico de las MSCs viene dado por esta capacidad secretora, más que por su habilidad de diferenciarse a distintos tipos celulares. Un ejemplo es un estudio realizado por Katsuda y colaboradores (2014), en el que se dieron cuenta de que el efecto terapéutico de las MSCs era resultado de los factores secretados por dichas células, como interleucinas (IL1-RA, IL-6, IL-8), factores de crecimiento (NGF, HGF), etc., que participan en la inmunosupresión, el crecimiento hepático y la hematopoyesis.

Gran cantidad de estudios han demostrado los efectos terapéuticos del uso de MSCs, con buenos resultados. De hecho, hay más de diez mil estudios en fase de ensayo clínico actualmente (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, s.f.-a).

Aunque durante mucho tiempo el estudio del efecto terapéutico de las MSCs se ha centrado en la secreción de moléculas, actualmente se sabe que esta acción viene, en parte, de la secreción de EVs. De hecho, ya se ha visto que tienen acción terapéutica en diversos tipos de enfermedades, como se verá en los siguientes apartados. La ventaja de utilizar EVs, con respecto a sus células progenitoras, es que son más seguras, que se pueden almacenar sin perder su función, y que contienen información de la célula progenitora, como proteínas, RNA y lípidos (Rani *et al.*, 2015).

En un artículo publicado por Witwer y colaboradores (2019), se sugirió que, para que una MSC pueda ser utilizada como fuente de EVs, se deben conocer al menos cuatro características: la primera, el tejido del que procede; la segunda, que sea parte de al menos uno de los tres linajes mencionados anteriormente (osteoblasto, adipocito o condroblasto) y que, por lo tanto, no es un fibroblasto; la tercera, si está modificada o no; y la última, se debe testar la funcionalidad de las EVs.

## **6.1. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA AUTOINMUNE Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS**

Las MSCs tienen importantes funciones moduladoras de la respuesta inmune que afectan tanto a la respuesta adaptativa como a la innata, cuando han sido preparadas por el microambiente inflamatorio. La inmunosupresión mediada por MSCs requiere que primero sean activadas por células del sistema inmune, concretamente liberando citoquinas proinflamatorias como INF- $\gamma$  junto a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . Es entonces cuando las MSCs liberan las citoquinas inmunosupresoras, como la prostaglandina E2, indoleamina 2,3-dioxigenasa, TGF-  $\beta$ 1 e IL-10 (Katsuda *et al.*, 2013).

En 1996 se demostró por primera vez que las EVs liberadas por las células B pueden promover respuestas en las células T (Raposo *et al.*, 1996), es decir, se probó que estas vesículas tienen actividad inmunorreguladora gracias a que son moléculas señalizadoras. Es importante destacar que las MSCs deben ser activadas para que las EVs derivadas de ellas secreten los factores terapéuticos. Además, las EVs tienen efectos inmunosupresores sobre las células T y NK y tienen un rol crucial en la inducción de células T reguladoras y mieloides para inhibir la respuesta inmune. En un estudio realizado por Franco da Cunha *et al.* (2020) se vio que las MSC-EVs reducían la diferenciación de los linfocitos T hacia el fenotipo Th1, generando células que sintetizan

más Foxp3 y menos IFN- $\gamma$ . También se dieron cuenta de que cambiaban el perfil de miRNA, disminuyendo la expresión de miR-23a-3p, lo que incrementa la expresión de su diana, TGFBR2. Este hecho indica que la vía TGF- $\beta$  está implicada, que inactiva la vía mTOR y, por tanto, se da una alteración del perfil metabólico de las células T. Estos descubrimientos sugieren que las MSC-EVs inducen tolerancia inmunológica.

Se ha estudiado la aplicación terapéutica de MSC-EVs para el tratamiento de enfermedades autoinmunes en modelos animales, concretamente en diabetes tipo 1 y uveoretinitis (Shigemoto-Kuroda et al., 2017). Se encontró que las EVs suprimen el desarrollo de Th1 y Th17, inhiben la activación de las células presentadoras de antígeno y las células T, e incrementan la expresión de IL-10 (citoquina inmunosupresora). Por tanto, este tipo de vesículas pueden ser beneficiosas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes en las que Th1 y Th17 juegan un papel importante, como son las mencionadas.

## **6.2. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA CARDIACA**

Las cardiopatías son, desde hace 20 años, la principal causa de mortalidad en el mundo, y ha ido aumentando en más de 2 millones de personas (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2020). Entre todas las enfermedades dentro de este grupo, el infarto agudo de miocardio (IAM) es la causa más común de fallo cardíaco. El IAM provoca la apoptosis, necrosis e hipertrofia de cardiomiocitos, daños en la neovascularización, fibrosis intersticial, inflamación y reducción de la contractilidad muscular, por lo que, para su tratamiento, es necesaria la regeneración del tejido y la inhibición de la remodelación patológica (Ranganath *et al.*, 2012). Los tres principales daños de una isquemia por reperfusión son: reducción del contenido en ATP/NADH, incremento del estrés oxidativo y muerte celular. Lo especialmente preocupante de esta cardiomiopatía, es que un corazón dañado de esta forma no es capaz de regenerarse por sí mismo a través de regeneración del músculo cardíaco, sino que se forma una cicatriz fibrosa que puede llevar a disfunción cardíaca y el remodelado del ventrículo izquierdo (Dai *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017).

Hay un gran número de estudios que han demostrado la acción terapéutica de las EVs derivadas de MSCs sobre la regeneración cardíaca de los cardiomiocitos. Las EVs participan en un gran número de vías metabólicas. Arslan y su equipo (2013) vieron que estas vesículas disminuían los daños de la isquemia por reperfusión, es decir, que incrementan los niveles de ATP, disminuyen el estrés oxidativo y activan la vía fosfatidilinositol-3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt). Estos efectos provocan una

mejora de la contractilidad y una reducción de la necrosis en cardiomiocitos. Por otro lado, se observó que las EVs contenían miRNA específicos, como miR-19a (Yu *et al.*, 2015) y miR-144 (Wen *et al.*, 2020), que reducen la expresión de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) en cardiomiocitos, incrementando la expresión de la vía Akt, con sus correspondientes efectos beneficiosos. Esta vía también previene la apoptosis, induce la autofagia de las células dañadas (Liu *et al.*, 2017) y evita la piroptosis (Tang *et al.*, 2020). Otra vía que ha sido diana para la regeneración del tejido cardíaco es la Wnt/ $\beta$ -catenina (Cui *et al.*, 2017). También se ha visto que algunas MSC-EVs contienen miR-125b, el cual tiene una gran variedad de dianas. Se ha visto que, en cardiomiocitos, este miRNA regula negativamente a SIRT7, que juega un papel importante en la regulación de la apoptosis celular y la respuesta al estrés del corazón, de forma que protege contra el daño por isquemia-reperfusión. Esta molécula también incrementa la viabilidad celular y disminuye la apoptosis, ya que reduce la expresión de Bax, caspasa 3 y los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , e incrementa los niveles de Bcl-2 (Chen *et al.*, 2020).

Otro efecto beneficioso de las MSC-EVs es que son capaces de polarizar el fenotipo de los macrófagos M2, es decir, aquellos con propiedades antiinflamatorias, para disminuir el daño cardíaco tras un infarto de miocardio. En esta polarización interviene el receptor esfingosina-1-fosfato 1 (S1PR1) (Wen *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Liu *et al.* (2020), demostraron que el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) atenuaba el daño por hipoxia o carencia de suero, ya que este factor inhibe la fragmentación mitocondrial y la apoptosis activando la vía AMPK.

Las MSC-EVs también tienen efectos terapéuticos sobre las células endoteliales. En estas vesículas, el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) está sobreexpresado mientras que, tras un infarto de miocardio, tiene mucha menos expresión. La sobreexpresión de este factor activa la vía PI3K, con sus correspondientes efectos mencionados anteriormente (Gong *et al.*, 2019).

Además de cardiomiocitos y células endoteliales, se ha estudiado si las EVs tendrían efecto terapéutico sobre células madre cardíacas en que han sufrido daños por isquemia-reperfusión, y se ha visto que incrementan la supervivencia, el potencial angiogénico y la capacidad de autorrenovación (Harrell *et al.*, 2019). Estas funciones se atribuyen a la presencia de miRNAs específicos, como miR-15, miR-21, miR-22 y miR-146a (Zhang *et al.*, 2016).

Por último, se ha estudiado la modificación de EVs para mejorar su potencial terapéutico (de Abreu *et al.*, 2020). Para empezar, se han modificado EVs para incrementar su

tiempo de vida, que sin modificar es de minutos (Smyth *et al.*, 2015), mediante la adición de PEG (Kooijmans *et al.*, 2016). También se han añadido péptidos a la membrana para que interactúen de forma más específica con las células diana, como el péptido WLSEAGPVVTVRALRGTGSW para cardiomiocitos (Mentkowski & Lang, 2019), o el CSTSMLKAC para el miocardio sufriendo isquemia (Antes *et al.*, 2018). Por otro lado, también se ha intentado modificar el contenido de las EVs modulando sus células progenitoras, a través de condiciones de estrés (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2017), cambios en el medio (Kang *et al.*, 2016) o adición de agentes externos (Ibrahim *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019), para enriquecer a las EVs secretadas de ciertas moléculas.

### **6.3. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA RENAL**

La insuficiencia renal aguda se define como una disminución de la función renal y pérdida de células tubulares, que se asocia a un aumento de la urea y la creatinina en el suero. El posible efecto terapéutico de las MSC-EVs en este tipo de daño ha sido estudiado en diversas ocasiones y se ha visto que viene dado en parte por los mRNAs y miRNAs que contienen (Bruno *et al.*, 2009, 2012; Gatti *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2012; Tomasoni *et al.*, 2013). Estos participan en la proliferación de las células tubulares que sobreviven al daño. Además, participan en la supervivencia a la insuficiencia renal inducida, por un lado por cisplatina, ya que incrementan la expresión de genes antiapoptóticos como Bcl2 y BIRC8 de las células renales, además de reducir la expresión de los proapoptóticos, como las caspasas 1 y 8 (Bruno *et al.*, 2012); y, por otro lado, por gentamicina (Reis *et al.*, 2012). También protegen de la insuficiencia renal aguda tras daño por isquemia-reperfusión y de una posible posterior enfermedad renal crónica, dado que inhiben la apoptosis y estimulan la proliferación de células tubulares (Gatti *et al.*, 2011). Por último, no solo los ácidos ribonucleicos ejercen efecto terapéutico en el daño renal, sino que se ha visto que la presencia de IGF-1 mejora la proliferación celular (Tomasoni *et al.*, 2013).

La fibrosis de glomérulos y túbulos causada por una hiperglicemia debida a la diabetes es la principal causa de una enfermedad crónica renal (Papadopoulou-Marketou *et al.*, 2017). Con el fin de tratar esta enfermedad, se ha estudiado el uso de MSC-EVs para su tratamiento. En un estudio de Grange y colaboradores (2019) se demostró que las MSC-EVs tienen efectos beneficiosos en la progresión de la nefropatía diabética en ratones, ya que inhiben el engrosamiento de los glomérulos y su consecuente expansión del área glomerular, además de la del espacio de Bowman. También inhiben la fibrosis glomerular e intersticial. En otro estudio realizado por Eirin *et al.* (2017) en cerdos con

enfermedad crónica renal provocada por estenosis de la arteria renal y síndrome metabólico, se observó que las EVs restauraron la tasa de filtración glomerular, y disminuyeron la inflamación, la hipoxia medular y la fibrosis. Este estudio sugiere que el efecto terapéutico de las EVs puede estar mediado por su contenido en IL-10.

#### **6.4. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA PULMONAR**

El síndrome de dificultad respiratoria aguda se caracteriza por un incremento en la permeabilidad de la membrana capilar alveolar, un influjo de fluido pulmonar rico en proteínas y una disfunción del surfactante, lo que resulta en hipoxemia (A. Liu *et al.*, 2020).

En un estudio reciente (Park *et al.*, 2019) se ha descubierto que las MVs tienen un efecto terapéutico beneficioso en neumonía severa causada por *Escherichia coli* en pulmones humanos, ya que incrementan la tasa de aclaramiento del fluido alveolar, disminuyen la permeabilidad pulmonar y también la cantidad de bacterias con su consecuente disminución de la inflamación. También estudiaron si el pretratamiento de las MSCs mejoraba las propiedades antimicrobianas de las MVs, y vieron que si se trataba con ácido policitídílico (poli I:C), esta sí mejoraba, ya que se pudo asociar con un menor influjo de células inflamatorias. Sin embargo, en este ensayo no se pudo mejorar la presión traqueal, ni la elasticidad ni la oxigenación pulmonares. Aún así, este ensayo preclínico abre las puertas al tratamiento de esta patología con MSC-EVs. Por otro lado, en un estudio hecho en ratones (Tang *et al.*, 2017), se ha visto que la administración de MSC-MVs mejoraba la inflamación pulmonar producida por lipopolisacáridos bacterianos y restauraba la permeabilidad capilar del pulmón. Al estudiar el contenido de las MVs, se vio que expresaban una alta cantidad de mRNA de angiopoyetina 1, y que el efecto terapéutico está mediado, en parte al menos, por la expresión de esta proteína.

Por último, también se ha estudiado si estas EVs tienen efecto terapéutico en síndrome de dificultad respiratoria causado por virus. Un ejemplo es un estudio realizado por Khatri *et al.* (2018), en el que se estudió la aplicación de este tratamiento en modelos porcinos con dificultad respiratoria causada por el virus influenza. Demostraron que las vesículas reprimían la replicación del virus en células epiteliales de pulmón, inhibían la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias e incrementaban las antiinflamatorias como IL-10, lo que supone un posible tratamiento para la enfermedad.

## 6.5. APLICACIONES TERAPÉUTICAS EN PATOLOGÍA NERVIOSA

Las isquemias cerebrales son la enfermedad más importante del sistema nervioso central, y son la causa de la mayoría de los casos de derrame cerebral. La falta de oxígeno y glucosa lleva a una disminución de la síntesis de ATP, lo que reduce el gradiente iónico de la membrana plasmática, conduciendo a un aumento de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma. La acumulación de glutamato y la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), lleva a un incremento de la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Los enzimas dependientes de este ion también aumentan, lo que activa la producción de mediadores de la apoptosis como ácido nítrico, radicales libres, y ácido araquidónico. Todos estos procesos resultan en el daño de la membrana plasmática, la destrucción de estructuras celulares y la activación de la cascada de señales inflamatorias, que pueden concluir en la apoptosis o necrosis de la célula, según la magnitud de los daños y el estado metabólico de la célula (Roy-O'Reilly & McCullough, 2014).

Hasta ahora las terapias que intentaban reducir la reacción inmunológica tras una isquemia cerebral usando mediadores de la inflamación o inhibidores de células inmunes no han sido eficaces, por lo que se está estudiando el uso de MSC-EVs (M. Guo *et al.*, 2020). En modelos en ratones, se ha visto que estas vesículas, gracias a su pequeño tamaño pueden cruzar la barrera hematoencefálica y provocan neurogénesis endógena, incrementan el número de axones, y mejoran las funciones vitales de los animales. También se ha observado neuroprotección a largo plazo y modulación de la respuesta inmune periférica (Dabrowska *et al.*, 2019).

Por otro lado, también se está estudiando su potencial uso para el tratamiento del Alzheimer. Esta enfermedad se caracteriza por una deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides y la agregación de tau hiperfosforiladas formando agregados neurofibrilares. Se ha visto que la neprilipsina y el enzima de degradación de la insulina participan en la degradación de los péptidos  $\beta$ -amiloides, por lo que se ha estudiado si las EVs derivadas de MSCs que contienen estas proteínas podrían tener ese efecto terapéutico, con resultados prometedores (Ding *et al.*, 2018; Katsuda *et al.*, 2013). Ya se está realizando un ensayo clínico con la finalidad de conocer la seguridad y eficacia de las EVs derivadas de MSCs del tejido adiposo (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, NCT04388982).

## 7. ENSAYOS CLÍNICOS CON LAS EVs PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ISQUÉMICAS

Las MSC-EVs han tenido mucho éxito en el tratamiento de patologías en fase preclínica, con beneficios sobre todos los resultados medidos en el 81% de los estudios, y en al menos uno de ellos en el 97% (Tieu *et al.*, 2020). Debido a esos buenos resultados, muchos de ellos han pasado a fase clínica. Actualmente hay doscientos noventa y siete estudios en fase de clínica que emplean EVs (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, s.f.-b; U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, s.f.-c).

De entre todos estos ensayos clínicos, solo uno utiliza EVs en el tratamiento de isquemias cardiacas (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, NCT04327635), pero aún no ha finalizado y se encuentra en fase I. En él, se hace un estudio de la dosis de administración más segura de un nuevo fármaco conocido como producto purificado de exosomas (PEP), en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio y se someten a una intervención coronaria por vía percutánea. La intervención coronaria se debe realizar entre 4 y 12 horas tras el inicio de los síntomas y el PEP se administra como máximo 20 minutos después de la colocación del stent o de la dilatación. Se experimenta con tres dosis: 5%, 10% y 20% de PEP, de un volumen de 10 ml, inyectadas una única vez. Tras la inyección, se miden la toxicidad limitante de la dosis y la dosis máxima tolerada en los días 1 al 14 tras el tratamiento. También se miden el tamaño de la cicatriz del infarto, la fracción de eyección, anomalías abdominales y respuestas autoinmunes.

Este ensayo cuenta con una publicación de un estudio realizado sobre un modelo porcino del mismo fármaco (Kisby *et al.*, 2021). En este estudio se buscó dilucidar la mejor pauta de administración del fármaco; se comparó la inyección del fármaco en un régimen de una dosis en comparación con diversas dosis, y tras una exposición aguda o subaguda. Las conclusiones fueron que el uso de varias dosis mejoraba significativamente la proliferación celular. Sin embargo, este estudio no se realizó sobre el miocardio, sino sobre tejido vaginal. Aún así, demostró la utilidad del PEP para regeneración tisular.

## 8. PERSPECTIVAS DE FUTURO Y CONCLUSIONES

Las vesículas extracelulares están siendo objeto de estudio para el tratamiento y diagnóstico de diversos tipos de patologías gracias a su presencia en la mayor parte de los fluidos biológicos, y debido a su papel en la comunicación intercelular (Raposo & Stoorvogel, 2013). Desde su descubrimiento, se ha avanzado mucho en el conocimiento de su biogénesis, funcionalidad y mecanismos moleculares, sin embargo, todavía quedan muchas incógnitas por resolver antes de estandarizar su uso en la práctica clínica.

Actualmente ni siquiera hay un consenso sobre su nomenclatura entre organismos e investigadores (Théry *et al.*, 2018), y mucho menos un procedimiento estandarizado para su aislamiento y caracterización, lo que impide su puesta en práctica en aplicaciones clínicas. Las técnicas actuales de aislamiento cuentan con diversos problemas debido al pequeño tamaño de las vesículas y su gran heterogeneidad, lo que dificulta un aislamiento selectivo. El contenido, por otro lado, depende de factores como el tipo de célula progenitora, su estadio fisiológico, o su biogénesis, por lo que la clasificación y caracterización de las vesículas extracelulares sigue siendo un reto. Además, todavía se desconocen muchos de los mecanismos moleculares tanto de biogénesis como de actuación de las vesículas extracelulares (Van Niel *et al.*, 2018).

Por otro lado, el potencial de las MSCs en medicina regenerativa está más que demostrado. Se sabe que las EVs liberadas por estas células son el medio por el que ejercen, al menos en parte, su poder terapéutico (Ryan *et al.*, 2005), por lo que su uso es preferible al ser de menor tamaño y contener muchas de las moléculas liberadas por sus progenitoras.

A pesar de estos desafíos aún por superar, los resultados de las EVs derivadas de MSCs en modelos preclínicos de diversas patologías son realmente prometedores. Se ha demostrado su potencial en patologías autoinmunes, cardíacas, renales, pulmonares, y nerviosas. De entre ellas, destaca su potencial aplicación a las cardiopatías, puesto que son la primera causa de muerte en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2020).

Con este fin, se ha estudiado el tratamiento de esta patología mediante EVs derivadas de MSC. Sin embargo, a día de hoy solo hay un ensayo clínico que las utiliza, todavía sin resultados. Aún así, todos los estudios en animales hacen de esta terapia un potencial tratamiento para las cardiopatías, ya que se ha conseguido mejorar la contractilidad de cardiomiocitos (Arslan *et al.*, 2013), reducir su necrosis (Arslan *et al.*, 2013), apoptosis (Liu *et al.*, 2017) y piroptosis (Tang *et al.*, 2020), incrementando así la

viabilidad celular y la supervivencia tras un infarto de miocardio (Chen *et al.*, 2020), incrementar su potencial angiogénico y su capacidad de autorrenovación (Harrell *et al.*, 2019), inducir la autofagia de las células dañadas (Liu *et al.*, 2017) y disminuir la apoptosis de células endoteliales (Gong *et al.*, 2019).

No obstante, el uso de EVs para el tratamiento de cardiopatías cuenta con limitaciones. Por un lado, para que las EVs actúen sobre las células deben interactuar correctamente con la membrana plasmática y liberar su contenido al interior celular, pero puede ocurrir que interactúen con la membrana de células que no sean las diana, pero que tengan sus mismos receptores de membrana, por lo que se deben conocer muy bien las células diana, o que sí interactúen con las diana pero que estas las digieran con lisosomas y no puedan ejercer su acción. Además, la acción terapéutica de las EVs viene dada por su contenido, que viene dado, a su vez, por su célula progenitora, por lo que es muy importante el estudio de la caracterización de las EVs para aplicarlas como tratamiento, y así saber qué moléculas ejercen el poder curativo. Por último, el seguimiento de las EVs *in vivo* al ser administradas está limitado a la realización de biopsias.

La aproximación que resulta más prometedora ya que pone solución a todas las limitaciones que se tienen actualmente, es la modificación de EVs (de Abreu *et al.*, 2020). Esta permite hacer más específica la interacción entre célula diana y EV mediante la adición de moléculas a su membrana (Antes *et al.*, 2018; Kooijmans *et al.*, 2016; Mentkowski & Lang, 2019), enriquecer las EVs del contenido de interés modulando las células progenitoras (Ibrahim *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2016; Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2017), y mejorar el seguimiento tras la distribución gracias a la adición mediante ingeniería genética de genes *reporter*, como la luciferasa (Lai *et al.*, 2014).

Por último, se deben estudiar los aspectos regulatorios de este tipo de tratamientos para que lleguen a la realidad. Las vesículas extracelulares entran en la categoría de medicinas biológicas (Lener *et al.*, 2015). Para poder ser comercializadas, las EVs deben ser correctamente caracterizadas, aisladas y almacenadas, pero aún se debe crear un protocolo estandarizado para ello, lo que imposibilita actualmente su distribución como producto farmacéutico.

Teniendo en cuenta todas las limitaciones a las que están sometidas, las EVs aún deben superar un número de desafíos de estandarización de protocolos y distribución para que su utilización en el ámbito clínico se convierta en realidad. No obstante, teniendo en cuenta su ventaja competitiva respecto a las terapias celulares y el número de estudios

en curso es previsible que en los próximos años se aclaren muchas dudas respecto a las ventajas de este tipo de terapia respecto a las predecesoras.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- ABELS, E. R., & BREAKFIELD, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- ABRIAL, M., DA SILVA, C. C., PILLOT, B., AUGEUL, L., IVANES, F., TEIXEIRA, G., CARTIER, R., ANGOULVANT, D., OVIZE, M., & FERRERA, R. (2014). Cardiac fibroblasts protect cardiomyocytes against lethal ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 68, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.005>
- AKERS, J. C., GONDA, D., KIM, R., CARTER, B. S., & CHEN, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- ANTES, T. J., MIDDLETON, R. C., LUTHER, K. M., IJICHI, T., PECK, K. A., LIU, W. J., VALLE, J., ECHAVEZ, A. K., & MARBÁN, E. (2018). Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0388-4>
- ARRAUD, N., LINARES, R., TAN, S., GOUNOU, C., PASQUET, J. M., MORNET, S., & BRISSON, A. R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(5), 614-627. <https://doi.org/10.1111/jth.12554>
- ARSLAN, F., LAI, R. C., SMEETS, M. B., AKEROYD, L., CHOO, A., AGUOR, E. N. E., TIMMERS, L., VAN RIJEN, H. V., DOEVENDANS, P. A., PASTERKAMP, G., LIM, S. K., & DE KLEIJN, D. P. (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 10(3), 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.01.002>
- BALKOM, B. W. M. VA., JONG, O. G. D., SMITS, M., BRUMMELMAN, J., OUDEN, K. DEN, BREE, P. M. D., EIJNDHOVEN, M. A. J. VA., PEGTEL, D. M., STOORVOGEL, W., WÜRDINGER, T., & VERHAAR, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood*, 121(19), 3997-S15. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-478925>

- BANG, C., BATKAI, S., DANGWAL, S., GUPTA, S. K., FOINQUINOS, A., HOLZMANN, A., JUST, A., REMKE, J., ZIMMER, K., ZEUG, A., PONIMASKIN, E., SCHMIEDL, A., YIN, X., MAYR, M., HALDER, R., FISCHER, A., ENGELHARDT, S., WEI, Y., SCHOBER, A., ... THUM, T. (2014). Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2136-2146. <https://doi.org/10.1172/JCI70577>
- BARILE, L., CERVIO, E., LIONETTI, V., MILANO, G., CIULLO, A., BIEMMI, V., BOLIS, S., ALTOMARE, C., MATTEUCCI, M., DI SILVESTRE, D., BRAMBILLA, F., FERTIG, T. E., TORRE, T., DEMERTZIS, S., MAURI, P., MOCCHETTI, T., & VASSALLI, G. (2018). Cardioprotection by cardiac progenitor cell-secreted exosomes: Role of pregnancy-associated plasma protein-A. *Cardiovascular Research*, 114(7), 992-1005. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy055>
- BARILE, L., LIONETTI, V., CERVIO, E., MATTEUCCI, M., GHERGHICEANU, M., POPESCU, L. M., TORRE, T., SICLARI, F., MOCCHETTI, T., & VASSALLI, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 103(4), 530–541. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu167>
- BARILE, L., MESSINA, E., GIACOMELLO, A., & MARBÁN, E. (2007). Endogenous Cardiac Stem Cells. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 50(1). <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2007.03.005>
- BELLIN, G., GARDIN, C., FERRONI, L., CHACHQUES, J., ROGANTE, M., MITREČIĆ, D., FERRARI, R., & ZAVAN, B. (2019). Exosome in Cardiovascular Diseases: A Complex World Full of Hope. *Cells*, 8(2), 166. <https://doi.org/10.3390/cells8020166>
- BELLINGHAM, S. A., COLEMAN, B. M., & HILL, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 10937-10949. <https://doi.org/10.1093/nar/gks832>
- BETTENCOURT, P. (2004). NT-proBNP and BNP: Biomarkers for heart failure management. *European Journal of Heart Failure*, 6(3), 359-363. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2004.01.008>
- BLEACKLEY, M. R., DAWSON, C. S., & ANDERSON, M. A. (2019). Fungal Extracellular Vesicles with a Focus on Proteomic Analysis. *Proteomics*, 19(8), e1800232. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800232>
- BOOTH, A. M., FANG, Y., FALLON, J. K., YANG, J. M., HILDRETH, J. E. K., GOULD, S. J., SANDEFUR, S., & VARTHAKAVI, V. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from

- endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 172(6), 923-935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508014>
- BRUNO, S., GRANGE, C., COLLINO, F., DEREGIBUS, M. C., CANTALUPPI, V., BIANCONE, L., TETTA, C., & CAMUSSI, G. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS ONE*, 7(3), e33115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033115>
  - BRUNO, S., GRANGE, C., DEREGIBUS, M. C., CALOGERO, R. A., SAVIOZZI, S., COLLINO, F., MORANDO, L., BUSCA, A., FALDA, M., BUSSOLATI, B., TETTA, C., & CAMUSSI, G. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(5), 1053-1067. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070798>
  - CAI, X., JANKU, F., ZHAN, Q., & FAN, J. B. (2015). Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends in Genetics*, 31(10), 564-575. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.06.001>
  - CAOBI, A., NAIR, M., & RAYMOND, A. D. (2020). Extracellular vesicles in the pathogenesis of viral infections in humans. *Viruses*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/v12101200>
  - CARNELL-MORRIS, P., TANNETTA, D., SIUPA, A., HOLE, P., & DRAGOVIC, R. (2017). Analysis of Extracellular Vesicles Using Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1660, 153-173. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_13)
  - CASADO, S., DEL VAL TOLEDO LOBO, M., & PAÍNO, C. L. (2017). Dynamics of plasma membrane surface related to the release of extracellular vesicles by mesenchymal stem cells in culture. *Scientific Reports*, 7(1), 6767. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07265-x>
  - CHARGAFF, E., & WEST, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of Biological Chemistry*, 166(1), 189-197. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34997-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34997-9)
  - CHEN, Q., LIU, Y., DING, X., LI, Q., QIU, F., WANG, M., SHEN, Z., ZHENG, H., & FU, G. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-secreted exosomes carrying microRNA-125b protect against myocardial ischemia reperfusion injury via targeting SIRT7. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 465(1–2), 103-114. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03671-z>
  - CHENG, L., SUN, X., SCICLUNA, B. J., COLEMAN, B. M., & HILL, A. F. (2014). Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney International*, 86(2), 433-444. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.502>

- CHENG, M., YANG, J., ZHAO, X., ZHANG, E., ZENG, Q., YU, Y., YANG, L., WU, B., YI, G., MAO, X., HUANG, K., DONG, N., XIE, M., LIMDI, N. A., PRABHU, S. D., ZHANG, J., & QIN, G. (2019). Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nature Communications*, *10*(1) 959. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08895-7>
- CHEOW, E. S. H., CHENG, W. C., LEE, C. N., DE KLEIJN, D., SOROKIN, V., & SZE, S. K. (2016). Plasma-derived extracellular vesicles contain predictive biomarkers and potential therapeutic targets for Myocardial Ischemic (MI) injury. *Molecular and Cellular Proteomics*, *15*(8), 2628–2640. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055731>
- CIZMAR, P., & YUANA, Y. (2017). Detection and Characterization of Extracellular Vesicles by Transmission and Cryo-Transmission Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1660*, 221-232. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_18)
- COLOMBO, M., MOITA, C., VAN NIEL, G., KOWAL, J., VIGNERON, J., BENAROCH, P., MANEL, N., MOITA, L. F., THÉRY, C., & RAPOSO, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, *126*(24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- CONLEY, A., MINCIACCHI, V. R., LEE, D. H., KNUDSEN, B. S., KARLAN, B. Y., CITRIGNO, L., VIGLIETTO, G., TEWARI, M., FREEMAN, M. R., DEMICHELIS, F., & DI VIZIO, D. (2017). High-throughput sequencing of two populations of extracellular vesicles provides an mRNA signature that can be detected in the circulation of breast cancer patients. *RNA Biology*, *14*(3), 305-316. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259061>
- CONSOLE, L., SCALISE, M., & INDIVERI, C. (2019). Exosomes in inflammation and role as biomarkers. *Clinica Chimica Acta*, *488*, 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.009>
- COUGHLAN, C., BRUCE, K. D., BURGY, O., BOYD, T. D., MICHEL, C. R., GARCIA-PEREZ, J. E., ADAME, V., ANTON, P., BETTCHER, B. M., CHIAL, H. J., KÖNIGSHOFF, M., HSIEH, E. W. Y., GRANER, M., & POTTER, H. (2020). Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses. *Current Protocols in Cell Biology*, *88*(1), e110. <https://doi.org/10.1002/cpcb.110>
- CRAPNELL, K., BLAESIUS, R., HASTINGS, A., LENNON, D. P., CAPLAN, A. I., & BRUDER, S. P. (2013). Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via

- combinatorial screening. *Experimental Cell Research*, 319(10), 1409-1418. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.04.004>
- CUI, X., HE, Z., LIANG, Z., CHEN, Z., WANG, H., & ZHANG, J. (2017). Exosomes from Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Protect the Myocardium Against Ischemia/Reperfusion Injury Through Wnt/b-Catenin Signaling Pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 70(4), 225–231. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000507>
  - DABROWSKA, S., ANDRZEJEWSKA, A., LUKOMSKA, B., & JANOWSKI, M. (2019). Neuroinflammation as a target for treatment of stroke using mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1571-8>
  - DAI, W., HERRING, M. J., HALE, S. L., & KLONER, R. A. (2015). Rapid Surface Cooling by ThermoSuit System Dramatically Reduces Scar Size, Prevents Post-Infarction Adverse Left Ventricular Remodeling, and Improves Cardiac Function in Rats. *Journal of the American Heart Association*, 4(7), e002265. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002265>
  - DE ABREU, R. C., FERNANDES, H., DA COSTA MARTINS, P. A., SAHOO, S., EMANUELI, C., & FERREIRA, L. (2020). Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. *Nature Reviews Cardiology*, 17(11), 685-697. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0389-5>
  - DE JONG, O. G., VERHAAR, M. C., CHEN, Y., VADER, P., GREMMELS, H., POSTHUMA, G., SCHIFFELERS, R. M., GUCEK, M., & VAN BALKOM, B. W. M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18396>
  - DING, M., SHEN, Y., WANG, P., XIE, Z., XU, S., ZHU, Z. Y., WANG, Y., LYU, Y., WANG, D., XU, L., BI, J. Z., & YANG, H. (2018). Exosomes Isolated From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid-Beta Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 43(11), 2165-2177. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2641-5>
  - DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., DEANS, R. J., KEATING, A., PROCKOP, D. J., & HORWITZ, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

- DOYLE, L., & WANG, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- DRAGOVIC, R. A., GARDINER, C., BROOKS, A. S., TANNETTA, D. S., FERGUSON, D. J. P., HOLE, P., CARR, B., REDMAN, C. W. G., HARRIS, A. L., DOBSON, P. J., HARRISON, P., & SARGENT, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- EGUCHI, S., TAKEFUJI, M., SAKAGUCHI, T., ISHIHAMA, S., MORI, Y., TSUDA, T., TAKIKAWA, T., YOSHIDA, T., OHASHI, K., SHIMIZU, Y., HAYASHIDA, R., KONDO, K., BANDO, Y. K., OUCHI, N., & MUROHARA, T. (2019). Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. *Journal of Biological Chemistry*, 294(31), 11665–11674. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007537>
- EIRIN, A., ZHU, X. Y., PURANIK, A. S., TANG, H., MCGURREN, K. A., VAN WIJNEN, A. J., LERMAN, A., & LERMAN, L. O. (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation. *Kidney International*, 92(1), 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.023>
- ERDBRÜGGER, U., RUDY, C. K., E. ETTER, M., DRYDEN, K. A., YEAGER, M., KLIBANOV, A. L., & LANNIGAN, J. (2014). Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 85(9), 756-770. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22494>
- EZEKOWITZ, J. A., KAUL, P., BAKAL, J. A., ARMSTRONG, P. W., WELSH, R. C., & MCALISTER, F. A. (2009). Declining In-Hospital Mortality and Increasing Heart Failure Incidence in Elderly Patients With First Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.08.067>
- FAN, Z. G., QU, X. L., CHU, P., GAO, Y. L., GAO, X. F., CHEN, S. L., & TIAN, N. L. (2018). MicroRNA-210 promotes angiogenesis in acute myocardial infarction. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5658–5665. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8620>
- FERNANDO, M. R., JIANG, C., KRZYZANOWSKI, G. D., & RYAN, W. L. (2017). New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS ONE*, 12(8), e0183915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183915>

- FRANCO DA CUNHA, F., ANDRADE-OLIVEIRA, V., CANDIDO DE ALMEIDA, D., BORGES DA SILVA, T., NAFFAH DE SOUZA BRENDA, C., COSTA CRUZ, M., FAQUIM-MAURO, E. L., ANTONIO CENEDEZE, M., IOSHIE HIYANE, M., PACHECO-SILVA, A., APARECIDA CAVINATO, R., TORRECILHAS, A. C., & OLSEN SARAIVA CÂMARA, N. (2020). Extracellular Vesicles isolated from Mesenchymal Stromal Cells Modulate CD4+ T Lymphocytes Toward a Regulatory Profile. *Cells*, 9(4), 1059. <https://doi.org/10.3390/cells9041059>
- FRIEDL, P., VISCHER, P., & FREYBERG, M. A. (2002). The role of thrombospondin-1 in apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(8), 1347-1357. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8512-9>
- GAL, D., MACDONALD, P. C., PORTER, J. C., SMITH, J. W., & SIMPSON, E. R. (1981). Effect of Cell Density and Confluency on Cholesterol Metabolism in Cancer Cells in Monolayer Culture. *Cancer Research*, 41(2), 473-477.
- GATTI, S., BRUNO, S., DEREGIBUS, M. C., SORDI, A., CANTALUPPI, V., TETTA, C., & CAMUSSI, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(5), 1474–1483. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr015>
- GAVIN, C., MEINKE, S., HELDRING, N., HECK, K. A., ACHOUR, A., IACOBAEUS, E., HÖGLUND, P., LE BLANC, K., & KADRI, N. (2019). The Complement System Is Essential for the Phagocytosis of Mesenchymal Stromal Cells by Monocytes. *Frontiers in Immunology*, 10, 2249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02249>
- GONG, X. H., LIU, H., WANG, S. J., LIANG, S. W., & WANG, G. G. (2019). Exosomes derived from SDF1-overexpressing mesenchymal stem cells inhibit ischemic myocardial cell apoptosis and promote cardiac endothelial microvascular regeneration in mice with myocardial infarction. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 13878-13893. <https://doi.org/10.1002/jcp.28070>
- GOREN, Y., KUSHNIR, M., ZAFRIR, B., TABAK, S., LEWIS, B. S., & AMIR, O. (2012). Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 14(2), 147-154. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr155>
- GOULD, S. J., & RAPOSO, G. (2013). As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 147-154. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
- GRANGE, C., TRITTA, S., TAPPARO, M., CEDRINO, M., TETTA, C., CAMUSSI, G., & BRIZZI, M. F. (2019). Stem cell-derived extracellular vesicles inhibit and revert

- fibrosis progression in a mouse model of diabetic nephropathy. *Scientific Reports*, 9(1), 4468. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41100-9>
- GREENING, D. W., XU, R., JI, H., TAURO, B. J., & SIMPSON, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: Evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1295, 179-209. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_15)
  - GRIFFIN, M. D., RYAN, A. E., ALAGESAN, S., LOHAN, P., TREACY, O., & RITTER, T. (2013). Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: What have we learned so far?. *Immunology and Cell Biology*, 91(1), 40-51. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.67>
  - GUDBERGSSON, J. M., JOHNSEN, K. B., SKOV, M. N., & DUROUX, M. (2016). Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology*, 68(4), 579–592. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9913-6>
  - GUO, M., YIN, Z., CHEN, F., & LEI, P. (2020). Mesenchymal stem cell-derived exosome: A promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 12(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00670-x>
  - GUO, Y., TAN, J., MIAO, Y., SUN, Z., & ZHANG, Q. (2019). Effects of microvesicles on cell apoptosis under hypoxia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5972152. <https://doi.org/10.1155/2019/5972152>
  - GUPTA, S., & KNOWLTON, A. A. (2007). HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: Role of the exosomal pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(6) H3052-H3056. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01355.2006>
  - GURUNATHAN, S., KANG, M.-H., JEYARAJ, M., QASIM, M., & KIM, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
  - HALKEIN, J., TABRUYN, S. P., RICKE-HOCH, M., HAGHIKIA, A., NGUYEN, N. Q. N., SCHERR, M., CASTERMANS, K., MALVAUX, L., LAMBERT, V., THIRY, M., SLIWA, K., NOEL, A., MARTIAL, J. A., HILFIKER-KLEINER, D., & STRUMAN, I. (2013). MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 123(5), 2143–2154. <https://doi.org/10.1172/JCI64365>

- HARRELL, C., FELLABAUM, C., JOVICIC, N., DJONOV, V., ARSENIJEVIC, N., & VOLAREVIC, V. (2019). Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*, 8(5), 467. <https://doi.org/10.3390/cells8050467>
- HELWA, I., CAI, J., DREWRY, M. D., ZIMMERMAN, A., DINKINS, M. B., KHALED, M. L., SEREMWE, M., DISMUKE, W. M., BIEBERICH, E., STAMER, W. D., HAMRICK, M. W., & LIU, Y. (2017). A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS ONE*, 12(1), e0170628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>
- HENNE, W. M., STENMARK, H., & EMR, S. D. (2013). Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a016766. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016766>
- HÖÖG, J. L., & LÖTVALL, J. (2015). Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 28680. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28680>
- HOSSEINI, S., VÁZQUEZ-VILLEGAS, P., RITO-PALOMARES, M., & MARTINEZ-CHAPA, S. O. (2018). General overviews on applications of ELISA. *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*, 19-29 [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6766-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6766-2_2)
- HSU, C., MOROHASHI, Y., YOSHIMURA, S. I., MANRIQUE-HOYOS, N., JUNG, S. Y., LAUTERBACH, M. A., BAKHTI, M., GRØNBORG, M., MÖBIUS, W., RHEE, J. S., BARR, F. A., & SIMONS, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 223-232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
- IBRAHIM, AHMED G.E., LI, C., ROGERS, R., FOURNIER, M., LI, L., VATURI, S. D., ANTES, T., SANCHEZ, L., AKHMEROV, A., MOSELEY, J. J., TOBIN, B., RODRIGUEZ-BORLADO, L., SMITH, R. R., MARBÁN, L., & MARBÁN, E. (2019). Augmenting canonical Wnt signalling in therapeutically inert cells converts them into therapeutically potent exosome factories. *Nature Biomedical Engineering*, 3(9), 695–705. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0448-6>
- IBRAHIM, AHMED GAMAL ELDIN, CHENG, K., & MARBÁN, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*, 2(5), 606–619. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.04.006>
- JENJAROENPUN, P., KREMENSKA, Y., NAIR, V. M., KREMENSKOY, M., JOSEPH, B., & KUROCHKIN, I. V. (2013). Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ*, 1, e201. <https://doi.org/10.7717/peerj.201>

- JOHNSTONE, R. M., ADAM, M., HAMMOND, J. R., ORR, L., & TURBIDE, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412-9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7)
- JUJO, K., II, M., SEKIGUCHI, H., KLYACHKO, E., MISENER, S., TANAKA, T., TONGERS, J., RONCALLI, J., RENAULT, M. A., THORNE, T., ITO, A., CLARKE, T., KAMIDE, C., TSURUMI, Y., HAGIWARA, N., QIN, G., ASAHI, M., & LOSORDO, D. W. (2013). CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Circulation*, 127(1), 63-73. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.099242>
- Jung, M. K., & MUN, J. Y. (2018). Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, (131), 56482. <https://doi.org/10.3791/56482>
- KANG, T., JONES, T. M., NADDELL, C., BACANAMWO, M., CALVERT, J. W., THOMPSON, W. E., BOND, V. C., CHEN, Y. E., & LIU, D. (2016). Adipose-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of miRNA-31. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(4), 440-450. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0177>
- KATSUDA, T., KOSAKA, N., TAKESHITA, F., & OCHIYA, T. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13(10–11), 1637–1653. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200373>
- KATSUDA, T., KURATA, H., TAMAI, R., BANAS, A., ISHII, T., ISHIKAWA, S., & OCHIYA, T. (2014). The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1213, 57-67. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1453-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1453-1_6)
- KATSUDA, T., TSUCHIYA, R., KOSAKA, N., YOSHIOKA, Y., TAKAGAKI, K., OKI, K., TAKESHITA, F., SAKAI, Y., KURODA, M., & OCHIYA, T. (2013). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Scientific Reports*, 3, 1197. <https://doi.org/10.1038/srep01197>
- KESHTKAR, S., AZARPIRA, N., & GHAREMANI, M. H. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0791-7>
- KHATRI, M., RICHARDSON, L. A., & MEULIA, T. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate influenza virus-induced acute lung injury

- in a pig model. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0774-8>
- KISBY, C. K., SHADRIN, I. Y., PENG, L. T., STALBOERGER, P. G., TRABUCO, E. C., BEHFAR, A., & OCCHINO, J. A. (2021). Impact of Repeat Dosing and Mesh Exposure Chronicity on Exosome-Induced Vaginal Tissue Regeneration in a Porcine Mesh Exposure Model. *Female Pelvic Medicine & Reconstructive Surgery*, 27(3), 195-201. <https://doi.org/10.1097/SPV.0000000000001017>
  - KO, J., BHAGWAT, N., YEE, S. S., ORTIZ, N., SAHMOUD, A., BLACK, T., AIELLO, N. M., MCKENZIE, L., O'HARA, M., REDLINGER, C., ROMEO, J., CARPENTER, E. L., STANGER, B. Z., & ISSADORE, D. (2017). Combining Machine Learning and Nanofluidic Technology to Diagnose Pancreatic Cancer Using Exosomes. *ACS Nano*, 11(11), 11182-11193. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05503>
  - KOOIJMANS, S. A. A., FLIERVOET, L. A. L., VAN DER MEEL, R., FENS, M. H. A. M., HEIJNEN, H. F. G., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. P., VADER, P., & SCHIFFELERS, R. M. (2016). PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time. *Journal of Controlled Release: official journal of the Controlled Release Society*, 224, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.009>
  - KOUMANGOYE, R. B., SAKWE, A. M., GOODWIN, J. S., PATEL, T., & OCHIENG, J. (2011). Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS ONE*, 6(9), e24234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024234>
  - KOWAL, E. J. K., TER-OVANESYAN, D., REGEV, A., & CHURCH, G. M. (2017). Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1660, 143-152. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_12)
  - KUCHARZEWSKA, P., CHRISTIANSON, H. C., WELCH, J. E., SVENSSON, K. J., FREDLUND, E., RINGNÉR, M., MÖRGELIN, M., BOURSEAU-GUILMAIN, E., BENZON, J., & BELTING, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7312-7317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110>
  - LAI, C. P., MARDINI, O., ERICSSON, M., PRABHAKAR, S., MAGUIRE, C. A., CHEN, J. W., TANNOUS, B. A., & BREAKEFIELD, X. O. (2014). Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS Nano*, 8(1), 483-494. <https://doi.org/10.1021/nn404945r>

- LÄSSER, C., ELDH, M., & LÖTVALL, J. (2012). Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of Visualized Experiments*, (59), e3037. <https://doi.org/10.3791/3037>
- LAUWERS, E., WANG, Y. C., GALLARDO, R., VAN DER KANT, R., MICHIELS, E., SWERTS, J., BAATSEN, P., ZAITER, S. S., MCALPINE, S. R., GOUNKO, N. V., ROUSSEAU, F., SCHYMKOWITZ, J., & VERSTREKEN, P. (2018). Hsp90 Mediates Membrane Deformation and Exosome Release. *Molecular Cell*, 71(5), 689-702-e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.016>
- LEE, J., KIM, S. H., CHOI, D. S., LEE, J. S., KIM, D. K., GO, G., PARK, S. M., KIM, S. H., SHIN, J. H., CHANG, C. L., & GHO, Y. S. (2015). Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 15(19), 3331-3337. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500037>
- LENER, T., GIMONA, M., AIGNER, L., BÖRGER, V., BUZAS, E., CAMUSSI, G., CHAPUT, N., CHATTERJEE, D., COURT, F. A., DEL PORTILLO, H. A., O'DRISCOLL, L., FAIS, S., FALCON-PEREZ, J. M., FELDERHOFF-MUESER, U., FRAILE, L., GHO, Y. S., GÖRGENS, A., GUPTA, R. C., HENDRIX, A., ... GIEBEL, B. (2015). Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - An ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 30087. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.30087>
- LI, J., LEE, Y., JOHANSSON, H. J., MÄGER, I., VADER, P., NORDIN, J. Z., WIKLANDER, O. P. B., LEHTIÖ, J., WOOD, M. J. A., & EL ANDALOUSSI, S. (2015). Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 26883. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26883>
- LI, P., KASLAN, M., LEE, S. H., YAO, J., & GAO, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- LINDENBERGH, M. F. S., WUBBOLTS, R., BORG, E. G. F., VAN 'T VELD, E. M., BOES, M., & STOORVOGEL, W. (2020). Dendritic cells release exosomes together with phagocytosed pathogen; potential implications for the role of exosomes in antigen presentation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1798606. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1798606>
- LIU, A., ZHANG, X., HE, H., ZHOU, L., NAITO, Y., SUGITA, S., & LEE, J. W. (2020). Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(2), 125-140. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1689954>
- LIU, F., VERMESH, O., MANI, V., GE, T. J., MADSEN, S. J., SABOUR, A., HSU, E. C., GOWRISHANKAR, G., KANADA, M., JOKERST, J. V., SIERRA, R. G., CHANG, E., LAU,

- K., SRIDHAR, K., BERMUDEZ, A., PITTERI, S. J., STOYANOVA, T., SINCLAIR, R., NAIR, V. S., ... DEMIRCI, U. (2017). The Exosome Total Isolation Chip. *ACS Nano*, 11(11), 10712-10723. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04878>
- LIU, L., JIN, X., HU, C. F., LI, R., ZHOU, Z., & SHEN, C. X. (2017). Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(1), 52-68. <https://doi.org/10.1159/000480317>
  - LIU, T., ZHANG, Q., ZHANG, J., LI, C., MIAO, Y. R., LEI, Q., LI, Q., & GUO, A. Y. (2019). EVmiRNA: A database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D89-D93. <https://doi.org/10.1093/nar/gky985>
  - LIU, X., LI, X., ZHU, W., ZHANG, Y., HONG, Y., LIANG, X., FAN, B., ZHAO, H., HE, H., & ZHANG, F. (2020). Exosomes from mesenchymal stem cells overexpressing MIF enhance myocardial repair. *Journal of Cellular Physiology*, 235(11), 8010-8022. <https://doi.org/10.1002/jcp.29456>
  - LUJAN, H. L., JANBAIH, H., FENG, H. Z., JIN, J. P., & DICARLO, S. E. (2012). Myocardial ischemia, reperfusion, and infarction in chronically instrumented, intact, conscious, and unrestrained mice. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 302(12), R1384-R1400. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00095.2012>
  - LUND, P., PILGAARD, L., DUROUX, M., FINK, T., & ZACHAR, V. (2009). Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy*, 11(2), 189-197. <https://doi.org/10.1080/14653240902736266>
  - MA, T., CHEN, Y., CHEN, Y., MENG, Q., SUN, J., SHAO, L., YU, Y., HUANG, H., HU, Y., YANG, Z., YANG, J., & SHEN, Z. (2018). MicroRNA-132, delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote angiogenesis in myocardial infarction. *Stem Cells International*, 2018, 3290372. <https://doi.org/10.1155/2018/3290372>
  - MAAS, S. L. N., BROEKMAN, M. L. D., & DE VRIJ, J. (2017). Tunable resistive pulse sensing for the characterization of extracellular vesicles. *Methods in Molecular Biology*, 1545, 21-33. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_2)
  - MATSUMOTO, S., SAKATA, Y., SUNA, S., NAKATANI, D., USAMI, M., HARA, M., KITAMURA, T., HAMASAKI, T., NANTO, S., KAWAHARA, Y., & KOMURO, I. (2013). Circulating p53-responsive MicroRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circulation Research*, 113(3), 322-326. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301209>

- MCKINNON, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- MENTKOWSKI, K. I., & LANG, J. K. (2019). Exosomes Engineered to Express a Cardiomyocyte Binding Peptide Demonstrate Improved Cardiac Retention in Vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 1004. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46407-1>
- MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD. (2011). *Estrategia en Cardiopatía Isquémica del Sistema Nacional de Salud*. Recuperado de: [https://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/docs/cardiopatia\\_isquemica/Estrategia\\_Cardiopatia\\_Isquemica.pdf](https://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/docs/cardiopatia_isquemica/Estrategia_Cardiopatia_Isquemica.pdf)
- MIRANDA, K. C., BOND, D. T., LEVIN, J. Z., ADICONIS, X., SIVACHENKO, A., RUSS, C., BROWN, D., NUSBAUM, C., & RUSSO, L. M. (2014). Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. In *PLoS ONE*, 9(5), e96094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096094>
- MÖHRMANN, L., HUANG, H. J., HONG, D. S., TSIMBERIDOU, A. M., FU, S., PIHA-PAUL, S. A., SUBBIAH, V., KARP, D. D., NAING, A., KRUG, A., ENDERLE, D., PRIEWASSER, T., NOERHOLM, M., EITAN, E., COTICCHIA, C., STOLL, G., JORDAN, L. M., ENG, C., KOPETZ, E. S., ... JANKU, F. (2018). Liquid biopsies using plasma exosomal nucleic acids and plasma cell-free DNA compared with clinical outcomes of patients with advanced cancers. *Clinical Cancer Research*, 24(1), 181-188. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2007>
- MULCAHY, L. A., PINK, R. C., & CARTER, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 10.3402/jev.v3.24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- NAKAZATO, K., NAGANUMA, W., OGAWA, K., YAOITA, H., MIZUNO, S., NAKAMURA, T., & MARUYAMA, Y. (2010). Attenuation of ischemic myocardial injury and dysfunction by cardiac fibroblast-derived factor(s). *Fukushima Journal of Medical Science*, 56(1), 1-16. <https://doi.org/10.5387/fms.56.1>
- NIE, S., WANG, X., SIVAKUMARAN, P., CHONG, M. M. W., LIU, X., KARNEZIS, T., BANDARA, N., TAKOV, K., NOWELL, C. J., WILCOX, S., SHAMBROOK, M., HILL, A. F., HARRIS, N. C., NEWCOMB, A. E., STRAPPE, P., SHAYAN, R., HERNÁNDEZ, D., CLARKE, J., HANSEN, E., ... LIM, S. Y. (2018). Biologically active constituents of the secretome of human W8B2+ cardiac stem cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1579. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19855-4>
- NOLAN, J. P., & DUGGAN, E. (2018). Analysis of individual extracellular vesicles by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 1678, 79-92. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_5)

- ONÓDI, Z., PELYHE, C., NAGY, C. T., BRENNER, G. B., ALMÁSI, L., KITTEL, Á., MANČEK-KEBER, M., FERDINANDY, P., BUZÁS, E. I., & GIRICZ, Z. (2018). Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma. *Frontiers in Physiology*, 9, 1479. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01479>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (9 de diciembre de 2020). *La OMS revela las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo: 2000–2019*. Recuperado el 26 de mayo de 2021, de <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>
- OROZCO, A. F., & LEWIS, D. E. (2010). Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. In *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(6), 502-514. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20886>
- OSTROWSKI, M., CARMO, N. B., KRUMEICH, S., FANGET, I., RAPOSO, G., SAVINA, A., MOITA, C. F., SCHAUER, K., HUME, A. N., FREITAS, R. P., GOUD, B., BENAROCH, P., HACOEN, N., FUKUDA, M., DESNOS, C., SEABRA, M. C., DARCHEN, F., AMIGORENA, S., MOITA, L. F., & THERY, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19-13. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- PAGLIARO, B. R., CANNATA, F., STEFANINI, G. G., & BOLOGNESE, L. (2020). Myocardial ischemia and coronary disease in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 25(1), 53-65. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09831-z>
- PAPADOPOULOU-MARKETOU, N., CHROUSOS, G. P., & KANAKA-GANTENBEIN, C. (2017). Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 33(2), 10.1002/dmrr.2841. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2841>
- PARK, J., KIM, S., LIM, H., LIU, A., HU, S., LEE, J. H., ZHUO, H., HAO, Q., MATTHAY, M. A., & LEE, J. W. (2019). Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell microvesicles in an ex vivo perfused human lung injured with severe *E. coli* pneumonia. *Thorax*, 74(1), 43-50. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211576>
- PEDROTTY, D. M., KLINGER, R. Y., KIRKTON, R. D., & BURSAC, N. (2009). Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 83(4), 688-697. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp164>
- PEGTEL, D. M., & GOULD, S. J. (2019). Exosomes.
- POLIAKOV, A., SPILMAN, M., DOKLAND, T., AMLING, C. L., & MOBLEY, J. A. (2009). Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles

- (prostasomes) in human semen. *Prostate*, 69(2), 159–167. <https://doi.org/10.1002/pros.20860>
- RANGANATH, S. H., LEVY, O., INAMDAR, M. S., & KARP, J. M. (2012). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*, 10(3), 244-258. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.005>
  - RANI, S., RYAN, A. E., GRIFFIN, M. D., & RITTER, T. (2015). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy*, 23(5), 812-823. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.44>
  - RAPOSO, G., & STOORVOGEL, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
  - RAPOSO, G., NIJMAN, H. W., STOORVOGEL, W., LEIJENDEKKER, R., HARDING, C. V., MELIEF, C. J. M., & GEUZE, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161-1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
  - REIS, L. A., BORGES, F. T., SIMÕES, M. J., BORGES, A. A., SINIGAGLIA-COIMBRA, R., & SCHOR, N. (2012). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Repaired but Did Not Prevent Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury through Paracrine Effects in Rats. *PLoS ONE*, 7(9), e44092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044092>
  - RIBEIRO-RODRIGUES, T. M., LAUNDOS, T. L., PEREIRA-CARVALHO, R., BATISTA-ALMEIDA, D., PEREIRA, R., COELHO-SANTOS, V., SILVA, A. P., FERNANDES, R., ZUZARTE, M., ENGUITA, F. J., COSTA, M. C., PINTO-DO-O, P., PINTO, M. T., GOUVEIA, P., FERREIRA, L., MASON, J. C., PEREIRA, P., KWAK, B. R., NASCIMENTO, D. S., & GIRAO, H. (2017). Exosomes secreted by cardiomyocytes subjected to ischaemia promote cardiac angiogenesis. *Cardiovascular Research*, 113(11), 1338-1350. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx118>
  - RIDER, M. A., HURWITZ, S. N., & MECKES, D. G. (2016). ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Scientific Reports*, 6, 23978. <https://doi.org/10.1038/srep23978>
  - ROY-O'REILLY, M., & MCCULLOUGH, L. D. (2014). Sex differences in stroke: The contribution of coagulation. *Experimental Neurology*, 259, 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.02.011>
  - RYAN, J. M., BARRY, F. P., MURPHY, J. M., & MAHON, B. P. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*, 2, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-2-8>

- SAVINA, A., FURLÁN, M., VIDAL, M., & COLOMBO, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20083-20090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301642200>
- SAVINA, A., VIDAL, M., & COLOMBO, M. I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *Journal of Cell Science*, 115(12), 2505-2515. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.12.2505>
- SHABIR, A., COX, A., RODRIGUEZ-MENOCAL, L., SALGADO, M., & VAN BADIAVAS, E. (2015). Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis in Vitro. *Stem Cells and Development*, 24(14), 1635-1647. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0316>
- SHARMA, K. D., SCHAAL, D., KORE, R. A., HAMZAH, R. N., PANDANABOINA, S. C., HAYAR, A., GRIFFIN, R. J., SRIVATSAN, M., REYNA, N. S., & XIE, J. Y. (2020). Glioma-derived exosomes drive the differentiation of neural stem cells to astrocytes. *PLoS ONE*, 15(7), e0234614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234614>
- SHELKE, G. V., LÄSSER, C., GHO, Y. S., & LÖTVALL, J. (2014). Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 10.3402/jev.v3.24783. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24783>
- SHIGEMOTO-KURODA, T., OH, J. Y., KIM, D. KI, JEONG, H. J., PARK, S. Y., LEE, H. J., PARK, J. W., KIM, T. W., AN, S. Y., PROCKOP, D. J., & LEE, R. H. (2017). MSC-derived Extracellular Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis. *Stem Cell Reports*, 8(5), 1214-1255. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.008>
- SINHA, S., HOSHINO, D., HONG, N. H., KIRKBRIDE, K. C., GREGA-LARSON, N. E., SEIKI, M., TYSKA, M. J., & WEAVER, A. M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *Journal of Cell Biology*, 214(2), 197-213. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601025>
- SLUIJTER, J. P. G., DAVIDSON, S. M., BOULANGER, C. M., BUZÁS, E. I., DE KLEIJN, D. P. V., ENGEL, F. B., GIRICZ, Z., HAUSENLOY, D. J., KISHORE, R., LECOUR, S., LEOR, J., MADONNA, R., PERRINO, C., PRUNIER, F., SAHOO, S., SCHIFFELERS, R. M., SCHULZ, R., VAN LAAKE, L. W., YTREHUS, K., & FERDINANDY, P. (2018). Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*, 114(1), 19–34. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx211>

- SMITH, V. L., CHENG, Y., BRYANT, B. R., & SCHOREY, J. S. (2017). Exosomes function in antigen presentation during an in vivo *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scientific Reports*, 7, 43578. <https://doi.org/10.1038/srep43578>
- SMYTH, T., KULLBERG, M., MALIK, N., SMITH-JONES, P., GRANER, M. W., & ANCHORDOQUY, T. J. (2015). Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 199, 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.013>
- STETEFELD, J., MCKENNA, S. A., & PATEL, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- STUFFERS, S., SEM WEGNER, C., STENMARK, H., & BRECH, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925–937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- SVENSSON, K. J., KUCHARZEWSKA, P., CHRISTIANSON, H. C., SKÖLD, S., LÖFSTEDT, T., JOHANSSON, M. C., MÖRGELIN, M., BENGZON, J., RUF, W., & BELTING, M. (2011). Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 13147-13152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104261108>
- SZATANEK, R., BAJ-KRZYWORZEKA, M., ZIMPOCH, J., LEKKA, M., SIEDLAR, M., & BARAN, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1153. <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
- TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHANG, K.-J., & BALTIMORE, D. (2006). NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481-12486.
- TANG, J., JIN, L., LIU, Y., LI, L., MA, Y., LU, L., MA, J., DING, P., YANG, X., LIU, J., & YANG, J. (2020). Exosomes derived from mesenchymal stem cells protect the myocardium against ischemia/ reperfusion injury through inhibiting pyroptosis. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 3765-3775. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S239546>
- TANG, X. D., SHI, L., MONSEL, A., LI, X. Y., ZHU, H. L., ZHU, Y. G., & QU, J. M. (2017). Mesenchymal Stem Cell Microvesicles Attenuate Acute Lung Injury in Mice Partly Mediated by Ang-1 mRNA. *Stem Cells*, 35(7), 1849-1859. <https://doi.org/10.1002/stem.2619>

- TANG, Y. T., HUANG, Y. Y., ZHENG, L., QIN, S. H., XU, X. P., AN, T. X., XU, Y., WU, Y. S., HU, X. M., PING, B. H., & WANG, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 834-844. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>
- TAURO, B. J., GREENING, D. W., MATHIAS, R. A., JI, H., MATHIVANAN, S., SCOTT, A. M., & SIMPSON, R. J. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 56(2), 293-304. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002>
- TAYLOR, J., AZIMI, I., MONTEITH, G., & BEBAWY, M. (2020). Ca<sup>2+</sup> mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1734326. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1734326>
- THERMOFISHER. (s.f.). Total Exosome Isolation Kit (from plasma). Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4484450#/4484450>
- THÉRY, C., WITWER, K. W., AIKAWA, E., ALCARAZ, M. J., ANDERSON, J. D., ANDRIANTSITOHAINA, R., ANTONIOU, A., ARAB, T., ARCHER, F., ATKIN-SMITH, G. K., AYRE, D. C., BACH, J. M., BACHURSKI, D., BAHARVAND, H., BALAJ, L., BALDACCHINO, S., BAUER, N. N., BAXTER, A. A., BEBAWY, M., ... ZUBA-SURMA, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- TIAN, Y., LI, S., SONG, J., JI, T., ZHU, M., ANDERSON, G. J., WEI, J., & NIE, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383-2390. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>
- TIEU, A., LALU, M. M., SLOBODIAN, M., GNYRA, C., FERGUSSON, D. A., MONTROY, J., BURGER, D., STEWART, D. J., & ALLAN, D. S. (2020). An Analysis of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Preclinical Use. *ACS Nano*, 14(8), 9728-9743. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01363>
- TOMASONI, S., LONGARETTI, L., ROTA, C., MORIGI, M., CONTI, S., GOTTI, E., CAPELLI, C., INTRONA, M., REMUZZI, G., & BENIGNI, A. (2013). Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 22(5), 772-780. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0266>

- TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRÜGGER, B., & SIMONS, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. (marzo de 2020 – actualidad). Safety Evaluation of Intracoronary Infusion of Extracellular Vesicles in Patients With AMI. NCT04327635. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04327635>
- U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. (mayo de 2020- actualidad). The Safety and the Efficacy Evaluation of Allogenic Adipose MSC-Exos in Patients With Alzheimer's Disease. NCT04388982. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04388982>
- U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. (s.f.-a). *Search of: MSC – List Results*. Recuperado el 24 de mayo de 2021 de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=MSC&cntry=&state=&city=&dist=>
- U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. (s.f.-b). *Search of: exosomes – List Results*. Recuperado el 24 de mayo de 2021 de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=exosomes&cntry=&state=&city=&dist=>
- U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. (s.f.-c). *Search of: extracellular vesicles – List Results*. Recuperado el 24 de mayo de 2021 de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=extracellular+vesicles&cntry=&state=&city=&dist=>
- VAN NIEL, G., D'ANGELO, G., & RAPOSO, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- WALENTA, K., SCHWARZ, V., SCHIRMER, S. H., KINDERMANN, I., FRIEDRICH, E. B., SOLOMAYER, E. F., SLIWA, K., LABIDI, S., HILFIKER-KLEINER, D., & BHM, M. (2012). Circulating microparticles as indicators of peripartum cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 33(12), 1469-1479. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr485>
- WANG, S., KOJIMA, K., MOBLEY, J. A., & WEST, A. B. (2019). Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles reveal biomarkers for neurologic disease. *EBioMedicine*, 45, 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.021>
- WATSON, C. J., COLLIER, P., TEA, I., NEARY, R., WATSON, J. A., ROBINSON, C., PHELAN, D., LEDWIDGE, M. T., MCDONALD, K. M., MCCANN, A., SHARAF, O., & BAUGH, J. A. (2014). Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like

- phenotype. *Human Molecular Genetics*, 23(8), 2176-2188. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt614>
- WEHMAN, A. M., POGGIOLI, C., SCHWEINSBERG, P., GRANT, B. D., & NANCE, J. (2011). The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Current Biology*, 21(23), 1951-1959. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.040>
  - WEI, Z., QIAO, S., ZHAO, J., YIHAI, L., QIAOLING, L., ZHONGHAI, W., QING, D., LINA, K., & BIAO, X. (2019). miRNA-181a over-expression in mesenchymal stem cell-derived exosomes influenced inflammatory response after myocardial ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences*, 232, 116632. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116632>
  - WEN, Z., MAI, Z., ZHU, X., WU, T., CHEN, Y., GENG, D., & WANG, J. (2020). Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1563-8>
  - WITWER, K. W., VAN BALKOM, B. W. M., BRUNO, S., CHOO, A., DOMINICI, M., GIMONA, M., HILL, A. F., DE KLEIJN, D., KOH, M., LAI, R. C., MITSIALIS, S. A., ORTIZ, L. A., ROHDE, E., ASADA, T., TOH, W. S., WEISS, D. J., ZHENG, L., GIEBEL, B., & LIM, S. K. (2019). Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1609206. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1609206>
  - WU, A. Y. T., UEDA, K., & LAI, C. P. K. (2019). Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles for Cancer Diagnostics. *Proteomics*, 19(1–2), e1800162. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800162>
  - WU, Z., CHEN, G., ZHANG, J., HUA, Y., LI, J., LIU, B., HUANG, A., LI, H., CHEN, M., & OU, C. (2017). Treatment of Myocardial Infarction with Gene-modified Mesenchymal Stem Cells in a Small Molecular Hydrogel. *Scientific Reports*, 7(1), 15826. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15870-z>
  - XIAO, J., PAN, Y., LI, X. H., YANG, X. Y., FENG, Y. L., TAN, H. H., JIANG, L., FENG, J., & YU, X. Y. (2016). Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4. *Cell Death and Disease*, 7(6), e2277. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.181>
  - XU, R., GREENING, D. W., ZHU, H. J., TAKAHASHI, N., & SIMPSON, R. J. (2016). Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 11152-1162. <https://doi.org/10.1172/JCI81129>

- XU, X., LAI, Y., & HUA, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- YANG, L., WU, X. H., WANG, D., LUO, C. L., & CHEN, L. X. (2013). Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1272-1278. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1634>
- YANG, Y., LI, Y., CHEN, X., CHENG, X., LIAO, Y., & YU, X. (2016). Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia. *Journal of Molecular Medicine*, 94(6), 711-724. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1387-2>
- YEO, R. W. Y., LAI, R. C., ZHANG, B., TAN, S. S., YIN, Y., TEH, B. J., & LIM, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 336-341. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
- YU, X., DENG, L., WANG, D., LI, N., CHEN, X., CHENG, X., YUAN, J., GAO, X., LIAO, M., WANG, M., & LIAO, Y. (2012). Mechanism of TNF- $\alpha$  autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: Initiated by hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , presented by exosomes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 53(6), 848–857. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.10.002>
- ZABEO, D., CVJETKOVIC, A., LÄSSER, C., SCHORB, M., LÖTVALL, J., & HÖÖG, J. L. (2017). Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1329476. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1329476>
- ZHANG, J., MA, J., LONG, K., QIU, W., WANG, Y., HU, Z., LIU, C., LUO, Y., JIANG, A., JIN, L., TANG, Q., WANG, X., LI, X., & LI, M. (2017). Overexpression of exosomal cardioprotective miRNAs mitigates hypoxia-induced H9c2 cells apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 711. <https://doi.org/10.3390/ijms18040711>
- ZHANG, M., JIN, K., GAO, L., ZHANG, Z., LI, F., ZHOU, F., & ZHANG, L. (2018). Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*, 2(9), 1800021. <https://doi.org/10.1002/smt.201800021>
- ZHANG, Z., YANG, J., YAN, W., LI, Y., SHEN, Z., & ASAHARA, T. (2016). Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair. *Journal of the American Heart Association*, 5(1), e002856. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002856>

- ZHOU, B., XU, K., ZHENG, X., CHEN, T., WANG, J., SONG, Y., SHAO, Y., & ZHENG, S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 144. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00258-9>
- ZHU, H., GUARIGLIA, S., YU, R. Y. L., LI, W., BRANCHO, D., PEINADO, H., LYDEN, D., SALZER, J., BENNETT, C., & CHOW, C. W. (2013). Mutation of SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth 1C alters production of exosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 24(11), 1619-S3. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-07-0544>
- ZOU, W., LAI, M., ZHANG, Y., ZHENG, L., XING, Z., LI, T., ZOU, Z., SONG, Q., ZHAO, X., XIA, L., YANG, J., LIU, A., ZHANG, H., CUI, Z. K., JIANG, Y., & BAI, X. (2019). Exosome Release Is Regulated by mTORC1. *Advanced Science*, 6(3), 1801313. <https://doi.org/10.1002/advs.201801313>

## 10. ANEXOS

Anexo I.