

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**UTILIZACIÓN DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE ORIGEN VEGETAL
EN EL MANEJO DEL ENVEJECIMIENTO
CUTÁNEO**

Autora:

Alina Kilasoniya Marfina

Directoras:

Dra. D.^a María del Mar Martínez Senac

Dra. D.^a Anastasia Malek

Dra. D.^a Tatiana Shtam

Murcia, 30 de abril de 2023



AUTORIZACIÓN DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La **Dra. D.^a María del Mar Martínez Senac**, la **Dra. D.^a Anastasia Malek** y la **Dra. D.^a Tatiana Shtam** como directoras de la tesis doctoral titulada «UTILIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ORIGEN VEGETAL EN EL MANEJO DEL ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO» realizada por **D.^a Alina Kilasoniya Marfina** en el *Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud*, autorizan su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa. Lo que firmamos, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia a 30 de abril de 2023.

Dra. D.^a María del Mar
Martínez Senac

Dra. D.^a Anastasia
Malek

Dra. D.^a Tatiana
Shtam

«Y si alguno se imagina que sabe algo, aún no sabe nada como debe
saberlo. Pero si alguno ama a Dios, es conocido por él».
(1 Corintios 8:2-3).

RESUMEN

Esta tesis doctoral tiene por objetivo buscar entre Vesículas Extracelulares de Plantas, de diferentes fuentes, un transportador prometedor de moléculas exógenas bioactivas, que en el futuro podrían ser utilizadas como sistemas de entrega en el manejo del envejecimiento cutáneo, particularmente, en la aceleración de la cicatrización de heridas, reducción de la pigmentación de la piel, reducción de arrugas y prevención de la formación de cicatrices.

Las Vesículas Extracelulares de Plantas se aislaron y caracterizaron de zumo de tres vegetales y del medio de cultivo de clorella. Se han utilizado varias metodologías compatibles para evaluar el tamaño de las partículas, su concentración, morfología y potencial Zeta. La eficacia de cargar las Vesículas Extracelulares de Plantas con una proteína exógena se evaluó mediante fluorimetría, y la eficacia de su entrega a células humanas *in vitro* se valoró mediante citometría de flujo.

Los hallazgos resultantes posiblemente respaldarían su aplicación futura en medicina estética (tanto como mesoterapia como en forma de producto cosmético) y en particular en el manejo del envejecimiento o la administración de compuestos bioactivos. Los resultados refuerzan la evidencia publicada hasta la fecha en este campo relativamente nuevo de la ciencia y ofrece nuevos conocimientos a los investigadores en el área especialmente respecto de las Vesículas Extracelulares de Plantas de clorella y sobre las bases para la producción industrial de Vesículas Extracelulares de Plantas. Teniendo en cuenta la futura aplicación industrial de las Vesículas Extracelulares de Plantas, se deben realizar estudios clínicos para validar su seguridad, estabilidad y eficacia *in vivo* lo que requerirá posteriormente un análisis en profundidad del marco regulatorio.

PALABRAS CLAVE

Vesículas extracelulares de origen vegetal, exosomas, moléculas exógenas bioactivas., biotecnología de productos naturales, biología molecular de plantas, estética.

ABSTRACT

This PhD thesis aim to search among Plant Extracellular Vesicles from different sources for a promising carrier of exogenous bioactive molecules, which in the future could be used as delivery systems in the management of skin ageing, particularly in the acceleration of wound healing, reduction of skin pigmentation, reduction of wrinkles and prevention of scar formation.

Plant Extracellular Vesicles were isolated and characterized from three plant juices and chlorella culture medium. Several compatible methodologies have been used to assess particle size, concentration, morphology and Zeta potential. The efficiency of loading the Plant Extracellular Vesicles with an exogenous protein was assessed by fluorimetry, and the efficiency of their delivery to human cells *in vitro* was assessed by flow cytometry.

The resulting findings would possibly support their future application in aesthetic medicine (both as mesotherapy and as a cosmetic product) and in particular in the management of ageing or the delivery of bioactive compounds. The results reinforce the evidence published to date in this relatively new field of science and offer new insights to researchers in the area especially with regard to chlorella Plant Extracellular Vesicles and on the basis for the industrial production of Plant Extracellular Vesicles. Considering the future industrial application of Plant Extracellular Vesicles, clinical studies should be performed to validate their safety, stability and efficacy *in vivo* which will subsequently require an in-depth analysis of the regulatory framework.

KEYWORDS

Extracellular vesicles of plant origin, exosomes, exogenous bioactive molecules, biotechnology of natural products, molecular biology of plants, aesthetics.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin el apoyo entusiasta y decidido de muchas personas a las que quiero agradecer de manera expresa su apoyo y colaboración.

En primer lugar, debo agradecer a mi marido, al hombre que cambio mi vida, que exigió que hiciera el Doctorado, que me apoyó en todo el camino y que ha estado conmigo en todos los momentos difíciles y quien, a lo largo de los muchos momentos en los que dudé de mis capacidades, siempre creyó en mí, estuvo a mi lado y me animó a continuar.

A la UCAM, mi Universidad, a la que me siento unida desde que conocí a su Presidente José Luis Mendoza (QEPD), un ejemplo de vida, quien me becó para hacer el Doctorado y siempre se interesó por mis avances en el mismo. A María Dolores García, actual Presidenta, por ser fiel continuadora de la gran obra de su marido. A Josefina García, Estrella Núñez, Jerónimo Lajara y María del Mar Martínez por su apoyo y estímulo constantes.

A mis directoras Anastasia Malek y Tatiana Shtam, quienes me ayudaron en todo el camino investigador recorrido recordándome con frecuencia que «las cosas difíciles se pueden hacer de manera sencilla», quienes, además y especialmente, compartieron su conocimiento conmigo, y a quienes ya siento como de mi familia.

A mis compañeros del IDIBE, Nuria Martí y Domingo Saura, y a sus discípulos Bryan Moreno y Julio Salazar, con quienes comencé a adentrarme en la investigación básica que tanto me sirvió durante mi posterior estancia en Rusia.

Al equipo del Laboratorio de Tecnología Subcelular (N.N. Petrov NMRC de oncología, SPb) por permitirme participar en el curso de formación «Tecnologías nanovesiculares en oncología» y por la asistencia metodológica en los experimentos.

A los miembros del Instituto de Física Nuclear de Petersburgo B.P. Konstantinov del Centro Nacional de Investigación «Instituto Kurchatov» por haberme enseñado y dirigido en toda la parte experimental de esta tesis.

Mención especial merecen, por las circunstancias de todos conocidas en estos momentos, mis compatriotas rusas Anastasia Malek, Tatiana Shtam, Luiza Garaeva, Anastasiia Spitsyna, Elena Putevich, Elena Komarova, Yuri Garmay, Andrey L. Konevega y tantos otros compañeros en mis estancias en Gatchina y Pesochny.

A Dorsia, por haberme invitado a participar en la clínica Majadahonda Estética y por su paciencia entendiendo la importancia de no incorporarme a mis actividades clínicas hasta haber escrito este texto. A Manuel Fernández por haber contado conmigo para la dirección docente de la cátedra UCAM-Dorsia de innovación en medicina estética.

A Germán Cantero por las labores de edición, corrección e impresión de esta tesis.

Y, por encima de todo, a Dios por dar valor y sentido a toda mi vida.

ÍNDICE GENERAL

	RESUMEN	5
I	INTRODUCCIÓN	21
1.1.	ENVEJECIMIENTO	23
1.1.1.	Daño al ADN, mutaciones y alteraciones epigenéticas durante el envejecimiento	24
1.1.2.	Acumulación de proteína dañada y disfuncional con el envejecimiento	26
1.1.3.	Metabolismo energético, estrés oxidativo y funciones mitocondriales en el envejecimiento	27
1.1.4.	Senescencia celular	29
1.1.5.	Envejecimiento saludable	30
1.2.	ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO	31
1.2.1.	Mecanismo de envejecimiento a nivel celular y molecular	33
1.2.2.	Glicosilación en el envejecimiento	34
1.2.3.	Radicales libres en el envejecimiento	34
1.2.4.	Ciclo celular y envejecimiento	35
1.3.	VESÍCULAS EXTRACELULARES	36
1.3.1.	Definición	36
1.3.2.	Tipos	36
1.3.3.	Composición y biogénesis de las EVs	36
<i>1.3.3.1.</i>	<i>Composición</i>	<i>36</i>
<i>1.3.3.2.</i>	<i>Biogénesis</i>	<i>37</i>
1.3.4.	Funciones de las EVs	39
1.3.5.	Vesículas de origen vegetal (PEVs)	41
<i>1.3.5.1.</i>	<i>Métodos de aislamiento</i>	<i>41</i>
<i>1.3.5.2.</i>	<i>Almacenamiento y estabilidad de PEVs</i>	<i>42</i>
<i>1.3.5.3.</i>	<i>Características de las PEVs</i>	<i>43</i>
1.3.6.	Utilización de las PEVs en sistemas de suministro de biomoléculas exógenas	47
1.4.	ÁCIDO HIALURÓNICO	48
1.5.	ASPECTOS REGULATORIOS DE LAS VES	51

II	JUSTIFICACIÓN	57
III	OBJETIVOS	61
IV	MATERIAL Y MÉTODO	65
4.1.	SELECCIÓN DEL MATERIAL DE PARTIDA	67
4.2.	OBTENCIÓN DE PEVS A PARTIR DE ZUMO/MEDIO DE CULTIVO DE VARIAS FUENTES	68
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE PREPARADOS DE PEVS POR CONCENTRACIÓN, TAMAÑO, FORMA Y MORFOLOGÍA	72
4.3.1.	Caracterización por análisis de nanoseguimiento (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)	72
4.3.2.	Caracterización por forma de PEVs obtenidas (Atomic Force Microscopy, AFM)	74
4.3.3.	Caracterización de PEVs por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Potencial Zeta	75
4.3.4.	Líneas celulares y condiciones de cultivo	76
4.3.5.	Carga de PEVs con proteína exógena	76
4.3.6.	Evaluación de la eficiencia de la carga PEV	77
4.3.7.	Evaluación de la eficiencia de la entrega de proteína marcada con fluorescencia usando PEV a células humanas <i>in vitro</i>	77
4.3.8.	Cultivo celular con ácido hialurónico	78
4.3.9.	Real Time PCR (qPCR)	78
4.3.10.	Tratamiento de datos estadísticos	80
V	RESULTADOS	81
5.1.	EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN	83
5.2.	CALIFICACIÓN EN FORMA	84
5.3.	CLASIFICACIÓN DE TAMAÑO	90
5.4.	EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ZETA DE LAS PEVS	103
5.5.	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CARGA Y LA ENTREGA DE LA PROTEÍNA EXÓGENA POR LAS PEVS A LAS CÉLULAS HUMANAS <i>IN VITRO</i>	106
5.6.	INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DE LAS PEVS EN LA EFICIENCIA DE CARGA Y ENTREGA DE PROTEÍNA EXÓGENA A CÉLULAS HUMANAS <i>IN VITRO</i>	111
5.7.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PRODUCTORES DE PEVS	112
5.8.	CULTIVO CELULAR CON ÁCIDO HIALURÓNICO	114

VI	DISCUSIÓN	119
6.1.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	125
6.2.	CARACTERIZACIÓN DE PEVS	128
6.3.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PRODUCTORES DE PEVS	133
6.4.	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y EFICIENCIA DE LA CARGA Y LA ENTREGA DE PROTEÍNA EXÓGENA POR LAS PEVS A LAS CÉLULAS HUMANAS <i>IN VITRO</i>	137
6.5.	CULTIVO CELULAR CON ÁCIDO HIALURÓNICO	139
VII	CONCLUSIONES	143
VIII	LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	147
IX	ANEXO	151
X	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico

AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

AFM. Microscopio de fuerza atómica

AGE. Glicosilación avanzada

AGO1. Proteína Argonaut 1

ALE-B. Expectativa de vida promedio al nacer

AMPK. Quinasa activada por AMP

APC. Alofocianina

ARN. Ácido ribonucleico

AV. Vesículas apoplásticas

BCA. Ensayo del ácido bicinconínico

BCR-ABL. Gen de fusión

Col-7. Colágeno tipo VII

COTM. Enzima catecol-ortometil-transferasa

DAF-16. Factores de transcripción

DEAD-box. Helicasas de ARN

DLS. Dispersión dinámica de luz

DM2. Diabetes mellitus tipo 2

EA. Enfermedad de Alzheimer

EGF. Factor de crecimiento epidérmico

EP. Enfermedad de Parkinson

ER. Retículo endoplásmico

ESCRT-0. Complejo de clasificación endosomal requerido para transporte

FESEM. Microscopía electrónica de transmisión

FRTA. Teoría de los Radicales Libres del Envejecimiento

FYVE. Proteínas con (que contienen) dominios del tipo dedo

GAG. Glicosaminoglicano

GAPDH. Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

GDF/GTP Rabex-5. Complejo de intercambio trifosfato de guanosina

Gl-Tr. Celulas de glioma

HA. Ácido hialurónico

HAS-2. Sintasa de ácido hialurónico 2

H4K12. Histona 4 lisina 12

HSF-1. Factor de choque térmico-1

HSP. Proteínas de choque térmico

Hsp70. Proteínas de shock térmico de 70 KDa

IGF-1. Factor de crecimiento similar a la insulina 1

IIS. Insulina y vía de señalización

La GTPasa Rab. Proteínas activadoras de GTPasas

LDA. Anemometría láser Doppler

LM. Microscopía óptica

LMNA. Gen situado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q22)

lp53. Proteína supresora de tumores

miARN. MicroARN

mTOR. Diana de rapamicina en células de mamífero

MTT. Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl) 2,5 difeniltetrazolio

MV. Microvesículas

NAD⁺. Dinucleótido de nicotinamida y adenina

ncARN. ARN no codificante largo

NTA. Análisis de seguimiento de nanopartículas

NV. Nanovesículas

OMS. Organización Mundial de la Salud

p-AMPK Thr172. Fosforilación en la treonina 172

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

Pdl. Índice de polidispersidad

PEVs. Vesículas Extracelulares de Plantas

pRB. Proteína del retinoblastoma

rARN. ARM ribosómico

ROS. Especies reactivas de oxígeno

RR. Reacciones de radicales libres

SAS. Secretor asociado a la senescencia

SDS-PAGE. Electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida

SEC. Cromatografía de exclusión por tamaño

SEM. Microscopía electrónica de barrido

Sir2.1. Regulador de información silencioso 2.1

SIRT. Sirtuinas

SIRT1-7. Sirtuina 1-7

SISTEMAS CRISPR-Cas9. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

snARN. Pequeño ARN nuclear

snoARN. ARN de núcleo pequeño

TAG. Triacilgliceroles

tARN. ARN de transferencia

TET8. Tetraspanina 8

TFS. Tampón fosfato salino

TMH. Tamaños medios hidrodinámicos, en nm

UC. Ultracentrifugación

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1	Biogénesis de las EVs (Gurung <i>et al.</i> , 2021)	38
Figura 2	Vías de formación de PEVs (Cui <i>et al.</i> , 2020)	46
Figura 3	Distribución del tamaño correspondiente a las PEVs	73
Figura 4	Captura de vídeo de PEVs de clorella obtenidas por el sistema NTA	73
Figura 5	AFM de PEVs de tomate	74
Figura 6	Distribución por tamaño de PEVs de tomate por AFM	75
Figura 7	Distribución de radios hidrodinámicos de PEVs heterótrofos de clorella	76
Figura 8	Imágenes AFM de PEVs de clorella	85
Figura 9	Imágenes AFM de PEVs de pepino	86
Figura 10	Imágenes AFM de PEVs de pomelo	86
Figura 11	Imágenes AFM de PEVs de tomate	87
Figura 12	Distribución de altura y diámetro de las PEVs de clorella	88
Figura 13	Distribución de altura y diámetro de las PEVs de pepino, pomelo y tomate	88
Figura 14	Fotografía de microscopio electrónico de PEVs de pomelo	89
Figura 15	Fotografía de microscopio electrónico de PEVs de tomate	90
Figura 16	Datos de correlación de las PEVs de clorella medidas por DLS	93
Figura 17	Datos de correlación de las PEVs de pepino, pomelo y tomate medidas por DLS	94
Figura 18	Potencial Zeta de las PEVs de clorella en los 9 análisis realizados	104
Figura 19	Potencial Zeta de las PEVs estudiadas	104
Figura 20	Fluorimetría: Evaluación comparativa de la eficiencia de carga de las PEVs de la proteína HSP70-Alexa647	107
Figura 21	Cantidad de zumo/medio (ml) requerido para obtener una unidad teórica de fluorescencia	108
Figura 22	Citometría de flujo	109
Figura 23	Evaluación de la eficiencia de la entrega de HSP70-Alexa647 exógena usando PEVs a células humanas <i>in vitro</i> según la intensidad de la fluorescencia	110

Figura 24	Evaluación de la perspectiva de las PEVs cuando se utilizan en sistemas de transporte de moléculas bioactivas exógenas	113
Figura 25	Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) tras la exposición a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico (mcg/pocillo)	114
Figura 26	Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) tras raspado de fibroblastos dérmicos sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico (mcg/placa)	115
Figura 27	Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) de fibroblastos dérmicos sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico y PEVs de los productos estudiados	116
Figura 28	Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) de fibroblastos dérmicos raspados o no añadiendo PBS 2 % y sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico y PEVs de los productos estudiados	117
Figura 29	Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) de fibroblastos dérmicos raspados o no añadiendo PBS 5 % y sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico y PEVs de los productos estudiados	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros de centrifugación de la fuente vegetal (pomelo)	69
Tabla 2	Parámetros de UC de la fuente vegetal (pomelo)	70
Tabla 3	Parámetros de centrifugación subsiguiente de la fuente vegetal (pomelo)	71
Tabla 4	Fuente, cantidad de material inicial, volumen tras licuar y rendimiento (en ml/g)	72
Tabla 5	Eficiencia de la producción de PEVs por 100 ml de zumo/ medio de cultivo	84
Tabla 6	Distribución de las PEVs por tamaño, por AFM, con el valor medio indicado para cada producto (N=100)	89
Tabla 7	Distribución de TMH y modas (en nm) de las PEVs de los diferentes productos obtenidos por NTA	91
Tabla 8	Distribución comparativa del tamaño de las PEVs por los 2 métodos utilizados	92
Tabla 9	Datos numéricos de correlación de las PEVs de clorella medidas por LKS	95
Tabla 10	Datos numéricos de correlación de las PEVs de pepino, pomelo y tomate medidas por LKS	97
Tabla 11	Datos de correlación de las PEVs de pomelo medidas por DLS	101
Tabla 12	Datos de correlación de las PEVs de tomate medidas por DLS	102
Tabla 13	Datos de tamaño de las PEVs con los tres métodos utilizados	103
Tabla 14	Potencial Zeta de las PEVs de pomelo y tomate por DLS-PALS	105
Tabla 15	Tamaños de partícula, polidispersidad, peso molecular y potencial Z de PEVs de pomelo y tomate	106
Tabla 16	Número de células fluorescentes coincubadas con PEVs cargadas	110
Tabla 17	Efecto de los parámetros físicos de las PEVs en la eficiencia de su carga y entrega de biomoléculas exógenas a las células humanas	112
Tabla 18	Parámetros para evaluar la ventaja de las PEVs para su uso en sistemas de administración de biomoléculas exógenas	113
Tabla 19	Métodos utilizados para el aislamiento de MV, NV y AV derivadas de plantas de diferentes órganos, como frutas, flores, semillas, rizomas y hojas, y los rendimientos obtenidos	122

Tabla 20	Diferencias entre exosomas animales y PEVs	124
Tabla 21	Resumen de los datos analizados	133
Tabla 22	Tamaño y morfología de PEVs según diferentes estudios	134
Tabla 23	Dependencia de las diferentes técnicas de detección en las propiedades de PEVs (Valkonen <i>et al.</i> , 2017)	136

I INTRODUCCIÓN

I

INTRODUCCIÓN

1.1. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso biológico definido como una disminución de las funciones celulares y del organismo con el tiempo, que también conduce a diversos trastornos metabólicos, como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y el cáncer, y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Kirkwood, 2005).

Se han propuesto muchas teorías del envejecimiento, entre las que se incluyen la teoría genética o del ADN, la teoría de los radicales libres, la teoría neuroendocrina, la teoría de la membrana, la teoría del límite de Hayflick, la teoría de la telomerasa y la teoría del declive mitocondrial, entre otras (López-Otín *et al.*, 2013a).

Las características del envejecimiento son la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, los cambios epigenéticos, la pérdida de proteos-tasis, la detección de nutrientes desregulada, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la comunicación intercelular alterada. Estos se consideran factores generales y fenotipos del envejecimiento con respecto a que ocurren durante el envejecimiento normal, y su deterioro experimental acelera el envejecimiento, mientras que la atenuación lo retrasa. Estos procesos no son necesariamente independientes

entre sí y, a menudo, ocurren simultáneamente de manera interconectada. En general, sin embargo, la biología del envejecimiento es poco conocida y se han sugerido varios enfoques para mejorar la duración de la salud (Longo *et al.*, 2015).

El envejecimiento es causado por estresores celulares endógenos y exógenos, que reducen la capacidad innata de recuperación celular. Se origina gracias a cambios en la información genética, la estructura cromosómica y la homeostasis de las proteínas. Por ejemplo, el daño genómico, las alteraciones epigenéticas, el acortamiento de los telómeros y el deterioro de la proteostasis aumentan durante el envejecimiento de las células, los tejidos y los organismos, y la acumulación de daños en la célula puede acelerar aún más el proceso de envejecimiento. La senescencia celular, definida como la detención irreversible del ciclo celular, es otra característica importante del envejecimiento de las células. En fenotipos de envejecimiento, las especies reactivas de oxígeno (ROS) muestran efectos bifásicos complejos; aunque pueden ser beneficiosos en niveles óptimos, pueden ejercer efectos negativos cuando están presentes en exceso. La senescencia celular tiene algunos beneficios fisiológicos, como la represión de la tumorigénesis; sin embargo, la acumulación excesiva de células senescentes exacerba los efectos negativos del envejecimiento. Debido a la compleja interconexión entre los fenotipos y procesos de envejecimiento, ha resultado difícil desarrollar estrategias antienviejimiento óptimas. Los resultados recientes de estudios fitoquímicos sugieren un enfoque potencial para ralentizar el proceso de envejecimiento en humanos para reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con la edad, lo que puede mejorar la esperanza de vida y la salud (Hoenicke & Zender, 2012).

1.1.1. Daño al ADN, mutaciones y alteraciones epigenéticas durante el envejecimiento

El daño y las mutaciones del ADN son características clave del envejecimiento de las células tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford causado por una mutación en la lámina A/C (LMNA) (1824C > T), que activa un sitio de empalme críptico que da como resultado la expresión de lámina con 50 aminoácidos eliminados cerca de su C-terminal. Esta deleción provoca la prenilación con farnesilo permanente de la proteína lámina, que deforma la membrana nuclear, provocando la pérdida de heterocromatina y cambios en la metilación de las histonas (de Sandre-Gio-

vannoli *et al.*, 2003). El síndrome de progeria, una enfermedad genética asociada con una mutación puntual en el gen *LMNA*, muestra cómo la mutación de un solo gen puede causar envejecimiento en humanos. Las mutaciones del ADN mitocondrial también causan enfermedades degenerativas y envejecimiento (Wallace, 2005). Se han encontrado mutaciones de reordenamiento del ADN mitocondrial en pacientes que padecen enfermedades relacionadas con la edad, incluida la enfermedad arterial coronaria crónica (Corral-Debrinski *et al.*, 1992) y la EA. Por lo tanto, la mutación y el daño del ADN cromosómico y mitocondrial pueden causar envejecimiento.

En las células cultivadas, el daño al ADN se acumula con el tiempo, lo que acelera aún más el proceso de envejecimiento. Las células y los organismos tienen sistemas endógenos de reparación de ADN y eliminación de ROS; sin embargo, estos sistemas no funcionan de manera efectiva en las células que envejecen. Por lo tanto, el daño múltiple al ADN o al sistema de reparación conduce a una acumulación de daño en el ADN, lo que resulta en alteraciones epigenéticas que causan un envejecimiento prematuro (Lord & Ashworth, 2012).

El telómero es una región terminal de secuencias repetitivas de ADN en cada extremo del cromosoma, que lo protege del deterioro y evita la fusión con los cromosomas vecinos. La pérdida de telómeros es un importante biomarcador del envejecimiento celular y el acortamiento de los telómeros puede exacerbar las enfermedades relacionadas con la edad (Blackburn *et al.*, 2006). Se requiere una telomerasa para mantener la longitud de los telómeros durante la replicación del ADN. La falta de función de la telomerasa conduce a la pérdida de las secuencias de nucleótidos que protegen los telómeros, y el acortamiento de los mismos a menudo resulta en una reducción de la proliferación celular y la senescencia celular. Estudios recientes han revelado que los telómeros cortos median defectos hematopoyéticos e inmunológicos en pacientes con disqueratosis congénita. Los telómeros cortos tienen un gran efecto sobre la capacidad de replicación de las células madre en tejidos de alta rotación, como la médula ósea, lo que contribuye a acelerar el envejecimiento. La activación experimental de la telomerasa retrasa o revierte los fenotipos de envejecimiento en ratones. Estos hallazgos demuestran que los telómeros son fundamentales para proteger las células contra el proceso de envejecimiento (Olovnikov, 1996).

Además de las mutaciones y el daño al ADN, las alteraciones epigenéticas como la modificación de histonas, la remodelación de la cromatina y la

metilación del ADN ocurren progresivamente en las células de los individuos que envejecen y están asociadas con fenotipos de envejecimiento y al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (Heidi A, 2001). Dado que las alteraciones epigenéticas se pueden revertir, mientras que las mutaciones genómicas no, la reversión de las alteraciones epigenéticas es un objetivo potencial para el tratamiento destinado a retrasar el envejecimiento de las células (Freije & López-Otín, 2012). En este contexto, las enzimas sirtuinas (SIRT), que tienen proteínas desacetilasas dependientes de NAD⁺ y muestran actividades de ADP ribosiltransferasa, se han estudiado como un regulador crítico del envejecimiento. Por ejemplo, la regulación positiva de los homólogos de SIRT1 como *Saccharomyces cerevisiae*, el regulador de información silencioso 2.1 (Sir2.1) en *Caenorhabditis elegans*, dSir2 en moscas y SIRT6 en ratones mejora la esperanza de vida. Además, los inhibidores de la histona desacetilasa que invierten la acetilación de la histona H4K12 atenúan las enfermedades relacionadas con la edad y los defectos de la memoria en ratones que envejecen. Estos resultados sugieren que tanto el daño en el ADN como los cambios epigenéticos en genes clave pueden acelerar el envejecimiento (Kanfi *et al.*, 2012).

1.1.2. Acumulación de proteína dañada y disfuncional con el envejecimiento

Los factores estresantes metabólicos y ambientales, como el choque térmico, el estrés del retículo endoplásmico (ER) y el estrés oxidativo, provocan el envejecimiento debido a la acumulación de proteínas dañadas y disfuncionales, a su vez causadas por defectos en la vía autofágica, degradación proteasomal, o plegamiento mediado por chaperonas. Durante el envejecimiento, las proteínas se dañan progresivamente y la capacidad de proteostasis disminuye. Las redes de proteostasis deterioradas, que se reflejan en la síntesis, el plegamiento, el transporte, la condensación y la degradación de proteínas interrumpidas, desencadenan enfermedades relacionadas con la edad, como la EA y la EP (Powers *et al.*, 2009).

Las proteínas de choque térmico (HSP) son chaperonas de proteínas que modulan el plegamiento de proteínas en respuesta al estrés celular y también están involucradas en el envejecimiento. El factor de choque térmico-1 (HSF-1) y los factores de transcripción DAF-16 regulan las HSP. Además, su aumento induce HSP y extiende la vida útil de *C. elegans*. HSF-1 modula las HSP a través de la actividad SIRT1. SIRT1 desacetila HSF-1, y HSF-1 desacetilado muestra

una unión prolongada al promotor Hsp70 para aumentar la expresión del gen *HSP70*. Estos hallazgos sugieren que la activación transcripcional de las HSP puede prolongar la vida al inhibir el proceso de envejecimiento (Leak, 2014).

Las actividades de los sistemas de degradación de proteínas, como los sistemas de autofagia-lisosomal y ubiquitina-proteasoma, disminuyen progresivamente con el envejecimiento. La activación de la autofagia puede extender significativamente la vida útil en modelos animales experimentales. Por ejemplo, la administración de rapamicina induce macroautofagia y atenúa el envejecimiento en ratones. Del mismo modo, la activación de la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la regulación positiva de las proteínas asociadas con el sistema ubiquitina-proteasoma retrasan el envejecimiento en *C. elegans*. Estos hallazgos sugieren que la activación del catabolismo de proteínas retrasa el proceso de envejecimiento y puede aumentar la esperanza de vida (Rubinsztein *et al.*, 2011).

1.1.3. Metabolismo energético, estrés oxidativo y funciones mitocondriales en el envejecimiento

La restricción calórica por sí sola prolonga la vida útil en ratones, perros, peces, animales invertebrados y levaduras. La insulina y la vía de señalización (IIS) del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), que es uno de los sistemas de detección de nutrientes, son objetivos potenciales para retrasar el envejecimiento. La atenuación de la vía IIS prolonga la vida útil al reducir el crecimiento celular, la reproducción y la tasa metabólica, almacenando así energía para el mantenimiento del sistema (Fontana *et al.*, 2010).

Los niveles celulares de NAD⁺ y la activación de los sensores NAD⁺ juegan un papel fundamental en el proceso de envejecimiento. Las SIRT son desacetilasas dependientes de NAD⁺ (desacetilasas de histonas de clase III) que están muy conservadas en varios organismos. La primera SIRT se descubrió en la levadura y se denominó SIRT2. En organismos inferiores, como levaduras, gusanos y moscas, los genes que codifican SIRT están asociados con la extensión de la vida. Entre los siete SIRT de mamíferos (SIRT1–7), SIRT1 es el homólogo más cercano a SIRT2 en función de su identidad de aminoácidos, y su activación conduce a la extensión de la vida útil. Debido a los prometedores resultados obtenidos en organismos inferiores, se ha llevado a cabo una amplia investigación para investigar la función de las proteínas SIRT en los sistemas de los mamíferos.

Los sistemas de detección de nutrientes, incluida la quinasa activada por AMP (AMPK), SIRT y mTOR, también regulan el envejecimiento. AMPK es un activador maestro de vías catabólicas como la oxidación de ácidos grasos y suprime el metabolismo anabólico, incluida la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos, mejorando así la actividad de la insulina. Su actividad se correlaciona con la fosforilación en la treonina 172 (p-AMPK Thr172). La activación de AMPK se ha propuesto como una estrategia para promover la longevidad en los mamíferos, y la actividad de AMPK puede regularse en asociación con, o independientemente de, la actividad SIRT. La expresión ectópica de AMPK extiende la vida útil en *C. elegans*. Los estudios han sugerido que la disminución de la señalización anabólica (IIS y mTOR) y el aumento de la señalización catabólica (AMPK y SIRT) a través de la restricción calórica o los miméticos de la restricción calórica pueden mejorar la longevidad (Houtkooper *et al.*, 2010).

Las mitocondrias generan radicales de oxígeno en la cadena respiratoria, y la eficiencia de la cadena de transporte de electrones disminuye progresivamente con el tiempo en los organismos que utilizan oxígeno. De acuerdo con la teoría de los radicales libres, las mitocondrias disfuncionales conducen a una generación excesiva de ROS, lo que induce daño celular y envejecimiento. Aunque el estrés oxidativo está involucrado en diversos procesos biológicos, incluida la diferenciación, la inmunidad, la autofagia y la adaptación metabólica, los niveles excesivos de ROS exacerban el proceso de envejecimiento. Los ROS acumuladas de mitocondrias disfuncionales pueden provocar la activación del inflammasoma, y la inducción crónica de ROS da lugar a enfermedades relacionadas con la edad. Los defectos mitocondriales pueden inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial y promover la muerte celular mediante la liberación de citocromo c y el aumento de la expresión de proteínas proapoptóticas (Tschopp & Schroder, 2010).

Las bajas tasas de eliminación mitocondrial y biogénesis debido a múltiples factores, incluida la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial, las proteínas mitocondriales oxidadas, la inestabilidad de la cadena respiratoria y un desequilibrio entre la fisión y la fusión de las mitocondrias, tienen un efecto acumulativo sobre el envejecimiento. Sin embargo, el estrés mitocondrial leve causado por intervenciones dietéticas, restricción calórica o ejercicio físico prolonga la longevidad al aumentar la resistencia al estrés, lo que también se denomina hormesis mitocondrial o mitohormesis. Estos hallazgos sugieren que la detección de nutrientes y el metabolismo energético son importantes en el envejecimiento. La activación del catabolismo y la supresión

del anabolismo pueden retrasar el envejecimiento. Las mitocondrias juegan un papel crítico en el envejecimiento y los niveles excesivos de ROS también aceleran el proceso de envejecimiento (Sena & Chandel, 2012).

1.1.4. Senescencia celular

La senescencia, también conocida como envejecimiento celular, es el sello distintivo del envejecimiento e incluye la reducción de la capacidad regenerativa de las células. En este sentido, la senescencia celular parece ser perjudicial porque consiste en un defecto de renovación y funcionalidad de los tejidos. La senescencia celular es una detención irreversible del crecimiento por la cual las células dejan de replicarse; ocurre en las células somáticas y limita su vida útil proliferativa (Childs *et al.*, 2015).

La senescencia celular se define como la detención irreversible de la proliferación celular en respuesta a estímulos exógenos o endógenos. Promueve la eliminación de las células dañadas a través de la apoptosis y el sistema inmunitario, protegiendo así a los tejidos de la oncogénesis. Sin embargo, el aumento de la tasa de formación de células senescentes y la disminución de la tasa de su eliminación en individuos de edad avanzada conducen a la acumulación de células senescentes, que inducen el deterioro del microambiente tisular al secretar factores del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP), incluidas las citoquinas inflamatorias, interleucinas y factores de crecimiento (Kirkland & Tchkonja, 2020).

La inflamación crónica por factores SASP exacerba el envejecimiento al alterar las funciones de los macrófagos, las respuestas inmunitarias y la comunicación de célula a célula. Algunos supresores de tumores inducen la senescencia celular mediante la regulación de varias vías, incluido el ciclo celular, la señalización de daños en el ADN, la respuesta inmunitaria y el metabolismo energético. Por ejemplo, el supresor de tumores *p16 INK4a* (o *p19 ARF*) es un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina que ralentiza la proliferación celular y provoca la detención de G1 en el ciclo celular. Se han observado niveles elevados de *p16 INK4a* (o *p19 ARF*) en las células que envejecen y son los principales biomarcadores de la senescencia celular. Además, los inhibidores del locus *CDK 4a (INK4a)/ARF*, que codifica *p16 INK4a* y *p19 ARF*, se inducen en células senescentes y causan enfermedades relacionadas con la edad, como cáncer, DM2, glaucoma y enfermedades ateroscleróticas. Por otro lado, la activación óptima de las vías supresoras de tumores que inducen la senescencia

puede aumentar la longevidad. La activación de *p53* e *INK4a/ARF* inhibe la proliferación de células dañadas, confiriendo protección contra la oncogénesis. Estos hallazgos sugieren que la senescencia celular es un fenotipo importante del envejecimiento con efectos bifásicos. El control de la senescencia puede suprimir el proceso de envejecimiento y la tumorigénesis (Campisi & D'Adda di Fagagna, 2007).

1.1.5. Envejecimiento saludable

Con los grandes avances en medicina, salud pública, ciencia y tecnología, los adultos mayores ahora viven más que las generaciones anteriores. Sin embargo, vivir más no significa necesariamente ser más saludable. El envejecimiento saludable se define como «el proceso de desarrollar y mantener la capacidad funcional que permite el bienestar en la vejez». De hecho, el mantenimiento de la salud en la vejez se ha convertido en un importante desafío para la salud pública.

Hoy en día, el foco de la investigación en gerontología ha pasado de la extensión de la esperanza de vida a la extensión de la calidad de vida. Esto tiene relación con el objetivo de envejecimiento saludable propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que sugirió un enfoque en la optimización de la capacidad intrínseca de las personas a medida que envejecen. Este modelo innovador hace hincapié en una evaluación integral de los diferentes dominios de la capacidad intrínseca, que es una combinación de las capacidades físicas y mentales de los individuos, incluidos los dominios de la cognición, la función psicológica, sensorial, la vitalidad y la locomoción. Se ha sugerido que la evaluación de los adultos mayores en un enfoque holístico genera mejores resultados en comparación con el modelo tradicional de atención basado en la enfermedad (Stuck *et al.*, 1993).

Las dolencias relacionadas con la edad, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, son las principales causas de morbilidad y muerte en todo el mundo. Un proceso gradual de envejecimiento de las células, tejidos y órganos, acompañado de una disminución constante de la función, son incidentes normales en la vida útil de un organismo. Cuando los cambios relacionados con la edad ocurren gradualmente, las personas logran lo que se conoce como «envejecimiento exitoso», que es una condición en la que las personas mayores de sesenta, setenta y ochenta años no muestran una enfermedad o discapacidad significativa, mantienen una función

cognitiva muy buena o razonable y participan activamente. Extender la vida útil de los organismos es uno de los principales objetivos de la investigación sobre el envejecimiento. Sin embargo, recientemente, se ha puesto un mayor énfasis en mantener una mejor salud física y mental durante el envejecimiento debido a que un porcentaje considerable de personas mayores están desarrollando una variedad de enfermedades relacionadas con la edad (Stambler, 2017).

El conocimiento profundo del envejecimiento requiere un enfoque integral de todos los sistemas bioquímicos y fisiológicos. El fenotipo de envejecimiento de los humanos es altamente heterogéneo y puede definirse como un mosaico intrincado que es consecuencia de la interacción de numerosos eventos ambientales y estocásticos, y también de modificaciones genéticas y epigenéticas que se acumulan durante la vida. Aunque es una gran complejidad, el mecanismo molecular básico y las vías principales del envejecimiento están restringidas a unos pocos mecanismos y vías bioquímicos que también están muy conservados y son responsables de mantener la homeostasis de los tejidos. Se ha indicado que la dieta juega un papel fundamental en el proceso de envejecimiento. En este sentido, varios compuestos dietéticos, que se encuentran en frutas, verduras y especias, se han extraído y evaluado a lo largo de varios años por su capacidad terapéutica y antienvjecimiento (Davinelli *et al.*, 2012).

Encontrar formas de prevenir las enfermedades relacionadas con la edad es aún más importante porque el envejecimiento de la población se está disparando en el mundo como resultado de una mejor nutrición, antibióticos efectivos contra enfermedades infecciosas y una mejor atención médica. Por lo tanto, el desarrollo de intervenciones que disminuyan la tasa de envejecimiento y reduzcan o pospongan la incidencia de enfermedades debilitantes relacionadas con la edad sería de gran valor para mejorar la calidad de vida y reducir los costos médicos. Los estudios en modelos animales han demostrado que una variedad de intervenciones genéticas, dietéticas y farmacológicas mejoran la esperanza de vida. Algunas de las estrategias antienvjecimiento que prolongan la vida útil también pueden ser útiles para retrasar la aparición de enfermedades relacionadas con la edad (de Magalhães, 2012).

1.2. ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO

El envejecimiento de la piel es un proceso en el que la calidad de la piel se deteriora con la edad debido a los efectos sinérgicos del envejecimiento cronológico, el fotoenvejecimiento, la deficiencia hormonal y los factores ambien-

tales (Bologniar *et al.*, 1989). En el envejecimiento de la piel, hay una reducción en el número de fibroblastos que sintetizan colágeno y vasos que irrigan la piel, lo que conduce a un aumento de la laxitud y, por lo tanto, a la formación de arrugas (Castelo-Branco *et al.*, 1992).

La piel expuesta al sol conduce gradualmente a la flacidez de la piel. Esto conduce a la pérdida de fibrillas y colágeno tipo VII (Col-7) que retarda la unión entre la epidermis y la dermis y conduce a una piel extrínsecamente envejecida (Curtis *et al.*, 2005).

En la piel intrínsecamente envejecida, los cambios histológicos ocurren dentro de la capa de células basales debido a las influencias internas que producen la flacidez y el adelgazamiento de la piel (Makrantonaki & Zouboulis, 2007). Por otro lado, en pieles envejecidas extrínsecamente expuestas al sol debido a la acumulación de tejido elástico anormal en la dermis media y profunda, la elastosis solar o la radiación UV, aumentan la actividad del promotor de elastina que induce la actividad transcripcional del gen de elastina y disminuye la expresión la fibrilación que resulta en una fuerte deposición de fibras elásticas, que son distróficas y se acortan. Si el compuesto reticulado derivado de la lisina aumenta, entonces se confirma la piel fotoenvejecida (Bemstein *et al.*, 1996).

Hay varios trastornos de la piel que están asociados con el proceso de envejecimiento, que incluyen la susceptibilidad a las infecciones, la aparición de la piel y los trastornos neurodegenerativos. En general, hay dos factores responsables del envejecimiento de la piel: el factor interno y el factor externo. Los factores internos pueden deberse a la desaceleración del flujo sanguíneo y, cuando el nivel de humedad disminuye, finalmente se desarrollan líneas finas en la piel. Por otro lado, los factores externos también pueden ser la causa del envejecimiento, que incluyen el estrés oxidativo en el que hay una liberación de moléculas en el cuerpo que son altamente inestables y capaces de dañar toda la estructura celular. Fumar conduce a una pérdida de elasticidad de la piel que da como resultado un bronceado grisáceo de la piel, así como un envejecimiento más rápido de la misma (Morita, 2007). Sin embargo, existen numerosos signos y síntomas que pueden aparecer en la piel debido al envejecimiento de la piel, como hipotermia, flacidez de la piel, artritis severa y disminución de la actividad visual.

En general, se producen cuatro tipos de envejecimiento de la piel. El primero es el envejecimiento intrínseco que se caracteriza por una piel sin imperfecciones, suave, pálida, más seca y menos elástica con arrugas finas (Landau, 2007) y se produce dentro del propio tejido a través de reducciones

en la dermis de mastocitos, fibroblastos, producción de colágeno. El segundo tipo es el envejecimiento extrínseco que puede ser causado por la exposición extrema al sol (es decir, el fotoenvejecimiento) y varios factores exógenos, como las influencias prooxidantes y antioxidantes en la renovación celular a través de modificadores de la respuesta biológica neuroendocrino-inmune (Leyden, 1990) que afecta principalmente a la cara y el cuello. El tercero es el fotoenvejecimiento causado por la luz solar que comprende principalmente luz infrarroja (52-55 %), visible (44 %) y luz ultravioleta (3 %), que es dañina para la piel y es completamente absorbida por la capa de ozono. El cuarto es el envejecimiento hormonal que se caracteriza por la disminución de la síntesis de colágeno, el grosor de la piel, la hidratación de la piel y la función de barrera epidérmica.

El envejecimiento de la piel puede ocurrir en cualquier capa de la misma. La síntesis de colágeno y elastina de la piel disminuye en un 1 % cada año, lo que conduce a la desorganización del tejido conectivo. Este agotamiento de colágeno y elastina provoca el desarrollo de arrugas en la capa de la dermis (Lovell *et al.*, 1987).

Se han sugerido varias bases moleculares que justifican plenamente el mecanismo de la fisiopatología de la piel para su envejecimiento. Este proceso puede explicarse por la teoría de la senescencia celular o privación de la capacidad de reparación del ADN celular y pérdida de telómeros, mutaciones puntuales del ADN mitocondrial extranuclear, estrés oxidativo o anomalías existentes en los cromosomas, mutaciones de un solo gen, azúcar reducida, inflamación crónica, entre otros. En general, se ha documentado que los factores extrínsecos son la causa principal del envejecimiento de la piel y solo el 3 % de los factores de envejecimiento son contribuidos por factores intrínsecos (Zhang & Duan, 2018).

1.2.1. Mecanismo de envejecimiento a nivel celular y molecular

El análisis del envejecimiento a nivel molecular mediante cultivo celular se realizó en 1920 por Carrel, quien realizó un experimento sobre la base de fibroblastos de corazón de pollo en el que las células podían dividirse indefinidamente (Carrel & Ebeling, 1913). Cuando se retiraron del mecanismo *in vivo* y luego se colocaron en un ambiente *in vitro*, se volvieron inmortales. En 1960, Hayflick demostró que los fibroblastos humanos normales tienen una capacidad limitada para proliferar *in vitro* (Jenkins, 2002). Demostró que

las células normales pueden duplicarse en un número infinito de veces y después de la fase de crecimiento exponencial, dejan de dividirse, lo que se conoce como límite de Hayflick (Hayflick, 1965). El envejecimiento está asociado con dos procesos superpuestos que conducen a la muerte, uno es la degeneración progresiva de la célula y otro es la pérdida de la capacidad de regeneración.

A medida que comienza el fenómeno del envejecimiento de la piel, la capacidad regenerativa de los músculos de la piel de los mamíferos disminuye debido a la disminución gradual de las células satélite, las células madre musculares, que experimentan disminuciones relacionadas con la edad en las capacidades proliferativas y miogénicas (Chaudhary *et al.*, 2019).

La degeneración proliferativa y la regeneración de las células son constantes en condiciones normales en cada etapa de la vida. Sin embargo, en la homeostasis mitótica se produce el reemplazo de las células dañadas y la preservación de la integridad funcional de las células y los tejidos. El mecanismo de degeneración se debe a la generación de ROS y glicosilación no enzimática de proteínas con pérdida del acortamiento de la telomerasa proliferativa y regenerativa y apoptosis. Esto simplifica el papel de los factores exógenos y endógenos en términos del proceso de envejecimiento.

1.2.2. Glicosilación en el envejecimiento

La degeneración celular relacionada con la edad implica la acumulación de productos finales de glicosilación avanzada (AGE). La producción de AGE en el colágeno conduce a la reticulación, como la expansión del empaquetamiento molecular, anomalías en la matriz extracelular, alteración de la interacción célula-matriz. Los AGE también se unen a receptores específicos en las células inmunitarias, lo que desencadena la liberación de mediadores inflamatorios y la generación de ROS conduce a un aumento en la producción de daños por AGE (Ly *et al.*, 2000).

1.2.3. Radicales libres en el envejecimiento

En la Teoría de los Radicales Libres del Envejecimiento (FRTA), la participación de los radicales libres en las reacciones metabólicas endógenas fue propuesta en 1954 (Harman, 1992). La FRTA sugiere que el proceso común de envejecimiento es el inicio de reacciones de radicales libres (RR). Después de

eso, se incluyeron algunas sugerencias como que la mayoría de las reacciones de radicales libres fueron iniciadas por las mitocondrias a un ritmo creciente con la edad, y que la duración de la vida está determinada por la tasa de daño de los radicales libres a las mitocondrias (Harman, 1992).

Las mejoras en las condiciones generales de vida aumentaron la expectativa de vida promedio al nacer (ALE-B) al disminuir las RR asociadas con condiciones de vida subóptimas o, por ejemplo, con antioxidantes como la vitamina E. Además, sus tasas de iniciación pueden reducirse al minimizar el cobre, el hierro y otros catalizadores oxidantes, que pueden reducir la tasa de formación de cambios de envejecimiento y disminuir la tasa de envejecimiento y de la patogénesis de la enfermedad (Commoner B, 1954).

1.2.4. Ciclo celular y envejecimiento

La atrofia de órganos o tejidos es una característica bien reconocida del envejecimiento que puede destruir genes para construir órganos debido a la mala circulación, pérdida de apoyo hormonal, disminución de la actividad física y estilo de vida menos activo. En los últimos años, el mecanismo del envejecimiento incluye la capacidad regenerativa reducida que involucra dos procesos para el control del ciclo celular que incluyen la regulación de la proliferación celular y la inducción de la proliferación y muerte celular programada (Golias *et al.*, 2004).

La telomerasa son fragmentos de ADN que forman los extremos de los cromosomas que se extienden hasta 12000 pares de bases, lo que protege la estabilidad de los mismos, de la degradación y la reorganización. En las células somáticas normales, la telomerasa se acorta durante la replicación del ADN a 100 pares de bases por división celular debido a que la ADN polimerasa no puede replicar por completo el extremo 3 del ADN lineal, lo que se denomina problema de replicación final. El acortamiento de la telomerasa disminuye a medida que los fibroblastos humanos se dividen, lo que lleva a la formación de arrugas. La telomerasa acortada daña el ADN que inicia las vías p53 y pRB (Buckingham & Klingelutz, 2011).

El acortamiento de la telomerasa en el envejecimiento conduce a la contribución de la apoptosis, que en el envejecimiento está estrechamente relacionada con la regulación del ciclo celular con un vínculo proporcionado por la proteína p53 que tiene la capacidad de inducir la apoptosis cuando el ADN se daña y estos daños se acumulan durante el envejecimiento (Moyzis *et al.*, 1988).

1.3. VESÍCULAS EXTRACELULARES

1.3.1. Definición

El término vesículas extracelulares (EVs) se introdujo por primera vez en 2011, aunque la primera evidencia de la existencia de estas vesículas se describió en la década de 1960 (György *et al.*, 2011; Wolf, 1967). En la actualidad, se entiende que las EVs son partículas de tamaño nanométrico rodeadas por una bicapa lipídica, que contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (AN), y que se secretan en el espacio extracelular.

Recientemente, las EVs de distinto origen han atraído la atención de la comunidad científica no sólo como objeto de investigación fundamental, sino también como posibles biomarcadores de la patogénesis de diversas enfermedades, como candidatos a fármacos y potenciales portadores de moléculas bioactivas (Garaeva *et al.*, 2021).

1.3.2. Tipos

En general, se distinguen tres tipos de EVs (Pegtel & Gould, 2019):

1. Microvesículas (o micropartículas o ectosomas) - desprendidas de la membrana plasmática, su tamaño es de 100-1000 nm.
2. Cuerpos apoptóticos: son fragmentos de células delimitados por la membrana plasmática que aparecen como resultado de la apoptosis
3. Exosomas: partículas de membrana extracelular de 30-100 nm, de origen endocítico, que se forman durante la formación de los cuerpos multivesiculares y se secretan en el espacio extracelular como resultado de la fusión con la membrana plasmática.

1.3.3. Composición y biogénesis de las EVs

1.3.3.1. Composición

La composición de las proteínas, los lípidos, los microARN y los ARN de la matriz transportados por los exosomas depende en gran medida de su origen, así como del estado fisiológico de la célula madre. En general, todos los exosomas contienen, GTPasas Rab, moléculas de adhesión y receptores, anexi-

nas, que regulan la fusión de su membrana con la membrana celular, y proteínas ESCRT (complejo de clasificación endosomal, diseñado para el transporte intracelular de proteínas y ARN). El principal marcador de los exosomas son las proteínas transmembránicas CD63, CD81 y CD9 de la familia de las tetraspaninas. Además, están presentes las proteínas de choque térmico, también conocidas como proteínas de estrés (HSP60, HSP70, HSP90) (Garcia *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Adicionalmente, los exosomas pueden contener proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su membrana. La membrana del exosoma está compuesta por componentes lipídicos como la esfingomielina, el colesterol y las ceramidas, que influyen en la clasificación de la carga, la secreción del exosoma, la estructura y la transducción de señales (Skryabin *et al.*, 2020).

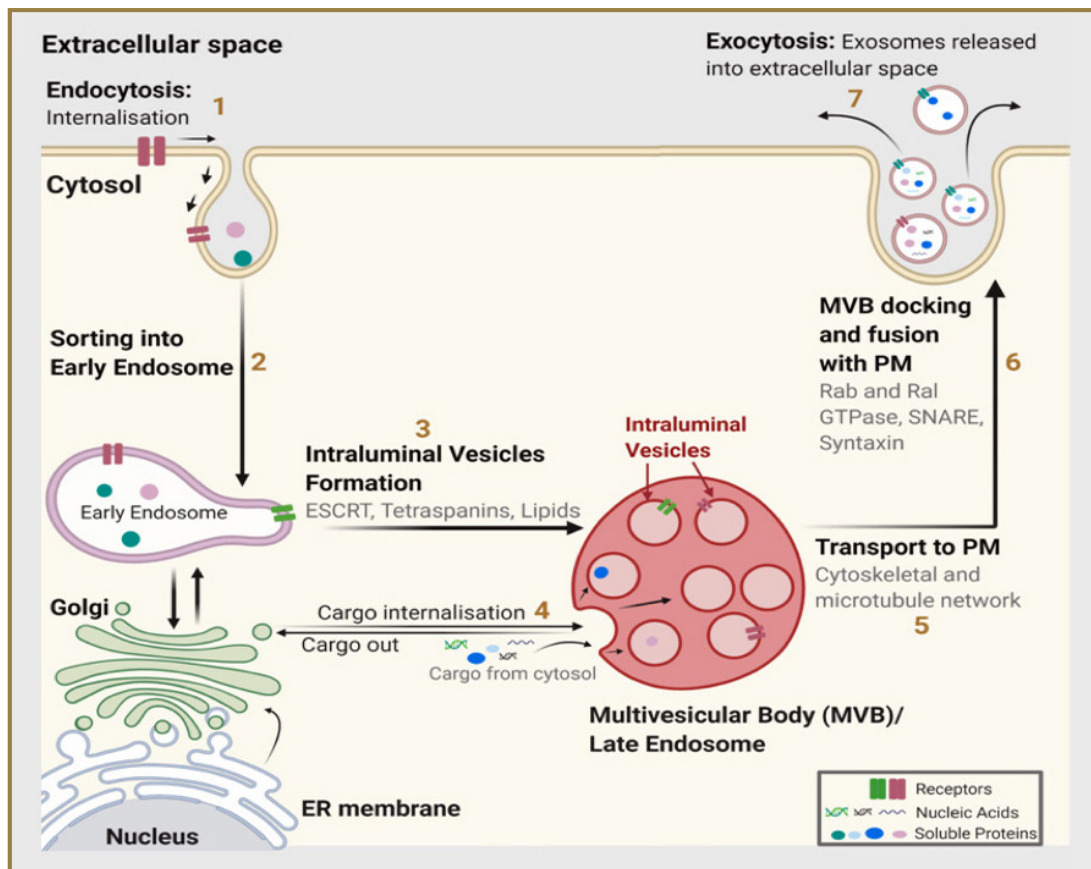
Los exosomas también incluyen los siguientes ARNs: ribosómico (rARN), microARN (miARN), ARN no codificante largo (ncARN), ARN de transferencia (tARN), pequeño ARN nuclear (snARN), ARN de núcleo pequeño (snoARN) (Skotland *et al.*, 2019).

1.3.3.2. Biogénesis

Como se observa en la figura 1, en el primer paso de la biogénesis de los exosomas, se forman los endosomas tempranos por invaginación de secciones de la membrana plasmática que contienen receptores de superficie ubiquitinilados. La proteína Rab5, que regula la fusión temprana de las membranas de las endosomas, se une al endosoma formado, permitiendo que las proteínas efectoras comiencen a actuar. La rabenosina-5 forma el complejo de intercambio GDF/GTP Rabex-5, que estabiliza la forma activa de Rab5, media la posterior fusión de membranas y proporciona una plataforma para el reconocimiento de las proteínas que contienen el dominio FYVE. Esto da lugar a la unión del complejo formado al dominio FYVE de una proteína que forma parte del complejo proteico ESCRT-0 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Dicha unión conduce al ensamblaje de otras partes del complejo ESCRT-0 en la membrana endosomal formada, que a su vez inicia el ensamblaje de los complejos ESCRT-I y ESCRT-II que median la invaginación posterior de la membrana en un cuerpo multivesicular recién formado y la formación del complejo ESCRT-III responsable de la formación final de microvesículas y su desprendimiento en la cavidad del cuerpo multivesicular (Henne *et al.*, 2011; Raiborg & Stenmark, 2009).

Figura 1

Biogénesis de las EVs (Gurung et al., 2021)



Dentro del sistema endosomal, [1] las cargas internalizadas se clasifican [2] en endosomas tempranos, [3] que luego maduran en endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares. Los endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares son compartimentos endosómicos especializados ricos en vesículas intraluminales, que secuestran proteínas, lípidos y compartimentos citosólicos y posibles cargas de exosomas. [4] También se liberan cargas desde la red trans-Golgi y posiblemente desde el citosol. [5] Los cuerpos multivesiculares que contienen cargas de exosomas se transportan a la membrana plasmática, [6] se fusionan con la superficie celular y [7] las vesículas intraluminales se secretan como exosomas. ER: retículo endoplásmico; MVB: cuerpos multivesiculares; PM: Membrana plasmática.

La GTPasa Rab desempeña un papel importante en el transporte de vesículas entre compartimentos intercelulares y está implicada en la entrega de cuerpos microvesiculares a la membrana plasmática para la liberación de exosomas. Así, Rab7 participa en la degradación de los cuerpos microvesiculares por los lisosomas; Rab6 es responsable del transporte de cuerpos microvesiculares al aparato de Golgi; Rab27a y Rab27b median la secreción de exosomas al espacio extracelular. Los complejos SNARE son necesarios para la fusión de los cuerpos microvesiculares con la membrana plasmática (Zhen & Stenmark, 2015).

En el espacio extracelular, las EVs son reconocidas por las células diana por sus componentes de superficie. Las EVs pueden transmitir información a las células diana actuando sobre la superficie celular sin aportar contenido (Tkach *et al.*, 2017). Sin embargo, la función principal de las EVs es su transferencia de carga a las células diana sin degradación.

La captación de EVs por parte de las células diana puede dividirse en 3 pasos: la focalización en la célula diana, la formación de un punto de entrada y la posterior captación del contenido por parte de la célula diana mediante la fusión de la membrana.

1.3.4. Funciones de las EVs

Las EVs se caracterizan por una gran variedad de funciones que implican una regulación genética y epigenética. La señalización intercelular a través de EVs se incorpora a los siguientes procesos: supresión inmunitaria, inflamación, presentación de antígenos, crecimiento tumoral, metástasis y angiogénesis, información genética, morfogénesis, transporte de virus, etc. El funcionamiento epigenético se extiende a la adhesión celular, la coagulación de la sangre, la eliminación de los «desechos» celulares y la protección contra el estrés, influencia sobre los vasos sanguíneos (Skotland *et al.*, 2019).

Las EVs no sólo participan en los procesos fisiológicos, sino también en los patológicos. Por ejemplo, se cree que las EVs están implicadas en la progresión de los trastornos neurodegenerativos, debido a la propagación de formas agregadas de varias proteínas específicas por todo el cuerpo (Braak *et al.*, 2003). Por ejemplo, las EVs que transportan proteínas agregadas se encuentran en el líquido cefalorraquídeo y en la sangre del paciente en la EP, EA, Creutzfeldt-Jakob y esclerosis lateral amiotrófica (Brettschneider *et al.*, 2015).

Varios estudios han informado de que, en la EP, las EVs desempeñan un papel importante en el transporte de sinucleína y microARN asociados a la enfermedad, y la determinación de los niveles de α -sinucleína en los exosomas del suero de los pacientes podría permitir un diagnóstico temprano de la enfermedad (Wu *et al.*, 2017).

Sin embargo, una de las mayores áreas de investigación sobre las EVs está relacionada con la propagación de tumores cancerosos. Según muchos estudios, los exosomas estimulan la metástasis y regulan la respuesta inmunitaria del tumor (lo Cicero *et al.*, 2015). Además, los exosomas secretados por las células tumorales son capaces de interactuar con células distantes y formar

nichos premetástáticos (Costa-Silva *et al.*, 2015; Hood *et al.*, 2011; Peinado *et al.*, 2012).

El hecho de que los exosomas sean producidos por un gran número de células y faciliten la transferencia horizontal dirigida de información genética indica que las EVs son candidatas adecuadas para el transporte de moléculas bioactivas. A diferencia de los sistemas de administración liposomal, los exosomas son fuentes naturales y, por tanto, es menos probable que causen reacciones tóxicas e inmunitarias. Además, los exosomas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica pero no atraviesan la barrera placentaria (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011).

La compleja composición de las membranas de las EVs (que contienen muchas proteínas receptoras) desempeña un papel importante en su interacción con las células diana. Por ejemplo, las vesículas sólo lipídicas no se fusionan con la membrana celular, lo que indica la importancia de los componentes proteicos en la composición lipídica de las EVs (Subra *et al.*, 2007).

Basándose en todo lo anterior, se puede suponer que el uso de las EVs es prometedor no sólo para fines de diagnóstico, sino también para fines terapéuticos. Hasta la fecha, se han dedicado muchas investigaciones al estudio de los exosomas como portadores de sustancias terapéuticas.

Existen varios métodos diferentes para cargar los exosomas con biomoléculas exógenas. El método más sencillo es la incubación de un fármaco con exosomas. Sin embargo, este método es poco eficaz y sólo es adecuado para fármacos hidrofóbicos capaces de penetrar a través de la capa bilipídica (Sun *et al.*, 2010). Los métodos activos como el ultrasonido, la electroporación, la transfección y la congelación/descongelación son más eficaces. Se basan en la deformación de la bicapa, que permite que los fármacos penetren en el exosoma por difusión, tras lo cual la capa bilipídica se restablece rápidamente (Kim *et al.*, 2016; Pascucci *et al.*, 2014). Muchos estudios han demostrado que los exosomas cargan, transportan y entregan con éxito moléculas exógenas como: siRNAs (Didiot *et al.*, 2016; El-Andaloussi *et al.*, 2012; Wahlgren *et al.*, 2012), sistemas CRISPR-Cas9 (Kim *et al.*, 2017), mRNAs (Deregibus *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2020), microRNAs (Ohno *et al.*, 2013; Zhuang *et al.*, 2016a) y proteínas (Robbins & Morelli, 2014) a las células. Por ejemplo, un grupo de investigadores utilizó la transfección de células de donantes para producir exosomas capaces de suministrar Imatinib o siRNAs de BCR-ABL a las células de Mieloma Linfóide Crónico. Así, los exosomas modificados que contienen IL3-Lamp2B y están cargados con Imatinib son capaces de dirigirse a las células tumorales in

vivo y reducir el tamaño del tumor canceroso. Además, este estudio demostró que el siARN de BCR-ABL se entregaba a las células resistentes a Imatinib mediante exosomas (Bellavia *et al.*, 2017).

Sin embargo, el uso de EVs aisladas de fluidos biológicos humanos como portadoras de moléculas terapéuticas tiene varias limitaciones, sobre todo debido al pequeño rendimiento de las partículas, que hace imposible su uso a escala de producción industrial. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de un agente de administración de fármacos alternativo. Así, las vesículas derivadas de plantas (PEVs) se consideran una fuente alternativa de EVs (Nemati *et al.*, 2022).

1.3.5. Vesículas de origen vegetal (PEVs)

1.3.5.1. Métodos de aislamiento

A pesar de que el interés por las PEVs ha crecido en los últimos años, aún no existe un protocolo estandarizado de aislamiento. Para aprovechar el potencial que ofrecen las PEVs, es necesario elegir el método adecuado de aislamiento y un material de salida apropiado. Las PEVs se pueden aislar de varios tipos de material vegetal, incluidos zumos, fluidos apoplásticos, mezclas de plantas homogeneizadas o cultivos de tejidos vegetales. Para el aislamiento de fluidos apoplásticos, es necesario utilizar toda la planta intacta. Para la preparación de mezclas y cultivos de tejidos, se puede utilizar toda la planta, pero también solo tallos, hojas, raíces, semillas o zumos (Rutter *et al.*, 2017).

Un método comúnmente utilizado para el aislamiento de PEVs a partir de diversos materiales vegetales es la ultracentrifugación. Aunque en los últimos años han surgido métodos alternativos (Chernyshev *et al.*, 2022) de aislamiento de PEVs, incluidos métodos de precipitación con polietilenglicol, cromatografía en gel y métodos de inmunofinidad, la ultracentrifugación sigue siendo el método de aislamiento de PEVs más utilizado (Suharta *et al.*, 2021).

La ultracentrifugación es una técnica físico-química de separación de partículas que utiliza la fuerza centrífuga relativa. Durante la centrifugación, cada partícula de la solución se expone a la fuerza centrífuga debido al dispositivo giratorio. Las partículas sedimentan según sus propiedades físicas, la viscosidad de la muestra y la cantidad de fuerza centrífuga. Dada su viscosidad y fuerza de la centrífuga, cada partícula sedimenta proporcionalmente a su peso molecular y a la diferencia entre la densidad de partículas y la densidad de dispersión (Bezouška, 2010). El proceso de aislamiento de PEVs mediante

ultracentrifugación diferencial comienza con una serie de pasos de centrifugación purificadora diseñados para eliminar las células y sus residuos, cuerpos apoptóticos y microvesículas. Después del último paso de purificación, se toma un sobrenadante que contiene una alta concentración de PEVs y se purifica mediante centrifugación de alta velocidad (10000–150000 × g). Dado que la ultracentrifugación también sedimenta contaminantes como proteínas, otras vesículas o agregados de proteínas de ARN, existe una variación de este protocolo, utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad (sacarosa o yodixanol) para la separación de subtipos de PEVs (Sidhom *et al.*, 2020). La centrifugación en gradiente de densidad puede producir VEs de alta calidad (Osteikoetxea *et al.*, 2015).

La ultracentrifugación a veces se complementa con la ultrafiltración que consiste en el uso de membranas con un tamaño de poro específico, a través de las cuales solo pueden pasar partículas de cierto tamaño. Cuando la filtración complementa la ultracentrifugación, se utilizan filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm o 0,45 µm (Maas *et al.*, 2017).

1.3.5.2. Almacenamiento y estabilidad de PEVs

La estabilidad y las funciones fisiológicas de las PEVs aisladas se ven afectadas por su adecuada conservación y almacenamiento. Entre los ectosomas, exosomas y cuerpos apoptóticos, los exosomas han demostrado ser las vesículas más estables. Se demostró que las EVs aumentan la estabilidad de sus moléculas de carga y, por lo tanto, pueden aumentar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos. Ya se demostró que las PEVs pueden resistir las enzimas en los fluidos digestivos, por lo que su contenido permanece protegido (Mu *et al.*, 2014a).

En estado óptimo, es decir, EVs recién aisladas, generalmente se recomienda almacenarlas a -80 °C hasta 1 año. Los ciclos repetidos de congelación y descongelación pueden afectar su identidad estructural y sus biofunciones. El estudio publicado por Richter *et al.*, (2019) ha demostrado que la recuperación de partículas fue mejor en el caso de vesículas almacenadas a -80 °C y 4 °C que en vesículas liofilizadas. Por otro lado, se recomendó el almacenamiento por liofilización de EVs al analizar biomarcadores de EVs, donde es importante mantener la integridad de las vesículas.

El método de almacenamiento y aislamiento puede estar relacionado con la formación de agregados de PEVs no deseados. Se estableció que los métodos

estándar de aislamiento de EVs, como la ultracentrifugación, tienden a inducir la agregación de partículas. Aunque la agregación se observa a menudo en las EVs de mamíferos, en los estudios centrados en las PEVs rara vez se menciona la agregación. Para garantizar la actividad biológica para aplicaciones posteriores, es crucial preservar las características físicas de las PEVs. Además, la presencia de agregados de PEVs puede dificultar o incluso imposibilitar el uso de ciertos métodos analíticos (Stremersch *et al.*, 2016). (Bosch *et al.*, 2016) suprimió la formación de agregados añadiendo trehalosa al material de partida durante el aislamiento

1.3.5.3. Características de las PEVs

Se cree que las PEVs forman una población heterogénea de vesículas con diferentes orígenes, incluidos cuerpos multivesiculares (MVB), autofagosomas, vacuolas y orgánulos positivos para exoquistes (EXPO). Las EVs se pueden caracterizar por sus propiedades físicas, como el tamaño o la carga superficial, así como por sus propiedades biológicas, predominantemente por el contenido de diferentes biomoléculas (proteínas, lípidos y pequeños ARN). Las características de las nanovesículas, como la carga negativa y el contenido de lípidos y proteínas de las PEVs, pueden afectar las interacciones y también los efectos resultantes de las PEVs en las células de mamíferos. Para mantener las funcionalidades fisiológicas de las PEVs, es necesario mantener intacta su membrana. La integridad de las EVs es sensible a los cambios de temperatura y pH (Robinson *et al.*, 2016).

El tamaño de las PEVs suele oscilar entre 30 y 1000 nm y depende del material de origen y del método de aislamiento. Las PEVs muestran un valor de potencial Zeta de -100 mV a 30 mV (Woith *et al.*, 2021).

La composición lipídica de la membrana de la vesícula es un componente importante, ya que participa en las interacciones intercelulares, así como en el mantenimiento de la estabilidad de la vesícula en condiciones fisiológicas y patológicas. Las vesículas de mamíferos son ricas en colesterol, ceramidas, glicoesfingolípidos y fosfatidilserina. Por el contrario, las PEVs se componen principalmente de ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, digalactosildiácilglicerol, monogalactosildiácilglicerol y fitoesteroides (Liu *et al.*, 2020). La composición de la membrana depende del origen de las PEVs y la presencia de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina puede mejorar las actividades antioxidantes, anticólicas y antiinflamatorias de las vesículas extracelulares. Se supone que existen

algunas vías específicas de ligando-receptor entre las PEVs y las células de mamífero, sin embargo, los mecanismos de administración e internalización de las PEVs aún no se han descrito suficientemente (Wang *et al.*, 2006).

En las PEVs se encuentra un perfil específico de proteínas, dependiendo del origen de las vesículas y del estado fisiológico de la planta. Es necesario mencionar que para obtener una población homogénea de PEVs de varios aislamientos, es necesario cultivar plantas (la fuente de PEVs) en condiciones estrictamente definidas y estables, ya que la presencia de componentes individuales puede variar según las condiciones de cultivo (Kubátová *et al.*, 2019). En paralelo a los lípidos de membrana, las proteínas también participan en la comunicación intercelular mediada por PEVs. La concentración de proteínas PEVs es baja, incluidas las proteínas citosólicas y de membrana, como los canales iónicos y los transportadores dentro de la membrana. Las proteínas que se encuentran en las vesículas vegetales son principalmente enzimas metabólicas, actinas, anexinas, acuaporinas, coatómeros, clatrininas, proteínas Rab, proteínas de choque térmico (HSP), syntaxinas, patelinas y ubiquitinas. Debido a la pequeña cantidad de análisis proteómicos realizados en PEVs, no se conocen muchos marcadores de EVs de plantas estandarizados. Pinedo *et al.* (2021) describe los marcadores de PEVs, incluidos HSP70, GAPDH, TET8 y S-adenosil-homocisteasa, aunque se necesitan más investigaciones en esta área.

Como ya se mencionó, las vesículas extracelulares de las plantas pueden servir como mecanismo de transporte para los ARNs. Las EVs derivadas de diferentes plantas pueden contener varias moléculas de ARN pequeñas, generalmente de 21 a 25 nucleótidos de largo, que pueden regular las funciones biológicas, como la comunicación entre reinos vegetal y animal a través de genes dirigidos en el genoma de los mamíferos (Yang *et al.*, 2020a).

El mecanismo de captación de ARN de vesículas extracelulares de plantas por parte de células de mamíferos aún no se comprende completamente. Sin embargo, hallazgos recientes prueban que las PEVs son capaces de entregar sRNA en las células diana (Wang *et al.*, 2013a). Recientemente, se encontraron en PEVs proteínas de unión a ARN, como la AGO1, DEAD-box y anexinas. Estas proteínas asociadas a PEVs se unen específicamente a pequeños ARN enriquecidos con PEVs y se colocalizan con cuerpos multivesiculares en la célula, donde el complejo de proteína de unión a ARN-sRNA se empaqueta en PEVs (He *et al.*, 2021a). Aunque los ARN de las vesículas de mamíferos se han caracterizado bien, el contenido y las funciones de los ARN en las PEVs también necesitan más investigación.

Además de otros compuestos, las PEVs pueden transportar metabolitos secundarios según la fuente de la vesícula. Estas moléculas activas naturales que tienen efectos antioxidantes, antitumorales o inmunomoduladores pueden transferirse a través de PEVs y, por lo tanto, pueden promover algunos de sus efectos beneficiosos en las células diana. Los metabolitos secundarios de las plantas solo son específicos para las PEVs, lo que les otorga un valor adicional. Se han publicado estudios para resaltar la promoción de los efectos de las PEVs, como la reducción de la inflamación, el apoyo al crecimiento de la microflora intestinal o la prevención del cáncer y la infección, debido a la aplicación de metabolitos secundarios que transportan (Dou *et al.*, 2013). Debido a la presencia de metabolitos secundarios en las PEVs, es posible predecir los efectos beneficiosos de estas vesículas en las células de los mamíferos, aunque se necesita más investigación.

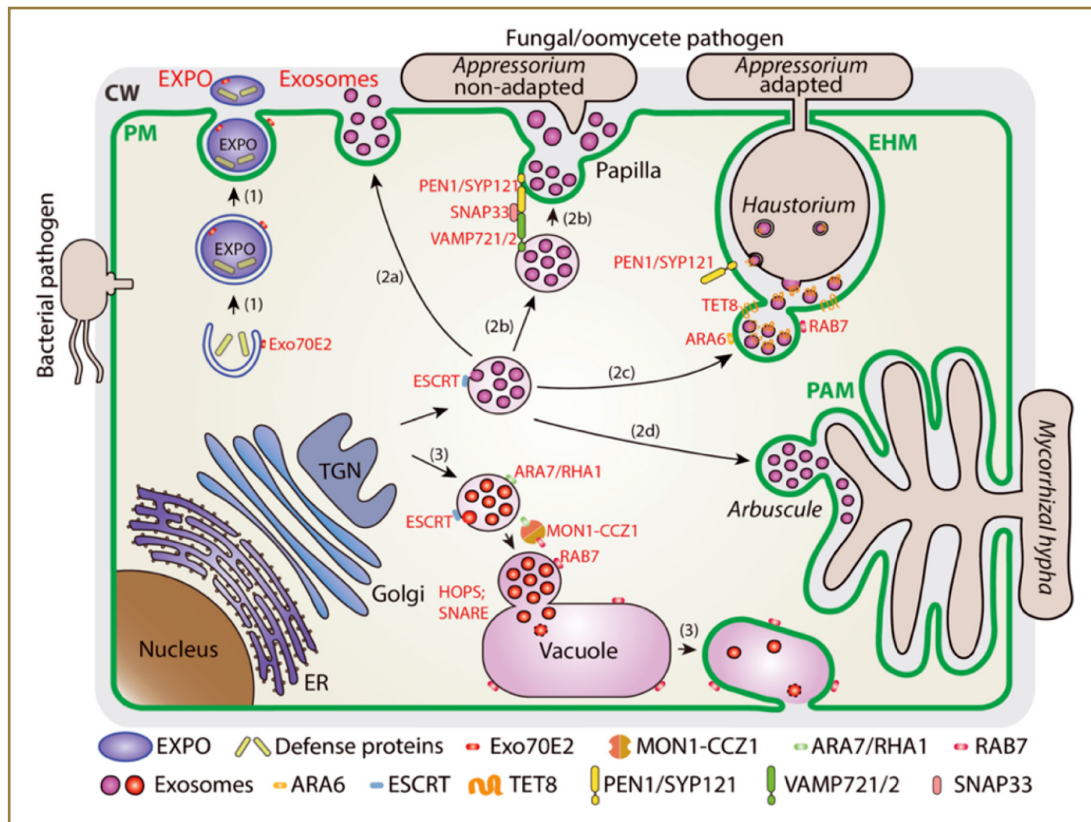
Las PEVs, al igual que las EVs de origen animal, transportan proteínas, NK y lípidos. Además, pueden obtenerse de las plantas en cantidades suficientemente grandes, y su producción es considerablemente más barata que la de sus homólogos poliméricos. Las PEVs entran en el cuerpo humano con los alimentos, son capaces de penetrar en las células animales y no provocan una respuesta tóxica o inmunitaria.

Sin embargo, las PEVs están poco estudiadas: no hay datos suficientes sobre su composición y sus efectos en las células animales. Además, pocos estudios se han centrado en los métodos de carga de PEVs con moléculas exógenas y en la eficacia de la captura de PEVs por parte de las células animales (Garaeva *et al.*, 2021).

Aunque existe una controversia sobre la existencia de PEVs en las plantas debido a su pared celular, cada vez hay más pruebas de que las plantas también secretan PEVs. Los investigadores distinguen varias vías para la formación de PEVs (figura 2).

En primer lugar, al igual que las EVs animales, las PEVs pueden ser secretadas en el espacio extracelular mediante la fusión de cuerpos microvesiculares a la membrana celular. También se cree que la formación de cuerpos microvesiculares está regulada por los complejos ESCRT (Gao *et al.*, 2017). Las GTPasas Rab5 y Rab7 se localizan principalmente en los cuerpos microvesiculares y median la fusión con la membrana plasmática (PM), liberando así las PEVs al espacio extracelular.

Figura 2

Vías de formación de PEVs (Cui *et al.*, 2020)

Cuando se enfrentan a patógenos (patógenos bacterianos y patógenos fúngicos/oomicetes), las células vegetales pueden liberar varios tipos de EVs para la defensa de la planta. La ruta [1] muestra la secreción de EXPO. La ruta [2a] muestra la fusión del MVB con el PM para liberar los ILV, como exosomas. Las rutas [2b-2d] presentan la secreción de MVB a los sitios de infección como se indica. La ruta [3] muestra la fusión de la vacuola con la MP para liberar las ILV restantes, que se obtienen de las MVB. También se incluyen reguladores representativos de distintas vías. Abreviaturas: CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; EXPO, exocyst-positive organelle; EHM, extrahaustorial membrane; PAM, peri-arbuscular membrane; ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; PM, plasma membrane; TGN, trans-Golgi network; ILV, intraluminal vesicles; MVB, multivesicular body.

Las PEVs pueden ser sintetizadas en el EXPO. Se ha demostrado que esta vía de exocitosis está asociada a la proteína EXO70E2 (Ding *et al.*, 2014).

Las vacuolas también pueden contribuir a la formación de PEVs. Los estudios demuestran la presencia de PEVs en las vacuolas debido a su fusión con los cuerpos microvesiculares. En respuesta a los patógenos bacterianos, las plantas inician la fusión de la vacuola con el cuerpos microvesiculares, por lo que las proteínas protectoras libres y las PEVs contenidas en la vacuola se liberan en el espacio extracelular inhibiendo la proliferación bacteriana (Cui *et al.*, 2019; Hatsugai *et al.*, 2009).

Muchos estudios demuestran que la secreción de PEVs es estimulada por infecciones patógenas. Las PEVs contienen lípidos de señalización, tRNAs y compuestos protectores, lo que indica su papel en la defensa inmune de las plantas (Rybak & Robatzek, 2019a).

De la misma manera, las PEVs están involucradas en la interferencia de ARN inter-asociado. Los investigadores han demostrado la acumulación del marcador único ARA6 (GTPasa vegetal Rab5) y TET8 (tetraspanina-8, similar a CD63 en los animales) en los sitios de la infección fúngica (Cai *et al.*, 2018). Del mismo modo, también se ha demostrado la liberación de PEVs en la membrana periarbuscular durante la formación de la simbiosis planta-hongo (Ivanov *et al.*, 2019).

Los investigadores creen que el papel de la EXPO reside en la construcción de la pared celular (Kim & Brandizzi, 2014). Del mismo modo, la endo-1,4-β-glucanasa, que participa en muchos procesos de crecimiento de las plantas y en la síntesis de la pared celular, se encontró en las PEVs de las plantas leñosas. Tales PEVs se han encontrado en el floema y el xilema de las plantas de sobrecogimiento y gimnospermas en la pared celular en los puntos de fusión con cuerpos microvesiculares (Chukhchin *et al.*, 2020).

1.3.6. Utilización de las PEVs en sistemas de suministro de biomoléculas exógenas

Se sabe que las PEVs contienen grandes cantidades de microARN pequeño. Por ejemplo, en un estudio reciente, se identificaron 418 microARN conservados en 11 frutas y verduras comestibles estudiadas (Xiao *et al.*, 2018). Estos análisis bioinformáticos se llevan a cabo para predecir los efectos que las PEVs pueden tener en las posibles células diana de los animales.

En un estudio sobre los efectos de las PEVs en las células humanas *in vitro*, se descubrió que el microARN-2911 contenido en las EVs de la madre selva (*lonicera caprifolium*) puede inhibir los virus de la gripe A al impedir la producción de las proteínas PB2 y NS1 (Zhou *et al.*, 2015).

Basándose en las propiedades naturales de las PEVs y teniendo en cuenta su capacidad para interactuar con las células animales, existen varios estudios destinados a utilizar las PEVs y sus formas modificadas para administrar biomoléculas exógenas terapéuticas a las células animales. Por ejemplo, las EVs de toronja se han utilizado para la administración intranasal de un microARN específico, el miR-17 family, que dio lugar a la re-

ducción del crecimiento de tumores cerebrales en ratones (Zhuang *et al.*, 2016b).

Algunos estudios han empleado lípidos de PEVs para crear liposomas. Estos liposomas son capaces de unirse a agentes hidrofóbicos aumentando su biodisponibilidad. Por ejemplo, los liposomas basados en las EVs aisladas de toronja transportaron con éxito ADN biotinilado, proteínas y miRNA en células diana animales *in vitro* (Wang *et al.*, 2013b), y las EVs derivadas de lípidos de jengibre se utilizaron para transportar miRNAs para el tratamiento de la colitis ulcerosa en ratones (Zhang *et al.*, 2017).

En algunos estudios también se utilizaron métodos híbridos de encapsulación de moléculas exógenas. Por ejemplo, se obtuvieron liposomas híbridos mediante la incubación de PEVs con liposomas, que se utilizaron además para el transporte del sistema CRISPR-Cas9 a células madre mesenquimales *in vivo* (Lin *et al.*, 2018).

1.4. ÁCIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico (HA), es un glicosaminoglicano (GAG) no sulfatado que consiste en unidades repetidas de disacárido de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina. Los glicanos y oligosacáridos ejercen diferentes efectos sobre las funciones biológicas de las células y los tejidos, como en los tejidos conectivo, epitelial y neural (Tammi *et al.*, 2002). HA juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la matriz extracelular y la regulación de las actividades intercelulares, como la unión célula-célula y la adhesión celular, al unirse a ligandos unidos a la membrana, glucanos y otras proteínas de unión a HA. Además, HA ocupa un gran volumen hidrodinámico que influye en gran medida en la hidratación y las propiedades físicas de los tejidos (Mo *et al.*, 2011) y actúa como adyuvante en la cicatrización de heridas.

El cambio histoquímico más dramático observado en la piel senescente es la marcada desaparición del HA epidérmico, mientras que el HA todavía está presente en la dermis. Se desconocen las razones de este cambio en la homeostasis de HA con el envejecimiento. También se ha mostrado una reducción progresiva del tamaño de los polímeros de HA en la piel como resultado del envejecimiento (Russell, 1987). Así, la epidermis pierde la principal molécula responsable de unir y retener las moléculas de agua, lo que provoca la pérdida de hidratación de la piel. En la dermis, el principal cambio relacionado con la edad es la creciente avidez de HA con las estructuras tisulares con

la pérdida concomitante de la capacidad de extracción de HA. Esto ocurre en paralelo al entrecruzamiento progresivo del colágeno y la pérdida constante de la capacidad de extracción del colágeno con la edad. Todos los fenómenos anteriores relacionados con la edad contribuyen a la aparente deshidratación, atrofia y pérdida de elasticidad que caracteriza a la piel envejecida.

El envejecimiento prematuro de la piel es el resultado de la exposición repetida y prolongada a la radiación UV. Aproximadamente el 80 % del envejecimiento de la piel del rostro se atribuye a la exposición a los rayos UV (Uitto J, 1997). El daño por radiación UV causa inicialmente una forma leve de cicatrización de heridas y se asocia al principio con un aumento del HA dérmico. El enrojecimiento inicial de la piel después de la exposición a la radiación UV puede deberse a una reacción edematosa leve inducida por la mayor deposición de HA y la liberación de histamina. Las exposiciones repetidas y extensas a los rayos UV simulan en última instancia una respuesta típica de cicatrización de heridas con depósito de colágeno tipo I similar a una cicatriz, en lugar de la mezcla habitual de colágeno tipo I y III que brinda elasticidad y flexibilidad a la piel.

En la piel, el fotoenvejecimiento da como resultado un contenido y una distribución anormales de GAG en comparación con los que se encuentran en las cicatrices, o en la respuesta de cicatrización de heridas, con aumento de HA y de los niveles de proteoglicanos de sulfato de condroitina. En los fibroblastos dérmicos, esta reducción en la síntesis de HA se atribuyó a los fragmentos de colágeno, que activan las integrinas $\alpha V \beta 3$ (receptor de vitronectina) y, a su vez, inhiben la vía de señalización del esqueleto de actina y la translocación nuclear de quinasa relacionada con la señal extracelular, lo que da como resultado una expresión reducida de sintasa de ácido hialurónico 2 (HAS-2) (Röck *et al.*, 2011).

Recientemente se han descubierto algunos de los cambios bioquímicos que pueden distinguir entre el fotoenvejecimiento y el envejecimiento natural. Usando muestras de tejido de piel humana fotoexpuesta y fotoprotegida, obtenidas del mismo paciente, se ha demostrado un aumento significativo en la expresión de HA de menor masa molecular en la piel fotoexpuesta, en comparación con la piel fotoprotegida. Este aumento de HA degradado se asoció con una disminución significativa en la expresión de HAS-1 y una mayor expresión de tres hialuronidasas. Estos hallazgos indican que la piel fotoexpuesta y, por lo tanto, el envejecimiento extrínseco de la piel, se caracteriza por una homeostasis distinta de HA (Tzello *et al.*, 2009).

Además de su uso en medicina convencional, en los últimos años el HA se ha utilizado habitualmente en medicina estética como relleno y en el tratamiento de los signos de la edad y en la resolución de manchas cutáneas (Salwowska *et al.*, 2016).

Como el envejecimiento facial se caracteriza por el desarrollo de líneas faciales y la reducción del volumen de los labios, los rellenos de HA se han propuesto como alternativas a otros rellenos cutáneos temporales para tratar las líneas de la piel del rostro y para proporcionar aumento de labios. Las ventajas del HA en medicina estética son que es fácil de producir, modificable, hidrófilo, no adhesivo y naturalmente biodegradable. Los sustitutos de tejidos blandos inyectables proporcionan una alternativa asequible y no quirúrgica para corregir los defectos del contorno de la piel del rostro (Bukhari *et al.*, 2018).

Cabe señalar que las actividades de HA dependen en gran medida del tamaño del polímero y del grado de reticulación. El HA de alto peso molecular muestra actividades antiinflamatorias e inmunosupresoras e induce procesos de reparación de tejidos como se describe en la cicatrización de heridas (Motolese *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el HA de alto peso molecular (es decir, 1000–10 000 kDa) inhibe la angiogénesis y mantiene los vasos estables. De manera opuesta, los fragmentos de HA, oligosacáridos con un tamaño menor a 200 kDa, muestran la capacidad de inducir el proceso inflamatorio, así como la angiogénesis a través de la interacción con receptores específicos, como el CD44 y el receptor de motilidad mediado por hialuronano. Esto también se logra reclutando células del estroma (Slevin *et al.*, 2007).

A nivel tisular, la vascularización y la organización de los componentes del estroma son requisitos para la homeostasis tisular y la biocompatibilidad de los dispositivos médicos sintéticos. Un suministro de sangre adecuado garantiza la supervivencia celular y el correcto funcionamiento bioquímico sin formación de edema, infiltración de células inflamatorias y desarrollo de cicatrices. Las células endoteliales son muy sensibles a los biomateriales exógenos y a los estímulos mecanofísicos en general. Por otro lado, las células del estroma como los fibroblastos, las células más comunes del tejido conectivo, representan células más robustas. Los fibroblastos son los principales productores de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular organizadas en el marco estructural de los tejidos animales. Sin embargo, su proliferación y actividad sintética deben ajustarse con precisión para evitar la falta de biocompatibilidad, la formación de cicatrices fibrosas o la desregulación del factor angiogénico (Stunova & Vistejnova, 2018).

1.5. ASPECTOS REGULATORIOS DE LAS EVs

En los últimos años, la creciente evidencia de las propiedades específicas de las PEVs, relacionadas principalmente con su caracterización biológica, su contenido biológico, efectos terapéuticos y potencial de administración de fármacos, hace que sea un tema de investigación muy atractivo. La naturaleza endógena de la formación de nanovesículas vegetales es su ventaja natural y única para la comunicación intercelular y una amplia gama de actividades biológicas. Las nanovesículas pueden ser captadas selectivamente tanto por células cercanas como distantes, reprogramándolas con su contenido biológicamente activo, principalmente debido a las proteínas y los ácidos ribonucleicos. La posibilidad de aislar las PEVs de una gran cantidad de material (incluidos los cultivos de tejidos vegetales estériles), la presencia de sustancias presentes de forma natural con posibles efectos beneficiosos para la salud humana, la biocompatibilidad con las células de mamíferos y la capacidad natural para atacar tipos de células específicos son las mayores ventajas de las PEVs.

Tal y como explican Shkryl *et al.* (2022b) aunque surgen constantemente nuevos estudios acerca de la formación regulada de nanovesículas, su actividad biológica y la orientación celular, así como el potencial de su producción a escala, de gran interés para el uso práctico, aún se necesita más investigación sobre las PEVs ya que, por ejemplo, las propiedades y la composición de las nanovesículas de muchas especies de plantas aún no se comprenden por completo. Adicionalmente y debido a la ausencia de un protocolo estandarizado de aislamiento, los resultados obtenidos a menudo varían según la fuente de la planta, el método de aislamiento o la condición fisiológica de la planta de manera que incluso al usar el mismo método de aislamiento, los resultados en el tamaño y la carga de las partículas pueden ser diferentes, al igual que el contenido de nanopartículas aisladas. Por otro lado, a menudo la falta de información sobre proteómica obstaculiza a los investigadores, ya que no hay muchos marcadores de proteínas PEV específicos. Es por todo esto que se requieren más estudios para estandarizar los protocolos para su aislamiento y caracterización, para desarrollar tecnologías de almacenamiento y carga eficiente, y para mejorar la orientación a ciertos tipos de células (Shkryl *et al.*, 2022b).

En general, las PEVs se caracterizan por una baja inmunogenicidad, falta de citotoxicidad, actividad antiinflamatoria natural y alta biocompa-

tibilidad, cualidades que permiten, en conjunto, que las nanovesículas derivadas de plantas realicen contribuciones importantes al desarrollo de la terapéutica de la nanomedicina. Por ello, Pinedo *et al.* (2021) deducen que el uso de PEVs en bio/nanomedicina todavía requiere un análisis más detallado, en el sentido de que es necesaria una comprensión más profunda de los mecanismos de formación de nanovesículas en las plantas, así como de los factores ambientales que afectan su número y el contenido de sus moléculas biológicamente activas, para optimizar la producción de productos médicos basados en PEVs. El estudio adicional de la regulación de las propiedades de las nanovesículas de plantas, utilizando los métodos de ingeniería metabólica y genética es de particular relevancia en vista de la posibilidad de controlar la cantidad y composición de componentes naturales de PEVs como los de bajo peso molecular, sustancias biológicamente activas y pequeños ARN (Pinedo *et al.*, 2021).

El 10 de junio de 2022, la Comisión Europea publicó la Recomendación 2022/C229/01, de la Comisión mediante la que modifica la definición del término nanomateriales para los países miembros de la UE. Hasta ahora, en el conjunto de la UE, existía una definición para este término, que aparecía en la Recomendación 2011/696/EU publicada en 2011 y que desde el pasado junio ha quedado derogada.

Las principales diferencias entre ambas recomendaciones son:

1. Se definen los requisitos dimensionales para nanomateriales y se establece un tamaño mínimo y máximo, que permite diferenciarlos de otras partículas.
2. En la nueva definición, los nanomateriales se limitan solo a partículas sólidas, excluyendo las partículas líquidas en emulsiones o partículas gaseosas. Además, se considera que las moléculas individuales no son consideradas partículas.
3. Se ha sustituido en la definición «contains» por «consists of» aclarando que los nanomateriales no contienen partículas nano, sino que están formados por partículas nano.

La nanotecnología es una tecnología multidisciplinaria y prometedora que implica el avance de materiales orgánicos e inorgánicos y la conversión y manipulación de estos materiales a escala atómica y molecular, que presentan propiedades biológicas, químicas y físicas personalizadas. Específicamente,

cuando la estructura de los materiales cambia y el tamaño de las partículas se reduce por debajo de su valor inicial a aproximadamente 1 a 100 nm, las propiedades físicas y químicas del material mostrarán diferencias significativas en comparación con los materiales originales, aunque ambos contengan el mismo contenido de materias primas (Duncan, 2011)

Debido a sus características químicas y físicas únicas, los materiales a nanoescala brindan beneficios excepcionales a una amplia variedad de campos de las ciencias y la tecnología, incluida la ingeniería, la ciencia de los materiales, la química, la física, la biología y la medicina. Estas propiedades únicas e incomparables de los materiales a nanoescala se deben a su alta relación área superficial/volumen en comparación con la microescala de los mismos materiales (Berekaa, n.d.). En la industria alimentaria, al igual que en otros sectores, la nanotecnología está desempeñando un papel crucial como tecnología prometedora para resolver problemas a través de soluciones innovadoras que se relacionan con la seguridad alimentaria, el procesamiento de alimentos, el envasado de alimentos, así como los alimentos funcionales (Mohammad *et al.*, 2022).

En la UE, los nanomateriales están cubiertos por el mismo marco normativo riguroso que garantiza el uso seguro de todos los productos químicos y mezclas, es decir, los Reglamentos REACH y CLP. Esto significa que deben evaluarse las propiedades peligrosas de las nanoformas de las sustancias y garantizarse su uso seguro.

Para ser fabricadas o importadas legalmente en la UE, todas las sustancias dentro del alcance de REACH deben estar registradas. Según el volumen colocado en el mercado, los fabricantes y/o importadores, como parte de su registro, deben presentar información sobre los efectos en la salud humana y el medio ambiente, y las nanoformas peligrosas: una estimación de la exposición a lo largo del ciclo de vida.

Las mismas obligaciones se aplican a los nanomateriales. Cuando las sustancias tienen propiedades peligrosas, el Reglamento de Clasificación, Etiquetado y Envasado (CLP) exige que se notifiquen a la ECHA y se etiqueten y envasen para que las sustancias puedan utilizarse de forma segura.

Las empresas deben ser transparentes en su registro REACH para indicar claramente cómo se ha abordado la seguridad de las nanoformas, incluidas las medidas necesarias para controlar adecuadamente el riesgo potencial y los documentos de orientación de la ECHA brindan más apoyo a las empresas sobre cómo identificar e informar las propiedades de sus nanoformas.

Además de REACH y CLP, también existe una legislación específica del sector en la UE para grupos específicos de productos como la legislación sobre cosméticos de modo que en los próximos años los esfuerzos deben dirigirse al uso de PEVs en aplicaciones transdérmicas, ya sea a través de productos cosméticos o dispositivos médicos, y como transportadores de fármacos.

El método transdérmico se utiliza principalmente para la aplicación en la piel, habiendo dos rutas de penetración de nanovesículas durante la aplicación transdérmica: utilizando canales físicos de la piel con un diámetro micrométrico suficiente para pasar a los vasos y a través del estrato córneo. Se supone que después de aplicar nanovesículas a la piel, penetran a través de la superficie de los canales ricos en lípidos en los folículos pilosos o bien penetran en la dermis a través del estrato córneo. A pesar de los mecanismos de penetración universales, una proporción significativa del producto podría permanecer inaccesible debido a la función de barrera de la piel, que varía de un paciente a otro según las diferentes partes del cuerpo y la edad del paciente, lo que también crearía problemas para la selección de la dosis (Vader *et al.*, 2016a).

Los cosméticos comercializados en la UE están regulados por el Reglamento sobre productos cosméticos que proporciona un marco de seguridad y estableció un sistema de notificación central para los productos cosméticos comercializados en el mercado de la UE y en el que los nanomateriales deben estar autorizados explícitamente. Antes de la autorización, el Comité Científico para la Seguridad de los Consumidores (SCCS) revisa los datos toxicológicos relacionados con la sustancia para la que se solicita la autorización. Los fabricantes, importadores o sus terceros designados deben registrar sus cosméticos a través del Portal de Notificación de Productos Cosméticos (CPNP). Si un producto contiene nanomateriales, el notificador debe identificar el nanomaterial y especificar la ruta probable a través de la cual una persona puede estar expuesta a él. Los consumidores pueden averiguar si un producto cosmético que están utilizando contiene nanomateriales consultando la lista de ingredientes en el envase del producto pues los nanomateriales en un producto cosmético deben etiquetarse con la palabra 'nano' entre paréntesis después del nombre del ingrediente.

Los dispositivos médicos abarcan una amplia gama de productos que, en la UE, deben tener una marca CE válida antes de que puedan comercializarse. Los productos clasificados por encima de la clase I son evaluados por organismos notificados bajo la supervisión de las autoridades nacionales competentes

de cada Estado miembro. El organismo notificado emite un certificado si el producto cumple con los requisitos de mercado CE. El certificado pasa a formar parte de la documentación del fabricante para la seguridad del producto y el mercado CE. El nuevo Reglamento de la UE sobre dispositivos médicos que entró en vigor en la primavera de 2020 contiene requisitos específicos sobre dispositivos que incorporan o consisten en nanomateriales. En virtud de este Reglamento, se prestará especial atención a los nanomateriales en el diseño y fabricación de dispositivos médicos y especifica el requisito de reducir, en la medida de lo posible, los riesgos relacionados con el tamaño y las propiedades de las nanopartículas que se liberan o pueden liberarse en el cuerpo del usuario. Los dispositivos que incorporan o consisten en nanomateriales pertenecen a la clase de riesgo más alto, clase III, si presentan un potencial alto o medio de exposición interna, y deben estar sujetos a procedimientos de evaluación más estrictos.

La tecnología farmacéutica desde hace varios años se ha dirigido al desarrollo de portadores inteligentes para la entrega de medicamentos y una revisión de los principales resultados y avances actuales en este campo indica claramente que las PEVs podrían ser excelentes vehículos para la entrega de compuestos naturales y terapéuticos (Nemati *et al.*, 2022). Una serie de características intrínsecas de las PEVs son de importancia instrumental para convertirlas en herramientas nuevas e interesantes para la entrega de compuestos bioactivos naturales y fármacos a objetivos celulares específicos (Alfieri *et al.*, 2021a):

1. Son capaces de atravesar membranas biológicas y son biocompatibles con células de mamíferos.
2. Podrían resolver la mayoría de los problemas asociados con la toxicidad o las propiedades inmunogénicas y alérgicas de los nanomateriales sintéticos, ya que se ha demostrado que la mayoría de ellas no inducen respuestas inmunitarias o inflamatorias en condiciones normales en las células huésped.
3. Son estables y capaces de resistir a la actividad de las enzimas digestivas hasta alcanzar las células diana, mejorando su uso para administración oral.
4. No pueden atravesar la placenta, y esta característica es muy crítica porque permitiría el uso de estas vesículas para transportar fármacos, incluso potencialmente tóxicos, a mujeres embarazadas sin repercusiones en el feto.

Los nanomedicamentos han estado en el mercado por más de 20 años (la primera nanomedicina fue autorizada por la Comisión Europea en 1996) y para cada fármaco que evalúa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) publica en su web un informe público europeo de evaluación (EPAR) explicando el uso y las características del fármaco (Alfieri *et al.*, 2021a).

II JUSTIFICACIÓN

II

JUSTIFICACIÓN

Las PEVs son transportadores naturales de diversas biomoléculas, entre ellas miARN, proteínas, aminoácidos y lípidos. Estas propiedades de las PEVs sugieren la posibilidad de su uso como transportadores para la entrega de carga.

A pesar de que, hasta la fecha, las EVs están atrayendo cada vez más la atención de la comunidad científica en cuanto a su aplicación en la terapia y diagnóstico precoz de diversas enfermedades y en la medicina estética, sólo recientemente la atención de los investigadores se ha dirigido al potencial de las PEVs como suministradoras de biomoléculas funcionales exógenas. A la confirmación práctica de esta hipótesis se han dedicado varios estudios aislados, principalmente dirigidos a la creación de sistemas lipídicos basados en PEVs, lo que constituye un procedimiento costoso. Al mismo tiempo, el uso de vesículas intactas para el suministro de biomoléculas no se ha contemplado hasta ahora.

Como, en general, las PEVs están mucho menos estudiadas que los exosomas y sus características estructurales y funcionales aún no se han evidenciado en detalle, esta tesis doctoral tiene por objetivo avanzar en técnicas de purificación y caracterización, establecer la estabilidad y la forma de transporte, discutir las oportunidades terapéuticas, así como el potencial como nuevos portadores de moléculas bioactivas.

Así pues, este estudio se ha destinado a aislar, caracterizar y evaluar la eficacia de la carga y el transporte de biomoléculas exógenas de diversos tipos a las células humanas por medio de distintas vesículas vegetales. Además, se ha intentado seleccionar la fuente más prometedora de vesículas vegetales, lo que contribuye a la posibilidad de impulsar en un futuro al desarrollo de sistemas de transporte de biomoléculas terapéuticas en medicina estética.

III OBJETIVOS

III

OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis doctoral son:

1. Aumentar el conocimiento sobre aislamiento y caracterización de PEVs estandarizando los protocolos de procedimientos.
2. Demostrar la función transportadora de las PEVs sobre moléculas bioactivas exógenas en células *in vitro*.
3. Mejorar la comprensión sobre el uso de PEVs y ácido hialurónico valorando sus efectos sobre la proliferación celular *in vitro*.
4. Fijar las pautas de futuros estudios *in vivo* así como establecer las bases para la producción industrial de PEVs.

IV
MATERIAL
Y MÉTODO

IV

MATERIAL Y MÉTODO

4.1. SELECCIÓN DEL MATERIAL DE PARTIDA

Teniendo en cuenta estudios previos sobre PEVs (Abraham *et al.*, 2022; Bokka *et al.*, 2020a; Garaeva *et al.*, 2021; Savci *et al.*, 2021), se seleccionaron tres fuentes vegetales a partir de las cuales obtener las PEVs a estudiar: Pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y pomelo (*Citrus paradisi*). Además, seleccionamos, por primera vez, el medio de cultivo del alga verde unicelular clorella (*Chlorella vulgaris*) en tres tipos de crecimiento: autótrofo/fototrofo, heterótrofo y mixótrofo.

Para obtener las PEVs de pepino, tomate y pomelo, se compraron las frutas en un mercado en la ciudad de Gátchina (Federación Rusa). Posteriormente, estas frutas fueron lavadas tres veces con agua destilada, procesadas con una licuadora modelo Moulinex Y36-Vitafruit y sometidas tras ello a una primera filtración con un colador doméstico habitual Atmosphere.

Por otro lado, las muestras de clorella cultivada en un fermentador hecho a mano con tres tipos diferentes de crecimiento (heterótrofo, fototrófico y mixotrófico) fueron facilitadas por el Dr. Eugenii Tolstenko. Las tres líneas de algas se habían comprado en Sev-in, Federación Rusa. La preparación de muestras de clorella se realizó mediante cultivo con medio convencional de agua dulce BG 11. El control de TAGs (microalgal triacylglycerols) se realizó

bajo los siguientes parámetros: temperatura - 31 °C; pH entre 7 y 7,2; Concentración de oxígeno disuelto (DO) - 10 % de saturación; y muestreo estéril diario para mediciones de nitrato y glucosa (filtrando 5 ml de medio y pesando el filtro seco).

4.2. OBTENCIÓN DE PEVS A PARTIR DE ZUMO/MEDIO DE CULTIVO DE VARIAS FUENTES

El método de extracción más utilizado para el aislamiento de PEVs, es la UC (Duong *et al.*, 2019; Garaeva *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020b).

Se compraron 3,212 kg de pomelo en la tienda «ОКЕЙ» de Gatchina (Federación Rusa), calle Leningrado, 12.

En el laboratorio comenzamos la etapa de purificación a partir de grandes agregados celulares. Primero, los pomelos se pasaron por un exprimidor de zumo de naranja obteniéndose 1,5 litros de zumo. Seguidamente el material se pasó por un colador doméstico Atmosphere y tras esta primera filtración se obtuvieron 1,4 litros. A continuación, se realizó una segunda filtración con ese mismo colador obteniéndose 1,375 litros de zumo.

Posteriormente, se utilizaron 4 tubos Beckman (para 500 ml) poniendo 350 ml de zumo de pomelo en cada uno (con un peso de 399,20 g).

Seguidamente, para eliminar las partículas grandes y los restos celulares, se empleó la técnica de centrifugación diferencial secuencial con la fuente vegetal de acuerdo con el esquema siguiente.

Tabla 1***Parámetros de centrifugación de la fuente vegetal (pomelo)***

Centrífuga	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I
Rotor	JA-10	JA-10	JA-10	JA-10	JA-10
Tubos	4	4	4	4	4
Zumo (ml/g)	350,00/399,20	325,00/372,32	325,00/369,21	325,00/367,63	325,00/365,00
Velocidad (RPM/g)	2911/1500	4117/3000	4117/3.000	4117/3000	4117/3000
Tiempo (horas:minutos)	00:30	00:20	00:20	00:20	00:25
Temperatura (°C)	4-8	4-8	4-8	4-8	4-8
Aceleración/Deceleración	MAX/MAX	MAX/MAX	MAX/MAX	MAX/MAX	MAX/MAX
Centrífuga	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I	Beckman Coulter Avanti J25I	
Rotor	JA-10	JA-10	JA-10	JA-10	
Tubos	4	4	4	4	
Zumo (ml/g)	320,00/364,00	320,00/360,25	320,00/359,50	320,00/353,63	
Velocidad (RPM/g)	7517/10000	9509/16000	7517/10000	9509/16000	
Tiempo (horas:minutos)	00:60	00:60	Overnight	00:60	
Temperatura (°C)	4-8	4-8	4-8	4-8	
Aceleración/Deceleración	MAX/MAX	MAX/MAX	MAX/MAX	MAX/MAX	

Fuente: Elaboración propia.

Al valorar la ausencia de partículas en suspensión se decidió proceder al siguiente paso.

Posteriormente, pasamos a la siguiente etapa, de UC, con los parámetros resumidos en la tabla 2.

Tabla 2**Parámetros de UC de la fuente vegetal (pomelo)**

Centrífuga	Beckman Coulter Optima XE-90	Beckman Coulter Optima XE-90	Beckman Coulter Optima XE-90
Rotor	45Ti	45Ti	45Ti
Tubos de policarbonato (ml)	6 (70ml)	6 (70ml)	6 (70ml)
Observaciones	Esperamos precipitación. Al terminar descartamos el sobrenadante.	Añadimos más suspensión de zumo hasta un peso de 101,40 g	Añadimos más suspensión de zumo hasta 2/3 del tubo y para correcta calibración añadimos 1/3 de TFS (tampón fosfato salino)
Suspensión de zumo (g)	100,60	101,40	101,10
Velocidad (RCF xg)	150000	150000	150000
Tiempo (horas)	02:00	02:00	02:00
Temperatura (°C)	4	4	4
Aceleración/Deceleración	Auto/Auto	Auto/Auto	Auto/Auto
Promedio de peso de precipitación (g)	Con tubo: 32,26. Sin tubo: 0,87		

Fuente: Elaboración propia

Tras la última UC anterior, retiramos la suspensión de los tubos, eliminando el sobrenadante y añadiendo 2 ml de TFS.

Después, rompemos mecánicamente el precipitado de los 6 tubos durante 1 hora, hasta que el contenido se puede pipetear. Se utiliza el material distribuyéndolo en 6 tubos de 5 ml y añadiendo 2 ml de TFS a cada tubo. La siguiente fase de UC consigue que las PEVs caigan en precipitación.

Tabla 3*Parámetros de centrifugación subsiguiente de la fuente vegetal (pomelo)*

Centrífuga	Beckman Coulter Optima XE-90	Beckman Coulter Optima XE-90
Rotor	55Ti	55Ti
Tubos de policarbonato (ml)	6 (5ml)	6 (5ml)
Observaciones	Separación en dos fases (sobrenadante/precipitado)	Añadimos sobrenadante y TFS hasta 41,07 g
Velocidad (RCF xg)	16000	150000
Tiempo (horas)	01:00	02:30
Temperatura (°C)	4	4
Aceleración/Deceleración	MAX/MAX	MAX/MAX
Promedio de peso de precipitación (g)	Total: 6,08 (tubo: 0,96) Precipitación: 1,06	

Fuente: Elaboración propia

Procedemos a retirar el sobrenadante a los tubos y el precipitado remanente son PEVs. Ponemos en cada tubo 100 micromoles de TFS y almacenamos en nevera a 4 °C.

Los procedimientos de obtención de PEVs a partir de pepino, tomate y clorella fueron los mismos que los detallados anteriormente para pomelo.

Se compraron 5,096 kg de pepinos espinosos medianos de invernadero en la tienda «ОКЕЙ» de Gatchina (Federación Rusa), calle Leningrado, 12.

Se compraron 4,400 kg de tomate de Azerbaijan en el mercado de Pushkin (Federación Rusa), calle Moscovskaya, 25.

La clorella de tres tipos de crecimiento (autótrofo, heterótrofo y mixótrofo) fue facilitada por un grupo de investigación del Instituto de Física Nuclear de Gatchina (Federación Rusa).

En la tabla siguiente se resumen los datos de las cantidades de materia vegetal fluida para centrifugar.

Tabla 4

Fuente, cantidad de material inicial, volumen tras licuar y rendimiento (en ml/g)

Fuente	Materia inicial	Volumen obtenido tras licuar	Rendimiento (ml/g)
Tomate	4400g	3000ml	0,68
Pepino	5096g	3700ml	0,73
Pomelo	3212g	1375ml	0,43
Clorella autótrofa		700ml	0,0001g/ml
Clorella heterótrofa		700ml	0,00414g/ml
Clorella mixótrofa		700ml	0,002765g/ml

Fuente: Elaboración propia

4.3. CARACTERIZACIÓN DE PREPARADOS DE PEVS POR CONCENTRACIÓN, TAMAÑO, FORMA Y MORFOLOGÍA

4.3.1. Caracterización por análisis de nanoseguimiento (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)

La distribución de PEVs por concentración y tamaño se obtuvo mediante análisis de trayectoria de nanopartículas (NTA) utilizando un analizador NanoSight® LM10 con láser ultravioleta (45 mW a 405 nm) y una cámara C11440-5B (Hamamatsu photonics KK, Japón). Los parámetros de la cámara fueron: Camera Level: 16, Low Threshold: 0, Hight Threshold: 2015.

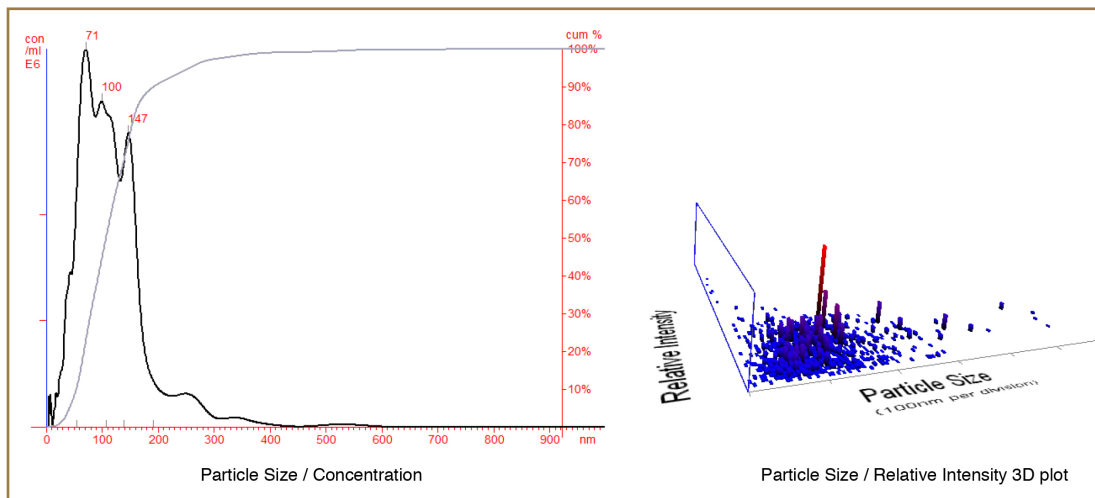
Los resultados se interpretaron utilizando el software NTA 2.3.

Las PEVs resultantes se diluyeron sucesivamente en Milli-Q de agua bi-distilada entre 1000 y 100000 veces. Las mediciones de NTA se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C, con una intensidad de cámara dada de 16, parámetros de umbral de 0 a 2015 (detección 7-9) y el tamaño de partícula mínimo esperado de 30 nm.

Durante el análisis, se grabó un vídeo tres veces durante 30 segundos, en el cual la instalación láser siguió la trayectoria de cada partícula en el fragmento visible de la muestra (figura 3). Teniendo datos de entrada sobre la viscosidad del Milli-Q y con base en el análisis del cambio de coordenadas de las partículas, el software, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, obtuvo explícitamente los valores de tamaño de las partículas (figura 4). Al analizar los registros se evaluaron los siguientes parámetros: el diámetro hidrodinámico promedio, el modo de distribución y la concentración de vesículas en la suspensión.

Figura 3

Distribución del tamaño correspondiente a las PEVs

**Figura 4**

Captura de vídeo de PEVs de clorella obtenidas por el sistema NTA

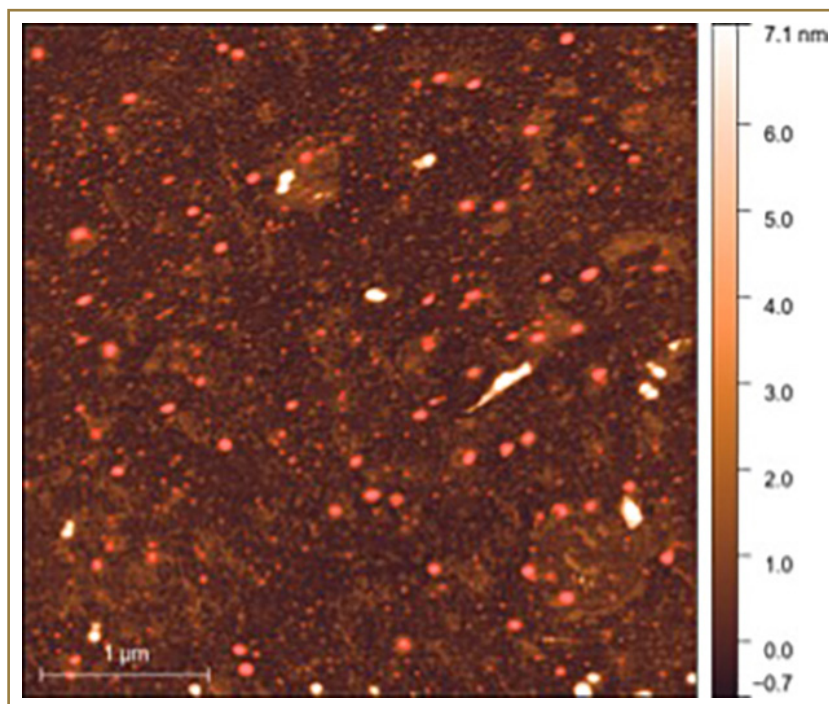


4.3.2. Caracterización por forma de PEVs obtenidas (Atomic Force Microscopy, AFM)

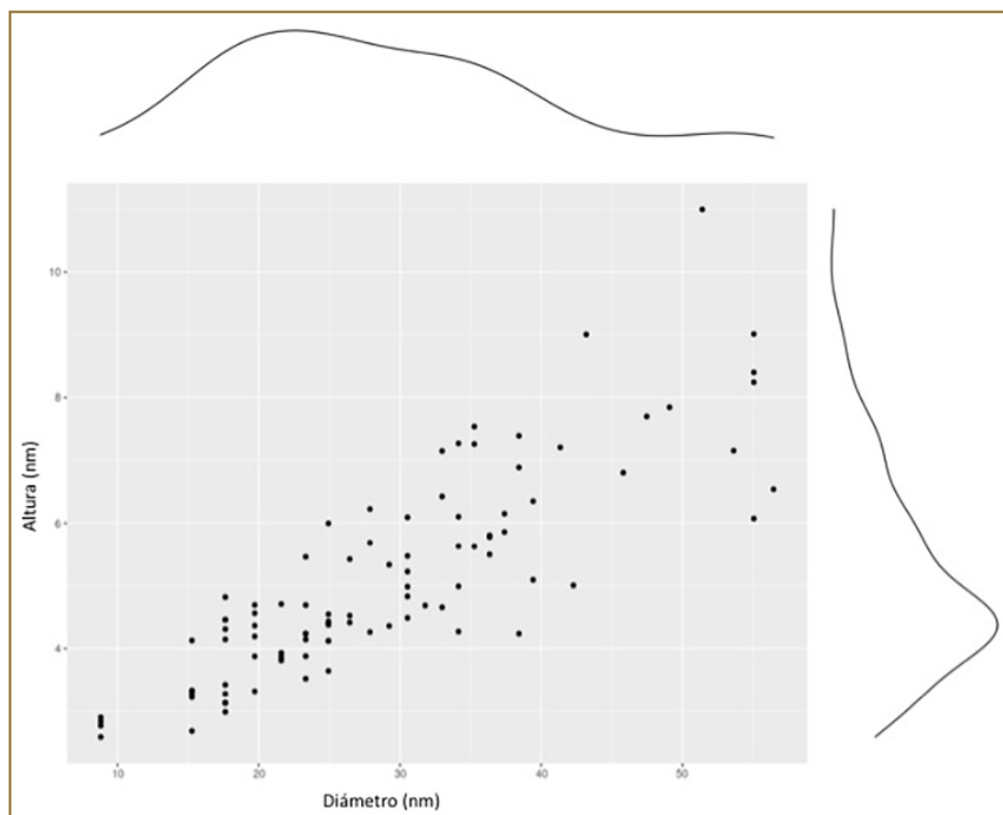
La forma de las PEVs se evaluó mediante AFM usando un microscopio NT-MDT Smena B (NT-MDT, Rusia) utilizando el software Nowa. El método AFM se basa en medir la interacción de fuerzas entre la superficie de la muestra de prueba y la sonda del microscopio fijada al final de un voladizo elástico (Ashcroft *et al.*, 2012). Al detectar la flexión de la sonda con un láser, es posible estimar la topografía de la superficie (Siedlecki *et al.*, 1999). Para el análisis, se aplicaron 10^7 PEVs a nanochips de mica (TipsNano, Estonia) en 5 μ L de PBS. Después del secado completo a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con mQ para eliminar los cristales de sal y se secaron a temperatura ambiente durante la noche o a 37 °C durante un mínimo de 2 horas. Las muestras se midieron por el método de semicontacto utilizando sondas NSG03 (NT-MDT, Rusia). En las figuras 5 y 6 se incluyen una fotografía de las PEVs de tomate y un cálculo de distribución por tamaño de las mismas.

Figura 5

AFM de PEVs de tomate



Fuente: elaboración propia

Figura 6*Distribución por tamaño de PEVs de tomate por AFM*

Fuente: elaboración propia

4.3.3. Caracterización de PEVs por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Potencial Zeta

La distribución de las PEVs por el tamaño y morfología se evaluó por el método de DLS utilizando dos aparatos de espectrofotometría de correlación láser Photocor Compact-Z y LKS-3 (Fotokor, Rusia).

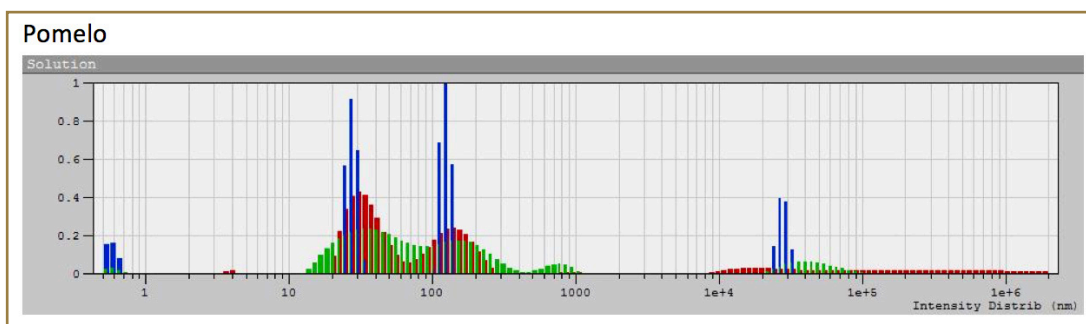
Para preparar las muestras se realizó una dilución de las mismas (concentración estimada 10^{11} partículas) 100 veces con agua Milli-Q y se centrifugó durante 40 minutos a 12000 RPM. Las mediciones se realizaron durante 90 segundos nueve veces.

La velocidad de las partículas hacia el electrodo se midió con un anemómetro láser Doppler. Para aumentar la precisión de las mediciones se utilizó un método especial de análisis de señales Doppler - PALS - que permite medir el desplazamiento de fase del rayo láser incidente, causado por la dispersión de la luz provocada por el movimiento de las partículas.

En la figura 7 se exponen los resultados de uno de los experimentos.

Figura 7

Distribución de radios hidrodinámicos de PEVs heterótrofos de clorella



4.3.4. Líneas celulares y condiciones de cultivo

En el estudio se utilizaron líneas celulares comerciales GI-Tr (Volnitskiy *et al.*, 2019) puestas a disposición por el Laboratorio de Biología Celular (Centro Nacional de Investigación «Instituto Kurchatov» - PNPI, Gatchina, Rusia). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂ utilizando medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) que contenía L-glutamina (Biolot, Rusia) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Biolot, Rusia), 0,1 mg/mL de gentamicina (Biolot, Rusia). Las células se contaron utilizando un contador de células automatizado LUNA (Logos Biosystems, Corea del Sur).

4.3.5. Carga de PEVs con proteína exógena

Las PEVs se cargaron con proteína humana recombinante HSP70 (proteína de shock térmico), marcada con fluorescencia con colorante Alexa fluor 647 (fluorocromo rojo con pico de emisión (EX) - 667 nm, pico de excitación (EM) - 651 nm. Thermo Fisher, Estados Unidos) usando una combinación de co- incubación y sonicación.

La proteína a una concentración final de 0,1 mg/ml se mezcló con una suspensión de PEV a una concentración final de $\sim 2 \times 10^{12}$ partículas/ml y se incubó durante la noche a +4 °C. A continuación, la mezcla se sonicó a 35 kHz durante 15 minutos en un baño ultrasónico Bandelin Sonorex Super (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Alemania) a temperatura ambiente y se incubó durante 90 minutos a +4 °C. Para eliminar la proteína libre, las vesículas se purificaron en 500 µl de PBS mediante centrifugación 10 veces a +8 °C, 13000 g durante 10 minutos usando filtros de 100 kDa (Amicon,

Millipore, Estados Unidos). Los eluatos primero y décimo en el procedimiento de filtración (F1 y F10) se usaron como controles en experimentos adicionales. La suspensión resultante de PEVs cargada se llevó al volumen inicial con PBS.

4.3.6. Evaluación de la eficiencia de la carga PEV

La eficiencia de la carga de PEV con la proteína HSP70 marcada con fluorescencia, así como la eficiencia de la eliminación de proteínas libres de las vesículas, se analizaron mediante espectroscopia de fluorescencia (Hitachi F-7000, Japón).

Para analizar la intensidad de fluorescencia de las PEVs cargadas, se diluyeron 10 µl de la muestra en 2 ml de PBS. Las mediciones se realizaron tres veces utilizando el software FL Solutions en el modo de fotometría con longitudes de onda de excitación y emisión especificadas a un voltaje de tubo fotomultiplicador de 400 V.

El método de fluorimetría se basa en el registro de la radiación secundaria, que se produce como resultado de la excitación de las sustancias fluorescentes estudiadas.

4.3.7. Evaluación de la eficiencia de la entrega de proteína marcada con fluorescencia usando PEV a células humanas *in vitro*

Para evaluar la eficiencia de la entrega de proteínas fluorescentes por PEVs a células humanas *in vitro*, se utilizó el método de citometría de flujo (CytoFlex, Beckman Coulter, Estados Unidos). Las células GI-Tr se sembraron en cantidad de 10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos, seguido de incubación durante 24 horas en condiciones estándar. A continuación, se cambió el medio para que contuviera PEV, F1, F10 cargadas y proteína libre en una cantidad de 30 µg (proteína cargada al 100 %) y 0,6 µg (proteína cargada al 2 %).

Después de 4 horas de incubación en condiciones estándar en presencia de PEVs, las células se desprendieron utilizando una solución de verseno-triprosina (Biolot, Rusia).

El análisis de la señal fluorescente, que se correlaciona con la eficiencia de la captación de PEV/proteína libre por parte de las células *in vitro*, se realizó mediante citometría de flujo a través del canal APC.

4.3.8. Cultivo celular con ácido hialurónico

En este estudio, se ha evaluado la actividad de ácido hialurónico (2 %, 10 ml) de alto (1,8MDa) y bajo peso molecular (<0,1MDa) (Fusion Mesotherapy, F-HA, Bioklass, Rusia).

Se han incluido fibroblastos (una vez desarrollados en monocapa) en una placa de 96 pocillos, alrededor de 10^4 células en cada pocillo. Se tuvieron en incubación durante 48 horas añadiéndose después ácido hialurónico de los dos tipos antes indicados (alto y bajo peso molecular) en cada pocillo, en concentraciones de 10 a 2000 μ g. En cada pocillo se incluyó hasta un máximo de 200 μ l (incluyendo hialurónico, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12), PBS al 5 % y antibiótico (penicilina estreptomycin)). Se dejó en incubación 72 horas y se realizó MTT test con longitud de onda 595 nm con rizoquina (Len Reaktiv, Rusia) en un Pleat Reader EnSpire Multilabel Plate Reader.

4.3.9. Real Time PCR (qPCR)

Se llevó a cabo una qPCR para comprobar si las PEVs por sí solas eran capaces de estimular la regeneración celular y aumentar la producción de las proteínas más ubicuas en la piel humana (Potekaev *et al.*, 2021).

Para hacer el diseño de matrix ARN de las proteínas de matriz extracelular (Pfisterer *et al.*, 2021) se seleccionaron las siguientes proteínas:

- a) Colágeno tipo I (tipo de colágeno más común en la dermis, con funciones de soporte y resistencia a la tracción).
- b) Colágeno tipo III (supone 1/3 del colágeno fibrilar en dermis, con funciones de soporte y resistencia a la tracción).
- c) Colágeno tipo IV (estructura formada por redes, altamente flexible, que proporciona fuerza a la piel).
- d) Colágeno tipo VI (une el colágeno tipo IV al colágeno fibrilar I y III en dermis papilar, se une a la decorina, biglicano y fibronectina).
- e) Elastina (proporciona elasticidad y resistencia a la piel).
- f) Fibrilina-1 (forma predominante, proporciona elasticidad y flexibilidad de la piel y actúa como mecanosensor).
- g) Biglicano (es la proteína que interactúa con el colágeno, muy abundante en la dermis papilar y regula la formación de fibrillas de colágeno).

- h)** Versicano (es un sulfato de condroitina proteoglicano que promueve la estabilidad a través de la interacción con fibras elásticas y proteínas matricelulares y estimula la proliferación de los fibroblastos).
- i)** Hialuronan sintetasa (HAS1, HAS2, HAS3) (actúa en la reparación de los tejidos, regula la hidrodinámica de los tejidos mediante la unión del agua e interactúa con CD44).
- j)** Primer House Keeping Gen (GAPDH) (actúa normalizando los niveles de transcriptasa).

Los primers diseñados fueron los siguientes (5' → 3'):

- 1.** *Homo sapiens* hialuronano sintasa 1. (HAS1), variante de transcripción 2:
 - a) F: GCCTGGTACAACCAGAAGTT
 - b) R: TCACGGAAGTACGACTTGGA
- 2.** *Homo sapiens* hialuronano sintasa 2. (HAS2):
 - a) F: TCC CGG TGA GAC AGA TGA G
 - b) R: GGC TGG GTC AAG CAT AGT G
- 3.** *Homo sapiens* hialuronano sintasa 3. (HAS3), variante de transcripción 3:
 - a) F: GCAGAAGTCGGGGAAGAGT
 - b) R: CACATAGGCTGCCAGGATG
- 4.** *Homo sapiens* colageno tipo I cadena alfa 1 (COL1A1):
 - a) F: CCAGCCACAAAGAGTCTACA
 - b) R: TCTGTACGCAGGTGATTGGT
- 5.** *Homo sapiens* elastina (ELN), variante de transcripción 1:
 - a) F: GGCAAACCTCTTAAGCCAGT
 - b) R: AGACACTCCTAAGCCACCAA
- 6.** GAPDH
 - a) F: GAAGGTCGGAGTCAACGGAT
 - b) R: GCCATGGGTGGAATCATATTG
- 7.** Fibrilino 1 (FBN1)
 - a) F: AAC GCC GAA TGC ATC AAC AC
 - b) R: ACC AGT GTG GCA AAG GCA AT
- 8.** Biglicano (BGN)
 - a) F: GGA CAC ACC GGA CAG ATA G
 - b) R: TCC AGG GTG AAG TCC CAG A

Los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo y se cultivaron durante 72 horas. A continuación, los fibroblastos se incubaron junto con PEVs durante 72 horas y luego se lavaron dos veces con PBS.

Para la extracción de ARN matrix se utilizó el Kit «Lyra+».

La cantidad de ARNmatrix específico se cuantificó mediante Nanophotometer N50 (Implen, Germany).

Para realizar la qPCR se utilizó producto de transcriptasa reversa M-MuLV-RN, (biolabmix.ru, Rusia) y se midió en CFX96 Real-Time System, C10000 Thermal Cycler, BioRad (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

4.3.10. Tratamiento de datos estadísticos

El procesamiento estadístico y la visualización de los datos se realizaron con los programas informáticos: SPSS 22.0, Prisma 8.1., ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos). El procesamiento gráfico de los datos de AFM se realizó con Gwyddion (*Gwyddion – Free SPM (AFM, SNOM/NSOM, STM, MFM, ...)*). El procesamiento gráfico y estadístico de los datos de citometría de flujo se realizó con el Flowing Software 2. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar en este estudio.

Se comprobó la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos para refutar la hipótesis nula de normalidad de la distribución (SPSS 22.0).

Los grupos se compararon entre sí mediante la prueba de ANOVA ajustada por comparación múltiple de Bonferroni (SPSS 22.0). Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas al nivel $p < 0,05$.

El análisis de correlación se realizó mediante las pruebas de Pearson y Spearman del SPSS 22.0 para datos con distribución normal y no normal, respectivamente. Se consideró que los coeficientes de correlación de entre 0,80 y 0,99, ambos inclusive, expresaban un alto nivel de asociación entre las variables según la escala de Cheddock.

V
RESULTADOS

V

RESULTADOS

Los resultados que se recogen seguidamente corresponden a los estudios realizados en los centros siguientes:

1. IFN-Instituto de Física Nuclear de Petersburgo B.P. Konstantinov del Centro Nacional de Investigación «Instituto Kurchatov», Gatchina, (Federación Rusa).
2. CMIP- Centro Médico de Investigación del Cáncer Petrov, San Petersburgo, (Federación Rusa).
3. IDIBE (Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche. Universidad Miguel Hernández).

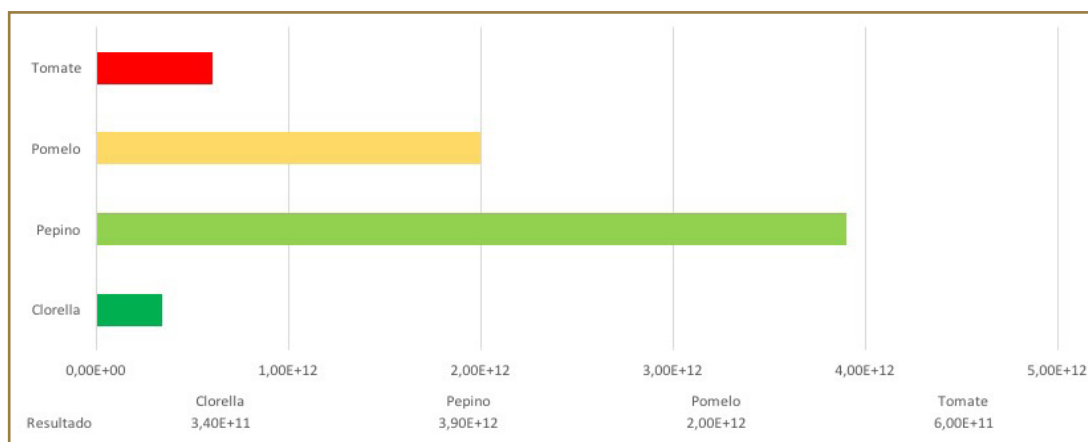
5.1. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En el transcurso del estudio en el IFN se obtuvieron PEVs de 3 productos: Del zumo de 3 fuentes vegetales: pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y pomelo (*Citrus paradisi*), y del medio de cultivo de un alga verde unicelular: clorella (*Chlorella vulgaris*).

La concentración de los preparados de PEVs obtenidas de diferentes productos se evaluó mediante el método NTA. A partir de los valores de concentración obtenidos, se estimó la eficacia del rendimiento de PEVs por 100 ml de zumo/medio de cultivo (tabla 5).

Tabla 5

Eficiencia de la producción de PEVs por 100 ml de zumo/medio de cultivo



Así, la mayor cantidad de PEVs por 100 ml de zumo/medio de cultivo se obtuvo de pepino ($3,9 \times 10^{12}$) y la cantidad más pequeña de PEVs se obtuvo de clorella ($3,4 \times 10^{11}$).

La cantidad (concentración) de partículas, o eficiencia de rendimiento, es una característica importante del producto, ya que está asociada con el costo de obtener PEVs a escala industrial, que potencialmente podrían usarse como transportadoras de moléculas bioactivas.

5.2. CALIFICACIÓN EN FORMA

Para el estudio de la forma de las PEVs se emplea AFM que escanea directamente la superficie de una vesícula inmovilizada para el cálculo posterior de su diámetro geométrico. Si consideramos una vesícula como una esfera rígida y no eléctrica, sus diámetros hidrodinámico y geométrico deberían ser iguales aunque, en la práctica, los valores hidrodinámicos suelen ser mayores que las dimensiones geométricas de las vesículas (Skliar & Chernyshev, 2019).

El área del sustrato ocupada por una PEV inmovilizada se aproxima como un círculo con un diámetro igual a la distancia media desde el «centro de masa» de la vesícula hasta su límite en la superficie de la mica y con la distribución de estos diámetros de proyección se obtiene la media (Życieńska *et al.*, 2022).

Las figuras obtenidas en el IFN muestran ejemplos de PEVs unidas a mica obtenidos a partir de imágenes de altura con AFM. En las figuras 8-11 se puede observar una gran variación en el tamaño de varias vesículas. Las imágenes

corresponden al uso de diferentes filtros cromáticos que permite evidenciar de mejor forma la altura de las vesículas. Las vesículas más grandes atraen más la atención, pero numéricamente dominan las pequeñas y medianas. Aunque algunos nanoobjetos parecen tener una forma alargada solo aquellos con suficiente simetría rotacional pueden tratarse como PEVs con imágenes correctas (Sebaihi *et al.*, 2017).

El análisis de las imágenes AFM se realizó con el software disponible gratuitamente Gwyddion y todas las imágenes se trataron mínimamente (es decir, una sustracción del plano medio, corrección de la inclinación del sustrato y acoplamiento de líneas) para evitar la deriva térmica y la inclinación de la muestra. Las PEVs aisladas se contaron utilizando la rutina de Gwyddion cambiando los parámetros de trabajo de acuerdo con la mejor identificación posible de las PEVs. En las figuras 8-11 se incluyen fotografías de PEVs de las diferentes fuentes estudiadas. Las escalas numéricas corresponden a la altura de las vesículas.

Figura 8

Imágenes AFM de PEVs de clorella

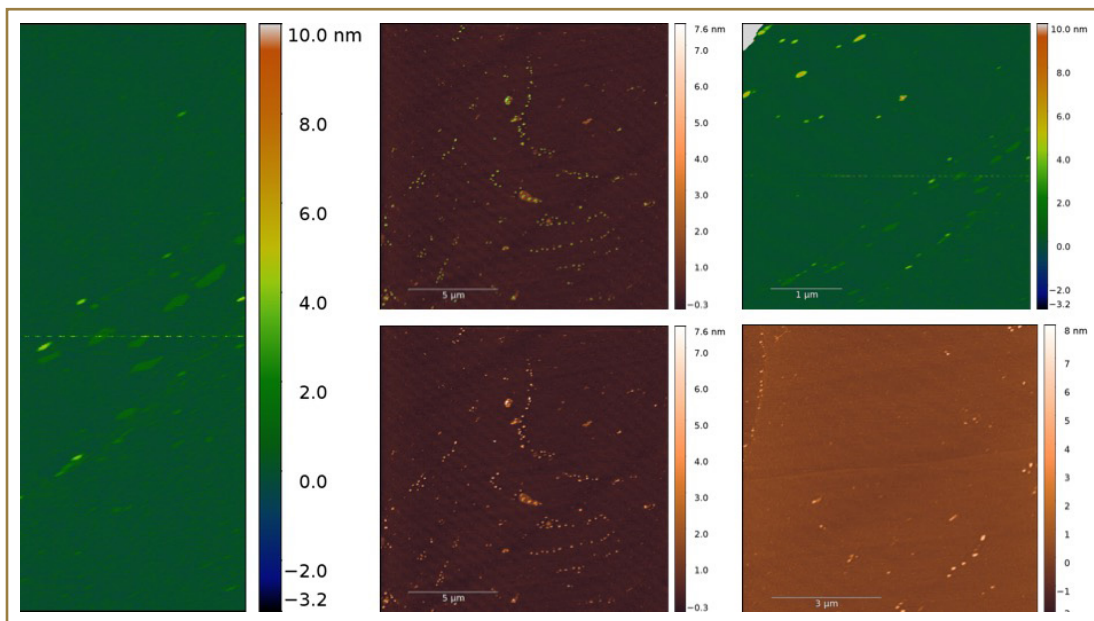


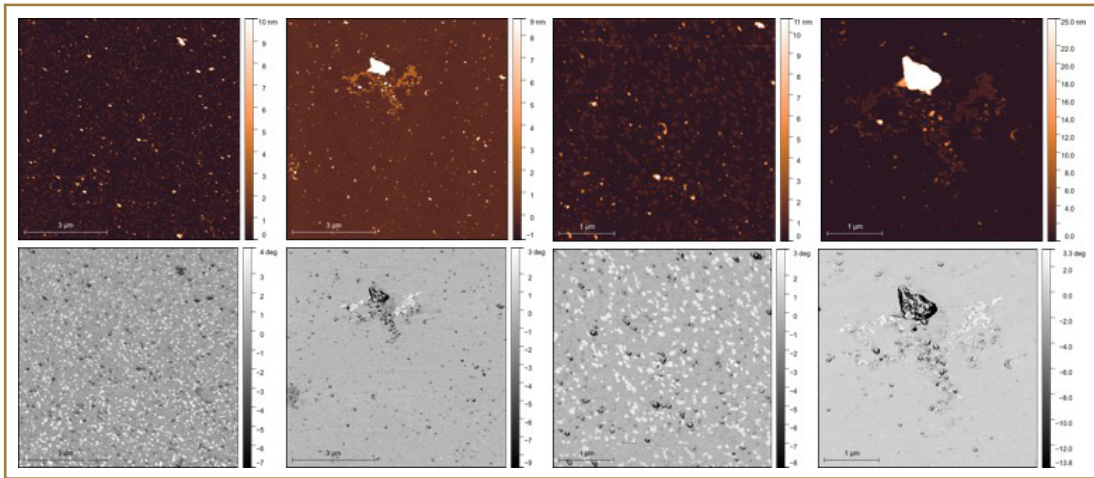
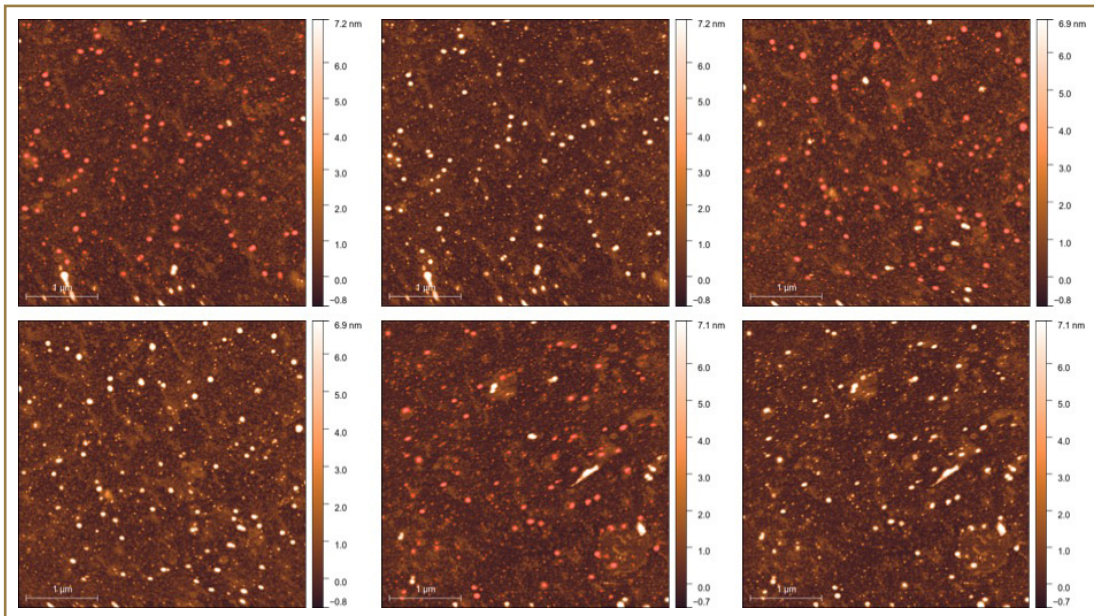
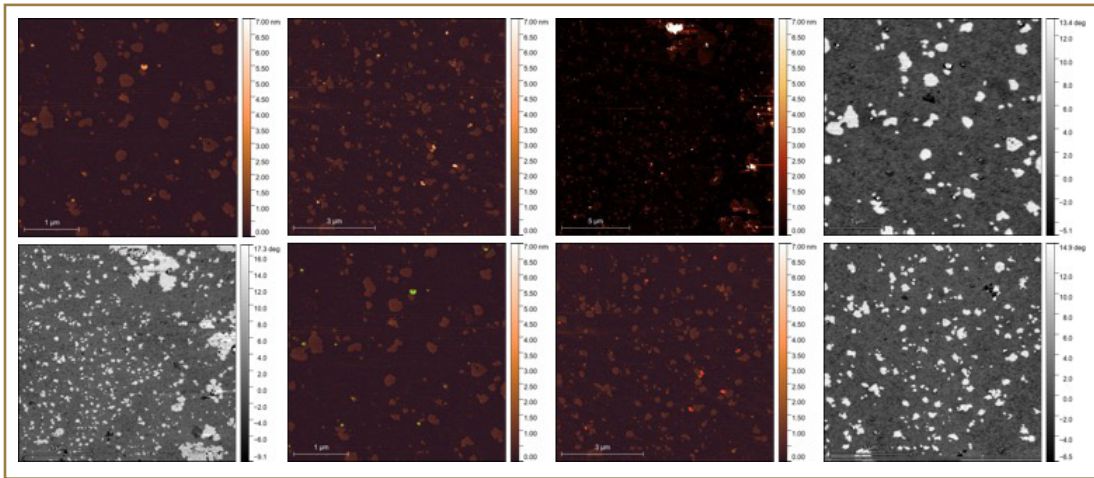
Figura 9*Imágenes AFM de PEVs de pepino***Figura 10***Imágenes AFM de PEVs de pomelo*

Figura 11

Imágenes AFM de PEVs de tomate



A partir de las fotografías anteriores, se demostró que las PEVs obtenidas de todos los productos estudiados tienen una forma predominantemente esférica, que corresponde a la forma de partículas similares a exosomas aislados de fluidos biológicos humanos.

Las distribuciones de altura y diámetro cuantifican aún más el impacto significativo de la inmovilización de la superficie electrostática en la forma distorsionada de las PEVs inmovilizadas. La solidez y la repetibilidad de los procedimientos del protocolo se confirmaron volviendo a analizar las mismas muestras tres veces, desde la preparación de la muestra hasta la obtención de imágenes, y cada repetición produjo resultados estadísticamente similares.

La evaluación inicial de la forma de las PEVs (caracterización del tamaño y la morfología) se realizó en el IFN mediante el método AFM a partir de las fotografías obtenidas y las PEVs detectadas se caracterizaron por su altura y diámetro, y no solo por la altura. En las figuras 12 y 13 se incluyen los resultados obtenidos por AFM.

Figura 12

Distribución de altura y diámetro de las PEVs de clorella

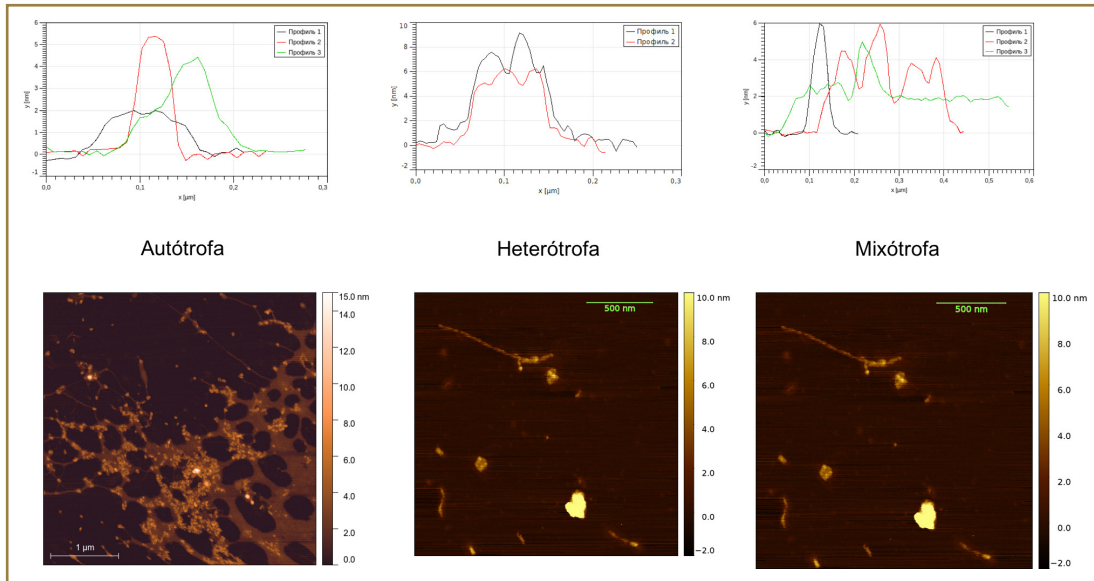
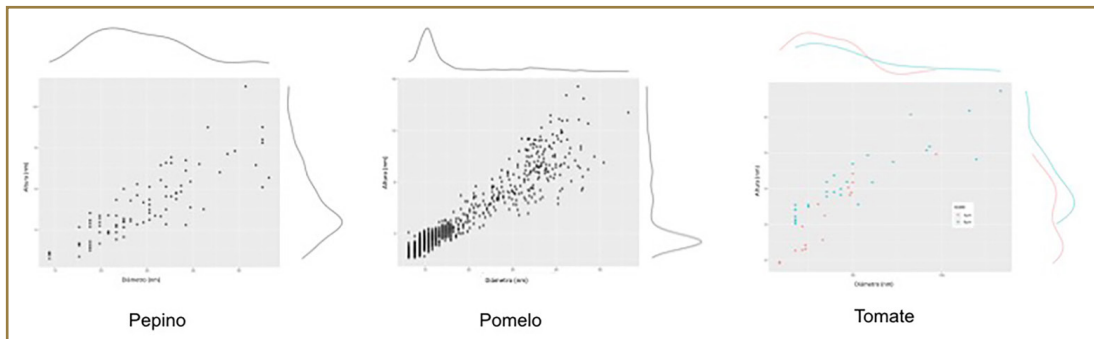


Figura 13

Distribución de altura y diámetro de las PEVs de pepino, pomelo y tomate



Tras las mediciones de altura y diámetro de las PEVs, que se obtuvieron a partir de las fotografías de las PEVs de cada producto, estimamos los tamaños medios de las PEVs para lo que utilizamos un mínimo de 100 partículas ($N=100$) para la evaluación estadística, la cual se hizo a partir del diámetro que se encuentra en el plano XOY. En la tabla 6 se resumen los resultados.

Tabla 6

Distribución de las PEVs por tamaño, por AFM, con el valor medio indicado para cada producto (N=100)

Producto	Nombre científico	Tamaño (nm)	DE (nm)
Clorella	<i>Chlorella vulgaris</i>	72	34
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	64	28
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i>	59	33
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	72	25

De esta forma, se obtuvo la distribución de tamaños de PEVs por AFM para cada producto estudiado. Los tamaños de las vesículas de todos los productos se encuentran en el rango de 50 a 72 nm, que también es característico de las partículas similares a exosomas.

Para poder comprobar la repetitividad de los resultados, realizamos microscopía electrónica de barrido (SEM) para, además y específicamente, obtener información microscópica sobre la superficie o la región cercana a la superficie de una muestra de las PEVs obtenidas de los zumos de pomelo y tomate.

Las fotografías de FESEM se incluyen en las figuras 14 y 15.

Figura 14

Fotografía de microscopio electrónico de PEVs de pomelo

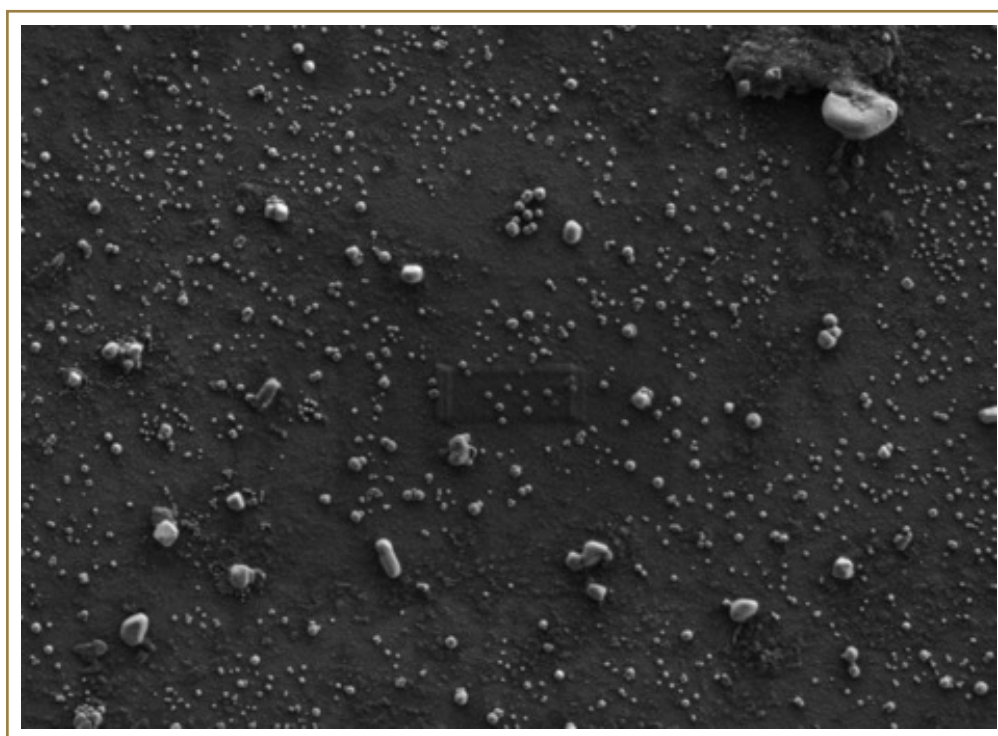
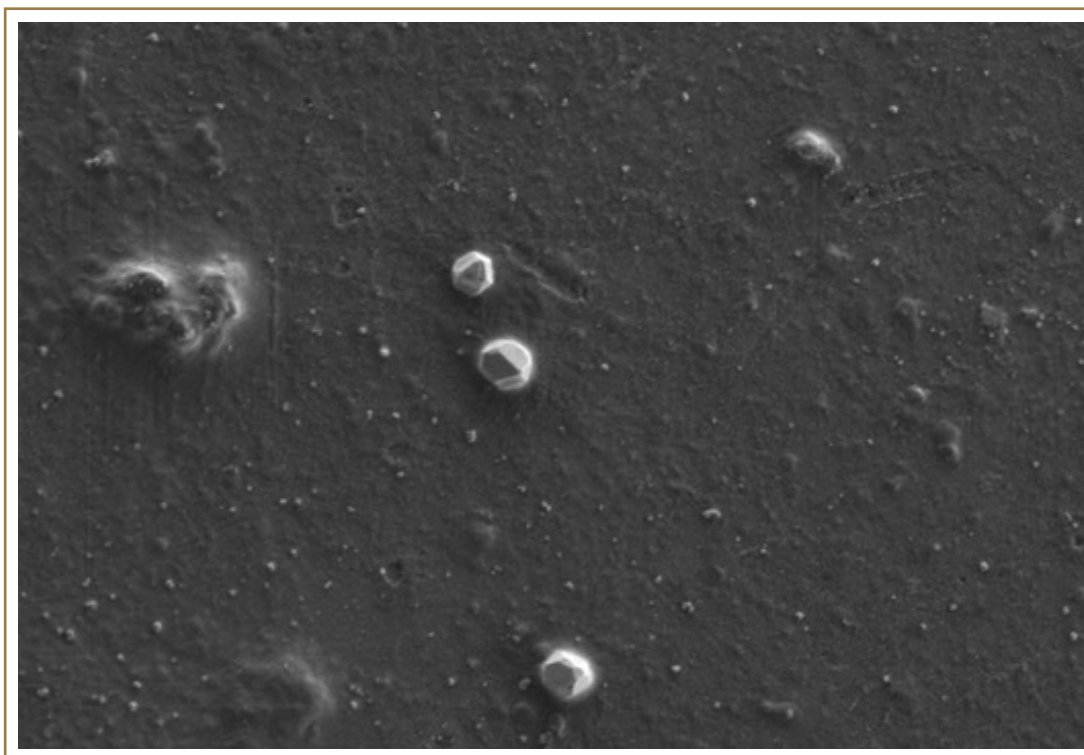


Figura 15

Fotografía de microscopio electrónico de PEVs de tomate



Las fotografías de microvesículas de pomelo y tomate muestran partículas de forma redonda entre cristales de PBS. Además, se observa que la muestra, inherentemente, presentó un recubrimiento. En la muestra de pomelo, se observan partículas que rondan los 100 nm. En el caso del tomate, las partículas obtenidas mostraron una menor homogeneidad de su forma. Esto puede deberse a que las partículas de tomate son menos estables a procesos de deshidratación y fijación que las partículas de pomelo. La forma redonda de las partículas de ambas muestras concuerda con partículas similares a exosomas provenientes de plantas, las cuales se ha mostrado por TEM y AFM que presentan esta forma en condiciones osmóticamente estables.

5.3. CLASIFICACIÓN DE TAMAÑO

Recientemente, se han desarrollado varios métodos de caracterización y validación, tanto para investigación como con fines clínicos, para analizar la pureza de las VEs y cuantificar su carga. Estos métodos incluyen microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), análisis de seguimiento de nanopartí-

culas (NTA), dispersión de luz dinámica (DLS), detección de pulso resistivo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), microfluidos y biosensores electroquímicos (Dragovic *et al.*, 2011a; Théry *et al.*, 2006).

El tipo de vesícula extracelular influye en la relación entre sus diámetros geométrico e hidrodinámico. La relación entre estos diámetros aún no se comprende bien, ya que carecemos de conocimientos estructurales y mecánicos sobre las propiedades de las EVs. En particular, los movimientos brownianos de las vesículas en una gota de muestra pueden hacer que las mediciones basadas en imágenes AFM dependan del tiempo de preparación de la muestra (Skliar & Chernyshev, 2019). Se sabe que la AFM, como método para la detección de PEVs, tiene una serie de limitaciones, lo que lleva a la necesidad de utilizar otras formas de estimar los parámetros de las PEVs, en particular su tamaño. Así, en el curso de este estudio en el IFN, este parámetro se estimó utilizando NTA al objeto de determinar la relación entre los tamaños geométricos de las PEVs medidas en el AFM y sus tamaños hidrodinámicos proporcionados por la NTA.

Además de la concentración, el método NTA estimó el diámetro hidrodinámico medio y la moda de las PEVs investigadas obtenidas de los cuatro productos estudiados (tabla 7).

Tabla 7

Distribución de TMH y modas (en nm) de las PEVs de los diferentes productos obtenidos por NTA



Así, las PEVs de tomate y clorella presentan los tamaños más grandes, teniendo un diámetro hidrodinámico promedio de 140 ± 13 y 127 ± 23 nm, respectivamente. Las PEVs de pepino tienen el tamaño más pequeño con los

valores correspondientes del diámetro hidrodinámico promedio de 50 ± 7 nm (tabla 7).

Los tamaños de PEVs obtenidos corresponden a partículas similares a exosomas y están en el rango de 50 a 140 nm.

Así, en el transcurso del estudio se realizó una evaluación del tamaño y morfología de las PEVs obtenidas de los 4 productos y los métodos AFM y NTA demostraron que las preparaciones resultantes contienen vesículas rodeadas por una bicapa lipídica de forma predominantemente esférica, que es típica de las partículas similares a exosomas.

Las distribuciones de tamaño de las PEVs estimadas por los dos métodos estaban en rangos similares pero tenían discrepancias (tabla 8) debido a las limitaciones y peculiaridades de cada método utilizado en el estudio. Por ejemplo, cuando se utiliza el método NTA es necesario considerar una posibilidad de «atrapar» las partículas pequeñas que se encuentran en el campo de las más grandes lo que lleva a la sobreestimación del tamaño de las partículas. Al preparar las muestras para el AFM, éstas se secan sobre mica, lo que, a su vez, provoca la deformación de las vesículas al interactuar con la superficie de la mica, por lo que su tamaño diametral en el plano de detección XOY puede aumentar debido a la disminución del tamaño a lo largo del eje Z.

Tabla 8

Distribución comparativa del tamaño de las PEVs por los dos métodos utilizados

	NTA		AFM	
	Media	DE	Media	DE
Clorella	127	13	72	9
Pepino	50	7	64	7
Pomelo	86	6	59	4
Tomate	140	13	72	11

Finalmente, para poder comprobar por otro medio la distribución de tamaño de vesículas extracelulares aisladas de zumos realizamos en el IFN una medición por dispersión de luz dinámica (DLS). De manera que las PEVs de pomelo, tomate y pepino, obtenidas mediante un procedimiento de centrifugación estándar, fueron examinadas por DLS en dos instrumentos: Photocor Compacto - z, y «LKS-3».

Los analizadores de tamaño de partículas Photocor se basan en la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) y están diseñados para mediciones de tamaños de partículas submicrométricos, coeficientes de difusión, viscosidades, pesos moleculares de polímeros en estudios básicos y aplicados. Mediante LKS-3 analizamos el tamaño de partícula, la carga de partícula (potencial Zeta) y su peso molecular.

Los resultados del procesamiento de la función de correlación (Photocor) para las diferentes muestras se resume en las figuras 16 y 17.

Figura 16

Datos de correlación de las PEVs de clorella medidas por DLS

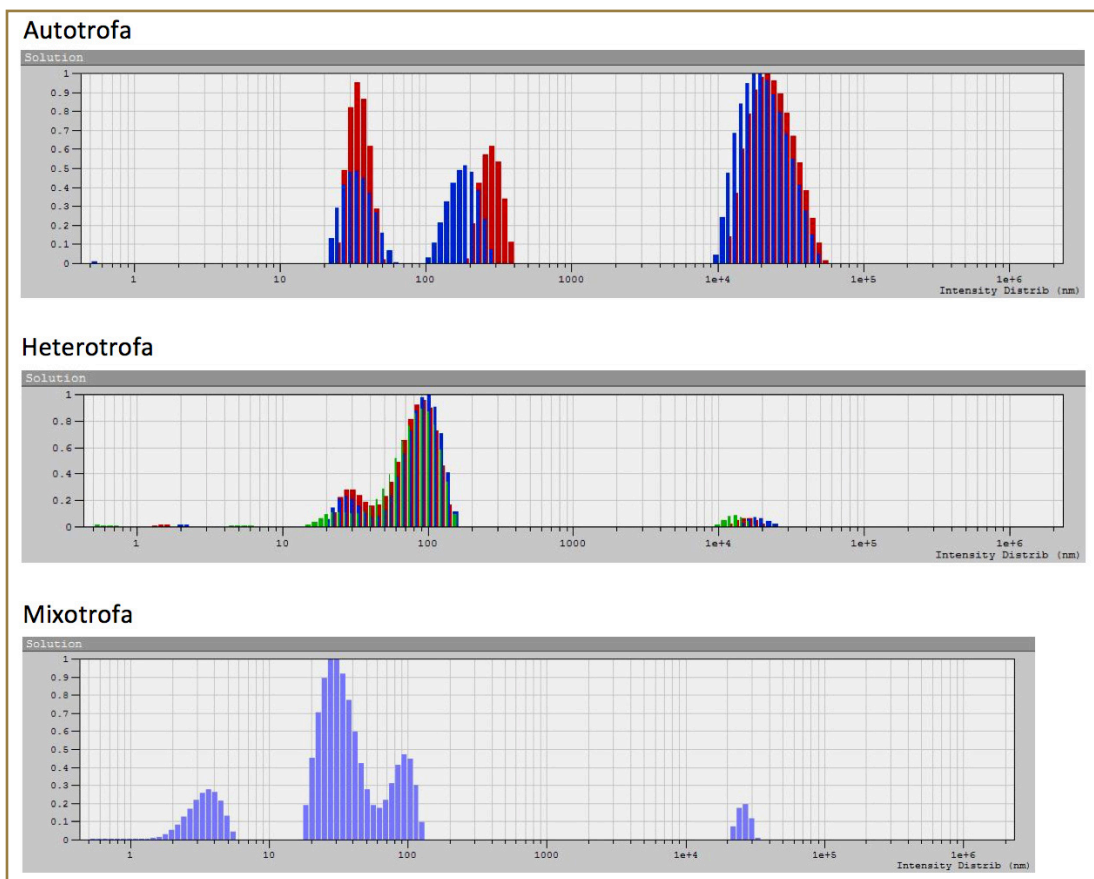
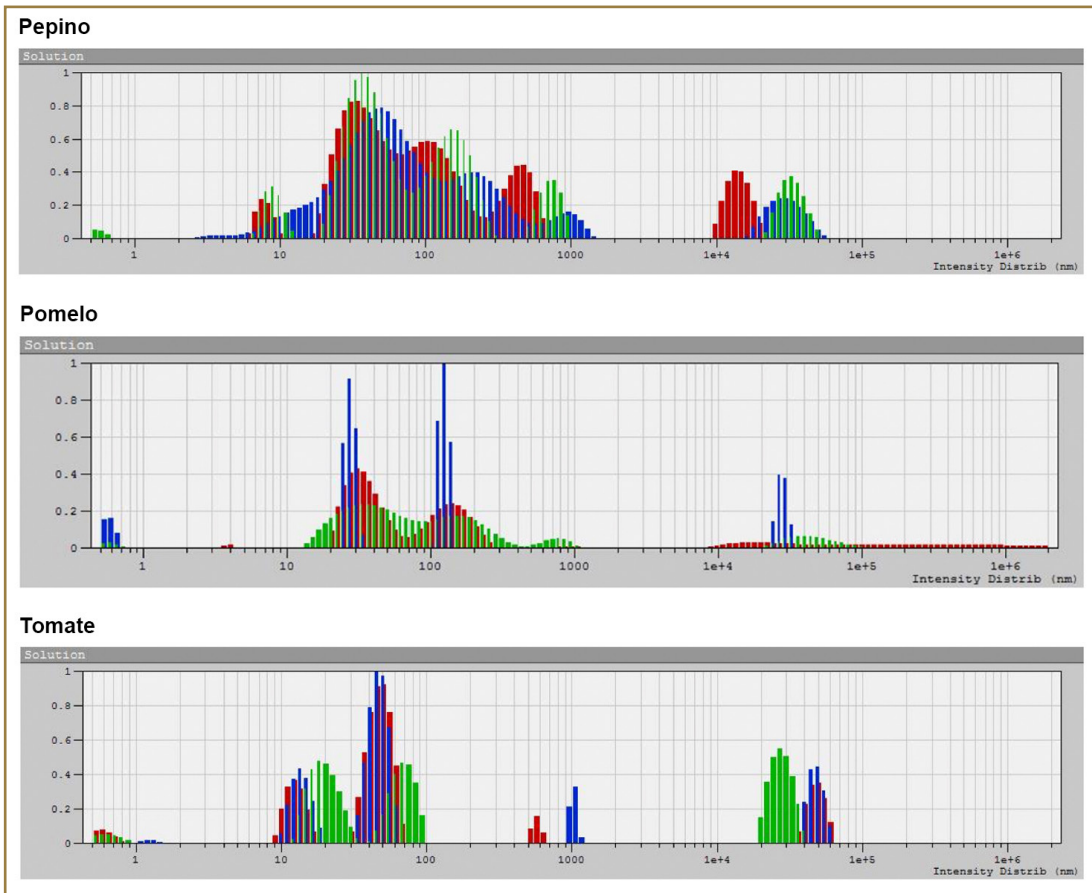


Figura 17

Datos de correlación de las PEVs de pepino, pomelo y tomate medidas por DLS



Los resultados numéricos del espectro a (LKS) para los diferentes zumos se resume en las tablas 9 y 10.

Tabla 9*Datos numéricos de correlación de las PEVs de clorella medidas por LKS*

AUTÓTROFA				
Peak analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,254	34,74	33,58	5,507
2	0,173	279,90	282,10	46,13
3	0,573	2,50E+04	2,20E+04	8479
X2: 0,004				
Fitting Range: (55; 288) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,190	34,71	33,58	8,078
2	0,199	183,30	188,10	41,77
3	0,611	2,20E+04	2,00E+04	8164
X2: 1,3E-4				
HETERÓTROFA				
Peak analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,003	1,532	1,606	0,089
2	0,151	29,71	27,42	4,587
3	0,817	86,22	92,52	23,38
4	0,029	1,60E+04	1,60E+04	2211
X2: 1,30E-4				
Fitting Range: (75; 181) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,003	1,532	1,606	0,089
2	0,151	29,71	27,42	4,587
3	0,817	86,22	102,4	23,38
4	0,029	1,60E+04	1,60E+04	2211
X2: 1,3E-4				

Fitting Range: (75; 181) channels

Number of intervals: 150

Boundaries: (0,500; 2E+6)

Resolution: 0

Distribution analysis

Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,060	22,38	24,78	3,906
2	0,901	85,70	92,52	28,37
3	0,039	1,30E+04	1,30E+04	2001

X2: 1,3E-4

MIXÓTROFA

Fitting Range: (90; 288) channels

Number of intervals: 150

Boundaries: (0,500; 2E+6)

Resolution: 0

Distribution analysis

Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,114	1,652	1,777	0,353
2	0,546	27,04	24,78	4,856
3	0,291	77,69	75,55	11,30
4	0,050	2,30E+04	2,40E+04	2334

X2: 1,5E-4

Tabla 10

Datos numéricos de correlación de las PEVs de pepino, pomelo y tomate medidas por LKS

PEPINO				
Peak analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,04	7,715	7,343	0,949
2	0,411	36,89	33,58	12,07
3	0,291	117,4	102,4	40,39
4	0,148	429,6	468,2	99,61
5	0,11	1,40E+04	1,30E+04	2598
X2: 1,80E-4				
Fitting Range: (75; 191) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,003	3,502	3,612	0,397
2	0,638	50,21	50,37	29,46
3	0,211	250,8	208,1	94,03
4	0,053	887,1	951,8	203,7
5	0,095	3,00E+04	2,70E+04	8258
X2: 1,3E-4				
Fitting Range: (75; 191) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,006	0,569	0,527	0,047
2	0,006	9,09	8,993	1,339
3	0,448	41,74	37,16	13,52
4	0,295	158,1	153,6	49,09
5	0,084	733	777,2	118,6
6	0,102	3,40E+04	3,30E+04	6457
X2: 1,9E-4				

POMELO				
Peak analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,005	3,832	3,998	0,268
2	0,519	34,12	30,34	9,649
3	0,342	138,3	138,8	42,9
4	0,066	3,00E+04	1,80E+04	1,80E+04
5	0,069	5,40E+05	2,00E+05	4,80E+05
X2: 2,20E-4				
Fitting Range: (75; 185) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,066	0,573	0,583	0,047
2	0,372	27,79	27,42	2,448
3	0,387	124,9	125,4	10,35
4	0,175	2,80E+04	2,70E+04	2644
X2: 4,7E-4				
Fitting Range: (75; 185) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,011	0,589	0,583	0,061
2	0,516	38,76	37,16	16,79
3	0,332	166,1	153,6	67,27
4	0,043	753,3	777,2	144,6
5	0,097	4,50E+04	4,00E+04	1,60E+04
X2: 1,7E-4				

TOMATE				
Peak analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,031	0,611	0,583	0,075
2	0,184	12,35	12,19	1,859
3	0,584	47,65	50,37	8,78
4	0,035	570,4	573,4	43,09
5	0,166	4,80E+04	5,00E+04	6659
X2: 2,60E-4				
Fitting Range: (75; 191) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,003	1,241	1,185	0,085
2	0,218	13,74	13,49	2,14
3	0,524	46,8	45,51	7,36
4	0,069	1.021	1.053	75,54
5	0,185	4,90E+04	5,00E+04	6101
X2: 2,4E-4				
Fitting Range: (75; 191) channels Number of intervals: 150 Boundaries: (0,500; 2E+6) Resolution: 0				
Distribution analysis				
Peak	Area	Mean	Position	STD
1	0,028	0,653	0,645	0,101
2	0,349	20	18,28	4,477
3	0,288	68,95	68,26	12,48
4	0,335	2,80E+04	2,70E+04	5079
X2: 9,7E-4				

Analizando los datos de distribución de radios hidrodinámicos de PEVs obtenidos por el método de regularización (de partículas grandes: banda 4000 Hz y de partículas pequeñas: banda 16000 Hz) observamos en el caso de clorella como omitiendo la cola multimicrónica, que muy probablemente sea un artefacto, se puede hablar de dos tipos de tamaños: 40-60 nm y 170-190 nm. En el caso de pepino, si tratamos de filtrar los valores generales, se pueden distinguir tamaños repetitivos de partículas grandes con tamaños del orden

de 250-500 nm, y de partículas pequeñas de entre 20-30 y 100 nm. En el caso de pomelo, entre la abundancia de datos, se pueden distinguir partículas grandes con tamaños del orden de 320 nm, y partículas pequeñas de entre 60 y 90 nm. En el caso de tomate, se pueden distinguir tamaños repetitivos de partículas grandes con tamaños del orden de 80-100 nm, y de partículas pequeñas de entre 20 y 30 nm.

Los análisis de DLS se repitieron en IDIBE para comprobar la repetitividad de los valores analíticos. Los datos para pomelo y tomate se incluyen en las tablas 11 y 12.

Tabla 11*Datos de correlación de las PEVs de pomelo medidas por DLS*

Particle size							
	1	2	3	X	SD		
Diámetro (nm):	104,4	108,33	104,92	105,88	1,74		
Polidispersidad:	0,3	0,311	0,343	0,318	0,018		
MW (g/mol):	3,16E+07	3,45E+07	3,20E+07	3,27E+07	1,26E+06		
Diam. 10 (nm):	54,17	55,61	52,31	54,03	1,35		
Diam. 50 (nm):	104,4	108,33	104,92	105,88	1,74		
Diam. 90 (nm):	201,22	211,02	210,46	207,57	4,49		
Size distribution							
	1	2	3	X	SD		
Diam. By intensity:	156,44	177,82	167,99	167,42	8,74		
Diam. By volume:	45,91	57,11	42,89	48,64	6,12		
Diam. By number:	31,85	39,71	36,31	35,96	3,22		
Sample: Grapefruit Code: GRP Method: DLS Liquid conditions Dilution: 1:10 Liquid: Water Temperature (°C): 25 Viscosity (cp): 0,89 Refractive index: 1,33 Scattering angle (°): 90							
Z-potential							
	1	2	3	4	5	X	SD
Z-potential (mV):	-16,37	-1,32	-9,89	-11,53	-10,84	-9,99	4,88
Mobility (μs)/(V/cm):	-1,28	-0,1	-0,77	-0,9	-0,84	-0,778	0,382
RMS residual	6,35E-02	3,95E-02	5,27E-02	8,15E-02	5,40E-02	0,06	0,01
Method: PALS Liquid conditions Dilution: 1:10 Liquid: Water Temperature (°C): 25 Viscosity (cp): 0,89 Refractive index: 1,33 Dielectric constant: 78,54 pH: 10,5							

Tabla 12*Datos de correlación de las PEVs de tomate medidas por DLS*

Particle size					
	1	2	3	X	SD
Diámetro (nm):	190,17	158,07	183,08	177,11	13,77
Polidispersidad:	0,355	0,299	0,351	0,335	0,026
MW (g/mol):	1,28E+08	8,29E+07	1,17E+08	1,09E+8	1,90E+07
Diam. 10 (nm):	93,82	82,02	90,61	88,82	4,98
Diam. 50 (nm):	190,17	158,07	183,08	177,11	13,77
Diam. 90 (nm):	385,49	304,6	369,89	353,33	35,04
Size distribution					
	1	2	3	X	SD
Diam. By intensity:	324,95	224,65	288,72	279,44	41,47
Diam. By volume:	239,53	98,03	156,27	164,61	58,07
Diam. By number:	63,97	63,22	53,72	60,30	4,67
Sample: Tomato Code: TTE Method: DLS					
Liquid conditions Dilution: 1:10 Liquid: Water Temperature (°C): 25 Viscosity (cp): 0,89 Refractive index: 1,33 Scattering angle (°): 90					

Z-potential							
	1	2	3	4	5	X	SD
Z-potential (mV):	-12,63	-11,05	-6,56	-12,21	-12,65	-11,02	2,30
Mobility (μs)/(V/cm):	-0,99	-0,86	-0,51	-0,95	-0,99	-0,860	0,181
RMS residual	3,09E-02	1,77E-02	2,07E-02	4,67E-02	2,17E-02	0,03	0,01
Method: PALS							
Liquid conditions Dilution: 1:10 Liquid: Water Temperature (°C): 25 Viscosity (cp): 0,89 Refractive index: 1,33 Dielectric constant: 78,54 pH: 10,5							

Tras esta repetición de los análisis de DLS, se comprobó que las nanopartículas de pomelo presentaron un tamaño de $105,88 \pm 1,74$ nm, mientras que las nanopartículas de tomate presentaron un tamaño de $177,11 \pm 13,77$ nm, siendo un tamaño mayor que el encontrado en las partículas de pomelo.

La comparación de los resultados de tamaño de las PEVs con los tres métodos utilizados se incluye en la tabla 13.

Tabla 13

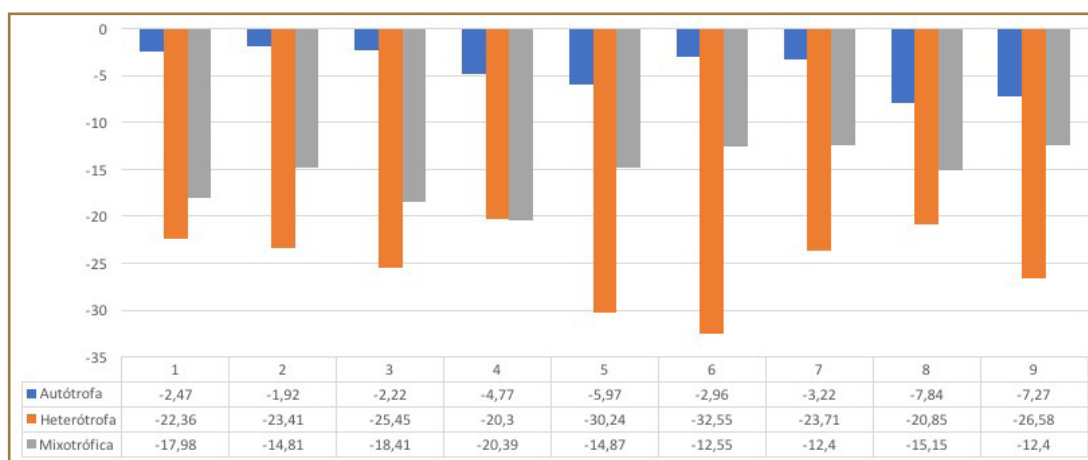
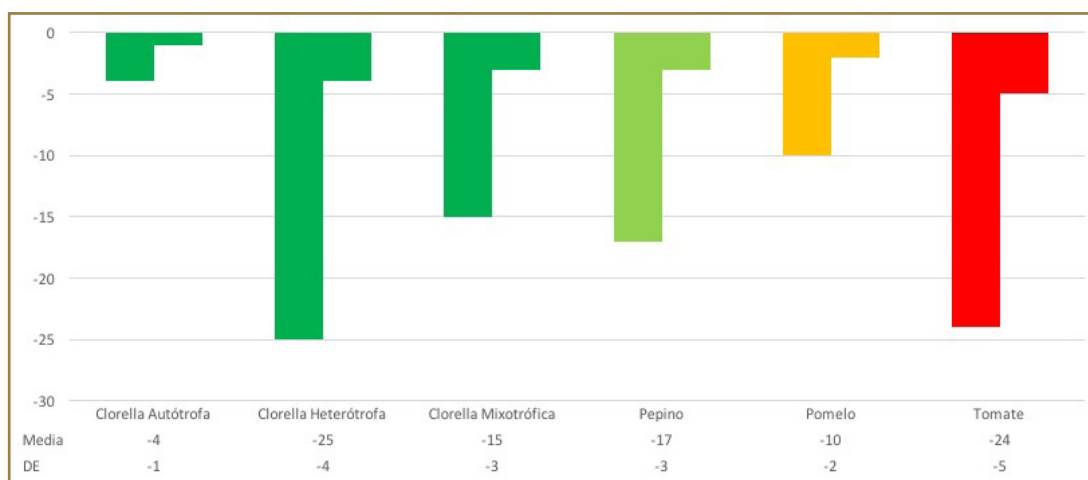
Datos de tamaño de las PEVs con los tres métodos utilizados

	NTA		AFM		DLS (IFN)		DLS (IDIBE)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Clorella	127	13	72	9	102	23	NE	NE
Pepino	50	7	64	7	158	21	NE	NE
Pomelo	86	6	59	4	125	10	106	2
Tomate	140	13	72	11	161	18	177	14
Tomate	140	13	72	11	161	18	177	14

5.4. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ZETA DE LAS PEVS

Presumiblemente, el valor de la carga de las partículas puede estar relacionado no sólo con la posibilidad de su carga por biomoléculas exógenas, sino también con la eficiencia de la «captura» de las vesículas por las células. Así, una carga más negativa de las PEVs puede disminuir la posibilidad de su penetración en la célula. El potencial Zeta de las PEVs, relacionado indirectamente con la carga de la partícula, se estimó mediante dispersión de luz electroforética (figura 19).

Las mediciones se hicieron nueve veces consecutivas y en la figura 18 se resumen los resultados para el caso de clorella.

Figura 18*Potencial Zeta de las PEVs de clorella en los 9 análisis realizados***Figura 19***Potencial Zeta de las PEVs estudiadas*

Todas las PEVs investigadas tenían carga negativa. Las vesículas de clorella heterótrofa y tomate tuvieron la mayor carga por módulo, con cargas de -25 y -24 mV, respectivamente, y las más bajas fueron las de clorella autótrofa con cargas de -4.

Para poder contrastar los resultados, procedimos en IDIBE a realizar una nueva medición en el modo de dispersión de luz electroforética, en el PALS (Parallel Phase Analysis Light Scattering). En dicho modo se analiza la función de fase de la señal Doppler y se mejora la dispersión de luz de análisis de fase convencional para determinar la movilidad electroforética y la carga, con la máxima sensibilidad y el mínimo daño a las biomoléculas frágiles. También

amplía las mediciones sólidas de otros métodos a proteínas y otras biomoléculas en soluciones tampón nativas (tabla 14).

Tabla 14

Potencial Zeta de las PEVs de pomelo y tomate por DLS-PALS

POMELO							
Z-potential							
	1	2	3	4	5	X	SD
Z-potential (mV):	-16,37	-1,32	-9,89	-11,53	-10,84	-9,99	4,88
Mobility ($\mu\text{s}/(\text{V}/\text{cm})$):	-1,28	-0,1	-0,77	-0,9	-0,84	-0,778	0,382
RMS residual	6,35E-02	3,95E-02	5,27E-02	8,15E-02	5,40E-02	0,06	0,01
TOMATE							
Z-potential							
	1	2	3	4	5	X	SD
Z-potential (mV):	-12,63	-11,05	-6,56	-12,21	-12,65	-11,02	2,30
Mobility ($\mu\text{s}/(\text{V}/\text{cm})$):	-0,99	-0,86	-0,51	-0,95	-0,99	-0,860	0,181
RMS residual	3,09E-02	1,77E-02	2,07E-02	4,67E-02	2,17E-02	0,03	0,01
Method: PALS							
Liquid conditions							
Dilution: 1:10							
Liquid: Water							
Temperature ($^{\circ}\text{C}$): 25							
Viscosity (cp): 0,89							
Refractive index: 1,33							
Dielectric constant: 78,54							
pH: 10,5							

El potencial Z para pomelo fue cercano a -10, lo que indica que la carga de estas partículas es negativa, mientras que el de tomate fue algo mayor de -11 y presentaron un potencial Z más negativo que las partículas de pomelo.

De los datos obtenidos podemos concluir que las PEVs de tomate presentaron un peso molecular mayor que el resto de muestras, lo cual se correlaciona con los datos de tamaño de partícula obtenidos.

Las muestras de pepino y pomelo presentan un tamaño de partícula inferior a 100 nm, pero su potencial Z indica que no son estables en suspensión y que tienden a precipitar. Esto se correlaciona con el peso molecular que presentan las partículas, los cuales en ambos casos, es alto. Por estas razones, aunque el proceso de obtención de PEVs de pomelo y tomate permitió obtener una distribución homogénea del tamaño de partículas en ambas muestras, las partículas obtenidas no presentan estabilidad en suspensión.

De los experimentos realizados en IDIBE hemos obtenido datos adicionales que se resumen en la tabla 15.

Tabla 15

Tamaños de partícula, polidispersidad, peso molecular y potencial Z de PEVs de pomelo y tomate

Muestra	Tamaño de partícula	Polidispersidad	Peso molecular	Potencial Z
	nm	-	g/mol	mV
Pomelo	105,88 ± 1,74	0,318 ± 0,018	3,27E07 ± 1,26E06	-9,99 ± 4,98
Tomate	177,11 ± 13,77	0,335 ± 0,026	1,19E08 ± 1,90E07	-11,02 ± 2,30

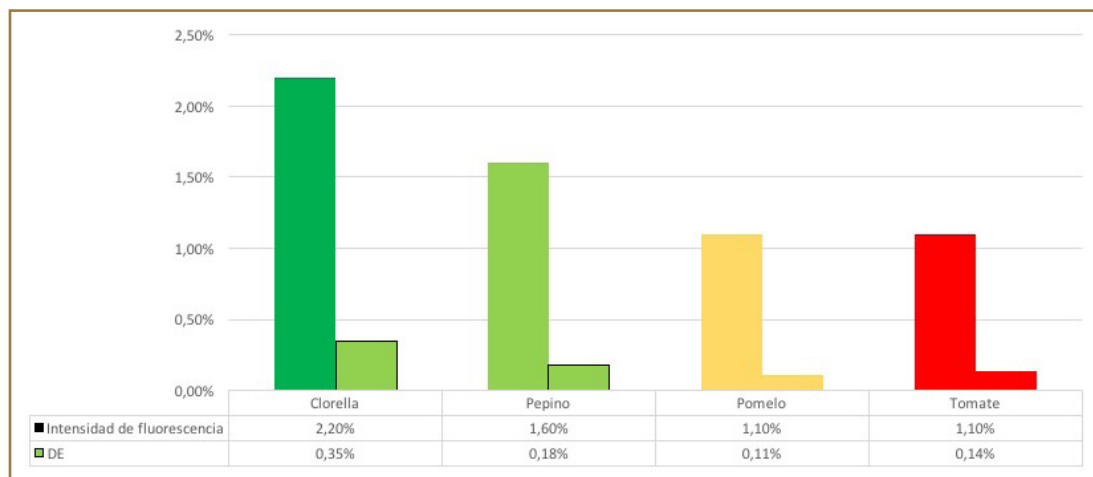
En pomelo, la distribución multimodal del tamaño de partícula muestra un patrón continuo, indicando que la polidispersión encontrada no se debe a diferentes tamaños de partículas en la muestra. En tomate, la distribución multimodal del tamaño de partícula muestra un patrón continuo, indicando que la polidispersión encontrada no se debe a diferentes tamaños de partículas en la muestra.

5.5. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CARGA Y LA ENTREGA DE LA PROTEÍNA EXÓGENA POR LAS PEVS A LAS CÉLULAS HUMANAS IN VITRO

En este trabajo, realizado en los centros IFN y CMIP, las PEVs obtenidas de los 4 productos fueron cargadas con la proteína exógena HSP70-Alexa647 por coincubación y tratamiento con ultrasonidos. La intensidad de la fluorescencia asociada a la cantidad de proteína HSP70-Alexa647 cargada en las vesículas de los diferentes productos se evaluó por fluorimetría. (figura 20). La cantidad de proteína que se cargó en las vesículas se determinó a partir de la intensidad de fluorescencia de las vesículas cargadas por proporción.

Figura 20

Fluorimetría: Evaluación comparativa de la eficiencia de carga de las PEVs de la proteína HSP70-Alexa647

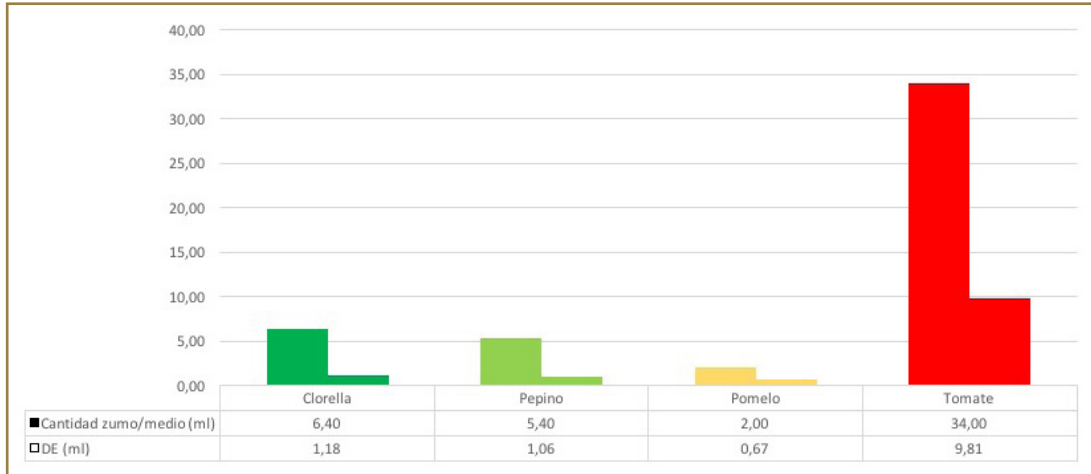


La intensidad de la fluorescencia de la preparación de la vesícula mezclada con HSP70-Alexa647 se tomó como el 100 %, lo que permitió la evaluación comparativa de la eficiencia de la carga y purificación de PEVs. Así, el primer filtrado tiene aproximadamente un 50 % de proteína fluorescente, mientras que el décimo filtrado tiene aproximadamente un 0,1 %, lo que indica que la muestra PEV fue purificada de proteína libre. Se demostró que las PEVs de clorella se cargaron de forma más eficiente con la proteína exógena HSP70-Alexa647, correspondiendo al 2,2 % de la cantidad de proteína en la mezcla original. Las PEVs de tomate y pomelo mostraron la menor eficiencia de carga, correspondiente al 1,1 % de proteína.

Dado que los diferentes productos producen distintas cantidades de vesículas, no es posible afirmar definitivamente cuál es el productor más promotor. Las vesículas de clorella son las mejores para entregar proteínas a las células, pero la clorella se segrega muy poco (lo sabemos por la NTA), por lo que no está claro si es más rentable utilizar vesículas que sean más baratas de segregar (el coste depende de la cantidad de zumo/medio a centrifugar) o las que sean mejores para entregar. Para poder responder a esta pregunta calculamos la cantidad teórica de zumo/medio (en el eje OY) que hay que utilizar para obtener una unidad teórica de fluorescencia (que corresponde a una determinada cantidad de proteína fluorescente entregada a las células).

Figura 21

Cantidad de zumo/medio (ml) requerido para obtener una unidad teórica de fluorescencia

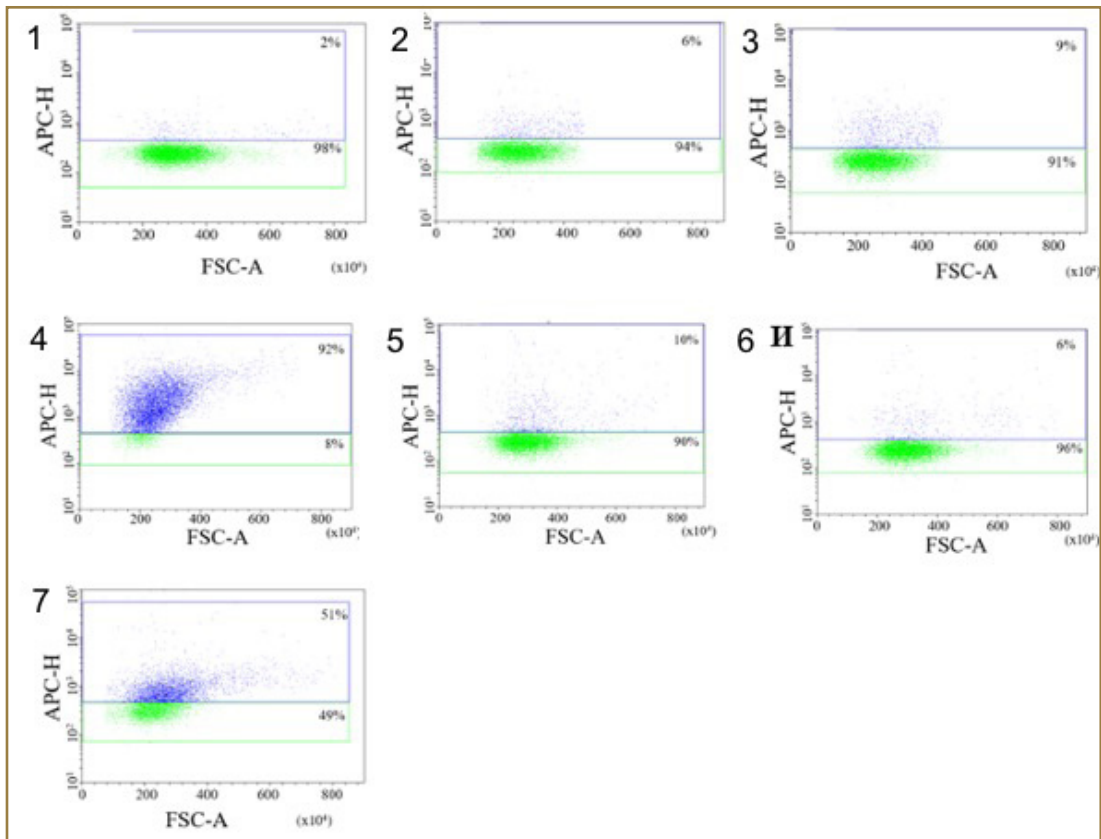


De estos datos podemos concluir que las PEVs de pomelo son las que deben usarse de preferencia como transportadores pues exigen una cantidad pequeña de zumo para obtener una unidad teórica de fluorescencia.

Se evaluó la eficacia del transporte por PEVs de la proteína exógena HSP70-Alexa a las células humanas *in vitro* mediante citometría de flujo. Las PEVs cargadas se añadieron a las células GI-Tr, los filtrados 1 y 10 se utilizaron como controles. También se añadió proteína libre a las células en cantidades del 2 % y el 5 %, correspondientes a los valores máximos de eficiencia de la carga de PEVs (figura 21).

La eficacia del suministro se evaluó mediante citometría de flujo por el número de células fluorescentes (número de eventos que se desplazaron a la zona con mayor intensidad de fluorescencia (figura 22 y tabla 16). En verde se señala la zona de fluorescencia normal y en azul la zona de mayor fluorescencia.

Figura 22

Citometría de flujo

Registro de transición celular desde la región de normal fluorescencia - verde, a la región de mayor fluorescencia - azul. 1) fluorescencia propia de las células de control; 2) fluorescencia celular, con la adición de 2 % de proteína de la mezcla inicial; 3) fluorescencia celular, con la adición de 5 % de proteína de la mezcla inicial; fluorescencia de las células tras la adición de PEVs cargadas: 4) clorella; 5) pepino; 6) tomate; 7) pomelo. En el eje OX, la señal de dispersión de luz directa (FSC), en el eje OY, la intensidad de fluorescencia en el canal de grabación del fluorocromo rojo Alexa 647 (APC)

La figura 22 muestra ejemplos de citogramas obtenidos con el software FlowCytometry. La zona verde es el área de las células de control cuya intensidad de fluorescencia se toma como cero. La zona azul es la zona de mayor intensidad de fluorescencia. El número de células transferidas de la zona de control a la zona fluorescente se expresó como porcentaje.

Tabla 16

Número de células fluorescentes coincubadas con PEVs cargadas

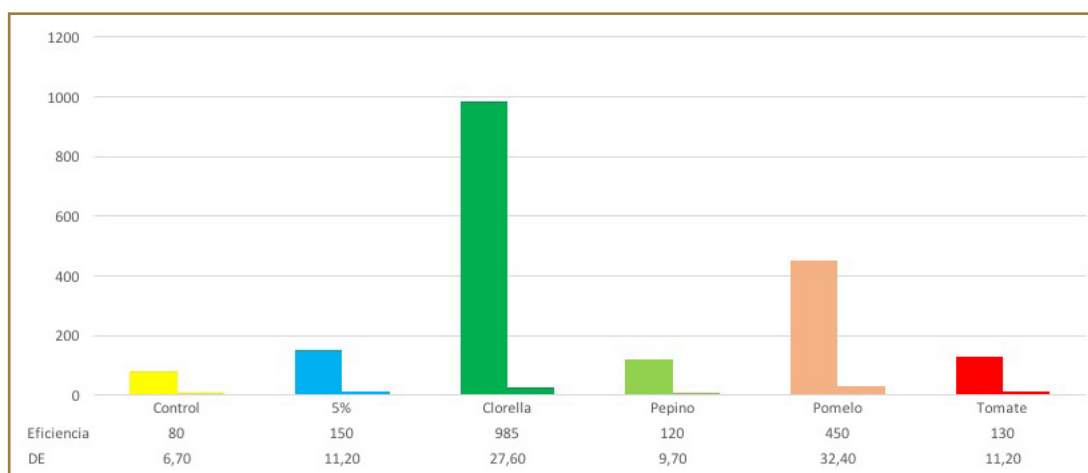
Producto	Nombre científico	Cantidad de células con fluorescencia	DE
Clorella	<i>Chlorella vulgaris</i>	92,00 %	9,70 %
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	10,00 %	1,30 %
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i>	51,00 %	6,80 %
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	6,00 %	1,60 %

El análisis mostró que la entrega más eficiente de la proteína exógena era mayor con las PEVs de clorella, con un 92 % de las células que se desplazaban a la región de mayor fluorescencia. Las PEVs de tomate y pepino tuvieron la menor eficiencia de entrega con un 6 % y 10 % de células, respectivamente.

Además de determinar el número de células que se encuentran en la región fluorescente, debe identificarse la intensidad de la fluorescencia de las células porque puede ser diferente, de ahí la necesidad de considerar un segundo parámetro de la eficiencia de entrega determinando la intensidad de fluorescencia de las células coincubadas con PEVs. La intensidad de la fluorescencia de las células corresponde a la acumulación de proteína fluorescente en las células (figura 23), que puede estar relacionada tanto con la eficiencia de la captación de vesículas por parte de las células como con la eficiencia de la carga de PEVs con HSP70-Alexa647 exógena.

Figura 23

Evaluación de la eficiencia de la entrega de HSP70-Alexa647 exógena usando PEVs a células humanas in vitro según la intensidad de la fluorescencia



En el transcurso del estudio, se llevó a cabo un análisis comparativo de la eficiencia de la entrega de proteína exógena por PEVs a células humanas, demostrándose que la proteína fluorescente HSP70-Alexa647 se transporta de manera más efectiva a las células humanas mediante las PEVs de clorella mientras que la proteína se transportó con la menor eficiencia utilizando las PEVs de pepino y tomate.

Cabe señalar que la proteína libre es capturada de manera menos eficiente por las células que en la composición de las vesículas, lo cual es un parámetro importante en el desarrollo de los transportadores de bioactivos, ya que esto ayuda a reducir la cantidad de biomoléculas utilizadas para lograr tal efecto funcional.

5.6. INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DE LAS PEVS EN LA EFICIENCIA DE CARGA Y ENTREGA DE PROTEÍNA EXÓGENA A CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO*

Los parámetros físicos de las PEVs (tamaño, carga, morfología) pueden afectar tanto la eficiencia de la carga como la del suministro de biomoléculas exógenas por parte de las vesículas vegetales a las células humanas. Por ejemplo, las partículas más grandes se pueden cargar de manera más eficiente que las vesículas más pequeñas. Al mismo tiempo, la presencia de sacos vesiculares y vesículas con varias capas lipídicas en los preparados de PEVs puede limitar la eficacia de su carga (el porcentaje de capas bilipídicas encontradas fue de 7 % para clorella, 18 % para pepino, 6 % para pomelo y 17 % para tomate). Además, el valor de la carga negativa de las PEVs puede afectar la eficiencia de su penetración en las células, aunque por el momento no se ha establecido el mecanismo exacto de captación de PEVs por parte de las células de mamíferos.

La fuerza de la relación entre los parámetros físicos estudiados de las vesículas y la eficiencia de su carga y entrega de proteínas exógenas se evaluó mediante análisis de correlación de Pearson y Spearman.

Se demostró que el valor del potencial Zeta estaba inversamente relacionado ($p=0,85$, $p^2=0,72$) con la eficiencia de la entrega de proteínas exógenas a las células humanas utilizando PEVs, pero no se encontró un efecto similar en la eficiencia de carga. Por lo tanto, cabe suponer que la carga de las partículas puede afectar a la capacidad de penetración de las PEVs en las células de los mamíferos.

También cabe destacar que no se encontraron relaciones entre los parámetros físicos (multicapa y tamaño, multicapa y potencial Zeta, etc.).

Tabla 17

Efecto de los parámetros físicos de las PEVs en la eficiencia de su carga y entrega de biomoléculas exógenas a las células humanas

	Tamaño,nm	Potencial Zeta	Varias capas bilipídicas	Eficiencia de la carga	Eficacia como transportador
Tamaño, nm	1,0	r=0,19	r= - 0,25	r=0,56	rs=0,33
		p=0,63	p=0,52	p=0,12	p=0,38
Potencial Zeta	r=0,19	1,0	r= - 0,54	r=0,61	rs=0,85
	p=0,63		p=0,13	p=0,08	p=0,004
Varias capas bilipídicas	r=- 0,25	r= - 0,54	1,0	r= - 0,18	rs= - 0,61
	p=0,52	p=0,13		p=0,64	p=0,08
Eficiencia de la carga	r=0,56	r=0,61	r= - 0,18	1,0	rs=0,60
	p=0,12	p=0,08	p=0,64		p=0,09
Eficacia como transportador	rs=0,33	rs=0,85	rs= - 0,61	rs=0,60	1,0
	p=0,38	p=0,004	p=0,08	p=0,09	

La tabla 17 muestra el coeficiente de correlación de Pearson (r), el coeficiente de correlación de Spearman (rs) y el nivel de significación (p), considerándose $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

5.7. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PRODUCTORES DE PEVS

Para evaluar las perspectivas de los productores de PEVs, que en el futuro serían los más apropiados para el desarrollo de sistemas de transportadores de nanoentrega de biomoléculas activas, entre IFN y CMIP, se seleccionaron dos parámetros principales, importantes dentro de la escala de producción: la eficiencia del rendimiento de las partículas y la eficiencia de la entrega de proteínas exógenas por PEVs a las células humanas *in vitro*.

Tabla 18

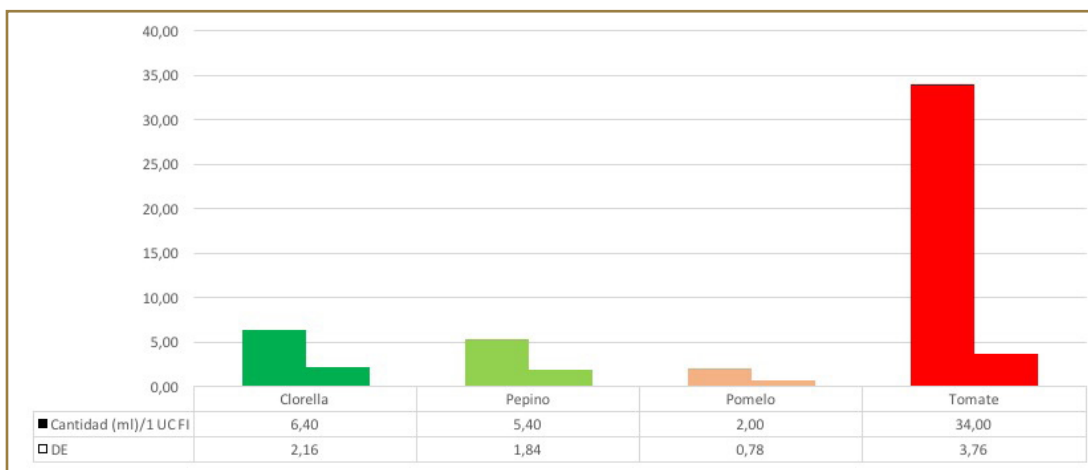
Parámetros para evaluar la ventaja de las PEVs para su uso en sistemas de administración de biomoléculas exógenas

	Efectividad de transporte en unidades convencionales	Eficiencia de rendimiento de las PEVs de 100 ml de zumo/medio de cultivo
Clorella	2411	3,40E+11
Pepino	251	3,90E+12
Pomelo	675	2,00E+12
Tomate	257	6,00E+11

Para establecer la correlación entre los dos parámetros seleccionados, los valores de FI (intensidad de fluorescencia) en unidades convencionales se correlacionan con la cantidad de proteína fluorescente transportada y acumulada y se relacionaron con el número de partículas de uno u otro producto necesarias para 1 unidad convencional de FI (figura 24). Esto dio como resultado el número de ml de zumo/medio de cultivo que serían necesarios para producir el número de partículas necesarias para una unidad convencional de FI.

Figura 24

Evaluación de la perspectiva de las PEVs cuando se utilizan en sistemas de transporte de moléculas bioactivas exógenas.



En el eje OY está la cantidad de zumo necesaria para obtener una eficiencia de entrega de proteínas exógenas (acumulación de proteínas en las células) equivalente a una unidad convencional de FI, obtenido por análisis de citometría de flujo de las células.

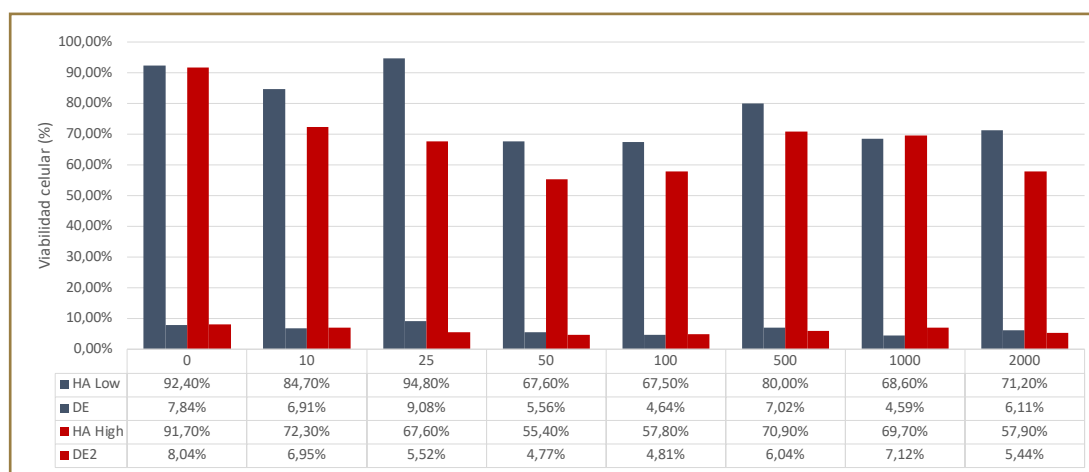
Así, se comprobó que la menor cantidad de materia prima (producto) para lograr una eficacia equivalente en la administración de proteínas exógenas a las células humanas fue en el caso de pomelo (2 ml/1 unidad convencional).

5.8. CULTIVO CELULAR CON ÁCIDO HIALURÓNICO

El objetivo del primer estudio fue evaluar la actividad de ácido hialurónico (2 %, 10 ml) de alto (1,8MDa) y bajo peso molecular (<0,1MDa) *in vitro* en cultivos de fibroblastos dérmicos para comprobar la supervivencia celular con ácido hialurónico para lo cual realizamos MTT test con longitud de onda 595 nm con Rizozurina, método que permite comprobar la supervivencia celular cuando se añade ácido hialurónico. Las conclusiones se resumen en la figura 25 que se refiere a la tasa de supervivencia celular de los fibroblastos dérmicos tras la exposición a los dos tipos de ácido hialurónico.

Figura 25

Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) tras la exposición a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico (mcg/pocillo)



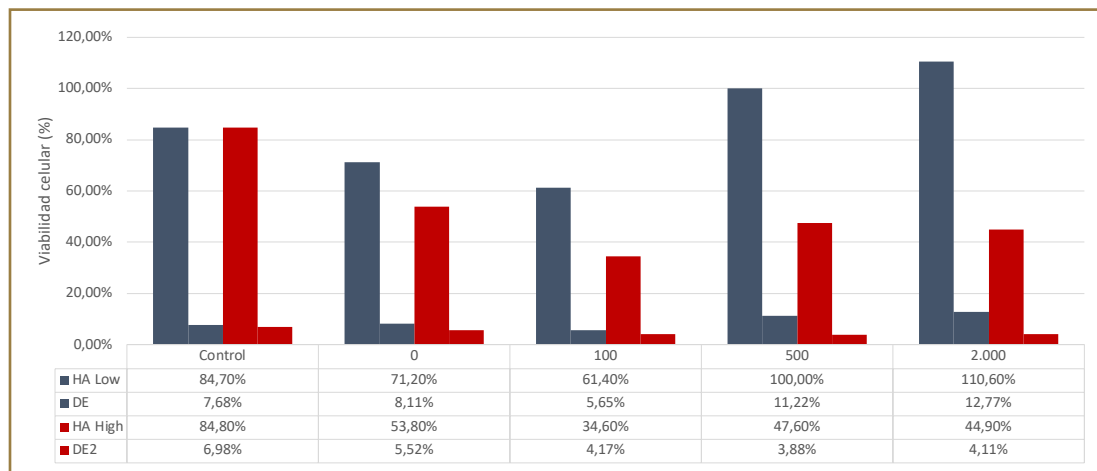
Observando cómo la viabilidad celular (o lo que es lo mismo, la supervivencia) es mayor con el ácido hialurónico de bajo peso molecular a concentraciones de 500 y 2000 mcg/pocillo.

Después de corroborar el tipo de ácido hialurónico menos tóxico para los fibroblastos dérmicos quisimos comprobar cuál de ellos tenía una mayor función regenerativa para lo que utilizamos un ensayo de raspado realizado en cultivos de fibroblastos confluentes para evaluar la motilidad celular en presencia del biomaterial al objeto de imitar la cicatrización de heridas. El control se tomó sin raspado y el 0 se realizó sobre células con raspado. El resto de pruebas se realizarón con diferentes concentraciones de los dos tipos de ácido hialurónico (mcg/placa). La cantidad de 100 mcg/placa se utilizó como control negativo pues era la concentración con peores resultados de viabilidad

celular en el estudio previo. Tras la medición con MTT Test evidenciamos que las concentraciones de 500 y 2000 mcg/placa de HA Low tienen un mayor efecto regenerativo (cicatrizante) posiblemente por favorecer la proliferación celular mientras que con HA High su efecto fue claramente menor (figura 26).

Figura 26

Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) tras raspado de fibroblastos dérmicos sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico (mcg/placa).

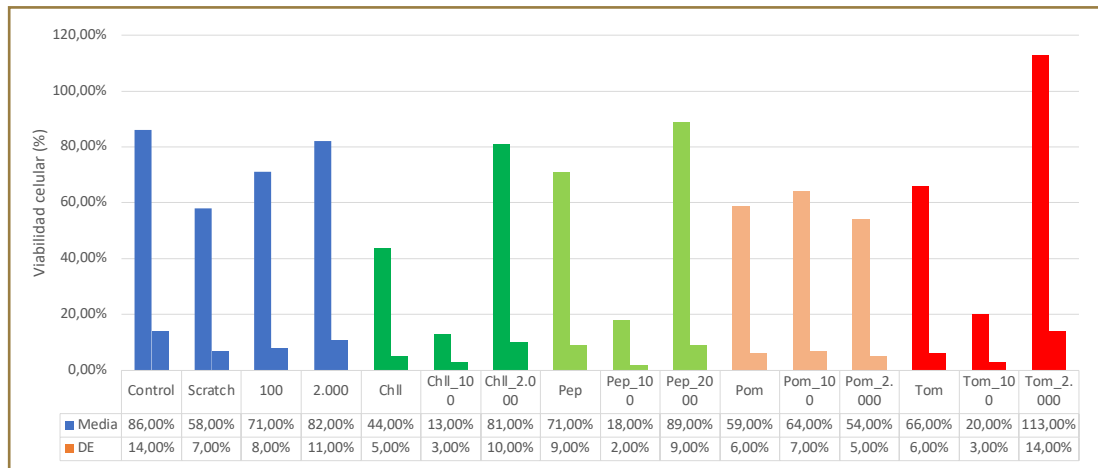


En resumen, comparando las dos formas de HA, solo HA Low fue capaz de inducir la regeneración de fibroblastos, lo que permitiría, en condiciones in vivo, reducir significativamente el área de una herida.

Seguidamente, estudiamos por MTT Test el efecto de HA y PEVs en la supervivencia de fibroblastos dérmicos raspados para lo cual utilizamos un control (fibroblastos), fibroblastos raspados, fibroblastos con 100 y 2000 mcg/placa de HA Low (figura 27). Se observa cómo el control tuvo un 86 % de supervivencia celular, los fibroblastos con raspado tras 72 % llegaron a un 58 % de supervivencia y los fibroblastos con 2000 mcg/placa de HA Low aumentaron su viabilidad celular hasta 82 %, cifras próximas a las del control. Al realizar los ensayos con PEVs y HA Low se observó cómo son las PEVs de tomate unidas a 2000 mcg/placa de HA Low son las que no solo producen mayor supervivencia de los fibroblastos, sino que aumentan su actividad lo que lleva a obtener un 113 % de viabilidad celular.

Figura 27

Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) de fibroblastos dérmicos sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico y PEVs de los productos estudiados

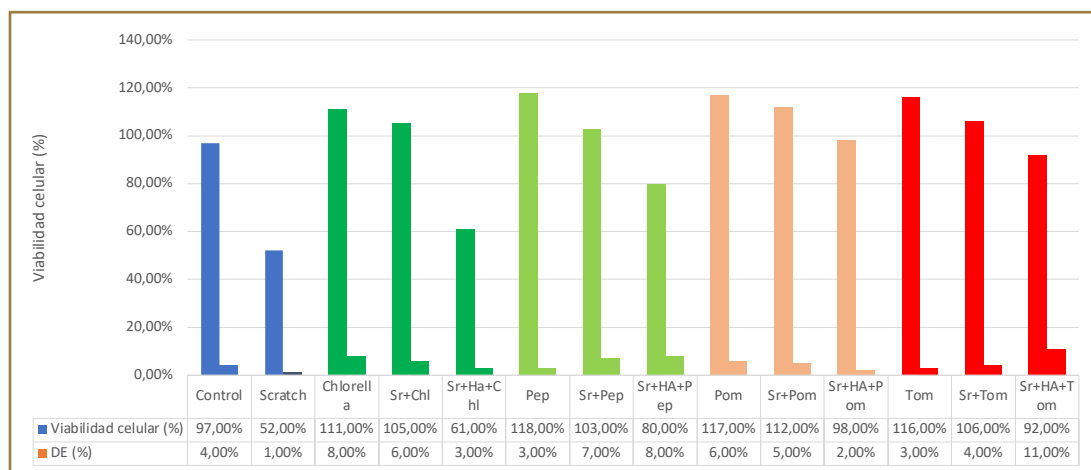


En resumen, frente a un control de 86 % de supervivencia, 2000 mcg/placa de HA Low aumenta la viabilidad celular lo que se ve magnificado al añadir PEVs de tomate llegando a un 113 % de viabilidad celular. Es destacable como la supervivencia se aumenta cuando, en general, a un aporte de 2000 mcg/placa de HA Low se le añaden diferentes PEVs.

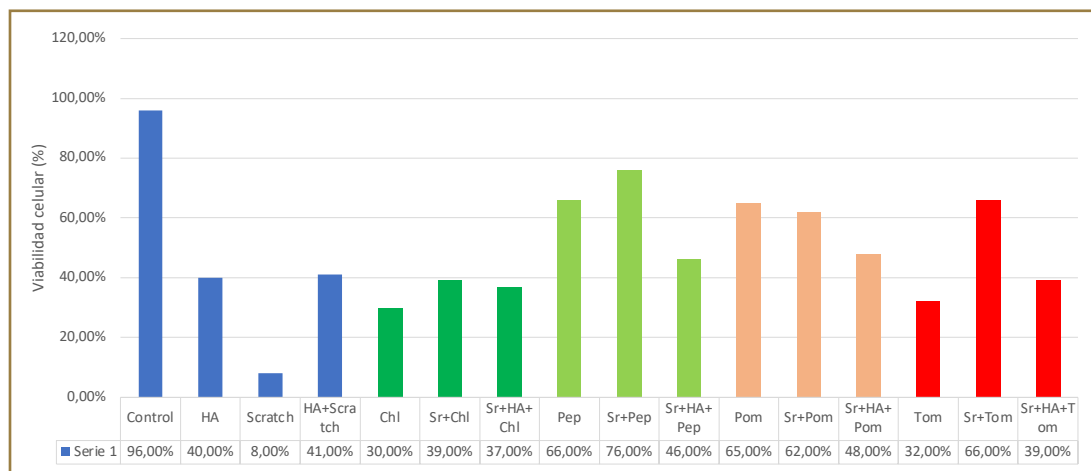
El siguiente experimento lo llevamos a cabo añadiendo PBS 2 % y PBS 5 % (solución tamponada con fosfato) y en todos los casos HA Low 2000 mcg/placa, al objeto de evidenciar si las PEVs producen un efecto compensador para mejorar el estado celular en caso de fibroblastos raspados mediante la medición por MTT Test (figura 28). Se observa que al utilizar PBS a menor concentración (2 %) las PEVs producían una mayor viabilidad celular a igual concentración de HA Low lo que resultó más evidente para las PEVs de pomelo. El uso de PBS a mayor concentración (5 %) redujo la supervivencia tras raspado (8 %) aunque al añadir HA Low la regeneración llegó al 41 %, cifra que aumentó (48 %) cuando se añadieron PEVs de pomelo (figura 28 y 29).

Figura 28

Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) de fibroblastos dérmicos raspados o no añadiendo PBS 2 % y sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico y PEVs de los productos estudiados

**Figura 29**

Viabilidad celular media en porcentaje (medida por MTT Test) de fibroblastos dérmicos raspados o no añadiendo PBS 5 % y sometidos a diferentes concentraciones de dos tipos de ácido hialurónico y PEVs de los productos estudiados



En resumen, HA Low produce un aumento de la viabilidad celular de los fibroblastos dérmicos raspados (41%) en menor proporción que cuando se añaden PEVs de pepino (76 %), tomate (66 %) y pomelo (62 %) si bien el efecto sinérgico de HA Low y PEVs sobre la viabilidad celular se produce cuando se combinan las de pomelo (48 %).

VI DISCUSIÓN

VI

DISCUSIÓN

Durante la última década, las EVs, especialmente los exosomas humanos, se consideraron portadores prometedores de diferentes moléculas bioactivas exógenas para las células humanas. Entre estos agentes, las moléculas terapéuticas de ARN, péptidos o proteínas son las más problemáticas para la administración por métodos estándar. Las EVs humanas de varios biofluidos están bien estudiadas (van Niel *et al.*, 2018) y se han logrado muchos avances en su uso como sistemas de administración de fármacos (Vader *et al.*, 2016b). En los últimos años, se han desarrollado y optimizado diferentes estrategias de carga de exosomas con diversas cargas exógenas (Luan *et al.*, 2017).

Sin embargo, para expandir las aplicaciones terapéuticas, se requiere un mayor desarrollo de las técnicas de administración basadas en VEs, especialmente para encontrar nuevas formas de obtener grandes cantidades de exosomas puros. Por lo tanto, en vista de su eficiencia y abundancia, las EVs aisladas de plantas comestibles son particularmente prometedoras para estos fines (Butreddy *et al.*, 2021). De hecho, las nanopartículas similares a exosomas derivadas de plantas también son biocompatibles y biodegradables, al igual que los exosomas de origen animal, y tienen varias ventajas distintas. Las PEVs se pueden aislar en grandes cantidades, lo que convierte a las plantas en la materia prima elegida para aislar vesículas seguras y eficaces para la administración de agentes terapéuticos.

El estudio de vesículas de tamaño nanométrico aisladas de plantas enteras u órganos de plantas ha abierto una nueva rama de investigación en el campo de las PEVs (An *et al.*, 2006). Varias publicaciones recientes y artículos de revisión describen el aislamiento exitoso de PEVs de una gran variedad de frutas y verduras comestibles (Bokka *et al.*, 2020b) y se resumen en la tabla 19.

Tabla 19

Métodos utilizados para el aislamiento de MV, NV y AV derivadas de plantas de diferentes órganos, como frutas, flores, semillas, rizomas y hojas, y los rendimientos obtenidos.

Recurso	Parte	Método de aislamiento	Tipo(s) de vesícula aislada(s)	Rendimiento (g/L o g/kg de material vegetal inicial)	Número de partículas (partículas/kg o partículas/l de material vegetal inicial)
<i>Álbum Viscum L.</i>	Hoja	DUC	AV		
<i>Arabidopsis thaliana L.</i>	Hoja	dUC/gUC	VE		
Arándano	Fruta	DUC/MF	NV		
Brócoli	Flor	dUC/gUC	NV, MV		
<i>Citrus aurantium</i>	Fruta	DUC	NV	0,161 g/L (proteína)	
<i>Citrus clementina</i>	Fruta	dUC/gUC	NV	$1,67 \times 10^{-3}$ g/L (proteína)	$1,16 \times 10E+12$ partículas/L
<i>Citrus paradisi</i>	Fruta	DUC	NV	0,134 g/L (proteína)	
<i>Citrus sinensis</i>	Fruta	DUC	NV	0,178 g/L (proteína)	
Coco	Fruta	DUC/MF	NV		
Girasol	Semilla	MF/dUC	AV		
Guisante	Semilla	DUC/MF	NV		
Haba de soja	Semilla	DUC/MF	NV		
Jengibre	Rizoma	dUC/gUC	NV	0,25–1,25 g/L	
Jengibre	Rizoma	dUC/precipitación	NV	2-3,8	
Jengibre	Rizoma	DUC	NV	4	
Jengibre	Rizoma	DUC	NV	$48,5 \pm 4,8 \times 10E+3$	
Jengibre	Rizoma	dUC/gUC	NV	0,890	$4,2 \times 10E+12$
Jengibre	Rizoma	DUC	NV		$0,5 - 2 \times 10E+14$
Jengibre	Rizoma	dUC/gUC	NV	Tres bandas, cada una de las cuales contiene $\approx 0,05$	
Kiwi	Fruta	DUC/MF	NV		
Limón	Fruta	DUC	NV	0,409 g/L (proteína)	

Recurso	Parte	Método de aislamiento	Tipo(s) de vesícula aislada(s)	Rendimiento (g/L o g/kg de material vegetal inicial)	Número de partículas (partículas/kg o partículas/l de material vegetal inicial)
Limón	Fruta	dUC/MF/gUC	NV	2,5 × 10E+3 g/L	
Manzana	Fruta	DUC	NV		1,6 × 10E+13 partículas/L
Melón hami	Fruta	DUC/MF	NV		
Naranja	Fruta	DUC/MF	NV		
<i>Nicotiana tabacum L.</i>	Hoja	DUC	AV		
<i>Oryza sativa L.</i> (Arroz)	Hoja	DUC	AV		
Pera	Fruta	DUC/MF	NV		
Pomelo	Fruta	dUC/gUC	NV	2,21 ± 0,044	
<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Hoja	DUC	VE	0,081 ± 0,03	
Tomates	Fruta	dUC/gUC	NV	0,44 ± 0,02	
Uva	Fruta	dUC/gUC	NV	1,76 ± 0,15	
Uva	Fruta	dUC/gUC	NV		
<i>Vinca menor L.</i>	Hoja	DUC	AV		
Zanahoria	Raíz	dUC/gUC	NV	0,298	

Las abreviaturas son las siguientes: dUC: ultracentrifugación diferencial, gUC: ultracentrifugación en gradiente, MF: microfiltración. El rendimiento se refiere al peso del sedimento que contiene vesículas, si no se indica lo contrario.

Las PEVs son morfológicamente similares a las EVs pequeñas (sEV) o exosomas aislados de cultivos de células de mamíferos y biofluidos (Ludwig *et al.*, 2019), y los métodos utilizados para su aislamiento y caracterización también son iguales o similares. Por lo general, la planta homogeneizada es el material de partida para el aislamiento de nanovesículas, que es una matriz muy compleja que hace que el proceso de aislamiento sea muy desafiante. Los aislados de PEVs son más complejos que las vesículas derivadas de células de mamíferos y contienen vesículas tanto intra como extracelulares (Mu *et al.*, 2014a)

La diferencia entre los exosomas animales y las PEVs en tamaño, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos se resume en la tabla 20.

Tabla 20**Diferencias entre exosomas animales y PEVs**

Fuente	Tamaño (nm)	Proteínas	Lípidos	Ácidos nucleicos
Exosomas animales	30~150	Proteína de fusión dirigida	Colesterol	mRNA
		Proteína de choque térmico	Esfingomielina	miRNA
		Transportador de membrana	Glicoesfingolípidos	lncRNA
		ALIX, TSG101	Ceramidas	
		CD9, CD63		
PEVs	50~1000	Actina	Digalactosildiacilglicerol (DGDG)	miARN
		Enzima proteolítica	Fosfatidilglicolamina (PE)	
		Acuaporina	Fosfatidilglicolamina (PE)	
		Cadena pesada de reticulina	Ácido fosfatídico (PA)	
		Proteínas de choque térmico		

Existe un interés creciente en las estrategias avanzadas para la producción de nanovesículas a partir de recursos vegetales debido a sus numerosas aplicaciones prometedoras, especialmente en los campos nutracéutico, cosmeceútico y terapéutico (Pocsfalvi *et al.*, 2019). Debido a su papel inherente en el tráfico intracelular, las nanovesículas nativas son absorbidas de manera eficiente por las células receptoras a las que transfieren sus lípidos, ARNm, microARN y biocarga de proteínas (Woith & Melzig, 2019). Curiosamente, se ha demostrado que algunas nanovesículas nativas poseen propiedades antiinflamatorias y antienvjecimiento (Zhang, Viennois, Xu, *et al.*, 2016).

En los últimos años, muchos grupos investigaron el contenido molecular de las PEVs de varias fuentes vegetales, en su mayoría comestibles, como frutas y verduras, raíces y tubérculos con almidón, nueces y semillas, plantas frescas y secas. Algunos estudios demostraron que la liberación de PEVs es estimulada por la infección y el estrés por patógenos, mientras que otros destacaron que las PEVs contienen proteínas, varios ARN, polisacáridos y señales de lípidos, relacionados con sus funciones en la defensa de las plantas (Rybak & Robatzek, 2019b).

El análisis del contenido de proteínas de las PEVs aisladas de diferentes fuentes reveló varias proteínas interesantes, que potencialmente se consideraran marcadores específicos, como Penetration1, patelinas 1-3, cadena pesada de clatrina, así como proteínas de choque térmico (Rutter & Innes, 2017). Aunque la composición lipídica de las vesículas vegetales es diferente de la de los exosomas de mamíferos, la eficiencia de su internalización por las células animales se ha confirmado en experimentos con partículas marcadas con PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling) y con la administración del agente quimioterapéutico metotrexato (Wang *et al.*, 2014).

6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El método más común de aislamiento de vesículas vegetales es la centrifugación diferencial seguida de ultracentrifugación (Berger *et al.*, 2020). El material de partida pueden ser frutos, raíces, tallos, hojas, semillas, y savia (Potesta *et al.*, 2019). Estas matrices se pueden exprimir manualmente o utilizando una batidora para obtener el jugo. El jugo se somete a varios pasos de centrifugación diferencial: centrifugación a baja velocidad (alrededor de 500 a $3000 \times g$ durante 10 a 15 minutos) para eliminar las fibras vegetales y las partículas grandes; centrifugación a velocidad intermedia (2000 a $10000 \times g$ durante 20 a 40 minutos) para eliminar los desechos grandes y los orgánulos subcelulares; y centrifugación de alta velocidad (100000 – $150000 \times g$ durante 1,5–2 horas) para obtener sedimentos de PEVs.

Además de estos pasos de centrifugación, algunos protocolos incluyen pasos de filtración con filtros de tamaño de poro de 0.8, 0.45 y 0.22 micras. Sin embargo, el tipo, la cantidad y la calidad de las PEVs obtenidas por ultracentrifugación pueden verse influenciadas por varios parámetros, como la fuerza g , el tipo de rotor, el ángulo de sedimentación del rotor y la viscosidad de la solución. Además, dado que la ultracentrifugación también sedimenta otras vesículas, proteínas y agregados de proteína/ARN, algunos protocolos añaden una ultracentrifugación en gradiente de densidad posterior usando iodixanol o sacarosa/óxido de deuterio para separar las PEVs de los contaminantes (Stanly *et al.*, 2016).

Así, aunque en los últimos años han surgido nuevas técnicas para el aislamiento de PEVs, como la purificación por inmunocaptura (He *et al.*, 2021b) y el sistema acuoso de dos fases (Kırbaş *et al.*, 2019), la centrifuga-

ción diferencial sigue siendo el método más utilizado (Mammadova *et al.*, 2021).

Otro método, como el aislamiento inmunitario, que se utiliza habitualmente para las VEs derivadas de animales, no se ha utilizado para las PEVs. Sahin *et al.* (2019) utilizaron un kit de purificación de exosomas que combina la precipitación con la cromatografía de exclusión por tamaño, y aisló con éxito las PEVs de *Triticum aestivum*. Yang *et al.* (2020c) propusieron un método alternativo para aislar las PEVs del limón combinando la técnica electroforética con una bolsa de diálisis de corte de 300 kDa. Centrifugaron jugo de limón a $3000 \times g$ por 10 minutos y $10000 \times g$ durante 20 minutos y filtraron el sobrenadante a través de un filtro de tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Luego, el jugo se colocó en una bolsa de diálisis de 300 kDa colocada en un casete de soporte de gel con una corriente de 300 mA.

Por todo lo anterior y por la experiencia de una de las directoras de la tesis doctoral, en nuestro caso utilizamos la ultracentrifugación tal y como se ha descrito con anterioridad.

El rendimiento de las PEVs obtenidas varía según el material de partida. Por ejemplo, Raimondo *et al.*, partiendo de 240 mL de jugo de limón, aislaron alrededor de 600 μg de nanovesículas (Raimondo *et al.*, 2015). Sin embargo, otro grupo obtuvo alrededor de 10 mg de PEVs a partir de 10 g de savia de *Dendropanax morbifera* (Kim *et al.*, 2020). Además de la cuantificación de proteínas, la recuperación de las PEVs se puede determinar mediante otras técnicas, como la citofluorimetría. Por ejemplo, Potesta *et al.* determinaron que el número de PEVs contenidas en 1 mg de extractos de semillas de *Moringa olifera* fue $16,921 \pm 617$ (Potestà *et al.*, 2020).

A pesar de ser bastante variable, el rendimiento de las vesículas derivadas de plantas es mayor que las obtenidas a partir de células animales; esto representa un punto muy atractivo para su potencial uso terapéutico. Sin embargo, la falta de un método de aislamiento estándar todavía representa una limitación para su uso.

Aunque la UC es el método de aislamiento más utilizado para obtener PEVs, dado que requiere el uso de centrífugas de ultra alta velocidad de alto costo, la premisa de la producción en masa de PEVs sería obtener un método más económico y efectivo sin afectar la calidad de la extracción. Basado en la seguridad, se ha propuesto la precipitación de PEG (poli etilen glicol) y aunque la tasa de extracción de la precipitación de PEG es cercana a la de la UC, el diámetro promedio de las PEVs obtenidas por este método es ligeramente

más pequeño que el de UC y la pureza de las PEVs obtenidas por este método es baja, de manera que la baja pureza y el alto costo limitan la aplicación de la precipitación con PEG (Suresh *et al.*, 2021).

Para poder evitar factores de confusión, en nuestro estudio diseñamos un protocolo de centrifugación diferencial que resume la experiencia del IFM sobre el tema:

1. El protocolo incluía la filtración de líquidos de lavado y pasos de centrifugación a baja velocidad para eliminar partículas y desechos más grandes, y un paso de centrifugación a alta velocidad para sedimentar PEVs (Rutter & Innes, 2017).
2. Los parámetros para DUC se basaron en el tamaño de las PEVs, la viscosidad de los líquidos de lavado y el tipo de rotor que se utilizó, utilizando recursos en línea disponibles.
3. Las velocidades de centrifugación se optimizaron para sedimentar las PEVs y evitar los contaminantes más pequeños que no forman vesículas (tiempos de sedimentación más prolongados a altas velocidades coagulan partículas que no son vesículas y podrían forzar asociaciones artificiales entre vesículas y proteínas libres y ARN) (Mateescu *et al.*, 2017).

En la sección de material y métodos hemos detallado claramente la cantidad inicial de líquido de lavado, los filtros utilizados, las velocidades de centrifugación, los tiempos y las temperaturas, así como el tipo y modelo de rotor utilizado.

Está en proceso compartir los métodos de este estudio en EV-TRACK, una base de datos en línea diseñada para mejorar la transparencia de los experimentos con EVs (van Deun *et al.*, 2017).

Otros estudios han evaluado la eficiencia de la filtración de flujo tangencial (TFF) para mejorar el rendimiento de vesículas extracelulares (EV) derivadas de células madre mesenquimales reportando un aumento del rendimiento 18 veces en comparación con el de la UC. Esta técnica podría ser utilizada en un futuro para aislar PEVs .

En resumen, si bien han surgido nuevos métodos para el aislamiento de VEs a lo largo de los años, la ultracentrifugación diferencial (DUC) sigue siendo la más utilizada. Los protocolos de ultracentrifugación son altamente reproducibles, requieren pocos consumibles y tienen un impacto mínimo en

la estabilidad de las EVs. En la investigación de PEVs, el material de partida se somete a múltiples pasos de centrifugación a velocidades cada vez más altas y tiempos más prolongados (Konoshenko *et al.*, 2018).

Desafortunadamente, no existe un protocolo unificado para la centrifugación diferencial de PEVs. Los tiempos y las velocidades pueden variar ampliamente y, a menudo, se aplican indiscriminadamente sin tener en cuenta los factores que influyen en la ultracentrifugación, como el tamaño de las PEVs, la viscosidad de los fluidos o el tipo de rotor (Cvjetkovic *et al.*, 2014; Livshits *et al.*, 2015; Konoshenko *et al.*, 2018). Como resultado, los estudios de PEVs se ven comprometidos por las bajas velocidades de centrifugado que han sedimentado ineficientemente las poblaciones de PEVs, lo que culmina en un rendimiento reducido o las altas velocidades de centrifugado durante un largo período de tiempo han coaislado contaminantes no vesiculares, lo que lleva a informes erróneos sobre los contenidos o funciones de las PEVs (Livshits *et al.*, 2015).

6.2. CARACTERIZACIÓN DE PEVS

Las características estructurales de las PEVs son similares a las de los exosomas animales. Son estructuras de membrana con bicapas lipídicas, proteínas de membrana en la superficie y proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias en el interior. Su tamaño de partícula es generalmente ligeramente mayor que el de los exosomas animales (Gardiner *et al.*, 2016). Por ejemplo, el diámetro medio de las PEVs derivadas del jengibre es de 284,1 nm y el potencial Zeta es de -29,7 mV. El tamaño de partícula promedio de las PEVs derivadas de la uva es de $380,5 \pm 37,47$ nm, y el valor del potencial Zeta fue negativo, con un potencial promedio de $-26,3 \pm 8,14$ mV, mostrando una buena estabilidad. El tamaño de partícula de las PEVs en el jugo de limón es de 50 a 70 nm. El diámetro máximo de las PEVs derivadas del agua de coco es de 138,1 nm, y el rango de tamaño de partícula es similar al de las PEVs derivados de la uva, que es significativamente mayor que el de los exosomas de leche y los exosomas de grasa (Kleinjan *et al.*, 2021). El rango de tamaño de las PEVs derivadas de la fresa es de 30 a 191 nm. El diámetro de las PEVs derivadas de la manzana está en el rango de 100 a 400 nm, y el diámetro promedio es de 170 nm. Estas nanovesículas generalmente tienen un rango de tamaño pequeño, entre 30 nm y 500 nm, y generalmente tienen un potencial Zeta negativo, que está por encima de -20 mV, con alta estabilidad (Wang *et al.*, 2022).

En este estudio, las PEVs nativas de 4 productos (zumos de pepino, pomelo y tomate y del microalga clorella) se caracterizaron por su tamaño, cantidad y morfología mediante métodos de interpretación de forma y tamaño de nanopartículas comúnmente utilizados, incluidos NTA, DLS y AFM. Como la población de PEVs aisladas suele ser heterogénea en tamaño, origen y componentes moleculares, se aplicaron las diferentes técnicas para su caracterización para evitar limitaciones. El método FESEM basado en imágenes directas de partículas individuales en su estado casi nativo proporciona los datos más fiables para la determinación del tamaño y la forma de las PEVs. De hecho, esta técnica nos permitió obtener imágenes de alta calidad de las vesículas y determinar con precisión su distribución de tamaño. La mayoría de las PEVs aisladas eran únicas, de forma redonda, con tamaños que oscilaban entre 59 y 72 nm. En general, los datos obtenidos están de acuerdo con el análisis de las PEVs por otros métodos basados en la determinación de tamaño de partículas. Si bien las PEVs se purificaron con una centrifugación más estricta, la visualización FESEM no mostró ninguna agregación significativa de nanovesículas ni formación de partículas dobles en la suspensión obtenida (Chernyshev *et al.*, 2015).

Hasta el estudio de Abraham *et al.* (2022b), las PEVs de pepino no se habían aislado ni investigado para la administración dérmica de fármacos. En este estudio, el aislamiento de las PEVs de pepino se realizó mediante ultracentrifugación diferencial seguida de agitación de alta velocidad. La purificación de las vesículas se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para el aislamiento de sus suspensiones crudas y permitir una caracterización fisicoquímica completa. Las PEVs se caracterizaron en cuanto a tamaño, forma, ZP, contenido de proteína y perfil de proteína. El tamaño se determinó mediante DLS y NTA. La forma y morfología de las formulaciones se determinaron mediante microscopía óptica (LM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). El potencial Zeta se determinó por anemometría láser Doppler (LDA); el contenido de proteína se analizó con el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) y el perfil proteico de las PEVs se determinó mediante electroforesis en gel de dodecil-sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). El diámetro hidrodinámico de las PEVs de pepino fue de 167 ± 3 nm y el índice de polidispersidad (PDI) fue de $0,2 \pm 0,02$. El análisis NTA determinó un tamaño de partícula de 123 nm, mostró una distribución de tamaño relativamente amplia (<40 nm–>400 nm) y una concentración de partículas de $1,0 \times 10^{12}$ partículas/mL, lo que está

muy de acuerdo con los datos informados anteriormente por nosotros sobre el tamaño y la distribución del tamaño de las PEVs de pepino. El potencial Zeta fue de $-32 \pm 0,13$ mV, lo que indica una buena estabilización física mediante estabilización electrostática. En nuestro caso el ZP fue de -17 mV. Los análisis SEM y AFM confirmaron, al igual que en nuestro estudio, los resultados de tamaño y distribución de tamaño obtenidos de DLS y NTA y reveló vesículas de forma esférica imperfecta con superficie no homogénea, lo que puede explicarse por la presencia de proteínas dentro de la membrana lipídica altamente densa. AFM también se utilizó para analizar la altura de las vesículas, que resultó ser de 15 nm por lo que las vesículas parecían más bien planas y no esféricas. En nuestro caso la altura vesicular fue alrededor de 11 nm. Se considera que este aplanamiento ocurre durante el paso de secado antes del análisis AFM por lo que la baja altura puede considerarse un artefacto, mientras que las vesículas crudas no secas probablemente tengan forma esférica. El contenido de proteína dentro de las vesículas fue de $6,22 \pm 0,83$ μg de proteína/g de pepino y el perfil de proteína mostró numerosas bandas en todo el gel. El uso de PEVs de pepino aumentó 1,5 veces la eficacia de penetración dérmica de un productos cosmético (Hartjes *et al.*, 2019).

Respecto de las PEVs de pomelo, el estudio de Savci *et al.* (2021) es similar al nuestro no solo porque la caracterización física y biomolecular de las PEVs se realizó de acuerdo con los estándares MISEV2018 sino porque realizaron un NTA para determinar la distribución del tamaño y la concentración de las EVs, que se calculó como $\sim 1,70 \times 10^{11}$ partículas por ml, si bien se observaron varios picos en el gráfico que indican grupos de partículas altamente concentrados que comparten tamaños de partículas similares. El pico con la concentración más alta tiene un rango alrededor de la región de 132 nm, lo que significa que este rango de tamaño contiene la mayor cantidad de partículas entre otros rangos de tamaño en la solución de PEVs. El segundo pico más alto tiene un rango de tamaño alrededor ~ 82 nm y es seguido por picos alrededor ~ 173 , ~ 196 , y ~ 239 nm. Además, estos resultados se confirmaron a partir de micrografías AFM de PEVs. Las nanovesículas derivadas de pomelo se han estudiado previamente en varios trabajos. Mediante el uso de modelos *in vitro* e *in vivo*, Wang *et al.* (2013c) han demostrado que las nanopartículas reconstruidas a partir de lípidos derivados de pomelo son muy eficaces para administrar una variedad de agentes terapéuticos, incluidos fármacos, vectores de expresión de ADN, siRNA y anticuerpos. El mismo grupo de investigación demostró una administración dirigida al tumor de

nanovectores derivados de pomelo recubiertos con membranas de leucocitos activados enriquecidos con receptores relacionados con la inflamación (Wang *et al.*, 2013c).

Respecto del aislamiento de las PEVs de tomate, se ha usado el método dUC/gUC (ultracentrifugación diferencial/ultracentrifugación en gradiente) obteniéndose 440 ± 20 mg de vesículas por kilogramo de fruta. Sin embargo, este rendimiento se basó en el peso medido de la muestra obtenida. A diferencia de esto, en nuestro estudio calculamos el rendimiento sobre la base de los métodos comúnmente utilizados para la cuantificación de PEVs, es decir, el número de partículas determinado por NTA. En el estudio de Bokka *et al.* (2020) se aislaron las vesículas por el método dUC clásico, obteniendo rendimientos excepcionalmente altos con proporciones altas de partículas a proteínas: $2,7 \times 10^{16}$ microvesículas ($35,6 \pm 8,6$ mg de proteína) y $3,8 \times 10^{16}$ ($25,8 \pm 11$ mg de proteína) partículas nanovesiculares, encontrando que el número de nanovesículas aisladas fue mayor que el de microvesículas, pero el contenido de proteína fue menor lo que puede indicar una mayor presencia de vesículas similares a liposomas en las nanovesículas con respecto a las microvesículas. Los aislados de vesículas se analizaron mediante DLS, NTA, TEM, SDS-PAGE y TLC. Curiosamente, no encontraron diferencias significativas entre la distribución de tamaños, la morfología y el contenido molecular de los aislados de micro y nanovesículas derivadas del tomate. Estos aislados se purificaron y separaron adicionalmente utilizando SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) o gUC. A través de la SEC purificaron el 27 % de las microvesículas crudas cargadas y el 37 % de las nanovesículas como objetos vesiculares nanométricos puros. Al comparar el rendimiento de dos métodos, se demostró que gUC es más útil en la separación de diferentes poblaciones de vesículas (sobre la base de la densidad de flotación) en comparación con SEC. En cambio, SEC fue eficiente en la eliminación de las proteínas copurificadoras y otras impurezas y, por lo tanto, mejoró la calidad de las preparaciones de micro y nanovesículas y les permitió realizar análisis posteriores, como ómicas y caracterizaciones biológicas. Cabe señalar que ambos métodos requirieron muestras concentradas para la separación (Bokka *et al.*, 2020a).

Aunque no hemos encontrado en la bibliografía estudios realizados específicamente para determinar PEVs de *Chlorella*, se ha demostrado recientemente que las microalgas son productores prometedores de PEVs (denominadas en este caso nanoalgosomas o simplemente algosomas) (Adamo *et*

al., 2021), habiéndose formado un consorcio, VES4US, que ha desarrollado una plataforma para la producción de PEVs que se aíslan del medio de cultivo de reactores de microalgas y en un estudio analizaron los nanoobjetos extracelulares de tamaño nanométrico producidos por 18 especies de microalgas e identificaron siete cepas prometedoras (*Cyanophora paradoxa*, *Tetraselmis chuii*, *Amphidinium sp.*, *Rhodella violácea*, *Diacronema sp.*, *Dunaliella tertiolecta* y *Phaeodactylum tricornutum*) productoras de PEVs que pertenecen a distintos linajes, lo que sugiere que la producción de PEVs en microalgas es un rasgo conservado evolutivamente. El rendimiento de proteína en la pequeña fracción PEV por mg de peso seco de biomasa de microalgas fue desde $0,2 \pm 0,2$ para *Phaeodactylum tricornutum* hasta $2,0 \pm 0,2$ en *Cyanophora paradoxa*, correspondiente a $2,0 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$ partículas por mg de biomasa seca y PEVs con un diámetro por NTA de 130 ± 5 nm (moda). En general, este trabajo establece una plataforma para la producción eficiente de PEVs a partir de un recurso biológico sostenible y destaca el potencial de las PEVs de microalgas como nuevos nanovehículos biogénicos (Picciotto *et al.*, 2021). Otro estudio destaca los procesos upstream y downstream necesarios para la producción escalable de nanoalgosomas a partir de cultivos de microalgas marinas *Tetraselmis chuii* evaluando diferentes parámetros técnicos, protocolos y condiciones para mejorar el aislamiento de PEVs mediante filtración de flujo tangencial (TFF), con el objetivo de mejorar la pureza y el rendimiento de la muestra. En otro estudio también se utilizó TFF como método de purificación de nanoalgosomas (Picciotto *et al.*, 2022).

La comparación de los datos de la bibliografía con los obtenidos en este estudio se resume en la tabla 21.

Tabla 21*Resumen de los datos analizados*

		Este estudio	Abraham, 2022	
Pepino	Concentración de partículas	$3,9 \times 10E+12$	$1,0 \times 10E+12$	
	Diámetro hidrodinámico (nm)	50 ± 7	167 ± 3	
	Índice de Polidispersidad		$0,2 \pm 0,02$	
	Tamaño de partícula (NTA)	64 ± 7	123	
	Potencial Z	-17	$-32 \pm 0,13$	
	Altura vesicular		15	
		Este estudio	Savci, 2021	
Pomelo	Concentración de partículas	$2,0 \times 10E+12$	$1,70 \times 10E+11$	
	Diámetro hidrodinámico (nm)	86 ± 6	82-239	
	Índice de Polidispersidad	$0,318 \pm 0,018$		
	Tamaño de partícula (NTA)	59 ± 4	132	
	Potencial Z	-10		
	Altura vesicular			
		Este estudio	Wang, 2013	Bokka, 2020
Tomate	Concentración de partículas	$6,0 \times 10E+11$	440 ± 20	$2,7 \times 10E+16$
	Diámetro hidrodinámico (nm)	140 ± 13		60-280
	Índice de Polidispersidad	$0,335 \pm 0,026$		
	Tamaño de partícula (NTA)	72 ± 11		110 ± 10
	Potencial Z	-24		
	Altura vesicular			
		Este estudio		
Clorella	Concentración de partículas	$3,4 \times 10E+11$		
	Diámetro hidrodinámico (nm)	127 ± 13		
	Índice de Polidispersidad			
	Tamaño de partícula (NTA)	72 ± 9		
	Potencial Z	-4		
	Altura vesicular			

6.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PRODUCTORES DE PEVS

Como se ha dicho, se han obtenido fracciones de EVs enriquecidas mediante la mezcla de materia vegetal como raíces de jengibre, hierbas, trigo y diente de león y también se han utilizado jugos de cítricos, peras, pomelos, sandías y agua de coco para preparar extractos de EVs. Sin embargo, a me-

nos que estén sujetos a más pasos de purificación, estos métodos a menudo dan como resultado una mezcla de EVs y contenido intracelular (vesículas, orgánulos, membranas), lo que significa que no son únicamente productos de PEVs por lo que se denominan nanovesículas derivadas de plantas (PDNV) o nanovesículas similares a exosomas (ELN) en lugar de PEVs que se refieren a las fracciones más puras (di Gioia *et al.*, 2020).

El rendimiento es variable dependiendo de la fuente vegetal y el método utilizado para la cuantificación (Zhang *et al.*, 2016) informaron un alto rendimiento de vesículas similares a exosomas de $48,5 \pm 4,8$ mg por 1 kg de jengibre. En otro estudio, los rendimientos de producción de PEVs son muy similares en las frutas y las plantas comestibles derivadas de raíces, con 100 g de material vegetal comestible que produce entre 350 y 450 mg de nanopartículas (Mu *et al.*, 2014b). Como alternativa al pesaje, el rendimiento de las PEVs se puede medir con un zeta-sizer. Por ejemplo, entre los hongos probados, las PEVs derivadas del hongo ostra tuvieron el rendimiento más bajo de $2,3 \pm 1,5 \times 10^{11}$ /g, mientras que las PEVs derivadas del hongo botón blanco tuvieron el rendimiento más alto de $8,1 \pm 1,6 \times 10^{11}$ /g (Liu *et al.*, 2020).

En la tabla resumimos las principales características de las PEVs investigadas en estudios recientes (Karamanidou & Tsouknidas, 2022).

Tabla 22

Tamaño y morfología de PEVs según diferentes estudios

Planta	Tamaño (nm)	Morfología PEVs
Arándanos	2 tipos	Esférica u ovalada
Coco	30 (leche). 13 (agua)	Esférica
Haba de soja	2 tipos	Esférica u ovalada
Hojas de Arabidopsis	50–300	Esférica
Jengibre	100–1000	En forma de copa o esférica
Naranjas	2 tipos	Esférica u ovalada
Peras	2 tipos	Esférica u ovalada
Pomelos	50–100 y 100–1000	En forma de copa o esférica
Sandías	2 tipos	Esférica u ovalada
Semillas de girasol	50–200	Esférica
Tomates	100–1000	Esférica u ovalada
Uvas	30–800	Esférica
Zanahorias	80–200 y 700–1500	En forma de copa o esférica

Estudios anteriores han indicado que el tamaño y la estructura de las PEVs en plantas comestibles son similares a las de los exosomas derivados de mamíferos. Nuestros hallazgos basados en análisis AFM y DLS respaldan el punto de vista de estos estudios anteriores encontrando que las PEVs tienen dos tipos de distribuciones, una hasta 100 nm y otra hasta 1000 nm, lo cual es consistente con resultados previos (Kameli *et al.*, 2021).

No obstante, todavía no se ha realizado un biomarcador basado en PEVs, en parte debido a la falta de estandarización. La estandarización es difícil porque la calibración de instrumentos, la interpretación y validación de resultados y la comparación de mediciones requieren un material de referencia con propiedades físicas iguales a las PEVs. Una de las propiedades más analizadas de una muestra PEV es la concentración. Sin embargo, la concentración de PEVs medida depende de las propiedades físicas de las PEVs, como la distribución de tamaño y el índice de refracción (RI), lo que complica el análisis (van der Pol *et al.*, 2016).

Las PEVs de menos de 300 nm constituyen la mayoría de la población de PEVs. Las distribuciones de tamaño típicas de las PEVs comienzan en ~ 30 nm, muestran un pico en un diámetro < 100 nm y siguen una función de ley de potencia decreciente o una función exponencial para diámetros > 100 nm. Con la excepción de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), ninguno de los métodos analíticos actuales puede detectar toda la población de PEVs. La incapacidad de detectar las PEVs más pequeñas conduce tanto a diferencias como a una subestimación de la concentración determinada (van der Pol *et al.*, 2014).

En la citometría de flujo, que es uno de los métodos más utilizados en los estudios de PEVs, la detección de partículas suele basarse en la dispersión de la luz. Debido a que el RI de las perlas de sílice (1,45) y poliestireno (1,61) es más alto que el IR medio de las PEVs naturales ($\sim 1,39$), la aplicación de una puerta en las señales de dispersión de las perlas de sílice o poliestireno dará como resultado estimaciones erróneas del tamaño de las PEVs y su concentración (Dragovic *et al.*, 2011b).

Con el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), la ecuación de Stokes-Einstein se utiliza para derivar el diámetro hidrodinámico de las PEVs a partir de su movimiento browniano. Aunque en NTA, el RI de las PEVs no afecta el diámetro medido, la distribución del tamaño de PEVs y el RI sí afectan la concentración medida, porque la concentración medida depende del brillo de la partícula dispersa (Filipe *et al.*, 2010).

En conjunto, estos ejemplos enfatizan la necesidad de emplear diferentes métodos analíticos y en centros diferentes para poder determinar objetivamente la distribución de tamaño, morfología y potencial Zeta de las PEVs (tabla 23).

Tabla 23

Dependencia de las diferentes técnicas de detección en las propiedades de PEVs (Valkonen et al., 2017).

	AFM	DLS	FCM	NTA	SAXS	TEM	TRPS
Adhesión	+	-	-	-	-	+	-
Carga	-	±	-	±	-	-	+
Concentración	+	+	+	+	++	+	+
Flotabilidad	-	-	-	-	-	-	±
Forma esférica	-	++	++	+	+	-	++
Índice de refracción	-	+	++	+	-	-	-
Monodispersidad	-	++	-	±	++	-	-
Proteínas de membrana	±	-	±	±	-	±	-
Rigidez	+	-	-	-	-	+	-
Tamaño	-	+	+	+	++	-	+

Abreviaturas: AFM: microscopía de fuerza atómica ; DLS: dispersión de luz dinámica sin opción de carga; FCM: citometría de flujo; NTA: análisis de seguimiento de nanopartículas sin opción de carga; SAXS: dispersión de rayos X de ángulo pequeño; TEM: microscopía electrónica de transmisión; TRPS: detección de pulso resistiva sintonizable.

Una encuesta de 2016 mostró que la caracterización de las EVs está dominada por el análisis de transferencia Western (individuación de biomarcadores), técnicas de seguimiento de partículas individuales (evaluación de distribución de tamaño mediante análisis de seguimiento de nanopartículas, sensor de pulso resistivo, dispersión de luz dinámica y microscopía electrónica para caracterización morfológica y estructural). Según la encuesta, menos del 10 % del trabajo realizado con EVs ha empleado AFM aunque, en comparación con otras técnicas, AFM puede al mismo tiempo medir la distribución del tamaño de las vesículas, mapear sus propiedades mecánicas con precisión nanométrica y también permite el análisis funcional del contenido de proteínas de la membrana externa de EVs, a través de puntas recubiertas de anticuerpos al tiempo que, mediante el uso de superficies recubiertas de anticuerpos específicos (mica y vidrio), se pueden capturar diferentes subpoblaciones de EVs. Sin embargo, a pesar de su adaptabilidad, el uso de AFM para la caracterización

de EVs todavía se limita a unos pocos estudios, principalmente debido al fuerte efecto de las condiciones de inmovilización en la medición del tamaño de las vesículas y a que no demasiados centros disponen no solo del aparato sino de técnicos cualificados para utilizarlo (Gardiner *et al.*, 2016).

Hemos utilizado los métodos AFM y FESEM porque son herramientas poderosas y complementarias para caracterizar la morfología de las PEVs sobre todo si se utilizan con una optimización detallada y dedicada utilizando los protocolos y métodos de preparación de muestras estandarizados. Además, hemos utilizado una terminología similar para describir la variación en la forma, morfología, estructura y topografía de las PEVs para revelar la presencia de estructuras e impurezas similares a PEVs lo que evita interpretaciones erróneas durante las investigaciones de las funciones biológicas de las PEVs (Malenica *et al.*, 2021).

6.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y EFICIENCIA DE LA CARGA Y LA ENTREGA DE PROTEÍNA EXÓGENA POR LAS PEVS A LAS CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO*

La oxidación es la causa del envejecimiento, la inflamación y otros factores negativos. La estructura vesicular de bicapa lipídica de las PEVs puede proteger los antioxidantes inestables en las vesículas. Los antioxidantes en frutas y verduras con actividad antioxidante significativa pueden encapsularse en las PEVs correspondientes y transportarse a los plásmidos *in vitro*. Se ha descubierto que las PEVs derivadas del limón son ricas en ácido cítrico y vitamina C, que tienen un efecto protector significativo sobre el estrés oxidativo de las células madre mesenquimales (MSC). Las PEVs derivadas de las fresas pueden ser internalizadas por MSC sin afectar su actividad. Los resultados experimentales muestran que las PEVs de las fresas pueden prevenir el estrés oxidativo de una manera dependiente de la dosis, lo que puede deberse a la riqueza en vitamina C en las vesículas. El efecto antioxidante de las PEVs tiene un gran potencial en cosmetología y medicina. Es importante considerar estas vesículas derivadas de plantas como nuevos ingredientes en nuestros alimentos para evaluar sus beneficios para la salud y el potencial de las tecnologías derivadas de alimentos (Perut *et al.*, 2021).

Hay mucho interés en saber si las PEVs pueden desempeñar un papel en la comunicación entre especies y tener beneficios directos para las enfermedades humanas. Las PEVs contienen proteínas, ARN, lípidos y los corres-

pondientes ingredientes activos, que pueden absorberse en el tracto intestinal mediante administración oral. Además, luego son transportados a diferentes partes, pueden resistir el ambiente extremadamente ácido del estómago y las enzimas proteolíticas altamente activas del intestino y pueden absorberse en el tracto intestinal mediante la administración oral, mediante la regulación de la flora intestinal, o mediante factores inflamatorios o afectando a las células madre intestinales, o mediante la regulación de la expresión génica de ARNs (Kim *et al.*, 2022).

La carga de las PEVs es compleja y heterogénea, por lo que los mejores métodos para estudiar su contenido se basan en análisis ómicos. En los últimos años se han llevado a cabo varios estudios para caracterizar el perfil proteómico de las PEVs aisladas de diferentes especies de plantas que podrían ayudar a identificar posibles marcadores de PEVs. Entre las proteínas identificadas en las PEVs, las más representadas son la proteína de choque térmico 70 (HSP70), la S-adenosil-homocisteínasa y la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y que podrían ser candidatas como marcadores de PEVs, aunque se necesitan más estudios para confirmar su presencia en EVs aisladas de la mayoría de las plantas. Otras familias de proteínas bien representadas en las PEVs son las acuaporinas y anexinas (Urzi *et al.*, 2022). Además de las proteínas, la caracterización de los lípidos de las PEVs ha atraído el interés de la comunidad científica, ya que este componente parece estar estrictamente relacionado con sus funciones biológicas. Las principales especies de lípidos identificadas en las PEVs son ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC). Además, la carga de PEVs incluye varios metabolitos, como el sulforafano, shogaol y los flavonoides, lo que podría explicar los roles beneficiosos mediados por PEVs en las interacciones planta-mamífero (Elliott & He, 2021).

Los datos obtenidos nos animaron a formular la hipótesis de que las PEVs nativas aisladas por ultracentrifugación se pueden utilizar como portadores de moléculas exógenas (moléculas diana de alto y bajo peso molecular). Así, cargamos de forma activa las PEVs con cargas de proteína utilizando la técnica de sonicación (que interrumpe temporalmente la membrana de las nanovesículas, lo que permite que varios compuestos se difundan hacia el interior, después de lo cual se repara la membrana) y aunque potencialmente también puede causar la distorsión estructural de las membranas, lo que resulta en la formación de vesículas fusionadas, no encontramos cambios significativos en la morfología y la distribución del tamaño de las PEVs cargadas por sonicación (Richter *et al.*, 2019).

Usando modelos *in vitro*, hemos demostrado la captación significativa-

mente más eficiente de las proteínas marcadas con fluorescencia HSP70-Alexa647 cargadas en PEVs por células humanas en comparación con las proteínas libres. Estos resultados sugieren que las PEVs son transportadores altamente eficientes de proteína exógena funcional en células humanas *in vitro*.

Los resultados de nuestro estudio indican claramente un alto potencial de las PEVs nativas para la entrega segura de proteínas exógenas en células y tejidos de mamíferos como demostró anteriormente (Garaeva *et al.*, 2021).

En general, estos resultados proporcionan una base sólida para futuros estudios y desarrollo de sistemas de administración de vesículas vegetales para su uso en nuevas terapias y medicina de precisión.

6.5. CULTIVO CELULAR CON ÁCIDO HIALURÓNICO

Una creciente evidencia ha demostrado que las PEVs pueden tener propiedades antiinflamatorias y teniendo en cuenta los efectos secundarios de las terapias antiinflamatorias existentes, el desarrollo de nuevos fármacos a partir de fuentes naturales está ganando interés entre la comunidad científica (Arulselvan *et al.*, 2016).

Aunque hay varios estudios publicados sobre el papel de PEVs en la inflamación, solo un trabajo publicado en 2019 mostró que las PEVs también pueden desempeñar un papel en la regeneración de la piel *in vitro*, encontrando que las nanovesículas aisladas de *Triticum aestivum* (trigo) aumentaron la proliferación celular y la migración de tres líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos (HDF), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT). Además, las nanovesículas de trigo mostraron efectos proangiogénicos, ya que promovieron la formación de tubos en HUVEC y aumentaron la expresión de proteínas y genes COL1A (colágeno tipo I) en HDF, afectando la proliferación y migración de células endoteliales, epiteliales y fibroblásticas dérmicas, de manera dependiente de la dosis, *in vitro*. Y el análisis de PCR en tiempo real mostró que hubo un aumento en la expresión de ARNm de colágeno tipo I (Şahin *et al.*, 2019). La formación de estructuras tubulares indica que juegan un papel importante en la vascularización durante la cicatrización de heridas.

You *et al.* (2021) mostraron que las nanovesículas aisladas de la col y la col roja promovieron la proliferación de células de mamíferos y suprimieron la inflamación en las células inmunitarias y la apoptosis en los queratinocitos y fibroblastos humanos.

Posteriormente, se evidenció cómo el extracto de trigo común o las nanovesículas aisladas de semillas de trigo exhibieron procesos de curación de heridas en la piel, actuando sobre la proliferación celular y promoviendo la reparación de heridas. Los mecanismos de reparación de heridas inducidos por *Triticum aestivum* se correlacionaron con la modulación de la síntesis de nueva fibronectina y la regulación positiva de HA sintasa y colágeno tipo I en fibroblastos dérmicos humanos, así como a través de la regulación positiva de 153 proteínas y la regulación negativa de 72 proteínas en el secretoma, que coordina los procesos de interacción célula-célula, proliferación celular, diferenciación, adhesión y migración (Morretta *et al.*, 2022).

Otro estudio verificó la liberación espontánea de PEVs de células de ginseng en raíces de ginseng y células cultivadas, así como sus efectos funcionales en la recuperación de la senescencia celular en células primarias de la piel humana. Según su análisis lipídico de GEV, se sugiere que diacilglicerol (DG) es un biomarcador de lípidos de PEVs potencial que puede mediar en la comunicación intercelular y evocar directamente respuestas celulares en células humanas a través de la señalización de proteína quinasa C (PKC) lo que demuestra los efectos anti-senescencia y antipigmentación en fibroblastos dérmicos humanos o melanocitos humanos tratados con radiación UVB, respectivamente, mediante la regulación a la baja de la actividad de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal) y proteínas relacionadas con la melanogénesis (Cho *et al.*, 2021).

Por otro lado, Lee *et al.* (2020) investigaron los efectos antimelanogénicos de las PEVs de *Dendropanax morbifera* demostrando que redujeron los niveles de actividad de melanina y tirosinasa (TYR) en la línea celular de melanoma de ratón B16-BL6, de manera dependiente de la dosis, ejerciendo un mayor efecto blanqueador sobre las células de melanoma que la arbutina, sin ningún tipo de citotoxicidad, al regular los genes y proteínas relacionados con la melanogénesis.

Otro estudio realizado con *Panax ginseng* y *Camellia sinensis* sugiere que las PEVs tienen su efecto específico según la planta de la que se deriva e indica que las PEVs, como sustancias biológicamente activas naturales, tienen efectos diferentes a los extractos de plantas convencionales y tienen potencial para ser comercializados como un producto cosmecéutico (Cho *et al.*, 2022).

En conclusión, hay evidencia aún no suficiente sobre el papel de las PEVs en afecciones de la piel y, aunque los mecanismos complejos que impulsan las funciones de las PEVs en estas enfermedades siguen siendo difíciles de comprender, existe evidencia de que las PEVs podrían tener un claro potencial

para tratar enfermedades de la piel y especialmente para la cicatrización de heridas, antisenescencia y antipigmentación de la piel (Li *et al.*, 2021).

Los enfoques proteómicos y metabolómicos revelaron que las PEVs transportan numerosos metabolitos bioactivos de gran interés farmacéutico. También se ha demostrado que las PEVs también están involucradas en la transferencia intercelular de pequeños ARN no codificantes, como los microARN, lo que sugiere mecanismos fascinantes de regulación de genes a larga distancia y transferencia horizontal de ARN reguladores y comunicaciones entre reinos. Su alta capacidad de carga, actividades biológicas intrínsecas, biocompatibilidad, y la fácil permeabilización en los compartimentos celulares hacen que las PEVs sean excelentes nanoherramientas naturales o creadas mediante bioingeniería para aplicaciones biomédicas con interesantes actividades antiinflamatorias y antioxidantes en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (Alfieri *et al.*, 2021b). Todo ello nos orientó a probar las PEVs de nuestro estudio en la carga con ácido hialurónico en un intento de abrir nuevas fronteras en la biotecnología vegetal aplicada a la nanomedicina.

Al igual que las EVs de otros reinos, las PEVs también se pueden rediseñar para formar nanoplataformas de administración de compuestos, denominadas «nanovectores derivados de PEVs» con lo que, al modificar o aumentar la carga en la superficie de las PEVs, se puede lograr un poderoso potencial biológico (Loureiro *et al.*, 2017).

Tomando como base estudios previos que demostraban como las nanopartículas modificadas con ligandos que se dirigen a las regiones inflamatorias pueden aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos inflamatorios y reducir la redistribución de fármacos en los tejidos normales y analizando otros estudios que han demostrado que el ácido hialurónico (HA) puede unirse específicamente a CD44 sobreexpresado en células epiteliales inflamatorias y macrófagos quisimos estudiar la aceleración de la capacidad direccional de las PEVs cargadas con HA y como los péptidos o ligandos selectivos en la superficie de las PEVs pueden dirigirse a las células receptoras que contienen receptores relacionados (Yepes-Molina *et al.*, 2020). Nuestro estudio pretendió obtener resultados sobre la eficacia y eficiencia de las PEVs combinadas con HA sobre el envejecimiento cutáneo incluso tras administración por mesoterapia tomando como base un estudio reciente que informó que las PEVs derivadas del brócoli tienen la capacidad de encapsular productos fluorescentes en los queratinocitos y penetrar en las capas profundas de la piel, destacando que las PEVs pueden usarse potencialmente para la administración transdérmica de compuestos. Además, se ha demostrado

que las PEVs penetran en un modelo de piel humana, lo que fomenta su consideración para los tratamientos para el cuidado de la piel (Farley *et al.*, 2022).

Los resultados mostrados permiten asegurar que HA Low produce un aumento de la viabilidad celular de los fibroblastos dérmicos raspados en menor proporción que cuando se añaden PEVs de pepino, tomate y pomelo si bien el efecto sinérgico de HA Low y PEVs sobre la viabilidad celular se produce cuando se combinan las de pomelo. Estos resultados parecen mostrar que las PEVs no solo estimularon la proliferación y migración de fibroblastos dérmicos, sino que también restauraron los cambios relacionados con la senescencia (raspado) en la expresión génica. Esto implicaría reducir la actividad de SA- β -Gal en fibroblastos raspados y suprimir la expresión de p53 y p21, que son factores clave involucrados en la detención del ciclo celular, la apoptosis y las vías de señalización de la senescencia celular. En general, estos resultados sugieren que las PEVs combinadas con HA puede ser una alternativa prometedora a los exosomas humanos para el tratamiento del envejecimiento de la piel (Logozzi *et al.*, 2022).

Además de su uso en mesoterapia, nuestros resultados sugieren la utilización transdérmica para la aplicación directa en la piel. Hay dos rutas de penetración de nanovesículas durante la aplicación transdérmica: utilizando canales físicos de la piel con un diámetro micrométrico suficiente para pasar a los vasos y a través del estrato córneo. Se supone que después de aplicar PEVs a la piel, penetran a través de la superficie de los canales ricos en lípidos en los folículos pilosos. Estas nanovesículas pueden llegar a los tallos del cabello al ingresar a las células de la matriz del cabello y avanzar más por la diferenciación celular o por la penetración directa en los tallos del cabello desde la punta del cabello. Otro método de penetración en la dermis es a través del estrato córneo. Las nanovesículas son capaces de penetrar la piel a través de vías transfoliculares, ya que su superficie tiene una estructura bicapa flexible. Las formulaciones para la vía transdérmica deben evitar el riesgo de irritación e inflamación. A pesar de los mecanismos de penetración universales, una proporción significativa del compuesto bioactivo permanecerá inaccesible debido a la función de barrera de la piel, que varía de un paciente a otro según las diferentes partes del cuerpo y la edad del paciente, lo que también crea problemas para la selección de la dosis (Shkryl *et al.*, 2022a).

VII

CONCLUSIONES

VII

CONCLUSIONES

1. Los métodos utilizados en esta tesis han sido complementarios y han permitido caracterizar la morfología de las PEVs utilizando protocolos, métodos de preparación de muestras y nomenclatura estandarizados.
 - Se ha demostrado que la UC diferencial es el método de preferencia para el aislamiento de PEVs de origen vegetal y algas unicelulares.
 - A partir de los valores de NTA, se estimó que la mayor eficacia del rendimiento de PEVs se obtuvo de pepino.
 - La distribución de las PEVs por tamaño, medido por AFM, se encontró en el rango de 50 a 72 nm, característico de las partículas similares a exosomas destacando como las más grandes corresponden a clorella y tomate y las menores a pepino y pomelo.
 - La FESEM demostró como las PEVs obtenidas de los zumos de pomelo y tomate tiene partículas de forma redonda.
 - El DHM y la moda investigadas por AFM evidenció que los tamaños de las PEVs obtenidas corresponden a partículas similares a exosomas y están en el rango de 50 a 140 nm siendo las de tomate y clorella las que presentan los tamaños más grandes.
 - La distribución de tamaño de PEVs se analizó por DLS presentando tamaños de 20-100 nm para partículas pequeñas y 80-500 para partículas grandes.

2. Eficiencia de carga y transporte de proteína exógena a las células humanas *in vitro*:
 - Las PEVs de clorella son las más eficientes para entregar proteínas a las células, si bien la fuente más costo-efectiva como transportador es el pomelo.
 - El potencial Zeta de las PEVs se estimó mediante DLS demostrándose que todas las PEVs tenían una carga negativa que oscilaba entre -1 y -24 mV. Además, se pudo especular como el valor del potencial Zeta de las PEVs puede influir en la eficacia del suministro de proteínas exógenas.

3. Cultivo celular con PEVs y ácido hialurónico:
 - Mediante MTT Test se demostró como la viabilidad celular de los fibroblastos dérmicos es mayor con el ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA Low) y como este efecto se ve magnificado al añadir PEVs de tomate.
 - También comprobamos como la proliferación celular de los fibroblastos dérmicos raspados es aumentada por el HA Low aunque en menor proporción que cuando se añaden PEVs de pepino si bien el efecto sinérgico de HA Low y PEVs sobre la viabilidad celular se produce cuando se combinan las de pomelo.

4. La probable futura aplicación industrial de las PEVs, requerirá realizar estudios clínicos para validar su seguridad, estabilidad y eficacia *in vivo*. Esto requerirá posteriormente un análisis en profundidad del marco regulatorio.

VIII
LIMITACIONES
Y FUTURAS LÍNEAS
DE INVESTIGACIÓN

VIII

LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Como es bien sabido, hay una serie de limitaciones asociadas al uso de exosomas humanos como transportadores para la administración de moléculas bioactivas (restricciones éticas, efectos adversos inmunitarios, obtención de cantidades insuficientes, aplicaciones clínicas, ...) por lo que la elección de fuentes alternativas de nanomateriales es crucial.

El uso de vesículas formadas de forma innata en las células vegetales como agentes de administración podría resolver los problemas asociados a los actuales sistemas orgánicos de nanodistribución.

En el futuro, nuestro estudio podría ampliarse con la evaluación de nuevas materias primas de plantas como agentes anti-envejecimiento, siendo importante evaluar la eficacia de cargar las PEVs con diversas moléculas exógenas, seguido de la verificación clínica de la mejora de su actividad funcional.

IX
ANEXO

IX

ANEXO¹

PEVs are natural transporters of various biomolecules, including miRNA, proteins, amino acids, and lipids. These properties of PEVs suggest the possibility of their use as carriers for cargo delivery.

Despite the fact that, to date, EVs are attracting more and more attention from the scientific community regarding their application in the therapy and early diagnosis of various diseases and in aesthetic medicine, only recently the attention of researchers has been addressed to the potential of PEVs as carriers of exogenous functional biomolecules. A number of isolated studies have been dedicated to the practical confirmation of this hypothesis, mainly aimed at the creation of lipid systems based on PEVs, which constitutes an expensive procedure. At the same time, the use of intact vesicles for the delivery of biomolecules has not been contemplated until now.

As, in general, PEVs are much less studied than exosomes and their structural and functional characteristics have not yet been demonstrated in detail, this study aims to advance purification and characterization techniques, establish stability and form of transport, discuss the therapeutic opportunities, as well as the potential as new carriers of bioactive molecules.

¹ Este anexo se aporta para dar cumplimiento a los requisitos de mención Internacional de esta tesis doctoral.
This annex is provided to comply with the International mention requirements of this doctoral thesis.

The main objectives of this doctoral thesis were to increase knowledge about PEVs isolation and characterization by standardizing procedural protocols; demonstrate the transport function of PEVs on exogenous bioactive molecules in cells *in vitro*; improve understanding of the use of PEVs and hyaluronic acid by assessing their effects on cell proliferation *in vitro*; and set the guidelines for future *in vivo* studies as well as establish the bases for the industrial production of PEVs.

Thus, this study has been aimed at isolating, characterizing and evaluating the efficiency of the loading and transport of exogenous biomolecules of various types to human cells by means of different plant vesicles. In addition, an attempt has been made to select the most promising source of plant vesicles, searching for a promising transporter of exogenous bioactive molecules, which in the future could be used as a delivery system in the management of skin aging, particularly in accelerating wound healing, reduction of skin pigmentation, reduction of wrinkles and prevention of scar formation.

The PEVs were isolated and characterized from the juice of three vegetables and from the chlorella culture medium. Various compatible methodologies have been used to assess particle size, concentration, morphology, and Zeta potential. The efficiency of loading the PEVs with an exogenous protein was assessed by fluorimetry, and the efficiency of its delivery to human cells *in vitro* was assessed by flow cytometry.

The main findings in our study have been:

- 1.** The methods used have been complementary and have made it possible to characterize the morphology of VEPs using standardized protocols, sample preparation methods and nomenclature.
 - I.** Differential UC has been shown to be the method of choice for the isolation of PEVs of plant origin and unicellular algae.
 - II.** From the NTA values, it was estimated that the highest yield efficiency of PEVs was obtained from cucumber.
 - III.** The distribution of PEVs by size, measured by AFM, was found in the range of 50 to 72 nm, characteristic of particles similar to exosomes, highlighting how the largest correspond to chlorella and tomato and the smallest to cucumber and grapefruit.
 - IV.** FESEM demonstrated how PEVs obtained from grapefruit and tomato juices have round shaped particles.

- V. The DHM and the mode investigated by AFM showed that the sizes of the PEVs obtained correspond to particles similar to exosomes and are in the range of 50 to 140 nm, with tomato and chlorella being the ones with the largest sizes.
 - VI. The size distribution of PEVs was analyzed by DLS presenting sizes of 20-100 nm for small particles and 80-500 for large particles.
2. Efficiency of loading and transport of exogenous protein to human cells in vitro:
 - I. Chlorella PEVs are the most efficient for delivering protein to cells, although the most cost-effective source as a carrier is grapefruit .
 - II. The Zeta potential of the PEVs was estimated using DLS, showing that all the PEVs had a negative charge ranging from -1 to -24 mV. In addition, it was possible to speculate how the value of the Zeta potential of PEVs may influence the efficiency of exogenous protein delivery.
 3. Cell culture with PEVs and hyaluronic acid:
 - I. Using the MTT Test, it was demonstrated how the cell viability of dermal fibroblasts is greater with low molecular weight hyaluronic acid (HA Low) and how this effect is magnified when adding tomato PEVs.
 - II. We also verified how the cell proliferation of scraped dermal fibroblasts is increased by HA Low, although to a lesser extent than when PEVs of cucumber are added, although the synergistic effect of HA Low and PEVs on cell viability occurs when grapefruit is combined.
 4. The probable future industrial application of PEVs will require clinical studies to validate their safety, stability and efficacy in vivo. This will subsequently require an in-depth analysis of the regulatory framework.

The resulting findings would possibly support its future application in aesthetic medicine (both as mesotherapy and in the form of a cosmetic product) and in particular in the management of aging or the administration of bio-active compounds. The results reinforce the evidence published to date in this relatively new field of science and offer new insights to researchers in the area especially regarding chlorella PEVs and the basis for the industrial production

of PEVs. Taking into account the future industrial application of PEVs, clinical studies must be carried out to validate their safety, stability and efficacy *in vivo*, which will subsequently require an in-depth analysis of the regulatory framework.

As is well known, there are a number of limitations associated with the use of human exosomes as carriers for the administration of bioactive molecules (ethical restrictions, immune adverse effects, obtaining insufficient quantities, clinical applications,...) so the choice of alternative sources of nanomaterials is crucial. The use of vesicles formed innately in plant cells as delivery agents could solve the problems associated with current organic nanodistribution systems. In the future, our study could be expanded with the evaluation of new plant raw materials as anti-aging agents, being important to evaluate the efficacy of loading PEVs with various exogenous molecules, followed by clinical verification of the improvement of their functional activity.

X
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

X

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, A. M., Wiemann, S., Ambreen, G., Zhou, J., Engelhardt, K., Brüßler, J., Bakowsky, U., Li, S. M., Mandic, R., Pocsfalvi, G., & Keck, C. M. (2022). Cucumber-Derived Exosome-like Vesicles and Plant Crystals for Improved Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*, *14* (3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030476>
- Adamo, G., Fierli, D., Romancino, D. P., Picciotto, S., Barone, M. E., Aranyos, A., Božič, D., Morsbach, S., Raccosta, S., Stanly, C., Paganini, C., Gai, M., Cusimano, A., Martorana, V., Noto, R., Carrotta, R., Librizzi, F., Randazzo, L., Parkes, R., ... Bongiovanni, A. (2021). Nanoalgosomes: Introducing extracellular vesicles produced by microalgae. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10* (6). <https://doi.org/10.1002/jev2.12081>
- Alfieri, M., Leone, A., & Ambrosone, A. (2021a). Plant-Derived Nano and Microvesicles for Human Health and Therapeutic Potential in Nanomedicine. *Pharmaceutics*, *13* (4). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13040498>
- Alfieri, M., Leone, A., & Ambrosone, A. (2021b). Plant-derived nano and microvesicles for human health and therapeutic potential in nanomedicine. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040498>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, *29* (4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- An, Q., Ehlers, K., Kogel, K. H., van Bel, A. J. E., & Hüchelhoven, R. (2006). Multi-vesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist*, *172* (3), 563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01844.x>

- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>
- Ashcroft, B. A., de Sonnevile, J., Yuana, Y., Osanto, S., Bertina, R., Kuil, M. E., & Oosterkamp, T. H. (2012). Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomedical Microdevices*, 14 (4), 641–649. <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9642-y>
- Bellavia, D., Raimondo, S., Calabrese, G., Forte, S., Cristaldi, M., Patinella, A., Memeo, L., Manno, M., Raccosta, S., Diana, P., Cirrincione, G., Giavaresi, G., Monteleone, F., Fontana, S., Leo, G. de, & Alessandro, R. (2017). Interleukin 3- receptor targeted exosomes inhibit in vitro and in vivo chronic myelogenous Leukemia cell growth. *Theranostics*, 7 (5), 1333–1345. <https://doi.org/10.7150/thno.17092>
- Bemstein, E. F., Qiu Chen, Y., Kopp, J. B., Fisher, L., Brown, D. B., Hahn, P. J., Robey, F. A., Lakkakorpi, J., & Uitto, J. (1996). Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis Comparison of sun-protected and photoaged skin by Northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. In *J AM Ac~a) D~MATOL* (Vol. 34).
- Berekaa, M. (n.d.). *Nanotechnology in Food Industry; Advances in Food processing, Packaging and Food Safety*. Retrieved November 11, 2022, from https://www.academia.edu/15414829/Nanotechnology_in_Food_Industry_Advances_in_Food_processing_Packaging_and_Food_Safety
- Berger, E., Colosetti, P., Jalabert, A., Meugnier, E., Wiklander, O. P. B., Jouhet, J., Errazurig-Cerda, E., Chanon, S., Gupta, D., Rautureau, G. J. P., Geloën, A., El-Andaloussi, S., Panthu, B., Rieusset, J., & Rome, S. (2020). Use of Nanovesicles from Orange Juice to Reverse Diet-Induced Gut Modifications in Diet-Induced Obese Mice. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 18, 880–892. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.009>
- Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). *Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging*. <http://www.nature.com/naturemedicine>
- Bokka, R., Ramos, A. P., Fiume, I., Manno, M., Raccosta, S., Turiák, L., Sugár, S., Adamo, G., Csizmadia, T., & Pocsfalvi, G. (2020a). Biomanufacturing of tomato-derived nanovesicles. *Foods*, 9 (12). <https://doi.org/10.3390/foods9121852>
- Bokka, R., Ramos, A. P., Fiume, I., Manno, M., Raccosta, S., Turiák, L., Sugár, S., Adamo, G., Csizmadia, T., & Pocsfalvi, G. (2020b). Biomanufacturing of tomato-derived nanovesicles. *Foods*, 9 (12). <https://doi.org/10.3390/foods9121852>
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*, 110 (5), 517–536. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>
- Brettschneider, J., del Tredici, K., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: A focus on human studies. In *Natu-*

- re Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 2, pp. 109–120). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3887>
- Buckingham, E. M., & Klingelutz, A. J. (2011). The role of telomeres in the ageing of human skin. In *Experimental Dermatology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 297–302). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01242.x>
- Bukhari, S. N. A., Roswandi, N. L., Waqas, M., Habib, H., Hussain, F., Khan, S., Sohail, M., Ramli, N. A., Thu, H. E., & Hussain, Z. (2018). Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 120, pp. 1682–1695). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>
- Butreddy, A., Kommineni, N., & Dudhipala, N. (2021). Exosomes as naturally occurring vehicles for delivery of biopharmaceuticals: Insights from drug delivery to clinical perspectives. In *Nanomaterials* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano11061481>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F. M., Palmquist, J., Huang, S. da, & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360 (6393), 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- Campisi, J., & D'Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 729–740). <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Castelo-Branco, C., Duran, M., & Gonzhlez-Merlo, J. (1992). Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. In *Maturitas* (Vol. 15).
- Chaudhary, M., Khan, A., & Gupta, M. (2019). Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Current Aging Science*, 13 (1), 22–30. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115>
- Chernyshev, V. S., Chuprov-Netochin, R. N., Tsydenzhapova, E., Svirshchevskaya, E. v., Poltavtseva, R. A., Merdalimova, A., Yashchenok, A., Keshelava, A., Sorokin, K., Keshelava, V., Sukhikh, G. T., Gorin, D., Leonov, S., & Skliar, M. (2022). Asymmetric depth-filtration: A versatile and scalable method for high-yield isolation of extracellular vesicles with low contamination. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11 (8). <https://doi.org/10.1002/jev2.12256>
- Chernyshev, V. S., Rachamadugu, R., Tseng, Y. H., Belnap, D. M., Jia, Y., Branch, K. J., Butterfield, A. E., Pease, L. F., Bernard, P. S., & Skliar, M. (2015). Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (12), 3285–3301. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8535-3>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. In *Nature Medicine* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1424–1435). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Cho, E. G., Choi, S. Y., Kim, H., Choi, E. J., Lee, E. J., Park, P. J., Ko, J., Kim, K. P., & Baek, H. S. (2021). Panax ginseng-derived extracellular vesicles facilitate anti-se-

- nescence effects in human skin cells: An eco-friendly and sustainable way to use ginseng substances. *Cells*, 10 (3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cells10030486>
- Cho, J. H., Hong, Y. D., Kim, D., Park, S. J., Kim, J. S., Kim, H. M., Yoon, E. J., & Cho, J. S. (2022). Confirmation of plant-derived exosomes as bioactive substances for skin application through comparative analysis of keratinocyte transcriptome. *Applied Biological Chemistry*, 65 (1). <https://doi.org/10.1186/s13765-022-00676-z>
- Chukhchin, D. G., Bolotova, K., Sinelnikov, I., Churilov, D., & Novozhilov, E. (2020). Exosomes in the phloem and xylem of woody plants. *Planta*, 251 (1). <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03315-y>
- Commoner B., Townsend J., Pake G.E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*. 1954 Oct 9;174(4432):689-91. doi: 10.1038/174689a0
- Corral-Debrinski, M., Shoffner, J. M., Lott, M. T., & Wallace, D. C. (1992). Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. In *Mutation Research* (Vol. 275).
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17 (6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Cui, Y., Cao, W., He, Y., Zhao, Q., Wakazaki, M., Zhuang, X., Gao, J., Zeng, Y., Gao, C., Ding, Y., Wong, H. Y., Wong, W. S., Lam, H. K., Wang, P., Ueda, T., Rojas-Pierce, M., Toyooka, K., Kang, B. H., & Jiang, L. (2019). A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in Arabidopsis root cells. *Nature Plants*, 5 (1), 95–105. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0328-1>
- Curtis, R., Geesaman, B. J., & DiStefano, P. S. (2005). Ageing and metabolism: Drug discovery opportunities. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 7, pp. 569–580). <https://doi.org/10.1038/nrd1777>
- Davinelli, S., Willcox, D. C., & Scapagnini, G. (2012). Extending healthy ageing: Nutrient sensitive pathway and centenarian population. In *Immunity and Ageing* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-9-9>
- de Magalhães, J. P. (2012). Programmatic features of aging originating in development: Aging mechanisms beyond molecular damage? In *FASEB Journal* (Vol. 26, Issue 12, pp. 4821–4826). <https://doi.org/10.1096/fj.12-210872>
- de Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., le Merrer, M., & Lévy, N. (2003). Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, 300 (5628), 2055. <https://doi.org/10.1126/science.1084125>
- Deregibus, M. C., Cantaluppi, V., Calogero, R., lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., & Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell - Derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*, 110 (7), 2440–2448. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-078709>

- di Gioia, S., Hossain, M. N., & Conese, M. (2020). Biological properties and therapeutic effects of plant-derived nanovesicles. *Open Medicine*, 15 (1), 1096–1122. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0160>
- Didiot, M. C., Hall, L. M., Coles, A. H., Haraszti, R. A., Godinho, B. M. D. C., Chase, K., Sapp, E., Ly, S., Alterman, J. F., Hassler, M. R., Echeverria, D., Raj, L., Morrissey, D. v., di Figlia, M., Aronin, N., & Khvorova, A. (2016). Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for huntingtin mRNA silencing. *Molecular Therapy*, 24 (10), 1836–1847. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.126>
- Ding, Y., Wang, J., Lai, J. H. C., Chan, V. H. L., Wang, X., Cai, Y., Tan, X., Bao, Y., Xia, J., Robinson, D. G., & Jiang, L. (2014). Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals. *Molecular Biology of the Cell*, 25 (3), 412–426. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0586>
- Dou, W., Zhang, J., Sun, A., Zhang, E., Ding, L., Mukherjee, S., Wei, X., Chou, G., Wang, Z. T., & Mani, S. (2013). Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *British Journal of Nutrition*, 110 (4), 599–608. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005594>
- 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. (2011a). 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>
- 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. (2011b). 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>
- Duncan, T. v. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363 (1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2011.07.017>
- Duong, P., Chung, A., Bouchareychas, L., & Raffai, R. L. (2019). Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC) improves the isolation efficiency of extracellular vesicles. *PLoS ONE*, 14 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215324>
- El-Andaloussi, S., Lee, Y., Lakkhal-Littleton, S., Li, J., Seow, Y., Gardiner, C., Alvarez-Erviti, L., Sargent, I. L., & Wood, M. J. A. (2012). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nature Protocols*, 7 (12), 2112–2126. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.131>
- Elliott, R. O., & He, M. (2021). Unlocking the power of exosomes for crossing biological barriers in drug delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 1, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010122>
- Farley, J. T., Eldahshoury, M. K., & de Marcos Lousa, C. (2022). Unconventional Secretion of Plant Extracellular Vesicles and Their Benefits to Human Health: A Mini

- Review. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.883841>
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27 (5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span—from yeast to humans. In *Science* (Vol. 328, Issue 5976, pp. 321–326). <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2012). Reprogramming aging and progeria. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 757–764). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.009>
- Gao, C., Zhuang, X., Shen, J., & Jiang, L. (2017). Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 11, pp. 986–998). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.003>
- Garaeva, L., Kamyshinsky, R., Kil, Y., Varfolomeeva, E., Verlov, N., Komarova, E., Garmay, Y., Landa, S., Burdakov, V., Myasnikov, A., Vinnikov, I. A., Margulis, B., Guzhova, I., Kagansky, A., Konevega, A. L., & Shtam, T. (2021). Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells in vitro. *Scientific Reports*, 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85833-y>
- Garcia, N. A., Ontoria-Oviedo, I., González-King, H., Diez-Juan, A., & Sepúlveda, P. (2015). Glucose starvation in cardiomyocytes enhances exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *PLoS ONE*, 10 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138849>
- Gardiner, C., Vizio, D. di, Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5 (1). <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract*. 2004 Dec;58(12):1134-41. doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00284.x
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 16, pp. 2667–2688). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
- Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. In *Mutation Research* (Vol. 275).
- Hartjes, T. A., Mytnyk, S., Jenster, G. W., van Steijn, V., & van Royen, M. E. (2019). Extracellular vesicle quantification and characterization: Common methods and emerging approaches. In *Bioengineering* (Vol. 6, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010007>

- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes and Development*, 23 (21), 2496–2506. <https://doi.org/10.1101/gad.1825209>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., & Jin, H. (2021a). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, 7 (3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., & Jin, H. (2021b). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, 7 (3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- Heidi A, T. (2001). *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. www.nature.com
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. In *Developmental Cell* (Vol. 21, Issue 1, pp. 77–91). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
- Hoenicke, L., & Zender, L. (2012). immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*, 33 (6), 1123–1126. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs124>
- Hood, J. L., San Roman, S., & Wickline, S. A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Research*, 71 (11), 3792–3801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4455>
- Houtkooper, R. H., Williams, R. W., & Auwerx, J. (2010). Metabolic Networks of Longevity. In *Cell* (Vol. 142, Issue 1, pp. 9–14). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.029>
- Integrated care for older people: guidelines on community-level interventions to manage declines in intrinsic capacity*. (n.d.). Retrieved November 9, 2022, from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258981>
- Ivanov, S., Austin, J., Berg, R. H., & Harrison, M. J. (2019). Extensive membrane systems at the host–arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nature Plants*, 5 (2), 194–203. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>
- Jenkins, G. (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. In *Mechanisms of Ageing and Development* (Vol. 123). www.elsevier.com/locate/mechagedev
- Kameli, N., Dragojlovic-kerkache, A., Savelkoul, P., & Stassen, F. R. (2021). Plant derived extracellular vesicles: Current findings, challenges, and future applications. In *Membranes* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/membranes11060411>
- Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., Bar-Joseph, Z., & Cohen, H. Y. (2012). The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*, 483 (7388), 218–221. <https://doi.org/10.1038/nature10815>
- Karamanidou, T., & Tsouknidas, A. (2022). Plant-derived extracellular vesicles as therapeutic nanocarriers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23010191>

- Kim, J., Li, S., Zhang, S., & Wang, J. (2022). Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. In *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 17, Issue 1, pp. 53–69). Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.006>
- Kim, K., Yoo, H. J., Jung, J. H., Lee, R., Hyun, J. K., Park, J. H., Na, D., & Yeon, J. H. (2020). Cytotoxic effects of plant sap-derived extracellular vesicles on various tumor cell types. *Journal of Functional Biomaterials*, 11 (2). <https://doi.org/10.3390/jfb11020022>
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. v., & Batrakov, E. v. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12 (3), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
- Kim, S. M., Yang, Y., Oh, S. J., Hong, Y., Seo, M., & Jang, M. (2017). Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *Journal of Controlled Release*, 266, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.013>
- Kim, S.-J., & Brandizzi, F. (2014). Title: *The plant secretory pathway: an essential factory for building plant cell walls* Running title: *Secretion and synthesis of plant cell walls* Downloaded from 4. <http://pcp.oxfordjournals.org/>
- Kirkland, J. L., & Tchkonina, T. (2020). Senolytic drugs: from discovery to translation. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 288, Issue 5, pp. 518–536). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/joim.13141>
- Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the odd science of aging. In *Cell* (Vol. 120, Issue 4, pp. 437–447). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>
- Kırbaş, O. K., Bozkurt, B. T., Asutay, A. B., Mat, B., Ozdemir, B., Öztürkoğlu, D., Ölmez, H., İşlek, Z., Şahin, F., & Taşlı, P. N. (2019). Optimized Isolation of Extracellular Vesicles From Various Organic Sources Using Aqueous Two-Phase System. *Scientific Reports*, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55477-0>
- Kleinjan, M., van Herwijnen, M. J. C., Libregts, S. F. W. M., van Neerven, R. J., Feitsma, A. L., & Wauben, M. H. M. (2021). Regular Industrial Processing of Bovine Milk Impacts the Integrity and Molecular Composition of Extracellular Vesicles. *Journal of Nutrition*, 151 (6), 1416–1425. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab031>
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. v., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
- Kubátová, Z., Pejchar, P., Potocký, M., Sekereš, J., Žárský, V., & Kulich, I. (2019). Arabidopsis trichome contains two plasma membrane domains with different lipid compositions which attract distinct EXO70 subunits. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153803>
- Landau, M. (2007). Environmental Factors in Skin Diseases. In *Curr Probl Dermatol. Basel, Karger* (Vol. 35).

- Leak, R. K. (2014). Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. In *Journal of Cell Communication and Signaling* (Vol. 8, Issue 4, pp. 293–310). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s12079-014-0243-9>
- Lee, R., Ko, H. J., Kim, K., Sohn, Y., Min, S. Y., Kim, J. A., Na, D., & Yeon, J. H. (2020). Anti-melanogenic effects of extracellular vesicles derived from plant leaves and stems in mouse melanoma cells and human healthy skin. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9 (1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1703480>
- Leyden, J. J. (1990). Clinical features of ageing skin. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 122).
- Li, Y., Xiao, Q., Tang, J., Xiong, L., & Li, L. (2021). Extracellular vesicles: Emerging therapeutics in cutaneous lesions. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 16, pp. 6183–6202). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S322356>
- Lin, Y., Wu, J., Gu, W., Huang, Y., Tong, Z., Huang, L., & Tan, J. (2018). Exosome-Liposome Hybrid Nanoparticles Deliver CRISPR/Cas9 System in MSCs. *Advanced Science*, 5 (4). <https://doi.org/10.1002/advs.201700611>
- Liu, B., Lu, Y., Chen, X., Muthuraj, P. G., Li, X., Pattabiraman, M., Zempleni, J., Kachman, S. D., Natarajan, S. K., & Yu, J. (2020). Protective role of shiitakemushroom-derived exosome-like nanoparticles in d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice. *Nutrients*, 12 (2). <https://doi.org/10.3390/nu12020477>
- Liu, N. J., Bao, J. J., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2020). Arabidopsis leaf extracellular vesicles in wound-induced jasmonate accumulation. *Plant Signaling and Behavior*, 15 (12). <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1833142>
- lo Cicero, A., Stahl, P. D., & Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 35, pp. 69–77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.013>
- Logozzi, M., di Raimo, R., Mizzoni, D., & Fais, S. (2022). The Potentiality of Plant-Derived Nanovesicles in Human Health—A Comparison with Human Exosomes and Artificial Nanoparticles. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23094919>
- Longo, V. D., Antebi, A., Bartke, A., Barzilai, N., Brown-Borg, H. M., Caruso, C., Curiel, T. J., de Cabo, R., Franceschi, C., Gems, D., Ingram, D. K., Johnson, T. E., Kennedy, B. K., Kenyon, C., Klein, S., Kopchick, J. J., Lepperdinger, G., Madeo, F., Mirisola, M. G., ... Fontana, L. (2015). Interventions to slow aging in humans: Are we ready? In *Aging Cell* (Vol. 14, Issue 4, pp. 497–510). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ace1.12338>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013a). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6, p. 1194). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013b). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6, p. 1194). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. In *Nature* (Vol. 481, Issue 7381, pp. 287–294). <https://doi.org/10.1038/nature10760>
- Loureiro, J. A., Andrade, S., Duarte, A., Neves, A. R., Queiroz, J. F., Nunes, C., Sevin, E., Fenart, L., Gosselet, F., Coelho, M. A. N., Pereira, M. C., & Latruffe, N. (2017). Resveratrol and grape extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 22 (2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020277>
- Lovell, C. R., Smolenski, K. A., Duance, V. C., Light, N. D., Young, S., & Dyson, M. (1987). Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 117).
- Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplatforams for drug delivery. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 38, Issue 6, pp. 754–763). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.12>
- Ludwig, N., Whiteside, T. L., & Reichert, T. E. (2019). Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20194684>
- Danith H. Ly, David J. Lockhart, Richard A. Lerner,* Peter G. Schultz. (2000). Mitotic Misregulation and Human Aging. *Science* (American Association for the Advancement of Science)-Vol. 287, Iss: 5462, pp 2486-2492.
- Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 27, Issue 3, pp. 172–188). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003>
- Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2007). Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. In *Dermatology* (Vol. 214, Issue 4, pp. 352–360). <https://doi.org/10.1159/000100890>
- Malenica, M., Vukomanović, M., Kurtjak, M., Masciotti, V., Dal Zilio, S., Greco, S., Lazzarino, M., Krušić, V., Perčić, M., Badovinac, I. J., Wechtersbach, K., Vidović, I., Baričević, V., Valić, S., Lučin, P., Kojc, N., & Grabušić, K. (2021). Perspectives of microscopy methods for morphology characterisation of extracellular vesicles from human biofluids. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060603>
- Mammadova, R., Fiume, I., Bokka, R., Kralj-Iglič, V., Božič, D., Kisovec, M., Podobnik, M., Zavec, A. B., Hočevar, M., Gellén, G., Schlosser, G., & Pocsfalvi, G. (2021). Identification of tomato infecting viruses that co-isolate with nanovesicles using a combined proteomics and electron-microscopic approach. *Nanomaterials*, 11 (8). <https://doi.org/10.3390/nano11081922>
- Mateescu, B., Kowal, E. J. K., van Balkom, B. W. M., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzás, E. I., Buck, A. H., de Candia, P., Chow, F. W. N., Das, S., Driedonks, T. A. P., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A. F., Jones, J. C., van Keuren-Jensen, K. R., Lai, C. P., Lässer, C., di Liegro, I., ... Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - An ISEV position paper. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6 (1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>

- Mo, W., Yang, C., Liu, Y., He, Y., Wang, Y., & Gao, F. (2011). The influence of hyaluronic acid on vascular endothelial cell proliferation and the relationship with ezrin/merlin expression. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43 (12), 930–939. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr094>
- Mohammad, Z. H., Ahmad, F., Salam, ., Ibrahim, A., & Zaidi, S. (2022). Application of nanotechnology in different aspects of the food industry. *Discover Food* 2022 2:1, 2 (1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/S44187-022-00013-9>
- Morita, A. (2007). Tobacco smoke causes premature skin aging. In *Journal of Dermatological Science* (Vol. 48, Issue 3, pp. 169–175). <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.06.015>
- Morretta, E., D'agostino, A., Cassese, E., Maglione, B., Petrella, A., Schiraldi, C., & Monti, M. C. (2022). Label-Free Quantitative Proteomics to Explore the Action Mechanism of the Pharmaceutical-Grade *Triticum vulgare* Extract in Speeding up Keratinocyte Healing. *Molecules*, 27 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031108>
- Motolese, A., Vignati, F., Brambilla, R., Cerati, M., & Passi, A. (2013). Interaction between a regenerative matrix and wound bed in nonhealing ulcers: Results with 16 cases. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/849321>
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Crams, L. S., Dani, M., Deavent, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., & Wu, J.-R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)., present at the telomeres of human chromosomes (human repetitive DNA/in situ hybridization/trypanosome telomeres/BAL-31 nuclease/flow cytometry). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. bin, Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014a). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58 (7), 1561–1573. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300729>
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. bin, Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014b). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58 (7), 1561–1573. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300729>
- Nemati, M., Singh, B., Mir, R. A., Nemati, M., Babaei, A., Ahmadi, M., Rasmi, Y., Golezani, A. G., & Rezaie, J. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: a novel nanomedicine approach with advantages and challenges. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 20 (1). <https://doi.org/10.1186/S12964-022-00889-1>
- Ohno, S. I., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N., & Kuroda, M. (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microrna to breast cancer cells. *Molecular Therapy*, 21 (1), 185–191. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>
- Osteikoetxea, X., Sódar, B., Németh, A., Szabó-Taylor, K., Pálóczi, K., Vukman, K. v., Tamási, V., Balogh, A., Kittel, Á., Pállinger, É., & Buzás, E. I. (2015). Differential

- detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 13 (38), 9775–9782. <https://doi.org/10.1039/c5ob01451d>
- Pascucci, L., Coccè, V., Bonomi, A., Ami, D., Ceccarelli, P., Ciusani, E., Viganò, L., Locatelli, A., Sisto, F., Doglia, S. M., Parati, E., Bernardo, M. E., Muraca, M., Alessandri, G., Bondiolotti, G., & Pessina, A. (2014). Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 192, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.042>
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). *Annual Review of Biochemistry Exosomes*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118>
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C. M., Nitoro-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18 (6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>
- Perut, F., Roncuzzi, L., Avnet, S., Massa, A., Zini, N., Sabbadini, S., Giampieri, F., Mezzetti, B., & Baldini, N. (2021). Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells. *Biomolecules*, 11 (1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom11010087>
- Pfisterer, K., Shaw, L. E., Symmank, D., & Weninger, W. (2021). The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.682414>
- Phillips TJ, Demircay Z, Sahu M. Hormonal effects on skin aging. *Clin Geriatr Med*. 2001 Nov;17(4):661-72, vi. doi: 10.1016/s0749-0690(05)70092-6. Picciotto, S., Barone, M. E., Fierli, D., Aranyos, A., Adamo, G., Božič, D., Romancino, D. P., Stanly, C., Parkes, R., Morsbach, S., Raccosta, S., Paganini, C., Cusimano, A., Martorana, V., Noto, R., Carrotta, R., Librizzi, F., Capasso Palmiero, U., Santonicola, P., ... Bongiovanni, A. (2021). Isolation of extracellular vesicles from microalgae: Towards the production of sustainable and natural nanocarriers of bioactive compounds. *Biomaterials Science*, 9 (8), 2917–2930. <https://doi.org/10.1039/d0bm01696a>
- Picciotto, S., Santonicola, P., Paterna, A., Rao, E., Raccosta, S., Romancino, D. P., Noto, R., Touzet, N., Manno, M., di Schiavi, E., Bongiovanni, A., & Adamo, G. (2022). Extracellular Vesicles From Microalgae: Uptake Studies in Human Cells and *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.830189>
- Pinedo, M., de la Canal, L., & de Marcos Lousa, C. (2021). A call for Rigor and standardization in plant extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10 (6), e12048. <https://doi.org/10.1002/JEV2.12048>
- Pocsfalvi, G., Turiák, L., Ambrosone, A., del Gaudio, P., Puska, G., Fiume, I., Silvestre, T., & Vékey, K. (2019). Physicochemical and protein datasets related to citrus juice sac cells-derived nanovesicles and microvesicles. *Data in Brief*, 22, 251–254. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.12.036>

- Potekaev, N. N., Borzykh, O. B., Medvedev, G. v., Petrova, M. M., Gavriilyuk, O. A., Karpova, E. I., Trefilova, V. v., Demina, O. M., Popova, T. E., & Shnayder, N. A. (2021). Genetic and epigenetic aspects of skin collagen fiber turnover and functioning. In *Cosmetics* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040092>
- Potestà, M., Roglia, V., Fanelli, M., Pietrobono, E., Gismondi, A., Vumbaca, S., Nguedia Tsangueu, R. G., Canini, A., Colizzi, V., Grelli, S., Minutolo, A., & Montesano, C. (2020). Effect of microvesicles from *Moringa oleifera* containing miRNA on proliferation and apoptosis in tumor cell lines. *Cell Death Discovery*, 6 (1). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0271-6>
- Potestà, M., Minutolo, A., Gismondi, A., Canuti, L., Kenzo, M., Roglia, V., Macchi, F., Grelli, S., Canini, A., Colizzi, V., & Montesano, C. (2019). Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Moringa oleifera* Lam on lymphoid and monocytoid cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7544>
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 78, pp. 959–991). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>
- Raiborg, C., & Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. In *Nature* (Vol. 458, Issue 7237, pp. 445–452). <https://doi.org/10.1038/nature07961>
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., di Bella, M. A., de Leo, G., & Alessandro, R. (2015). *Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death*. www.impactjournals.com/oncotarget/
- Ramirez, M. I., Amorim, M. G., Gadelha, C., Milic, I., Welsh, J. A., Freitas, V. M., Nawaz, M., Akbar, N., Couch, Y., Makin, L., Cooke, F., Vettore, A. L., Batista, P. X., Freezor, R., Pezuk, J. A., Rosa-Fernandes, L., Carreira, A. C. O., Devitt, A., Jacobs, L., ... Dias-Neto, E. (2018). Technical challenges of working with extracellular vesicles. In *Nanoscale* (Vol. 10, Issue 3, pp. 881–906). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7nr08360b>
- Richter, M., Fuhrmann, K., & Fuhrmann, G. (2019). Evaluation of the storage stability of extracellular vesicles. *Journal of Visualized Experiments*, 2019 (147). <https://doi.org/10.3791/59584>
- Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 195–208). <https://doi.org/10.1038/nri3622>
- Robinson, D. G., Ding, Y., & Jiang, L. (2016). Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. In *Protoplasma* (Vol. 253, Issue 1, pp. 31–43). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0887-1>
- Röck, K., Grandoch, M., Majora, M., Krutmann, J., & Fischer, J. W. (2011). Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ul-

- traviolet B (UVB): New insights into mechanisms of matrix remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (20), 18268–18276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201665>
- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. In *Cell* (Vol. 146, Issue 5, pp. 682–695). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
- Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiology*, 173 (1), 728–741. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>
- Rutter, B., Rutter, K., & Innes, R. (2017). Isolation and Quantification of Plant Extracellular Vesicles. *BIO-PROTOCOL*, 7 (17). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2533>
- Rybak, K., & Robatzek, S. (2019a). Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence. *Plant Physiology*, 179 (4), 1236–1247. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01557>
- Rybak, K., & Robatzek, S. (2019b). Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence. *Plant Physiology*, 179 (4), 1236–1247. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01557>
- Sahin, F., Koçak, P., Güneş, M. Y., Özkan, İ., Yıldırım, E., & Kala, E. Y. (2019). In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188 (2), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2913-1>
- Salwowska, N. M., Bebenek, K. A., Za Z Dłó, D. A. , Dominika, & Wcisło-Dzia-decka, L. (2016). Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. In *Journal of Cosmetic Dermatology* (Vol. 0).
- Savci, Y., Kirbas, O. K., Bozkurt, B. T., Abdik, E. A., Tasli, P. N., Sahin, F., & Abdik, H. (2021). Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing. *Food and Function*, 12 (11), 5144–5156. <https://doi.org/10.1039/d0fo02953j>
- Sebaihi, N., de Boeck, B., Yuana, Y., Nieuwland, R., & Pétry, J. (2017). Dimensional characterization of extracellular vesicles using atomic force microscopy. *Measurement Science and Technology*, 28 (3). <https://doi.org/10.1088/1361-6501/28/3/034006>
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. In *Molecular Cell* (Vol. 48, Issue 2, pp. 158–167). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Shkryl, Y., Tsydeneshieva, Z., Degtyarenko, A., Yugay, Y., Balabanova, L., Rusapetova, T., & Bulgakov, V. (2022a). Plant Exosomal Vesicles: Perspective Information Nanocarriers in Biomedicine. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/app12168262>
- Shkryl, Y., Tsydeneshieva, Z., Degtyarenko, A., Yugay, Y., Balabanova, L., Rusapetova, T., & Bulgakov, V. (2022b). Plant Exosomal Vesicles: Perspective Information Nanocarriers in Biomedicine. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 8262, 12 (16), 8262. <https://doi.org/10.3390/APP12168262>

- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Siedlecki, C. A., Wang, I. W., Higashi, J. M., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (1999). Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. In *Biomaterials* (Vol. 20).
- Skliar, M., & Chernyshev, V. S. (2019). Imaging of extracellular vesicles by atomic force microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 2019 (151). <https://doi.org/10.3791/59254>
- Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K., & Llorente, A. (2019). Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 60, Issue 1, pp. 9–18). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084343>
- Skryabin, G. O., Komelkov, A. v., Savelyeva, E. E., & Tchevkina, E. M. (2020). Lipid Rafts in Exosome Biogenesis. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 85, Issue 2, pp. 177–191). Pleiades journals. <https://doi.org/10.1134/S0006297920020054>
- Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S., West, D., Delisser, H., Savani, R. C., & Kumar, S. (2007). Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. In *Matrix Biology* (Vol. 26, Issue 1, pp. 58–68). <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.08.261>
- Stambler, I. (2017). Recognizing degenerative aging as a treatable medical condition: Methodology and policy. In *Aging and Disease* (Vol. 8, Issue 5, pp. 583–589). International Society on Aging and Disease. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0130>
- Stanly, C., Fiume, I., Capasso, G., & Pocsfalvi, G. (2016). Isolation of exosome-like vesicles from plants by ultracentrifugation on sucrose/deuterium oxide (D2O) density cushions. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1459, pp. 259–269). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_18
- Stremersch, S., de Smedt, S. C., & Raemdonck, K. (2016). Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release*, 244, 167–183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.054>
- Stuck, A. E., Siu, A. L., Wieland, G. D., Rubenstein, L. Z., & Adams, J. (1993). Comprehensive geriatric assessment: a meta-analysis of controlled trials. *Lancet (London, England)*, 342 (8878), 1032–1036. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92884-V](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92884-V)
- Stunova, A., & Vistejnova, L. (2018). Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 39, pp. 137–150). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.01.003>
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., & Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. In *Biochimie* (Vol. 89, Issue 2, pp. 205–212). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.014>

- Suharta, S., Barlian, A., Hidajah, A. C., Notobroto, H. B., Ana, I. D., Indariani, S., Wungu, T. D. K., & Wijaya, C. H. (2021). Plant-derived exosome-like nanoparticles: A concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. In *Journal of Food Science* (Vol. 86, Issue 7, pp. 2838–2850). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15787>
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Barnes, S., Grizzle, W., Miller, D., & Zhang, H. G. (2010). A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy*, 18 (9), 1606–1614. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.105>
- Suresh, A. P., Kalarikkal, S. P., Pullareddy, B., & Sundaram, G. M. (2021). Low pH-Based method to increase the yield of plant-derived nanoparticles from fresh ginger rhizomes. *ACS Omega*, 6 (27), 17635–17641. <https://doi.org/10.1021/acso-mega.1c02162>
- Tammi, M. I., Day, A. J., & Turley, E. A. (2002). Hyaluronan and homeostasis: A balancing act. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 277, Issue 7, pp. 4581–4584). <https://doi.org/10.1074/jbc.R100037200>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30 (1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Tkach, M., Kowal, J., Zucchetti, A. E., Enserink, L., Jouve, M., Lankar, D., Saitakis, M., Martin-Jaular, L., & Théry, C. (2017). Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *The EMBO Journal*, 36 (20), 3012–3028. <https://doi.org/10.15252/embj.201696003>
- Tschopp, J., & Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 3, pp. 210–215). <https://doi.org/10.1038/nri2725>
- Tzellos, T. G., Klagas, I., Vahtsevanos, K., Triaridis, S., Printza, A., Kyrgidis, A., Karakioulakis, G., Zouboulis, C. C., & Papakonstantinou, E. (2009). Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Experimental Dermatology*, 18 (12), 1028–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00889.x>
- Uitto J. (1997). Understanding Premature skin Aging. *The New England Journal of Medicine*, 337 (20), 1463–1465.
- Urzi, O., Gasparro, R., Rabienezhad Ganji, N., Alessandro, R., & Raimondo, S. (2022). Plant-RNA in Extracellular Vesicles: The Secret of Cross-Kingdom Communication. In *Membranes* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/membranes12040352>
- Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., & Schiffelers, R. M. (2016a). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 148–156. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.02.006>
- Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., & Schiffelers, R. M. (2016b). Extracellular vesicles for drug delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 106, pp. 148–156). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006>

- Valkonen, S., van der Pol, E., Böing, A., Yuana, Y., Yliperttula, M., Nieuwland, R., Laitinen, S., & Siljander, P. R. M. (2017). Biological reference materials for extracellular vesicle studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.008>
- van der Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L., & Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14 (1), 48–56. <https://doi.org/10.1111/jth.13190>
- van der Pol, E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., Nieuwland, R., & van Leeuwen, T. G. (2014). Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis. *Nano Letters*, 14 (11), 6195–6201. <https://doi.org/10.1021/nl503371p>
- van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z. A., Baetens, T., Beghein, E., Bertier, L., Berx, G., Boere, J., Boukouris, S., Bremer, M., Buschmann, D., Byrd, J. B., Casert, C., Cheng, L., Cmoch, A., ... Hendrix, A. (2017). EV-TRACK: Transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. In *Nature Methods* (Vol. 14, Issue 3, pp. 228–232). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4185>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 213–228). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Volnitskiy, A., Shtam, T., Burdakov, V., Kovalev, R., Konev, A., & Filatov, M. (2019). Abnormal activity of transcription factors gli in high-grade gliomas. *PLoS ONE*, 14 (2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0211980>
- Wahlgren, J., Karlson, T. D. L., Brisslert, M., Vaziri Sani, F., Telemo, E., Sunnerhagen, P., & Valadi, H. (2012). Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research*, 40 (17). <https://doi.org/10.1093/nar/gks463>
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 39, pp. 359–407). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095751>
- Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z. bin, Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H., Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Molecular Therapy*, 22 (3), 522–534. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.190>
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. bin, Jiang, H., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2013a). Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. bin, Jiang, H., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2013b). Delivery of therapeutic agents by nanopar-

- ticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>
- Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. bin, Jiang, H., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2013c). Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2886>
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W., & Welti, R. (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 45, Issue 3, pp. 250–278). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.005>
- Wang, Y., Wang, J., Ma, J., Zhou, Y., & Lu, R. (2022). Focusing on Future Applications and Current Challenges of Plant Derived Extracellular Vesicles. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph15060708>
- Woith, E., Guerriero, G., Hausman, J. F., Renaut, J., Leclercq, C. C., Weise, C., Legay, S., Weng, A., & Melzig, M. F. (2021). Plant extracellular vesicles and nanovesicles: Focus on secondary metabolites, proteins and lipids with perspectives on their potential and sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073719>
- Woith, E., & Melzig, M. F. (2019). Extracellular vesicles from fresh and dried plants—Simultaneous purification and visualization using gel electrophoresis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020357>
- Wu, X., Zheng, T., & Zhang, B. (2017). Exosomes in Parkinson's Disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 33, Issue 3, pp. 331–338). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0092-z>
- Xiao, J., Feng, S., Wang, X., Long, K., Luo, Y., Wang, Y., Ma, J., Tang, Q., Jin, L., Li, X., & Li, M. (2018). Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ*, 2018 (7). <https://doi.org/10.7717/peerj.5186>
- Yang, M., Liu, X., Luo, Q., Xu, L., & Chen, F. (2020a). An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00656-9>
- Yang, M., Liu, X., Luo, Q., Xu, L., & Chen, F. (2020b). An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00656-9>
- Yang, M., Liu, X., Luo, Q., Xu, L., & Chen, F. (2020c). An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 18 (1). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00656-9>
- Yang, Z., Shi, J., Xie, J., Wang, Y., Sun, J., Liu, T., Zhao, Y., Zhao, X., Wang, X., Ma, Y., Malkoc, V., Chiang, C., Deng, W., Chen, Y., Fu, Y., Kwak, K. J., Fan, Y., Kang, C., Yin, C., ... Lee, L. J. (2020). Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation. *Nature Biomedical Engineering*, 4 (1), 69–83. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0485-1>
- Yepes-Molina, L., Martínez-Ballesta, M. C., & Carvajal, M. (2020). Plant plasma membrane vesicles interaction with keratinocytes reveals their potential as

- carriers. *Journal of Advanced Research*, 23, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.02.004>
- You, J. Y., Kang, S. J., & Rhee, W. J. (2021). Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive Materials*, 6 (12), 4321–4332. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.023>
- Zhang, M., Viennois, E., Prasad, M., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, Z., Han, M. K., Xiao, B., Xu, C., Srinivasan, S., & Merlin, D. (2016). Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*, 101, 321–340. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.018>
- Zhang, M., Viennois, E., Xu, C., & Merlin, D. (2016). Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases. In *Tissue Barriers* (Vol. 4, Issue 2). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1134415>
- Zhang, M., Wang, X., Han, M. K., Collins, J. F., & Merlin, D. (2017). Oral administration of ginger-derived nanolipids loaded with siRNA as a novel approach for efficient siRNA drug delivery to treat ulcerative colitis. *Nanomedicine*, 12 (16), 1927–1943. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0196>
- Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. In *Cell Transplantation* (Vol. 27, Issue 5, pp. 729–738). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. In *Cell and Bioscience* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhen, Y., & Stenmark, H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 128 (17), 3171–3176. <https://doi.org/10.1242/jcs.166074>
- Zhou, Z., Li, X., Liu, J., Dong, L., Chen, Q., Liu, J., Kong, H., Zhang, Q., Qi, X., Hou, D., Zhang, L., Zhang, G., Liu, Y., Zhang, Y., Li, J., Wang, J., Chen, X., Wang, H., Zhang, J., ... Zhang, C. Y. (2015). Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Research*, 25 (1), 39–49. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.130>
- Zhuang, X., Teng, Y., Samykutty, A., Mu, J., Deng, Z., Zhang, L., Cao, P., Rong, Y., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2016a). Grapefruit-derived nanovectors delivering therapeutic miR17 through an intranasal route inhibit brain tumor progression. *Molecular Therapy*, 24 (1), 96–105. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.188>
- Zhuang, X., Teng, Y., Samykutty, A., Mu, J., Deng, Z., Zhang, L., Cao, P., Rong, Y., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2016b). Grapefruit-derived nanovectors delivering therapeutic miR17 through an intranasal route inhibit brain tumor progression. *Molecular Therapy*, 24 (1), 96–105. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.188>
- Życieńska, K., Pszczołkowska, B., Brzozowska, B., Kamiński, M., Lorenc, T., Olejarsz, W., Sęk, S., & Ginter, J. (2022). Brownian Motion Influence on AFM Exosomes' Size Measurements. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710074>

