

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Aislamiento de exosomas a partir de biopsia líquida y su potencial aplicación en la clínica

Liquid biopsy derived exosomes and their potential application in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer

Paula Daniela Morales^a , Nicolás Molina Franco^a , Josefa A. Rodríguez^{a,b} 

Fecha de sometimiento: 29/10/2020, fecha de aceptación: 19/05/2021
Disponible en internet: 01/07/2021
<https://doi.org/10.35509/01239015.733>

Abstract

Exosomes are extracellular microvesicles secreted by all cell types that have become highly important due to their potential clinical application for identification of new biomarkers for the diagnosis, prognosis, and monitoring of neurodegenerative diseases and cancer, or to determine their potential therapeutic application. Since these vesicles are found naturally in body fluids such as blood, urine, or saliva, it is possible to isolate them from a liquid biopsy to analyze their content, explain their interaction with different cell populations (crosstalk), and determine their effect during the development of particular pathologies. In this review, we outline the latest findings related to the design and application of extracellular vesicle-based therapies, particularly exosomes, for the treatment of cancer or as biomarkers for disease diagnosis, prognosis, or monitoring.

Keywords: Cancer, liquid biopsy, exosomes, biomarkers, cancer therapy.

Resumen

Los exosomas son micro vesículas extracelulares secretadas por las células que han cobrado gran importancia por su potencial aplicación en la clínica para la identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades como el cáncer, o para determinar su potencial aplicación terapéutica. Dado que estas vesículas se encuentran de forma natural en fluidos corporales tales como sangre, orina o saliva, es posible aislarlas a partir de una biopsia líquida para analizar su contenido, dilucidar su interacción con diferentes poblaciones celulares (crosstalk) y determinar su efecto durante el desarrollo de una patología particular. En esta revisión abordamos los últimos hallazgos relacionados con el diseño y la aplicación de terapias que emplean vesículas extracelulares, particularmente exosomas, para el tratamiento del cáncer o como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la enfermedad.

Palabras clave: cáncer, biopsia líquida, exosomas, biomarcadores y terapia del cáncer

Introducción

Los exosomas son vesículas intraluminales liberadas por las células nucleadas al espacio extracelular, tras la fusión del cuerpo multi vesicular (MVB) con la membrana plasmática. Su tamaño varía entre 30 y 150 nanómetros de diámetro (1) y una vez en el espacio extracelular, los exosomas se distribuyen por todo el organismo y pueden aislarse a partir de una biopsia líquida (2) —que constituye una estrategia de muestreo importante por su potencial diagnóstico para el cáncer—, y que surge como una alternativa a la biopsia tisular, que es la prueba de oro para su diagnóstico.

^a Semillero de Investigación en Inmunobiología Tumoral. Universidad Distrital Francisco José de Caldas (SIIT-UD), Bogotá, Colombia

^b Investigadora principal: Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia

Tabla 1. Investigaciones en curso con el uso de exosomas para terapias alternativas de distintos tipos de cáncer.

Nombre y diseño del estudio	Descripción	Brazos e inter-venciones	Medidas de resultado	Criterios de elegibilidad	Identificador ClinicalTrials.gov
<p>Capacidad de los exosomas de plantas comestibles para prevenir la mucositis oral asociada al tratamiento con quimio radiación del cáncer de cabeza y cuello.</p> <p>-Ensayo clínico aleatorizado</p> <p>-60 participantes.</p> <p>Propósito: desarrollar un tratamiento para la mucositis oral.</p>	<ol style="list-style-type: none"> Investigar la capacidad de los exosomas de uva, como agente antiinflamatorio para prevenir la mucositis oral asociada con la quimio radiación en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. Evaluar su efecto sobre la producción de citoquinas y sobre la respuesta inmune contra antígenos tumorales presentes en los exosomas. 	<p>Dos brazos:</p> <ol style="list-style-type: none"> Experimental: Extracto de uva diariamente por 35 días durante la quimio radiación. Comparador: Tratamiento estándar para el manejo del dolor y enjuagues antifúngicos <p>Intervención: Extracto de Uva en polvo por 35 días.</p>	<p>Medidas primarias evaluación semanal durante el tratamiento (30días) -Seguimiento: 6 meses</p> <ol style="list-style-type: none"> Dolor por mucositis oral. Grado de dolor por mucositis. <p>Medidas secundarias:</p> <p>3 días después de finalizar la radioterapia.</p> <ol style="list-style-type: none"> Biomarcadores inmunes en sangre. (citoquinas, células T, células NK CD11c IL12) Niveles de biomarcadores inmunes (CD3, CD8, CD11b, F4/80, BRDU) en raspado de tejido mucoso al final de la radioterapia. para comparar con los niveles iniciales. 	<p>Edad: 20 a 85 años</p> <p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> tener cáncer de cabeza y cuello. quimio radiación <p>Criteria de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> firma del consentimiento. <p>Criterio de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> Síndrome de cáncer de cabeza y cuello familiar. Neoplasia previa. Embarazo. <p>-Inmunosupresión por VIH o fármacos.</p> <p>-Enfermedad inflamatoria intestinal.</p>	<p>https://clinical-trials.gov/ct2/show/NCT01668849?cond=exoso-mest-draw=4&rank=22</p>
<p>Análisis de exosomas en el LCR de pacientes con cáncer de mama y sospecha de metástasis leptomenígea.</p> <p>-Ensayo clínico intervencionista y multicéntrico.</p> <p>-74 participantes.</p> <p>Propósito: Evaluar la utilidad del perfil de proteínas de micro vesículas del LCR para el diagnóstico de metástasis leptomenígeas.</p>	<ol style="list-style-type: none"> Describir la asociación entre el perfil proteómico y el análisis citológico inicial de micro vesículas de LCR en pacientes con Cáncer mama con sospecha de meningitis metastásica. Describir la asociación entre el perfil proteómico inicial y los tipos histológicos, el estado de los receptores hormonales del cáncer de mama y la probabilidad de metástasis leptomenígea según la clasificación EANO-ESMO, combinada con el tipo histológico y el estado de los receptores hormonales. 	<p>Brazo experimental: Obtención de muestras de sangre y LCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> En el diagnóstico inicial. Al mes y a los 3 meses después en pacientes "posibles", "probables" o "confirmados" según la clasificación EANO-ESMO. <ul style="list-style-type: none"> A los 3 meses en pacientes clasificados como "falta de evidencia" según la clasificación EANO-ESMO, en caso de tener síntomas sugestivos de metástasis. <p>Intervención: toma de muestras en los tiempos estipulados según clasificación EANO-ESMO.</p>	<p>Medidas primarias: Perfiles proteómicos obtenidos mediante análisis bioinformático del LCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> Resultado del análisis citológico del LCR al diagnóstico: "positivo", "negativo", "equivoco". <p>Medidas secundarias:</p> <ul style="list-style-type: none"> Perfiles proteómicos obtenidos mediante análisis bioinformático del LCR 1 y 3 meses del inicio del tratamiento 3 meses después de que el paciente es clasificado como "falta de evidencia". 	<p>Edad: ≥ 18 años</p> <p>Sexo femenino</p> <p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> Tener cáncer de mama con sospecha de leptomeningitis metastásica. <p>-Firma del consentimiento informado.</p> <p>Criterio de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> Antecedente de otro tipo de cáncer. <p>-Contraindicación para realizar punción lumbar o tomar imágenes de resonancia magnética cerebroespinal.</p> <p>-Paciente embarazada o en período de lactancia.</p>	<p>https://clinical-trials.gov/ct2/show/NCT03974204?cond=exoso-mes+in+cancer&draw=2&rank=9</p>

<p>1. Investigar la capacidad de los exosomas vegetales como vehículo para la administración de curcumina en tejido normal y tumoral del colon.</p> <p>2. Caracterizar el efecto de la curcumina administrada en exosomas en la modulación inmune, el metabolismo celular y el perfil de fosfolípidos en células normales y tumorales del colon de pacientes con cáncer de colon recién diagnosticado tratados con cirugía.</p> <p>- Caracterizar el efecto de la curcumina administrada en exosomas sobre la producción de citoquinas, los cambios de las células inmunes y el metabolismo de la glucosa.</p>	<p>Medidas primarias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medir la concentración de curcumina en tejido normal y tumoral 7 días después del inicio de la ingestión de curcumina sola o en exosomas. - Comparar la concentración de la curcumina sola o en exosomas en tejido normal y tumorales del colon. - Estimar el efecto de la curcumina sola o en exosomas de plantas. - Medir la seguridad y tolerabilidad de la curcumina por vía oral. - Determinar el efecto de la curcumina en células normales y tumorales del colon midiendo biomarcadores por tinción histoquímica. - Determinar la respuesta inmune frente a la curcumina, midiendo niveles de citoquinas en suero. - Determinar la respuesta inmune in vitro en cultivos celulares de cáncer de colon tratadas con curcumina sola o en exosomas de plantas. - Medir las características metabólicas de la mucosa del colon normal y tumoral frente a la exposición a la curcumina sola o en exosomas de plantas. 	<p>Edad: ≥ 20 años</p> <p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diagnóstico cáncer de colon candidato a resección quirúrgica del tumor. - Sin antecedentes de diabetes. - Firma del consentimiento informado. - No tener condiciones médicas que limiten la vida. - Índice de Karnofsky > 60%. - Función medula ósea ANC > 1000 / ml -Recuento de plaquetas > 100.000 / ml <p>Criterio de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de cáncer de colon familiar. - Embarazo. - VIH. - Uso de fármacos inmunosupresores. - Enfermedad inflamatoria intestinal. -Segunda neoplasia maligna activa en los últimos 5 años. - Pacientes que hayan recibido quimioterapia o radioterapia previa para el cáncer de colon primario. -Intolerancia a las uvas, pomelo o curcumina. - Historia de diabetes mellitus. 	<p>https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01294072?cond=exoso-mes+in+canccer&draw=2&rank=7</p>
<p>Capacidad de los exosomas vegetales para administrar curcumina al tejido normal y con cáncer de colon.</p> <p>-Ensayo clínico aleatorizado intervencionista</p> <p>7 participantes</p> <p>Propósito: tratamiento</p>	<p>Medidas primarias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caracterizar el perfil molecular de exosomas de tumores de pacientes con cáncer gástrico avanzado. - Correlacionar el nivel plasmático y la cinética de los exosomas derivados del suero de pacientes con cáncer gástrico tratados con quimioterapia de primera línea al inicio del tratamiento y mensualmente durante la terapia hasta la progresión tumoral o la muerte. Duración: 3 años desde el inicio del estudio. -Medidas: tiempo hasta la ocurrencia del evento: supervivencia general, supervivencia libre de progresión y tasa de respuesta general. 	<p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Firmar el consentimiento informado. - Edad > 18 años. - Diagnósticos: adenocarcinoma de estómago, de la unión gástricoesofágica o de esófago. -Enfermedad metastásica o localmente avanzada. - Esperanza de vida de mínimo 12 semanas desde la inclusión en el estudio. -No antecedentes de cáncer en los últimos 5 años, excepto cáncer baso-celular o de cuello uterino in situ. <p>Criterios de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Antecedentes de tumor carcinoide gástrico, sarcoma o carcinomas. - Embarazo o lactancia. - Incapacidad para comprender el consentimiento informado. - Hepatitis B o C activa. - VIH. 	<p>https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01779583?term=exosom&cond=Gas-tric+Canccer&draw=2&rank=1</p>
<p>Exosomas circulantes como posibles biomarcadores pronósticos y predictivos en pacientes con cáncer gástrico avanzado.</p> <p>-Estudio prospectivo observacional de casos y controles.</p> <p>80 participantes</p>	<p>Dos cohortes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pacientes con cáncer gástrico avanzado sin tratamiento previo y candidatos a tratamiento con quimioterapia de primera línea. Grupo de control: Voluntarios adultos sanos sin diagnóstico de cáncer Intervención: Toma de muestras biológicas -Suero -Tejido tumoral 	<p>Este estudio prospectivo traslacional. Fase preclínica y fase clínica.</p> <p>Propósito:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Evaluar la utilidad diagnóstica de caracterizar el perfil molecular de los exosomas en tumores de pacientes con cáncer gástrico. -Evaluar el valor pronóstico y predictivo y la cinética de los niveles de exosomas circulantes en el plasma de una cohorte prospectiva de pacientes con cáncer gástrico avanzado durante la quimioterapia de primera línea. 	

La toma de una biopsia tisular, además de ser invasiva es incómoda para el paciente, puede generar efectos adversos y no permite evaluar la heterogeneidad tumoral ni su dispersión a otros tejidos del cuerpo. Los exosomas contenidos en las biopsias líquidas se consideran un material valioso para identificar biomarcadores de diferentes patologías, particularmente en cáncer (Tabla1), porque se ha demostrado que las células tumorales producen una mayor cantidad de exosomas en comparación con las células sanas y que hay grandes diferencias en la composición y función de los exosomas dependiendo de la estirpe celular de la cual provienen o del estado fisiológico del individuo (3). Por estas razones, en este artículo se revisará la composición de los diferentes fluidos corporales que pueden ser útiles como biopsia líquida para la obtención de exosomas, y sus posibles aplicaciones en la clínica para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer o para la administración de terapias antitumorales.

La búsqueda de literatura se realizó en las siguientes bases de datos: PubMed-NCBI, Elsevier, ExoCarta, Clinical Trials Database y Science direct, y se filtró empleando las palabras clave: cancer, liquid biopsy, exosomes, biomarkers and cancer therapy. Se revisaron 50 artículos relacionados con el tema, publicados durante los últimos 10 años. Adicionalmente, se revisaron otros 9 seleccionados de las referencias contenidas en estos artículos con el fin de aclarar algunos temas. En total se revisaron 59 referencias.

Biopsia líquida:

El término biopsia líquida se refiere al análisis de biomarcadores presentes en sangre u otro fluido biológico como orina, plasma, saliva, suero, líquido amniótico, leche materna, semen, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo (Figura 1) (4-6). Numerosos estudios han determinado su utilidad clínica para el diagnóstico temprano del cáncer, la administración de terapias dirigidas y el monitoreo no invasivo y en tiempo real para obtener información relacionada con la evolución de la neoplasia. La biopsia líquida, combinada con la citología, la inmunquímica y la secuenciación de próxima generación, es un enfoque útil para proporcionar información diagnóstica y terapéutica en ciertos casos raros de cáncer que son difíciles de diagnosticar, como el caso de una metástasis a la falange del índice derecho, que fue la manifestación inicial de un adenocarcinoma de pulmón, en una mujer de 69 años, reportado por Clerly y colaboradores (7).

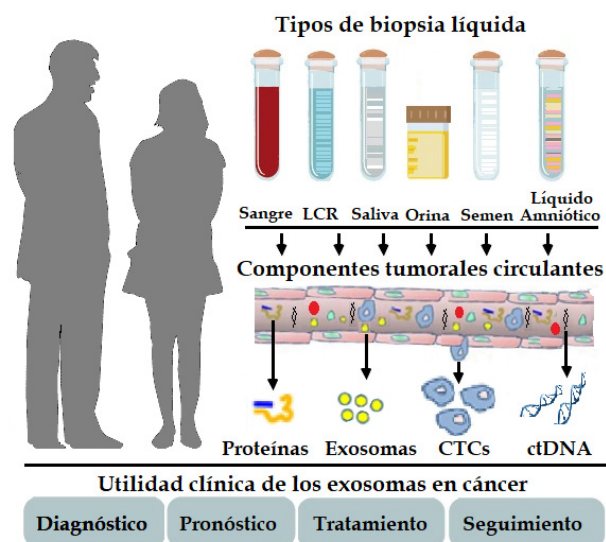


Figura 1. Tipos de biopsia líquida y su utilidad clínica en cáncer como fuente de biomarcadores con potencial para el diagnóstico temprano, pronóstico y seguimiento de la enfermedad.

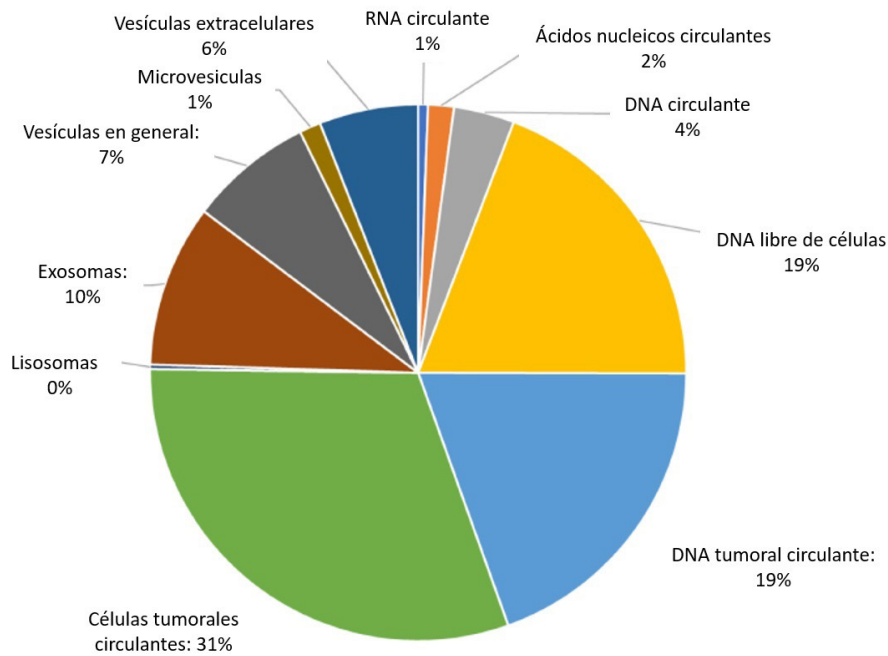
La sangre periférica es, hasta el momento, la biopsia líquida más utilizada para analizar diversos componentes tumorales. Durante el desarrollo tumoral, las células adquieren ocho capacidades biológicas que incluyen: el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la adquisición de inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y metástasis, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmune. Adicionalmente, el reclutamiento de células, aparentemente normales, que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos al crear el “microambiente tumoral”, agregan otro nivel de complejidad a la biología tumoral (8). El reconocimiento de estos conceptos permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para tratar el cáncer humano.

De las capacidades adquiridas por las células tumorales, la activación de la invasión y metástasis constituyen el principal mecanismo utilizado por el tumor para desprenderse del sitio primario e ir a colonizar lugares distantes por vía sanguínea. Diferentes componentes tumorales (células tumorales circulantes (CTCs), micro vesículas, apoptosomas, exosomas, ácidos nucleicos (DNAs tumorales circulantes (ctDNAs), DNA extracelular de 134-144 pb (cfDNA), y microRNAs (miRNAs)) (Figura 2), circulan en la sangre y tienen utilidad como biomarcadores y/o dianas moleculares

(9). La detección de células tumorales circulantes podría aplicarse al diagnóstico temprano del cáncer, puesto que numerosos estudios han demostrado que las metástasis pueden ocurrir en estadios tempranos del desarrollo tumoral, demostrando la utilidad de la sangre como biopsia líquida para el diagnóstico oportuno del cáncer (10).

Joose y Pantel, en 2015, monitorearon en tiempo real los cambios en las células y los productos celulares liberados por los tumores en la sangre, y encontraron

que, aunque las plaquetas educadas por el tumor pueden proporcionar información específica sobre la ubicación y composición molecular del tumor primario —y pueden contener fragmentos de RNA tumoral que favorecen su crecimiento y diseminación, éstas no son muy utilizadas para estudios de detección de RNAs tumorales porque el RNA de plaquetas se puede alterar por factores como la inflamación (11) y adicionalmente, hay más RNA tumoral en los exosomas que en las plaquetas (12).



Fuente: SelectBiosciences (SelectBIO.com)

Figura 2. Proporciones relativas de los componentes tumorales con potencial utilidad clínica para el diagnóstico del cáncer, presentes en biopsias líquidas basadas en sangre, plasma, suero, saliva, orina y otros fluidos corporales.

Aunque la sangre ha sido la biopsia líquida más estudiada para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades, en la actualidad el análisis de otros fluidos ha cobrado gran interés para el diagnóstico de enfermedades complejas como el cáncer. La saliva está siendo objeto de muchos estudios para la identificación de biomarcadores porque comprende las secreciones, suministradas por la sangre, en las glándulas salivales mayores y menores. De ella se pueden aislar DNA, RNA, proteínas y todos los metabolitos presentes en la sangre, además de los presentes en el microbioma. Por otro lado, la recolección de las muestras de saliva y su procesamiento es simple, y una ventaja que tiene la saliva sobre la sangre es que no se coagula (13).

El exosoma salival posee mucha información clínicamente relevante. Una vez que los exosomas derivados del cáncer entran en la circulación, alcanzan las glándulas salivales por endocitosis o por fusión de membrana y son arrojados en la saliva, donde pueden ser recolectados como una muestra con gran potencial para la búsqueda de biomarcadores tumorales (5, 14). Kazuya et al. demostraron que los exosomas salivales tienen menor tamaño y mayor densidad que los aislados a partir de sobrenadante de una línea celular de adenocarcinoma de colon humano, lo que sugiere que los exosomas de saliva pueden proporcionar más información que otros componentes tumorales presentes en la saliva con potencial para su uso en el diagnóstico temprano del cáncer (15). Los exosomas aislados de saliva contienen varios tipos de RNA,

pseudogenes y grandes repertorios de RNA pequeños que pueden mediar la comunicación intercelular al transferirlos a las células diana como reguladores de la expresión génica (16). Se han descrito otros tipos de biomarcadores RNA útiles para el diagnóstico de tipos específicos de cáncer como el oral, esofágico, gástrico (17) pulmonar, pancreático, de mama o de ovario (5).

Otro fluido corporal, de interés para su uso como biopsia líquida es la orina, puesto que, al igual que la saliva, la obtención de una muestra no es invasiva y tiene gran potencial para la detección temprana, seguimiento de recurrencia, metástasis y eficacia terapéutica en cáncer no urológico. Aunque, en comparación con la sangre, el análisis de la orina en como biopsia líquida todavía se encuentra en etapas tempranas, estudios recientes han demostrado su valor como biopsia líquida y se espera un mayor desarrollo de investigaciones con este tipo de muestra como alternativa a la biopsia líquida basada en sangre (18). En un estudio donde se analizó el contenido de miRNAs presentes en exosomas provenientes de orina, en búsqueda de biomarcadores para la detección temprana del cáncer de endometrio, se concluyó que estos exosomas poseen una firma de miRNA que los hace únicos, por lo que pueden ser útiles como fuente potencial de biomarcadores tumorales (19). Por otra parte, Elsharkawi y colaboradores encontraron un incremento significativo en la cantidad de exosomas presentes en suero y orina de pacientes con cáncer de vejiga, en comparación con los controles sanos. Este incremento fue progresivo durante el curso de la enfermedad y se asoció con la invasión tumoral (20).

Otras biopsias líquidas con potencial para la identificación de biomarcadores tumorales son el fluido seminal, debido a que en pacientes con cáncer de próstata la concentración de cfDNA es mayor que la obtenida a partir de otros fluidos, como la sangre o la orina. Adicionalmente, la facilidad con que se puede aislar el DNA a partir de este tipo de muestra, sugiere que puede ser ideal para el diagnóstico temprano del cáncer de próstata (21); el líquido cefalorraquídeo (LCR), está en contacto directo con el sistema nervioso central (SNC), y tiene uso potencial como biopsia líquida porque, contiene material biológico circulante útil para perfilar biomarcadores tales como ácidos nucleicos libres de células (cfDNA y miRNA), proteínas, vesículas extracelulares y células tumorales circulantes de pacientes con tumores cerebrales como el glioblastoma o con tumores que han hecho metástasis al cerebro (22).

Huang y colaboradores detectaron una mutación en el gen de la histona 3 (H3) en el LCR de niños con tumores cerebrales, incluido el glioma difuso. que se asocia con una rápida evolución y propagación de la enfermedad, por lo que se sugiere como biopsia líquida para complementar el diagnóstico de glioma en la biopsia tisular debido a su sensibilidad y especificidad. A futuro, podría proponerse incluso como alternativa a la biopsia de tejido por su valor para la estadificación de la enfermedad, para orientar el tratamiento con terapias dirigidas o para realizar el monitoreo de la respuesta al tratamiento (23), entre otras aplicaciones. Cabe anotar que la toma de la muestra de LCR es un procedimiento que se realiza en pacientes con leucemias y tumores cerebrales, incluido el glioblastoma (24), mediante punción lumbar, un procedimiento invasivo e incómodo para el paciente que puede generar efectos adversos en algunos casos (25).

Lo anterior resalta la potencial utilidad clínica de la biopsia líquida para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, como prueba de tamizaje o como base para desarrollar terapias alternativas utilizando los exosomas como vehículos moleculares para la entrega de fármacos (26).

Biogénesis de los exosomas:

La biogénesis de los exosomas está mediada por la vía endosoma-lisosoma, un sistema de endomembranas presente en las células eucariotas. Se originan a partir de una invaginación de la membrana plasmática dando origen a un endosoma temprano, que madura a endosoma tardío para formar, mediante la invaginación de su membrana, cuerpos multivesiculares (MVBs) cargados de vesículas intraluminales (ILVs), que son secretadas como exosomas al espacio extracelular por su fusión con la membrana plasmática. Otras micro vesículas circulantes con diferente origen son los cuerpos apoptóticos (derivados de células que están muriendo por apoptosis) o los ectosomas (originados por la evaginación de la membrana plasmática) (Figura 3). A pesar de que estos tres tipos de vesículas tienen aproximadamente el mismo tamaño (30-150 nm de diámetro) y contienen una porción de citoplasma en su interior, son diferentes entre sí y desempeñan funciones no relacionadas que deben ser bien entendidas para definir las metodologías adecuadas para el desarrollo de sus posibles aplicaciones clínicas (27).

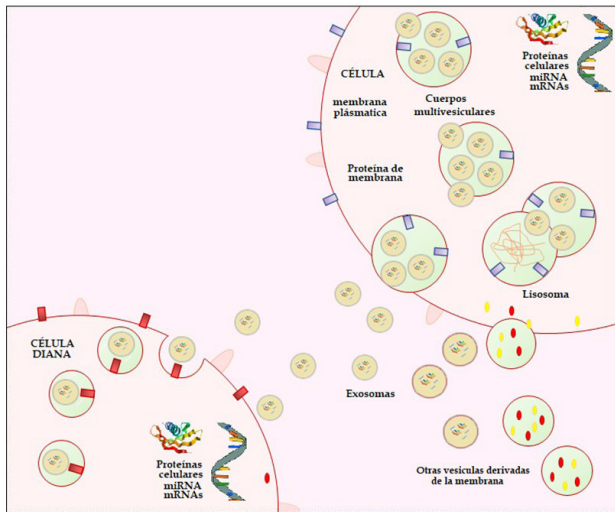


Figura 3. Biogénesis de los exosomas: en las células se forma el MVB al interior del endosoma por invaginación de su membrana y se forman pequeñas vesículas que contienen proteínas, RNAm y miRNA del citoplasma. La fusión de la membrana del MVB con la membrana celular conduce a la liberación de las vesículas como exosomas. El MVB puede también fusionarse con lisosomas, para degradar su contenido. Una vez encontrada la célula diana, los exosomas pueden ingresar en ella de dos maneras: por la vía endocítica o por fusión con su membrana para liberar el contenido directamente en el citoplasma. Además de los exosomas, las células secretan otras vesículas derivadas de su membrana celular, tales como ectosomas, micro vesículas y cuerpos apoptóticos.

En condiciones fisiológicas, los exosomas están presentes en todos los tejidos del cuerpo (28), sus componentes moleculares son los que constituyen una célula: ácidos nucleicos como RNAs (microRNA, RNAm, circRNAs etc.), DNA y una serie de proteínas y otros componentes del citoplasma de la célula de la cual provienen, englobados en una bicapa lipídica (29). Se ha descrito que expresan proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), integrinas, tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), proteínas del antígeno de los leucocitos humanos (HLA-II), moléculas de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), ALIX, CD9, y TSG-101. Varias de estas proteínas son utilizadas como marcadores para su identificación o aislamiento (30). La capacidad de los exosomas para fusionarse con las membranas celulares hace que desempeñen un papel fundamental en la comunicación intercelular y les permite atravesar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere su uso potencial como vehículo para la administración de fármacos en lugares de difícil acceso como el cerebro (31).

Tauro y colaboradores, en 2012, demostraron que los exosomas derivados de células tumorales contienen parte del genoma, transcriptoma y secretoma del tumor, por lo que pueden transportar oncoproteínas, proteínas supresoras de tumores, reguladores de la transcripción, y diferentes especies de RNAs (32) y DNAs, que pueden proporcionar información referente al origen de las células tumorales (33). En general, favorecen el desarrollo y crecimiento tumoral, por su capacidad de fundirse con las membranas celulares para reprogramar las células hacia un fenotipo particular que puede ser angiogénico, de resistencia a la terapia o de evasión de la respuesta inmune antitumoral entre otros (34).

Aislamiento y purificación de exosomas:

Uno de los prerrequisitos para la aplicación clínica de los exosomas es la estandarización de un proceso de aislamiento que sea escalable, reproducible y robusto para obtener un buen rendimiento de exosomas de alta pureza (35). Dado que éstos son secretados por casi todos los tipos celulares, su producción a gran escala para uso terapéutico constituye un desafío. El proceso para obtenerlos implica la expansión de la línea celular donante, para recolectar grandes cantidades de medio de cultivo y realizar el adecuado aislamiento de estas estructuras membranosas mediante la aplicación de diferentes técnicas que dependen de la muestra, su aplicación y los recursos tecnológicos disponibles. Por otra parte, el aislamiento de exosomas adecuados para aplicaciones posteriores implica el uso de técnicas costosas que requieren equipos sofisticados y especializados (36).

A la fecha, las técnicas más utilizadas para la separación de exosomas son la centrifugación diferencial, la ultra centrifugación seguida por precipitación isoeléctrica, y la purificación por inmunoafinidad. La centrifugación diferencial (37), fundamentada en la remoción de diferentes impurezas mediante ciclos de centrifugación a velocidades crecientes. Inicia a baja velocidad (elimina células), y finaliza con una ultra centrifugación (precipita exosomas). Una vez precipitados los exosomas, se realiza una nueva ultra centrifugación, esta vez con PBS (lavado y remoción de proteínas). Esta técnica permite separar, por tamaño y densidad, los exosomas de otras vesículas, pues en general las micro vesículas precipitan a 20.000g y los cuerpos apoptóticos a 16.000g (38), mientras que los exosomas precipitan entre las 100.000g y las 120.000g, lo que permite diseñar protocolos específicos para la población

de vesículas que se desee estudiar. Sin embargo, la diferencia de tamaño y densidad de las micro vesículas es tan pequeña que se dificulta el establecimiento de los ciclos y velocidades de centrifugación óptimos para separar de manera efectiva las micro vesículas de los cuerpos apoptóticos. Por otra parte, a menudo los exosomas así obtenidos no sirven para llevar a cabo estudios funcionales posteriores (39).

La ultra centrifugación, seguida por precipitación isoelectrica (IP), es una técnica rápida y efectiva para obtener exosomas de mejor calidad que los aislados por centrifugación diferencial que ha demostrado ser efectiva para obtener exosomas a partir de leche, porque permite eliminar las caseínas (40). La ultrafiltración es más rápida que la centrifugación diferencial y no requiere de equipo especial (41); sin embargo, su mayor desventaja es que tanto los fluidos corporales como los medios de cultivo celulares poseen una gran variedad de nanopartículas con el mismo tamaño de los exosomas, lo que dificulta su adecuada separación. Adicionalmente, implica el uso de reactivos costosos libres de partículas (42).

La purificación por inmunofinidad podría ser la técnica de elección para el aislamiento de exosomas a partir de muestras heterogéneas como plasma, suero y orina, porque utiliza anticuerpos inmovilizados que reconocen proteínas como CD63, CD81, CD82, CD9, Alix, anexina, EpCAM y Rab5 que pueden ser utilizados de manera individual o en combinación, para separar los exosomas. Estos anticuerpos pueden unirse de manera covalente a soportes tales como las perlas magnéticas y matrices de cromatografía. Sin embargo, esta metodología debe ser validada con el fin de determinar el anticuerpo óptimo para separar específicamente el tipo de exosomas que se quiere aislar. Se ha demostrado que, aunque el uso de anti-CD63 es útil para aislar exosomas, esta proteína no es específica de las vesículas extracelulares tumorales y algunos cánceres secretan vesículas con baja expresión de CD63. Otros marcadores de exosomas son Rab GTPasa, anexinas, SNARE, Alix y flotillin7 TSG101, tetraspaninas, CD63 y CD81(43).

Recientemente se ha desarrollado una plataforma basada en micro fluidos para aislar exosomas circulantes directamente del suero sanguíneo, que permite la captura y cuantificación simultánea de exosomas en un solo dispositivo novedoso, simple y de bajo costo, con el que se obtiene una mejor tasa de recuperación en un menor tiempo de procesamiento que el necesario para la ultra centrifugación.

El dispositivo de micro fluidos es fabricado en polidimetilsiloxano (PDMS) y funciona mediante el uso de anticuerpos contra CD63, que se encuentra comúnmente sobre expresado en exosomas; sin embargo, como se mencionó anteriormente, muchos tumores producen exosomas con baja expresión de DC63, por lo que esta técnica no es muy adecuada para aislar exosomas provenientes de tumor a menos que se utilice un anticuerpo diferente. La fosfatidilserina (PS) se expresa en la superficie externa de las vesículas extracelulares derivadas de células tumorales, por lo que el uso de anticuerpos contra PS, para el aislamiento de exosomas derivados de tumor a partir de plasma. Con el uso de este dispositivo, se logró una eficiencia de captura del 90% para exosomas de células tumorales en comparación con el 38% para los exosomas de células normales. Adicionalmente, se aisló un 35% más de exosomas derivados de la línea celular de cáncer de pulmón A549 que con el dispositivo conjugado con anti-CD63, lo que facilita el aislamiento de un tipo específico de exosomas (44).

Otra técnica muy eficaz para purificar y aislar exosomas intactos es la separación magnética, que funciona mejor que las metodologías convencionales utilizadas para la separación de exosomas porque, con este método, las vesículas extracelulares son capturadas por iones y proteínas de unión a fosfatidilserina y posteriormente se extraen con un reactivo quelante que permite obtener exosomas que pueden utilizarse en futuras aplicaciones (45).

Carga del medicamento (Endógeno y Exógeno)

Los exosomas tumorales tienen la capacidad de reclutar y activar células inmunes que generan un microambiente inmunosupresor y juegan papel importante en la patogénesis y progresión del cáncer así como en el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos antitumorales (46). Los macrófagos asociados al tumor favorecen el desarrollo de este microambiente inmunosupresor que puede contener diversos fenotipos tumorigénicos dentro de la misma masa tumoral: unas zonas con alta proliferación celular, y otras en las que se favorece la angiogénesis e invasión, dependiendo del perfil de secreción de proteasas, citoquinas y factores de crecimiento de las células inmunes reclutadas por el tumor (47).

Debido al papel que juegan los exosomas en la progresión del cáncer (48) y teniendo en cuenta su participación en la comunicación intercelular

mediante la entrega de moléculas producidas por el tumor durante su desarrollo, se han adelantado estudios para determinar su capacidad para proporcionar información relacionada con el estado y evolución del tumor, apoyando el diagnóstico temprano, permitiendo realizar un seguimiento de la respuesta a los tratamientos e incluso a futuro, facilitando el transporte de fármacos a sitios específicos. Existe suficiente evidencia sobre la capacidad de los exosomas para actuar como vehículos en la administración de terapias dirigidas que incluyen el transporte de proteínas, ácidos nucleicos o medicamentos contra el cáncer (49). La Tabla 1 presenta algunos estudios clínicos que están en curso con el uso de exosomas como alternativa terapéutica en distintos tipos de cáncer.

La potencial aplicación terapéutica (terapéutica + diagnóstica) de los exosomas para el manejo

clínico de las enfermedades se debe a su asombrosa capacidad para transportar y entregar la carga celular del donante (biomoléculas) a las células diana (Figura 4), uniéndose a ellas mediante proteínas de adhesión celular y ligandos como las tetraspaninas o la integrina CD11b/CD18, (50,51). Por otra parte, los exosomas tienen un tropismo celular específico, dependiendo de sus características y origen, y expresan en su membrana proteínas específicas del tipo celular del que derivan, lo que les confiere selectividad dirigida (53) hacia tejidos y órganos enfermos para ejercer su acción terapéutica (52). Mientras que su membrana lipídica protege al fármaco de su degradación en el medio extracelular (54), o de su destrucción por parte de los fagocitos mononucleares de sangre periférica al actuar como un manto invisible para el transporte de nanopartículas sintéticas fácilmente degradables en circulación y que pueden ser tóxicas para el organismo (55).

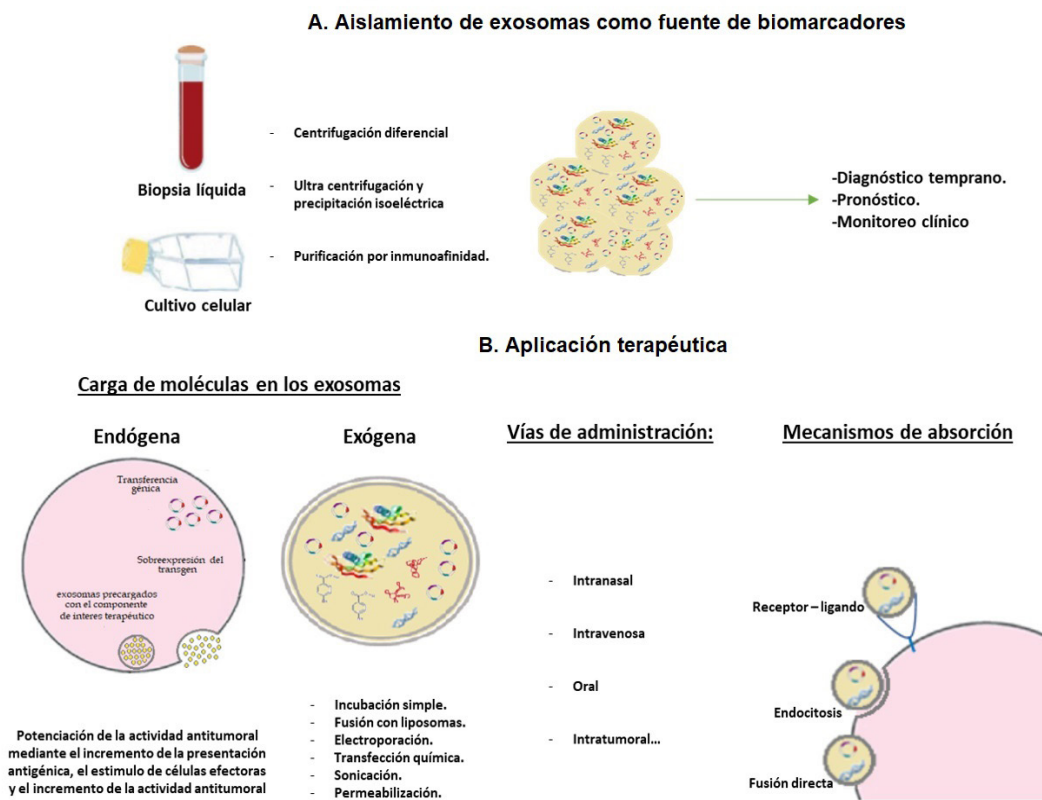


Figura 4. Aplicación clínica de los exosomas: A. Exosomas provenientes de biopsia líquida se pueden aislar mediante diversas técnicas para su uso como fuente de biomarcadores con utilidad clínica. B. Pueden cargarse con moléculas de interés terapéutico por vía endógena, mediante la transferencia génica in vitro, para obtener exosomas precargados con la molécula de interés, o por vía exógena empleando técnicas como la electroporación, la sonicación y la fusión con liposomas, entre otras. Para su aplicación terapéutica, los exosomas así obtenidos se pueden suministrar utilizando diferentes vías de administración y son internalizados en la célula diana por endocitosis, por interacción receptor ligando o por fusión directa.

A la fecha, se han descrito dos metodologías útiles para cargar moléculas en exosomas: i) Incorporación endógena, induciendo la sobreexpresión del ácido nucleico o proteína de interés en las células donantes con el fin de generar exosomas precargados enriquecidos con el componente de interés terapéutico y ii), incorporación exógena del fármaco, mediante la carga directa de los exosomas con ácidos nucleicos y pequeñas moléculas utilizando métodos como la transfección química, la electroporación y la sonicación e incubación, dependiendo del componente terapéutico que se espera cargar en los exosomas. Sin embargo, un aspecto muy importante que debe tenerse en cuenta es que, en general, todas las células de mamíferos liberan pequeñas cantidades de exosomas y que su purificación es difícil, por lo cual se requiere el desarrollo de nuevas metodologías para la producción en gran escala de estas micro vesículas. Zhu et al., proponen una estrategia mediante la extrusión de células NK a través de filtros con tamaños de poros progresivamente más pequeños, para obtener miméticos de exosomas (NK-EM) cuya morfología similar a exosomas se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión, seguimiento de nanopartículas y Western blot. Por otra parte, su efecto antitumoral se evaluó mediante ensayos de citotoxicidad in vitro contra líneas celulares tumorales como glioblastoma, mama, tiroides e hígado, utilizando imágenes de bioluminiscencia y el Kit para conteo celular, Cell Counting Kit - 8 (CCK-8) (31).

Aplicaciones de los exosomas

Las aplicaciones de los exosomas no se limitan a su uso como fuente de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la enfermedad, sino que pueden ser eficientes para la terapia del cáncer debido a las características antes mencionadas y al hecho de que pueden ser cargados de manera endógena o exógena, lo que les confiere una gran versatilidad para su uso terapéutico. El uso de exosomas derivados de células inmunes se ha propuesto para potenciar la respuesta antitumoral debido a que, dependiendo de su fuente celular, pueden inducir apoptosis e inhibir el crecimiento de células tumorales (31,56), inducir la secreción de altos niveles de citocinas como IL-2 e IFN- γ , aumentar la producción de IgG2a y la activación de células T (57), para inhibir el crecimiento tumoral (58). A diferencia de las vacunas tradicionales, los exosomas son fácilmente accesibles, no-tóxicos y dependiendo de las metodologías empleadas para su aplicación podrían ser económicos, lo que incrementa su potencial como alternativa terapéutica (59) (Figura 4).

Por otra parte, es necesario desarrollar nuevas metodologías que permitan su aislamiento de manera rápida y eficaz para su uso en aplicaciones clínicas oportunas como soporte para el manejo de la enfermedad. El análisis clínico de exosomas, y otras fuentes de biomarcadores no invasivos presentes en biopsia líquida, podría ser una estrategia eficaz para identificar marcadores de desarrollo y progresión tumoral para encontrar alternativas que permitan la entrega de medicamentos de manera órgano específica o para el análisis de resistencia a antibióticos, entre otras aplicaciones clínicas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales.

Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales. Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Fuente de financiación

Instituto Nacional de Cancerología, Proyecto “Utilidad clínica de la molécula HLA-G soluble en el diagnóstico y pronóstico del Cáncer Gástrico” con código xRPM N° C19010300-408

Conflicto de intereses

Ninguno que declarar.

Referencias

1. Quek C, Hill AF. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Feb;483(4):1178-86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16315571>
2. Cui S, Cheng Z, Qin W, Jiang L. Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2018 Feb;116:46-54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169500217306190>
3. Ilić M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2016 Aug;5(4):420-3. Available from: <http://tlcr.amegroupp.com/article/view/8950/8064>
4. Fontanilles M, Duran-Peña A, Idbaih A. Liquid Biopsy in Primary Brain Tumors: Looking for Stardust! *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2018 Mar 9;18(3):13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11910-018-0820-z>
5. Cheng J, Nonaka T, Wong D. Salivary Exosomes as Nanocarriers for Cancer Biomarker Delivery. *Materials (Basel)* [Internet]. 2019 Feb 21;12(4):654. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/12/4/654>

6. Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Battelli N. Urinary Markers in Bladder Cancer: An Update. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Sep 7;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00362/full>
7. Clery E, Pisapia P, Migliatico I, Pepe F, De Luca C, Russo M, et al. Cytology meets next generation sequencing and liquid biopsy: A case of lung adenocarcinoma presenting as metastasis to the phalanx. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2020 Aug 22;48(8):759-64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dc.24438>
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar;144(5):646-74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>
9. Lu Y-T, Delijani K, Mecum A, Goldkorn A. Current status of liquid biopsies for the detection and management of prostate cancer. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2019 Jun;Volume 11:5271-91. Available from: <https://www.dovepress.com/current-status-of-liquid-biopsies-for-the-detection-and-management-of-peer-reviewed-article-CMAR>
10. Hu Y, Yu X, Xu G, Liu S. Metastasis: an early event in cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 May 29;143(5):745-57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00432-016-2279-0>
11. Joosse SA, Pantel K. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. *Cancer Cell* [Internet]. 2015 Nov;28(5):552-4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610815003840>
12. Brinkman K, Meyer L, Bickel A, Enderle D, Berking C, Skog J, et al. Extracellular vesicles from plasma have higher tumour RNA fraction than platelets. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2020 Jan 1;9(1):1741176. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2020.1741176>
13. Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *J Dent Res* [Internet]. 2018 Jun 7;97(6):701-8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034518762071>
14. Lousada-Fernandez F, Rapado-Gonzalez O, Lopez-Cedrun J-L, Lopez-Lopez R, Muinelo-Romay L, Suarez-Cunqueiro M. Liquid Biopsy in Oral Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Jun 8;19(6):1704. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1704>
15. Iwai K, Minamisawa T, Suga K, Yajima Y, Shiba K. Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2016 Jan 17;5(1):30829. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.30829>
16. Ogawa Y, Tsujimoto M, Yanoshita R. Next-Generation Sequencing of Protein-Coding and Long Non-protein-Coding RNAs in Two Types of Exosomes Derived from Human Whole Saliva. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2016;39(9):1496-507. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/9/39_b16-00297/article
17. Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM, et al. Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags Quantification for Gastric Cancer Detection. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb 25;6(1):22165. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep22165>
18. Jain S, Lin SY, Song W, Su Y-H. Urine-Based Liquid Biopsy for Nonurological Cancers. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2019 Apr;23(4):277-83. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2018.0189>
19. Srivastava A, Moxley K, Ruskin R, Dhanasekaran DN, Zhao YD, Ramesh R. A Non-invasive Liquid Biopsy Screening of Urine-Derived Exosomes for miRNAs as Biomarkers in Endometrial Cancer Patients. *AAPS J* [Internet]. 2018 Sep 9;20(5):82. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-018-0220-y>
20. Elsharkawi F, Elsabah M, Shabayek M, Khaled H. Urine and Serum Exosomes as Novel Biomarkers in Detection of Bladder Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 2019 Jul 1;20(7):2219-24. Available from: http://journal.waocp.org/article_88667.html
21. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Micali S, Torricelli F, Milandri R, et al. Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2019 Oct;497:76-80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898119319485>
22. Bertero L, Siravegna G, Rudà R, Soffietti R, Bardelli A, Cassoni P. Review: Peering through a keyhole: liquid biopsy in primary and metastatic central nervous system tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2019 Dec 14;45(7):655-70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nan.12553>
23. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, Qi J, Horbinski CM, Tomita T, et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2017 Dec 17;5(1):28. Available from: <https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-017-0436-6>
24. Saenz-Antoñanzas, Auzmendi-Iriarte, Carrasco-Garcia, Moreno-Cugnon, Ruiz, Villanua, et al. Liquid Biopsy in Glioblastoma: Opportunities, Applications and Challenges. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Jul 5;11(7):950. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/950>
25. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2017 Oct 3;17(10):943-7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2017.1374854>
26. Srivastava A, Amreddy N, Razaq M, Towner R, Zhao YD, Ahmed RA, et al. Exosomes as Theranostics for Lung Cancer. In: *Advances in Cancer Research* [Internet]. 2018. p. 1-33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X18300265>
27. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aau6977>
28. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Apr 1;126(4):1208-15. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/81135>

29. Fu M, Gu J, Jiang P, Qian H, Xu W, Zhang X. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 Dec 15;18(1):41. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-1001-7>
30. Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L, et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2016 Oct;5(5):483-91. Available from: <http://tlcr.amegroupp.com/article/view/10203/8671>
31. Zhu L, Gangadaran P, Kalimuthu S, Oh JM, Baek SH, Jeong SY, et al. Novel alternatives to extracellular vesicle-based immunotherapy - exosome mimetics derived from natural killer cells. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2018 Nov 12;46(sup3):S166-79. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2018.1489824>
32. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013 Mar;12(3):587-98. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M112.021303>
33. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med* [Internet]. 2013 Apr 22;91(4):431-7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00109-013-1020-6>
34. Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. In: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. 2016. p. 103-41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242315300056>
35. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):30087. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.30087>
36. Urbanelli L, Buratta S, Sagini K, Ferrara G, Lanni M, Emiliani C. Exosome-based strategies for Diagnosis and Therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov* [Internet]. 2015 Jul 27;10(1):10-27. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-8898&volume=10&issue=1&spage=10>
37. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Erratum: Corrigendum: Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Mar 29;6(1):21447. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep21447>
38. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* [Internet]. 2017;7(3):789-804. Available from: <http://www.thno.org/v07p0789.htm>
39. Yu L-L, Zhu J, Liu J-X, Jiang F, Ni W-K, Qu L-S, et al. A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 Jul 26;2018:1-9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3634563/>
40. Yamauchi M, Shimizu K, Rahman M, Ishikawa H, Takase H, Ugawa S, et al. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2019 Mar 4;45(3):359-64. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2018.1539743>
41. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PST, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2007 May;292(5):F1657-61. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00434.2006>
42. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov A V. Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2015 Apr 1;2015(4):pdb.top074476. Available from: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.top074476>
43. Sumrin A, Moazzam S, Khan AA, Ramzan I, Batool Z, Kaleem S, et al. Exosomes as Biomarker of Cancer. *Brazilian Arch Biol Technol* [Internet]. 2018 Oct 8;61. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132018000100309&lng=en&tlng=en
44. Kang Y, Purcell E, Palacios-Rolston C, Lo T, Ramnath N, Jolly S, et al. Isolation and Profiling of Circulating Tumor-Associated Exosomes Using Extracellular Vesicular Lipid-Protein Binding Affinity Based Microfluidic Device. *Small* [Internet]. 2019 Nov 7;15(47):1903600. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml.201903600>
45. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagrath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip* [Internet]. 2014;14(11):1891-900. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4LC00136B>
46. Biswas S, Mandal G, Roy Chowdhury S, Purohit S, Payne KK, Anadon C, et al. Exosomes Produced by Mesenchymal Stem Cells Drive Differentiation of Myeloid Cells into Immunosuppressive M2-Polarized Macrophages in Breast Cancer. *J Immunol* [Internet]. 2019 Dec 15;203(12):3447-60. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1900692>
47. Rashed M, Bayraktar E, K. Helal G, Abd-Ellah M, Amero P, Chavez-Reyes A, et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Mar 2;18(3):538. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/538>
48. Tai Y-L, Chen K-C, Hsieh J-T, Shen T-L. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci* [Internet]. 2018 Aug;109(8):2364-74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.13697>
49. Mughees M, Kumar K, Wajid S. Exosome vesicle as a nano-therapeutic carrier for breast cancer. *J Drug Target* [Internet]. 2020 Aug 26;1-10. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1061186X.2020.1808001>
50. Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* [Internet]. 1988 May 15;263(14):6884-92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129432>
51. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Aug 5;9(8):581-93. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2567>

52. Wiklander OPB, Nordin JZ, O'Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):26316. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.26316>
53. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011 Apr 20;29(4):341-5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.1807>
54. Ha D, Yang N, Nadihe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2016 Jul;6(4):287-96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383515301003>
55. Batrakova E V, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2015 Dec;219:396-405. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915300420>
56. Lu Z, Zuo B, Jing R, Gao X, Rao Q, Liu Z, et al. Dendritic cell-derived exosomes elicit tumor regression in autochthonous hepatocellular carcinoma mouse models. *J Hepatol* [Internet]. 2017 Oct;67(4):739-48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882781732055X>
57. Cho J, Lee Y-S, Kim S-H, Ko J-K, Kim C-W. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett* [Internet]. 2009 Mar;275(2):256-65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508008355>
58. Cheng L, Wang Y, Huang L. Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. *Mol Ther* [Internet]. 2017 Jul;25(7):1665-75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001617300618>
59. Sarvizadeh M, Ghasemi F, Tavakoli F, Sadat Khatami S, Razi E, Sharifi H, et al. Vaccines for colorectal cancer: an update. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Jun 9;120(6):8815-28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.28179>