



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Ciencias

Vesículas extracelulares como vehículos para
terapias contra el cáncer

T E S I S

Que para obtener el título de:
Biólogo

Presenta:
Fernando Ileanov Martínez Chávez

Directora de tesis:
Dra. Blanca Ortiz Quintero





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

La presente tesis fue realizada bajo la dirección de la Doctora Blanca Ortiz Quintero, jefe del departamento de biomedicina molecular e investigación traslacional del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, a quien agradezco la orientación, paciencia y sabiduría transmitida durante la realización de este escrito, también agradezco a la Secretaria de Asuntos Estudiantiles por otorgarme la beca de titulación de egresados de alto rendimiento periodo 2022-2023, y finalmente también agradezco a mi familia por siempre apoyar mis decisiones y brindarme consejo siempre que ha sido necesario.

Índice.

Agradecimientos	1
Índice	2
Resumen	4
Introducción	4
Justificación	5
Objetivo General	5
Metodología	5
Resultados	6
1. Vesículas extracelulares (EVs)	6
1.1. Definición y clasificación	6
1.1.1. Exosoma	7
1.1.2. Las Microvesículas (MVs)	8
1.1.3. Cuerpos apoptóticos	8
1.2. Biogénesis	8
1.2.1. Biogénesis de exosomas	8
1.2.1.1. Vía dependiente de ESCRT	9
1.2.1.2. Vía independiente de ESCRT	9
1.2.2. Biogénesis de Microvesículas (MVs)	10
1.2.3. Biogénesis de los cuerpos apoptóticos	11
1.3. Tipo de biomoléculas que transportan las EVs	12
2. Función de las vesículas extracelulares en comunicación intercelular en cáncer	17
2.1. Etapas de desarrollo de cáncer; Iniciación, promoción y progresión	19
2.1.1. Iniciación	19

2.1.2 Promoción	20
2.1.3 Progresión	22
2.2. Tropismo y biodistribución de las EVs liberadas por células cancerosas	23
2.3. Metástasis	25
3. EVs como vehículos para terapias contra el cáncer	28
4. Técnicas de purificación y de validación de EVs para uso en terapia	30
4.1. Purificación de EVs	30
4.2. Validación o caracterización de EVs	33
5. Avances en la ingeniería o modificación artificial de EVs para su uso en terapia	34
6. Conclusiones y perspectivas	37
7. Bibliografía	37
Indice figuras	3
Figura 1. Representación básica de una vesícula extracelular cargada con material biológicamente activo	7
Figura 2. Proceso de biogénesis de exosomas con la maquinaria dependiente e independiente de ESCRT	10
Figura 3. Esquematzación de formas de purificación de microvesículas	32
Figura 4. Representación esquemática de algunos métodos de carga o modificación artificial de las EVs	36
Indice de tablas	3
Tabla 1. Elementos transportados por exosomas bajo condiciones de normalidad y su comparación en presencia y desarrollo de algún tipo de cáncer	13
Tabla 2. Elementos transportados por MVs involucrados en la biogénesis y su comparación con los elementos transportados durante la progresión del cáncer	15
Tabla 3. Exosomas derivados de líneas celulares que inducen un proceso metastásico y su órgano diana	24

Tabla 4. Elementos transportados por exosomas durante el proceso de de metástasis	27
Tabla 5. EVs cargadas con medicamentos terapéuticos contra algún tipo de cáncer	29
Tabla 6. Pruebas realizadas a EVs para su validación en usos terapéuticos	33

RESUMEN

Las vesículas extracelulares (EVs) son partículas con membrana plasmática que son liberadas por las células en el espacio extracelular, contienen moléculas biológicamente activas tales como proteínas y ácidos nucleicos entre otros. Las EVs transportan y transfieren su contenido a otras células como un mecanismo de comunicación célula-célula, donde la carga liberada ejerce efectos sobre diversos procesos biológicos en las células receptoras. Por su naturaleza, las EVs son estructuras transportadoras estables, presentan baja inmunogenicidad, y una capacidad inherente para reconocer, unirse y liberar su carga dentro de otras células. Por lo anterior, las EVs están siendo ampliamente estudiadas como vehículos transportadores de fármacos o moléculas con actividad terapéutica en diversas enfermedades. En particular, las EVs secretadas por células cancerosas presentan alteraciones en el contenido de sus biomoléculas las cuales han sido asociadas con procesos de carcinogénesis y metástasis. Más aún, las EVs secretadas por células cancerosas parecen dirigirse específicamente a órganos blanco (organotropismo), lo cual ha sido relacionado con la formación de nichos pre-malignos. Por lo anterior, el uso de las EVs como vehículos para terapia dirigida contra el cáncer ha ganado gran relevancia. El presente trabajo consistió en realizar una revisión bibliográfica en donde se describen las propiedades biológicas de las EV's, así como sus características, su biogénesis y su asociación con procesos carcinogénicos, además de los avances en el campo de investigación para el uso de EVs como vehículos transportadores de fármacos y biomoléculas contra el cáncer.

INTRODUCCIÓN

Las vesículas extracelulares (EVs) se definen como un grupo heterogéneo de partículas carentes de capacidad replicativa, están limitadas por una membrana y son liberadas por las células hacia el espacio extracelular (1). Las EVs contienen moléculas biológicamente activas que son transportadas y liberadas dentro de otras células blanco, ejerciendo un efecto sobre diversos procesos biológicos en las células receptoras.

En un inicio las EVs fueron descritas como material fraccionado procedente de plaquetas resultado de una centrifugación de alta velocidad por parte de los estudios sobre “la naturaleza e importancia de los productos plaquetarios en plasma humano” realizados por Peter Wolf en la década de los 60 (2,3), pero fue en 1971 cuando Neville Crawford logró documentar de manera fotográfica estas partículas a las que después llamaría “micropartículas”, demostró su composición bioquímica e infirió un origen superficial membranal o de tipo intracelular dentro de las plaquetas sanguíneas (2,4).

En la década de los 90, se descubrió que las células liberan vesículas al medio exterior como vehículos que transportan moléculas biológicamente activas para llevar a cabo un proceso complejo de comunicación célula-célula. Posteriormente se descubrió que este proceso de comunicación intercelular regula procesos biológicos diversos en un estado fisiológico de normalidad y también en procesos biológicos involucrados en enfermedad, como el cáncer. Se ha observado que las EVs pueden servir de

biomarcadores del diagnóstico de varias enfermedades, además de vehículos potenciales para transportar fármacos (5).

Las EVs contienen moléculas biológicamente activas como proteínas (citoplasmáticas y de membrana), lípidos, ácidos nucleicos de naturaleza compleja como el RNA mensajero (RNAm), el RNA de silenciamiento (siRNA), los micro-RNA (miRNA), partículas virales, moléculas de señalización y moléculas de ADN. Debido a la naturaleza membranal de su superficie, las EVs presentan baja o nula citotoxicidad si se introducen a la circulación sanguínea de organismos vivos. Las EVs presentan baja inmunogenicidad dependiendo del origen celular de la vesícula. Se ha descrito que las EVs son producidas y secretadas al espacio extracelular por muchos tipos de células, entre las que se encuentran, las células sanguíneas, dendríticas, endoteliales y epiteliales, células del sistema nervioso, células madre, células embrionarias y células tumorales (5, 6).

En el cáncer, la evidencia indica que las células tumorales liberan EVs a su entorno, las cuales transportan material biológicamente activo como RNA's no-codificantes entre otros, que afectan a otras células blanco, ya sean normales o tumorales, promoviendo el inicio y progresión del tumor mediante la regulación de procesos tales como la proliferación y la migración celular, la metástasis, la transición epitelial-mesenquimatoso (EMT), la angiogénesis y la evasión de la respuesta inmune (6,7,8,9). Una característica relevante de las EVs secretadas por células tumorales es que presentan un tropismo hacia el órgano que dio origen al tumor, y en el caso de células tumorales con características metastásicas, éstas presentan un tropismo específico hacia órganos blanco en donde estas células pueden hacer metástasis (10,11,12). Por lo anterior, el uso de los EVs como vehículos para terapia dirigida contra el cáncer ha ganado gran relevancia. En el presente trabajo se describen las características biológicas de las EVs, su biogénesis, las funciones que hasta la fecha se han identificado y su asociación con procesos carcinogénicos, así como el conocimiento de los avances en el campo de investigación del uso de EVs como vehículos transportadores de fármacos y biomoléculas contra el cáncer.

JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de las características biológicas, la función y la biodistribución de las EVs, así como el conocimiento de los avances en el campo de investigación del uso de EVs como vehículos transportadores de fármacos y biomoléculas, contribuirá al desarrollo de las herramientas para que las EVs sean utilizadas como vehículos para terapias contra el cáncer de forma segura y eficiente en la práctica clínica.

OBJETIVO GENERAL

Presentar una revisión sistemática del estado del arte de las vesículas extracelulares (EV's) como vehículos para terapias contra el cáncer mediante la lectura y análisis crítico de la información

contenida en artículos científicos recientemente publicados en revistas con revisión de pares, cuyo idioma principal fue el inglés y, con factor de impacto mayor a 3.

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión sistemática del estado del arte del tema seleccionado, mediante la lectura y análisis crítico de la información contenida en artículos científicos recientemente publicados en revistas con revisión de pares, en el idioma inglés, con factor de impacto mayor de 3. Se utilizó la base de datos PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) de la National Library of Medicine (NLM) como fuente para la investigación, usando palabras clave como “extracellular vesicles in cancer”, “extracellular vesicles in cell-to-cell communication”, “Tumor-derived extracellular vesicles”, “extracellular vesicles as therapeutic tools”, “extracellular vesicles for cancer therapy”, “Extracellular vesicles for drug delivery”, “Engineering EV cargo for cancer therapy”, etc. Los artículos seleccionados fueron recientes (2018-2022) y los artículos que proporcionaron información esencial originalmente publicada previamente a ese periodo, también fueron incluidos.

RESULTADOS

1. VESICULAS EXTRACELULARES (EVs)

Las EVs incluyen diferentes subtipos de partículas heterogéneas, con diferentes tamaños, origen subcelular, biogénesis, mecanismos de ensamblaje y de liberación, marcadores y contenido, por lo que establecer una clasificación consensuada de las mismas ha sido complicado (8,13). Básicamente, las EV's se conforman de una membrana lipídica que contiene proteínas transmembranales y moléculas de adhesión, así como proteínas, transductores de señales, ácidos nucleicos y moléculas con actividad biológica (ver figura 1)

En el 2012 se formó la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, por sus siglas en inglés), en un esfuerzo por homogeneizar los conceptos y conocimiento referente a las EVs. El propósito de la ISEV es la recopilación, profundización y aprovechamiento del conocimiento generado para formular soluciones en cuanto al potencial de estas partículas (8,13).

En 2018 la ISEV respaldó el uso de “vesícula extracelular” (EV) como el término genérico para las partículas liberadas naturalmente por las células que están delimitadas por una bicapa lipídica y carecen de capacidad replicativa (13).

Aunque aún no hay un consenso internacional, se ha propuesto que la clasificación de las EVs sea acorde con el tamaño, origen subcelular, métodos de purificación, densidad, marcadores de superficie y mecanismos de liberación (8, 14, 15).

1.1. Definición y clasificación

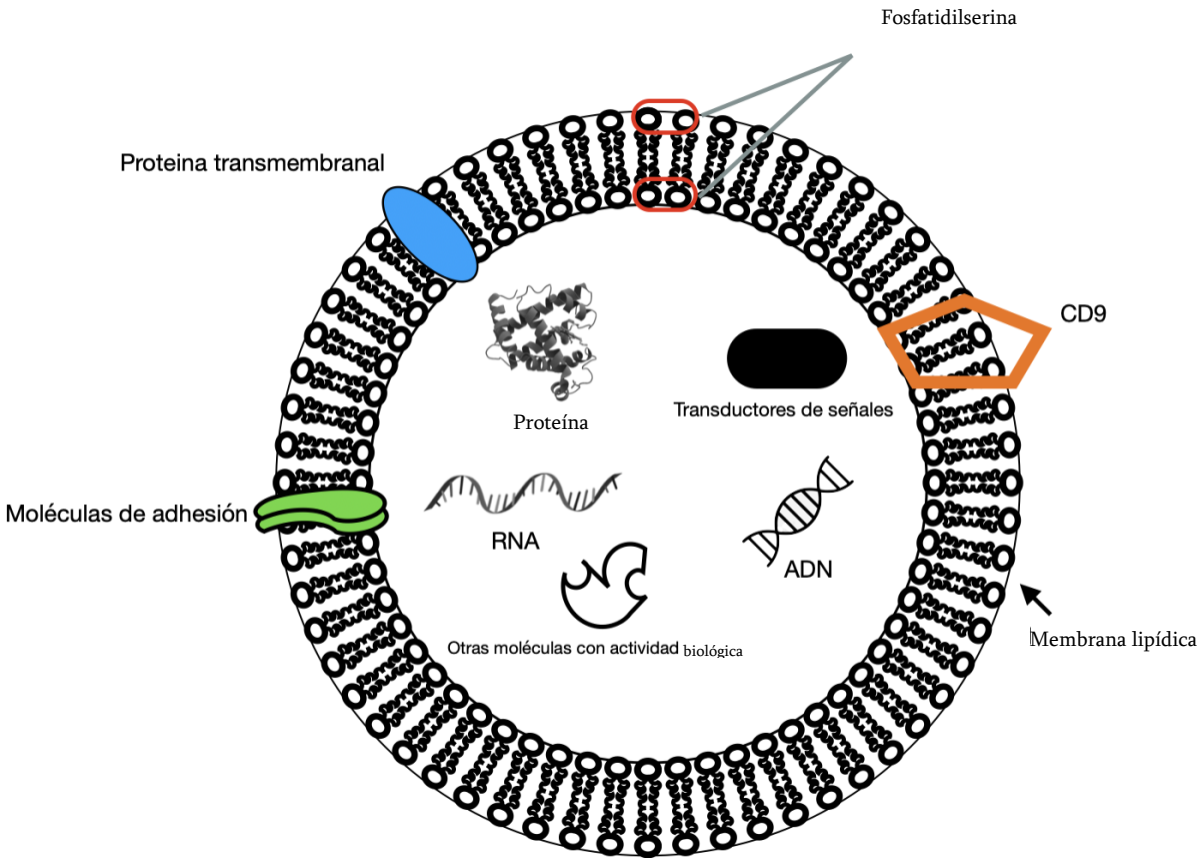


Figura 1. Representación básica de una vesícula extracelular cargada con material biológicamente activo.

1.1.1 Exosomas:

Son liberados de manera constitutiva por células epiteliales, neuronas, células glía, células del sistema inmune y por células tumorales principalmente. Su formación se origina a partir de la gemación interna de un cuerpo multivesicular (MVB) limitado por la membrana celular. Los exosomas miden de 30-150 nm y su biogénesis presenta dos vías, una dependiente de los complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte (ESCRT) y otra vía independiente de estos complejos proteínicos (6, 19).

Los exosomas son liberados por las células al espacio extracelular, donde reconocen y son internalizados de forma selectiva por células blanco cercanas o distantes. Estos exosomas transportan moléculas biológicamente activas como proteínas, lípidos y material genético, que son liberados dentro de la célula

blanco y modifican varios procesos celulares de la célula blanco. En la actualidad, se conoce que una de las moléculas biológicamente activas transportadas, los RNA's no codificantes, regulan varios procesos biológicos como angiogénesis, hematopoyesis y oncogénesis. Este efecto biológico ejercido sobre la célula blanco-específica ha despertado un gran interés en las EVs debido a que podrían utilizarse como transportadoras de moléculas biológicamente activas dirigidas a modificar procesos patológicos celulares como los que ocurren en el cáncer (20,21).

Los exosomas que son liberados por las células al espacio extracelular pueden identificarse en prácticamente todos los fluidos corporales tales como sangre periférica, saliva, orina, etc., y el contenido de estos exosomas, tales como los RNAs no codificantes y proteínas, han demostrado presentar un patrón específico para varios tipos de cáncer, por lo que presentan un potencial como biomarcadores.

1.1.2 Las Microvesículas (MVs):

Las MVs son un grupo heterogéneo de partículas derivadas de la membrana celular, miden de 150-1000 nm y son liberadas por diversas células tales como plaquetas, monocitos, linfocitos, eritrocitos, neutrófilos, células endoteliales, entre otras (22). Las MVs se generan por la formación de protuberancias membranales con capacidad de desprendimiento de la célula que son liberadas de manera natural ya que están involucradas en el proceso de comunicación celular (23, 24).

Las MVs se producen específicamente por la célula, esto significa que su contenido no es universal y depende del tipo y estado de la célula de origen. Las microvesículas se producen con mayor frecuencia durante los procesos de regeneración y defensa inmune, tales como: coagulación, estrés oxidativo, inflamación, angiogénesis, respuesta inmune, migración y diferenciación celular. Las MVs también se producen durante el desarrollo y progresión de enfermedades tales como tumores, enfermedad cardiovascular, padecimientos neurodegenerativos, e infecciones virales. Por lo anterior, las MVs pueden ser indicativos de la presencia de la patología (22, 23, 24, 25, 26).

1.1.3. Cuerpos apoptóticos:

Los cuerpos apoptóticos son vesículas extracelulares que se generan después de la apoptosis, cuyo propósito varía de acuerdo con la etapa de vida del organismo. La apoptosis promueve la eliminación de células innecesarias durante el desarrollo embrionario, mientras que durante la adultez elimina células degeneradas que potencialmente pueden convertirse en células cancerígenas, además ayuda a mantener la homeostasis tisular dentro de parámetros normales. Los cuerpos apoptóticos poseen un diámetro de 800-5000 nm, se caracterizan por presentar fosfatidilserina en la superficie, cuyo propósito es actuar como señal de fagocitosis para su eliminación (24,27,28,29, 30, 31).

1.2. Biogénesis

1.2.1 Biogénesis de exosomas.

De manera general la biogénesis de exosomas comienza con la invaginación (formación de una bolsa o pliegue hacia el interior) de la membrana celular formando endosomas tempranos los cuales posteriormente evolucionaran a endosomas tardíos que contienen en su interior pequeñas vesículas

intraluminales (ILV's) producto de la invaginación de la membrana endosomal. De forma simultánea durante dicho proceso, múltiples proteínas, ácidos nucleicos y lípidos son clasificados e introducidos a las ILV's; los endosomas que ya contiene un número considerable de ILV's se denominan ahora cuerpos multivesiculaes (MVB). El proceso finaliza cuando los MVB se fusionan con la membrana celular y liberan a los ILV's al espacio extracelular en forma de exosomas. La formación de las ILV's puede ocurrir por dos vías; una dependiente del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés) o una vía independiente de dichos complejos proteicos (6,19).

1.2.1.1. Vía dependiente de ESCRT

El complejo ESCRT se encuentra formado por aproximadamente 30 proteínas pertenecientes a la familia de proteínas clasificadoras vacuolares (Vps's por sus siglas en inglés) organizadas en 4 complejos denominados; ESCRT 0, I, II y III, además de proteínas fundamentales presentes durante esta vía de formación tales como la Vps4 (un complejo enzimático con actividad AAA ATPasa); la proteína VTA1 (proteína Vps-asociada) y la proteína ALIX (proteína de interacción ALG-2). El mecanismo canónico de acción de estos complejos es el siguiente: el complejo ESCRT 0 se encarga de reconocer y reclutar proteínas ubiquitinadas en dominios específicos de la membrana endosomal mediante la unión de subunidades de ubiquitina. Posteriormente, los complejos ESCRT I y II inducen la deformación de la membrana mediante la unión con ESCRTIII para la promoción del proceso de gemación de las ILV's (19,33, 34) (ver figura 2).

El complejo ESCRT-0 está formado por las proteínas moleculares multidominio Hrs (sustrato de tirosina quinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos) y STAM (molécula adaptadora transductora de señales), las cuales le confieren al complejo la habilidad para interactuar con múltiples contrapartes. Por un lado el complejo ESCRT-0 es dirigido hacia el endosoma vía el dominio FYVE (presente en Hrs), el cual se une específicamente al lípido fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P) presente en la membrana endosomal. Hrs se une a las proteínas endocíticas clatrina (cuya función es recubrir las vesículas intracelulares) y EPS15 (receptor de sustrato 15 del factor de crecimiento epidermal). Hrs se une también al dominio UEV (variante 2 de ubiquitina) del complejo ESCRT-I a través de su motivo PSAP, lo cual vincula a los complejos. ESCRT-0 mediante sus proteínas Hrs y STAM selecciona y recluta las proteínas ubiquitinadas que serán depositadas en las ILV's, de tal forma que dicho complejo funciona como un puente entre la maquinaria de endocitosis (rio arriba) y la biogénesis de los MVB's (rio debajo de la vía) (35).

ESCRT-I comienza el reclutamiento de ESCRT-III mediante ESCRT-II y finalmente se lleva a cabo la disociación y reciclaje de la maquinaria del complejo ESCRT-III por la interacción de Vps4, conformando el ciclo completo (33, 34, 35).

Se han identificado mecanismos alternos (no-canónicos) en la vía dependiente de ESCRT para reclutar a los complejos ESCRT-III y Vps4 con la finalidad de seleccionar e incorporar moléculas en los exosomas. Por ejemplo, el mecanismo de asociación del complejo ESCRT-III con la proteína ALIX, mediante la cual se seleccionan e incorporan las proteínas tetraspaninas a la membrana de los ILV's.

Dicho mecanismo no requiere de los complejos ESCRT-0, I y II para el reclutamiento de ESCRT-III (36, 37).

1.2.1.2. Vía independiente del ESCRT

Los complejos ESCRT están involucrados en la vía clásica para la generación de vesículas endosómicas intraluminales (ILV's), sin embargo, existen otras proteínas y lípidos que en conjunto pueden llevar a cabo el proceso de formación de ILV's de forma independiente. Un mecanismo que se ha identificado en células oligodendrogliales depende de microdominios altamente enriquecidos de esfingomielina en la membrana endosomal. En dicho mecanismo, la esfingomielinasa neutral 2 (nSMase2) forma ceramidas a partir de la esfingomielina por medio de la eliminación hidrolítica de fosfatidilcolina. Dichas ceramidas inducen la unión de microdominios, lo que da origen a "brotos" hacia el interior de la membrana endosomal los cuales ulteriormente dan origen a las ILV's. Se ha determinado que la proteína tetraspanina CD63 es esencial para la formación de las ILV's (19,20,33,34) (ver figura 2). Si bien existen mecanismos independientes del complejo ESCRT, depende del órgano y del tipo de célula la predisposición a seguir alguna de estas dos rutas de biogénesis (38).

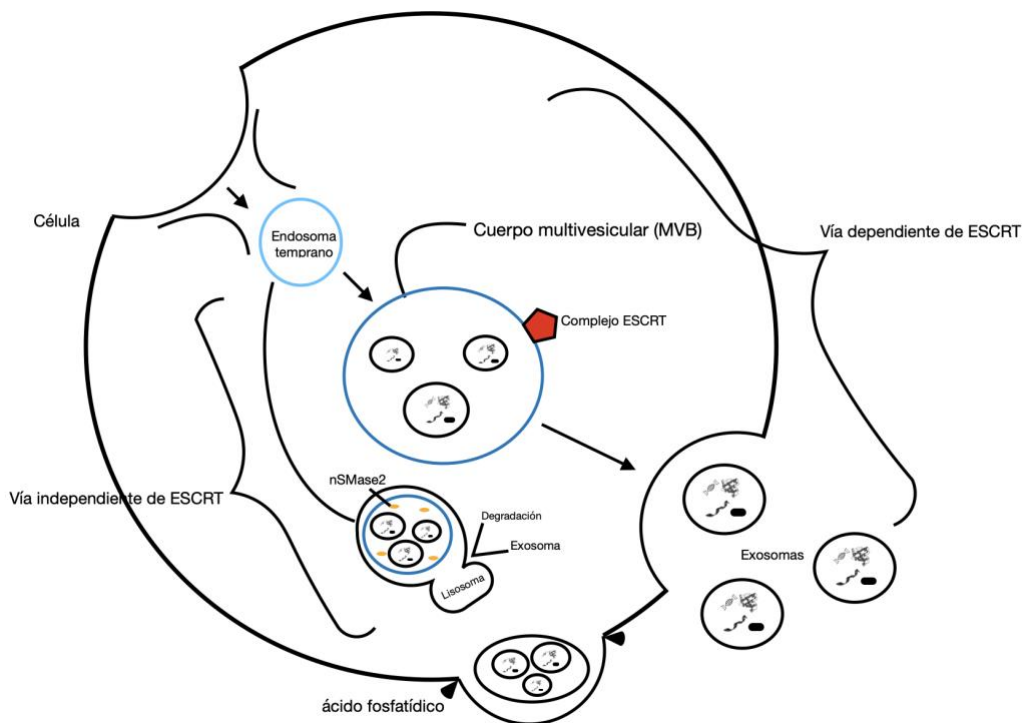


FIGURA 2. Proceso de biogénesis de exosomas con la maquinaria dependiente de ESCRT e independiente de ESCRT, mediante la acción de la nSMase2. La biogénesis de exosomas inicia con la formación de endosomas tempranos resultantes de la gemación interna de la membrana celular, posteriormente se sigue una vía de formación de exosomas, ya sea mediante el complejo ESCRT en donde el resultado final será la deformación y gemación de la vesícula, o una vía alternativa independiente

de este la cual depende de nSMase2, en donde el cuerpo multivesicular que contiene al exosoma se fusiona con la membrana celular externa para la liberación posterior del exosoma al espacio extracelular.

1.2.2. Biogénesis de Microvesículas (MVs).

Son liberadas prácticamente por todas las células del organismo ya que funcionan como un sistema de comunicación entre células. La biogénesis de las MVs inicia con la gemación o formación de una “ampolla” en la membrana plasmática, seguida por la liberación de la vesícula de la superficie celular al espacio extracelular. El proceso requiere varios mecanismos esenciales, tales como la movilización de calcio intracelular (Ca^{2+}), el reordenamiento del citoesqueleto, rearrreglos en la distribución de los componentes fosfolipídicos de la membrana plasmática y la activación de proteínas citosólicas responsables del reordenamiento del citoesqueleto.

El iniciador más conocido de la biogénesis de MVs es la activación celular, por ejemplo, cuando existe un estímulo al sistema inmune, ocasionado por alguna lesión, sin embargo, algunas señales de apoptosis también se asocian con la formación de MVs (39).

La activación celular induce un incremento en el calcio intracelular, el cual induce a su vez cambios en la distribución de los fosfolípidos de membrana (pérdida de la asimetría) y la activación y translocación de calpaína a la membrana plasmática (40). La calpaína es una proteasa que escinde las proteínas del citoesqueleto que anclan la membrana. La acción de la calpaína en conjunto con la alteración de la actividad de las enzimas responsables de la distribución de los fosfolípidos de membrana flipasas (inactivación), flipasas y escramblasas (activación), promueven la remodelación del citoesqueleto y la asimetría de la membrana (41, 42, 43). Lo anterior compromete el anclaje, forma y rigidez de la membrana y favorece la formación de la MV y su liberación.

El proceso implica la formación de un tráfico molecular en el que los componentes biológicamente activos se cargan dentro de la vesícula, para su posterior liberación. Este proceso es dependiente del factor 6 de ribosilación (ARF6) que transporta moléculas biológicamente activas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos). Después se da un reordenamiento de la membrana celular dependiente de la proteína A de la familia homóloga de Ras (RHOA). RHOA es una proteína perteneciente a la superfamilia Rho cuya función es controlar la formación de diversas estructuras que conforman el citoesqueleto mediante la deformación en los filamentos de actina que conforman al citoesqueleto (44). La deformación de la capa superficial de la membrana detona la expresión de fosfatidilserina la cual se trastoca desde la lamela interna (región invaginada de la membrana celular que forma pozos o pliegues en la membrana para la agrupación de componentes biológicamente activos) hacia la lamela superficial. El translocamiento es dependiente de tres enzimas: la flopasa (externalizar), lipasa (internalizar) y la escramblasa (genera un flujo bidireccional). Las dos primeras enzimas dependen de la hidrólisis de ATP para funcionar, pero la última (escramblasa) prescinde de este elemento, sin embargo, es dependiente de la concentración citosólica de calcio (45, 46, 47, 48). Una vez que las moléculas de carga de las MVs están dentro de ellas, se genera una protuberancia o “pellizco” en la membrana celular mediante la contracción de la actomiosina del citoesqueleto (regulada por RHOA) y finalmente las MVs se desprenden de su célula origen (44) y se liberan al espacio extracelular. Adicionalmente, la activación de RhoA por ARF6 o ARF1

conduce a una contracción basada en actina-miosina que se requiere para la gemación de MV a través de las quinasas ROCK y ERK (49)

1.2.3. Biogénesis de los cuerpos apoptóticos

Los cuerpos apoptóticos son EVs producidas por células que sufren apoptosis. La apoptosis es un proceso fisiológico de eliminación celular dependiente de la activación de proteasas intercelulares denominadas caspasas. Durante el desarrollo de la apoptosis la célula experimenta cambios fisiológicos y morfológicos, caracterizados por, la fragmentación y condensación de la cromatina, la ruptura de la envoltura nuclear por la destrucción de las láminas nucleares, el encogimiento de los organelos y la célula, lo que finalmente conducirá a la formación de vesículas por parte de la membrana citoplasmática dando origen a los cuerpos apoptóticos, los cuales almacenan todas las moléculas intracelulares de la célula y son liberados al espacio extracelular para ser internalizadas por otras células con capacidad de reconocimiento de los marcadores de señalización molecular superficiales, tales como los macrófagos, los cuales se encargaran de su asimilación (50, 51).

A diferencia de los exosomas y las MVs, el contenido de los cuerpos apoptóticos es aleatorio, además tienen importantes funciones de regulación inmunológica ante la muerte celular programada (51). La apoptosis puede ser inducida por dos vías de señalización, la extrínseca o de receptor de muerte y la intrínseca o mitocondrial.

La vía extrínseca o vía de receptor de muerte es una vía independiente de la proteína supresora de tumores p53 y es controlada por citosinas que se unen a dominios celulares específicos en el exterior de la célula, desencadenando así la cascada de señalización de muerte. Existen 3 complejos proteicos involucrados en la apoptosis: el factor de Necrosis Tumoral (TNF), la proteína ligando Fas (Fas/ FasL) y el ligando APO2L/ ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (APO2L/TRAIL) (52,53, 54). Por otro lado, la vía intrínseca/mitocondrial o de vía regulada por BCL-2 es activada en el interior de la célula, principalmente por daños en el ADN o los microtúbulos ocasionados principalmente por estrés. Esta vía puede ser dependiente de p53, lo cual implica la interacción de proteínas de la familia Bcl-2, así como proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak (54). Bcl-2 genera un poro en la membrana mitocondrial, por lo tanto, serán liberadas numerosas proteínas como el citocromo-C, una vez en el citosol este activara el complejo proteico de apoptosoma (regula proteínas e interfiere en la acción de inhibidores de apoptosis) cuyo fin es inducir a la caspasa-9 a iniciar la apoptosis hasta llegar a la caspasa-3, quien activará la desoxirribonucleasa cuya tarea será la fragmentación del ADN. Una vez concluida una de las dos vías de la apoptosis, los cuerpos apoptóticos cargados con el material celular residual serán liberados al espacio extracelular y será cuestión de tiempo para que los macrófagos identifiquen a estas vesículas y las asimilen (53,54,55).

1.3. Tipo de biomoléculas que transportan las EVs

Las EVs transportan una gran variedad de moléculas biológicamente activas que incluyen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El tipo y cantidad de las moléculas transportadas por las EVs varía de acuerdo

con el origen de la célula y las condiciones fisiológicas o patológicas como es el caso del cáncer (56, 57, 58, 59). Las EVs contienen ADN, RNA (mRNAs, miRNAs, y otros RNAs no codificantes), moléculas protéicas, glicoprotéicas y lípidos, incluyendo citosinas, moléculas coestimuladoras, y metabolitos (57). Las EVs son liberadas por las células al espacio extracelular, donde pueden ser absorbidas por sus células blanco mediante el reconocimiento mediado por receptores, liberando así su contenido, el cual puede desencadenar cambios fenotípicos en las células blanco (56).

Los exosomas y las MVs son los dos tipos de EVs que transportan moléculas biológicamente activas hacia las células receptoras blanco como un mecanismo de comunicación inter-celular en estado fisiológico y en enfermedad, mientras que los cuerpos apoptóticos están relacionados con regulación inmunológica ante la muerte celular. El análisis de los exosomas y MVs mostró que su contenido es distintivo de cada vesícula, indicando una función diferencial entre estos tipos de EVs. Más aún, el tipo y cantidad de las moléculas biológicamente activas, y otros elementos, transportados por las EVs se modifica de un estado fisiológico a uno patológico como el cáncer, indicando que estas moléculas podrían tener un papel biológico relevante en los mecanismos asociados al proceso de carcinogénesis. Adicionalmente, el tipo y concentración de las moléculas contenidas en las EVs podrían servir como biomarcadores (indicadores de la presencia de la enfermedad).

A continuación, se describen los elementos transportados por los exosomas y MVs en estado fisiológico y en diversos tipos de cánceres.

La tabla 1 muestra el contenido transportado por exosomas en condiciones fisiológicas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y su comparación con los componentes moleculares derivados de un tejido cuando hay algún proceso de desarrollo cancerígeno.

Tabla 1. Elementos moleculares transportados por exosomas bajo condiciones fisiológicas y su comparación en presencia y desarrollo de algún tipo de cáncer. (Tablas basadas en la bibliografía; 19, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84).

Tipo de molécula	Moléculas en condiciones de fisiológicas	Moléculas transportadas en condiciones patológicas como el cáncer
Proteínas	<p>De formación/ biogénesis: Complejo ESCRT (0-III), Her, VPS4, TSG101, ALIX, flotilina, clatrina (19)</p> <p>Citoesqueleto: Actina, tubulina, cofilina-1, moesina, miosina, vimentina, erzina, radixina, perlecán, fibronectina, queratina, THBS1, IQGAP1 (19,61, 62)</p> <p>De adhesión: integrinas, lactaderina, ICAM-1, MFGE8, P-selectina (19,61)</p>	<p>Cáncer de vejiga: Edil-3 (83)</p> <p>Cáncer de mama: Anexina II, Heparasa, TGFB (63, 64, 65)</p> <p>Cáncer colorrectal: Plexina B2, Tetraspanina-8 (66)</p> <p>Glioblastoma: Angiogenina, CXCR4, FGFa, IL-6, IL-8, MMP2, MMP9, TGFB, TIMP-1, TIMP-2, VEGF (67,68)</p> <p>Leucemia: Heparanasa (65)</p>

De transporte y fusión: Anexina I, II, IV, V, VI, dinamina, sintaxina-3, RAB4,5,7 y 11, Rap1B, RABGDI, SLC3A2, CLIC1 (19, 61, 62)

De choque térmico: α B-cristalina, HSP20, 22, 27, 40, 60, 70, 90, HSC70, HSPA5, CCT2 (19, 62, 70, 71)

Tetraspaninas: CD9, CD37, CD53, CD55, CD63, CD81, CD82 (19, 61)

Implicados en la presentación de antígenos: HLA tipo I y II (19)

Implicados en señalización: GTPasa, HRAS, sintenina-1, Gi2a, proteínas 14-3-3, ARF1, CDC42, NRAS, EHD1, EHD4, RAN, PEBP1, MIF, RRAS2, PDCD6 y estomatina (19, 61, 62)

Enzimas: Glucosa-6-fosfato isomerasa, ácido graso sintasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, PFKL, peroxiredoxina-1, hexocinasa, fosfoglicerato cinasa-1, fosfoglicerato mutasa 1, piruvato cinasa, isoenzimas MI/M2, ATP citrato liasa, ATPasa, Glucosa-6-fosfato isomerasa, aspartato aminotransferasa, aldehído reductasa, enolasa-1, lactato deshidrogenasa, aldolasa-1, dipeptidil peptidasa-4 (19, 61, 62, 76)

De transporte: RTFs (19)

Citocinas: Factor de Necrosis Tumoral (TNF por sus siglas en inglés) - α (19)

Antiapoptosis: ALIX, tioredoxina peroxidasa (61)

Reguladoras de transcripción: EEF1A1, EEF2, LGALS3, EEF1A2 (62)

Caveolares: Caveolina 1 y 3 (77)

Cáncer de pulmón: Sortilina (69)

Melanoma maligno: IL-6, MMP2, VEGF (68)

Mieloma múltiple: Angiogenina, Heparanasa, HGF, MMP9, Serpina E1, Serpina F1, VEGF (65, 72)

Carcinoma nasofaríngeo: CD44v5, HAX-1, ICAM-1, MMP13 (73,74, 75)

Lípidos	Fosfolípidos: Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido lisobiofosfatídico (60)	
	Esfingolípidos: Esfingomiolina, hexosilceramida, lactosilceramida (61)	
	Gangliósidos: GM1, GM3 (79, 80)	
	Otros: Ácido araquidónico, prostaglandina E, 15-d prostaglandina J2, diacilglicerol, triacilglicerol, hexadecilglicerol (60, 81)	
Ácidos nucleicos	RNA: miRNAs (Let-7, miR-1, 15, 16, 17, 18, 19-19b, 20, 21, 29a, 126, 143, 145, 151, 155, 181, 200, 214, 320, 375, 382), RNAm, RNA circ, RNAmi, RNAt, RNAp. (19, 82).	RNA: miR-126a (Cáncer de mama), miR-21, miR-23a, miR-210 (Cáncer de pulmón), miR-21 (Cáncer de ovario) (60, 61, 62, 67, 84)
	ADN: ADNmt, ADNcs, ADNcd, ADN viral (82).	

ESCRT: complejo de clasificación endosomal requeridos para el transporte; VPS4: proteína vacuolar de clasificación 4; TSG101: Gen de susceptibilidad tumoral 101; ALIX: ALG-2-interacting protein X; THBS1: trombospodina 1; IQGAP1: IQ motif containing GTPase activating protein 1; ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1; MFGE8: glóbulo de grasa láctea EGF y dominio de factor V/VIII; Rab-4: gen ras del cerebro de rata; Rap 1B: proteína relacionada con Ras 1-b; RABGDI: inhibidor de la disociación de GDP específico de rab; SLC3A2: portador de soluto de la familia 3 miembro 2; CLIC1: canal intracelular de cloruro 1; HSP20: proteína de choque térmico 20; HSC70: proteína Heat shock cognate-70; HSPA5: proteína de choque térmico miembro 5; CCT2: chaperona que contiene la subunidad 2 de TCP1; CD (19, 37, 53, 55, 63, 81, 82): cluster de diferenciación; HLA I, II: antígenos leucocitarios humanos; GTPasa: guanosa trifosfatasa; HRAS: HRas proto-oncogene, GTPasa; ARF-1: factor de ribosilación 1; CDC-42: ciclo de división celular 42; NRAS-2: neuroblastoma Ras; EHD1: proteína 1 que contiene el dominio EH; PEBP-1: proteína de unión a fosfatidiletanolamina; MIF: factor inhibidor de la migración del macrófago; RRAS2: RAS relacionado 2; PDCD6: muerte celular programada 6; EDIL-3: EGF like repeats and discoidin domains 3; TGFβ: factor de crecimiento transformante β; CXCR4: receptor 4 de quimiocina; FGFa: factor de crecimiento de fibroblastos; IL (6, 8): interleucinas; MMP (2, 19): matriz de metalopeptidasa; TIMP (1, 2): inhibidor de metalopeptidasa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; HAX1: HCLS1 asociado a la proteína X-1; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; PFKL: fosfofructoquinasa de tipo hepático; RTFs: receptor soluble de transferrina; FNT-α: fRNAesiltransferasa, caja CAAX, alfa; EEF1A1: factor de elongación de traducción eucariota 1Alfa 1; LGALS3: galectina-3; GM (1, 3): monosialotetrahexosilgangliósido; RNAm: RNA mensajero; circRNA: RNA circular; miRNA: microRNA; RNAt: RNA de transferencia; RNAp: RNA polimerasa; ADNmt: ADN mitocondrial; ADNcs: ADN de cadena simple; ADNcd: ADN de doble cadena

En las MVs el contenido molecular que será transportado depende de la célula de origen ya sea que esta se encuentre bajo condiciones fisiológicas o en presencia de alguna enfermedad, sin embargo, algunos elementos compartidos indistintamente si se presenta o no alguna patología son; derivados proteicos de la biogénesis y material estructural de citoesqueleto. El mecanismo de carga de material biológicamente

activo en las MVs no se realiza de manera aleatoria y utiliza a la proteína ARF6 para cargar de manera selectiva el material que será transportado (85, 86).

La Tabla 2 muestra el transporte de componentes involucrados en el proceso de biogénesis y formación estructural de los MVs no involucrados con la progresión cancerígena, y los elementos biológicamente activos durante la progresión de esta patología.

Tabla 2. Elementos moleculares transportados por MVs involucrados en la biogénesis y su comparación con los elementos transportados durante la progresión del cáncer. (Tablas basadas en la bibliografía; 58, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115).

Función	Familia de proteínas	Proteína
Proteínas transportadas involucradas en la biogénesis	Anexina	Anexina A1 (87,88,89, 90, 94) Anexina A2 (88, 90, 92, 94) Anexina A2 en isoforma 1, Anexina A4 (88, 90, 92, 94) Anexina A5 (88, 90, 95) Anexina A11 (87, 91, 92, 94)
	Arf	Factor de ribosilación de ADP-1, Factor de ribosilación de ADP-4, Factor de ribosilación de ADP-5 (92, 94) Factor de ribosilación de ADP-3 (92, 93)
	ERM	Fosfoproteína 50 de unión a ezrin-radizina-moesina (94) Ezrina (90, 92, 95) Moezina (88, 90, 92, 95, 114) Radixina (92, 94, 95)
	ESCRT	CHMP1A, CHMP2A, Alix (94, 92, 95)
	RAB	Rab-1B (93, 94) Rab-5B, Rab-5C, Rab-10, Rab-11A, Rab-11B, Rab-33B, Rab-35 (92, 94) Rab-6A (87, 92) Rab-7 (88, 92, 94) Rab-8A (87, 92, 94)

		<p>Precursor de calnexina (89, 93, 94)</p> <p>Cadena pesada de clatrina 1 (88, 89,93, 94, 114)</p> <p>Cadena pesada de dineína citosolica (89)</p> <p>EHD4 (92, 93)</p> <p>Proteína nuclear de unión a GTP Ran (94)</p> <p>LAMP1 (92)</p> <p>Miosina, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa A (87, 93, 94)</p> <p>Precursor de peptidilprolil isomerasa B (89, 93, 94)</p> <p>Proteína RAB inhibidor de la disociación de GDP beta (93, 95)</p> <p>RAP1A (92, 93)</p> <p>RAP 1B (91, 92, 93)</p> <p>Isoforma 1 del empalme de identificación de miosina, SNAP23a (93)</p> <p>SNAP 23b, Isoforma 2 de sinteina, Isoforma 3 de sinteina, Sinteina-1 (92, 93, 95)</p> <p>Proteína 3 de la membrana asociada a la vesícula (92)</p> <p>Proteína 8 de la membrana asociada a la vesícula (93)</p>
	Otros	
	Soluble	<p>Proteasas: MMP2, MMP9, uPA (96, 97, 98)</p> <p>VEGF (98, 99, 115)</p>
Proteínas involucradas en la progresión del cáncer	Asociadas a la membrana	<p>Proteasas: MT1MMP, Cathepsina B (100, 102, 103, 104)</p> <p>Integrina B1 (100, 101)</p> <p>EGFR (105)</p> <p>VAMP3, ARF6 (101)</p> <p>HER2 (106)</p> <p>TNFL6/FasL (107, 108)</p> <p>LMP-1 (109)</p> <p>CD147/ EMMPRIN (98, 110)</p> <p>Factor tisular (111)</p> <p>MUC1 (58)</p>
	Asociada al citoesqueleto	<p>Actina (101, 112)</p> <p>Miosina (101, 113)</p>

ADP (1,3,4,5): adenosín difosfato; CHMP1A: proteína corporal multivesicular cargada 1A; ALIX: ALG-2-interacting protein X; Rab (1B, 5B, 5C, 10, 11A, 11B, 33B, 35, 6A, 7, 8A): proteína relacionada con Ras; EHD4: proteína que contiene el dominio EH 4; GTPran: GTPasa Ran; LAMP1: proteína de membrana 1 asociada a lisosomas; Rap (1A,1B): proteína relacionada con Ras; SNAP 23 (a, b): proteína asociada al sinaptosoma 25; (MMP (2, 19): matriz de metalopeptidasa; uPA: activador de plasmogeno de uroquinasa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; MT1MMP: matriz metalopeptidasa 14; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; VAMP3: proteína 3 de membrana asociada a la vesícula; HER2: factor de crecimiento epidémico humano; TNFL6/FasL: miembro 6 de la superfamilia de ligandos de factor de necrosis tumoral; LMP-1: proteína latente de membrana 1; CD147: cluster de diferenciación 147;

MUC1: Lucina 1, asociada a la superficie celular.

La emisión de material molecular varia en relación a la etapa de desarrollo de algún tipo de patología cancerígena y en algunos casos la única variante es la cantidad de moléculas emitidas por la célula (85). De manera concreta las MVs liberadas durante el inicio de la enfermedad pueden transferir factores de crecimiento, factores de inducción de la angiogénesis, evasión del sistema inmune, aumento de motilidad celular y resistencia farmacológica, así mismo, durante la progresión de la enfermedad las EVs pueden transferir horizontalmente material bioactivo como factores de crecimiento tumoral específicos (EGFRvIII) o factores de inducción de angiogénesis (VEGF y TGF- β) en fases más avanzadas de la enfermedad o durante la metástasis (85, 86, 92, 116, 117)

A diferencia de los exosomas y las MVs, los cuerpos apoptóticos no transportan moléculas biológicamente activas hacia células receptoras blanco, por lo que no se considera un mecanismo de comunicación inter-celular.

2. FUNCIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN COMUNICACIÓN INTERCELULAR Y EN CÁNCER

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la multiplicación descontrolada de células neoplásicas como resultado de la acumulación gradual de múltiples alteraciones moleculares a nivel genético y epigenético, que traen como consecuencia la transformación maligna de las células las cuales logran evadir y sobrevivir a los procesos de regulación celular y de apoptosis (118). Las alteraciones tienen múltiples causas ambientales y endógenas. Las causas endógenas son la predisposición genética que pueda presentar el individuo por mutaciones presentadas al nacimiento o durante el transcurso su vida por factores ambientales. Por otro lado, las causas ambientales están relacionadas con la exposición a radiación (radiación solar o agentes radioactivos), agentes químicos (mutágenos), una dieta inadecuada, consumo periódico y excesivo de alcohol o tabaco, edad y patógenos (como el Virus de Papiloma Humano) (119).

Durante el desarrollo de cualquier tipo de cáncer, las EVs juegan un papel crucial debido a su capacidad de transferencia de biomoléculas que pueden promover la expresión de genes alterados genética y epigenéticamente en células sanas, lo que induce el desarrollo del cáncer (25, 118, 120).

Cuando los exosomas y otras EVs son liberadas al espacio extracelular pueden reconocer a células blanco y liberar su contenido, induciendo efectos biológicos. Estudios recientes indican que los exosomas se unen a la superficie celular de las células blanco mediante tetraspaninas exosomales, que interactúan con integrinas. El acoplamiento involucra proteoglicanos de heparán sulfato y lectinas que se encuentran tanto en los EVs como en la membrana plasmática de la célula receptora. Una vez que los EVs se adhieren a la superficie celular de la célula receptora, los EVs se internalizan mediante una endocitosis mediada por clatrina o bien por medio de caveolas y balsas lipídicas. Otra forma de internalizar a las EVs es por medio de una micropinocitosis, y fagocitosis (121).

Los exosomas se forman mayoritariamente en hígado, bazo, tracto gastrointestinal y pulmones y gracias a su tamaño entregan una cantidad mayor de elementos biológicamente activos en comparación con las MVs, además durante el desarrollo tumoral y metástasis de los órganos antes mencionados, se libera una cantidad mayor de exosomas (122). Cabe señalar que, durante los procesos oncogénicos, al haber una mayor producción de EVs estas pueden ser identificadas en fluidos corporales tales como sangre, saliva, sudor, entre otros además de que mediante el uso de análisis moleculares se puede determinar la etapa de desarrollo de tumor o etapa de diseminación (122).

Al inicio del proceso cancerígeno las células tumorales comienzan a modelar el entorno estromal por contacto de célula a célula mediante la liberación de exosomas, los cuales están cargados de moléculas capaces de preparar el tejido para la implantación correcta de la célula cancerígena que ahí va a proliferar. Además, la EVs contienen moléculas que pueden inhibir la respuesta inmunológica. Esto se logra mediante la liberación de biomoléculas encargadas de atrofiar el sistema de señalización de la cascada molecular de la apoptosis o por medio de la segregación de antígenos tumorales que suprimen de manera progresiva las respuestas inmunitarias contra el cáncer. Los exosomas son las únicas vesículas extracelulares que se encuentran durante todo el desarrollo cancerígeno e inclusive poseen la capacidad de inhabilitar la segregación de otras vesículas (micropartículas y cuerpos apoptóticos) debido al contenido que transportan (6, 47, 86).

La producción de cuerpos apoptóticos durante el desarrollo de enfermedades neoplásicas se ve inhibida por elementos transportados en exosomas y microvesículas, así mismo algunas moléculas secretadas por las células que conforman la masa tumoral pueden invertir la función normal de los cuerpos apoptóticos dando lugar a factores anti-apoptóticos y pro-angiogénicos, por ejemplo la proteína transmembrana perteneciente a la familia de receptores tipo toll, el receptor tipo toll-4 (TLR-4) que se expresa principalmente en células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y también en células epiteliales y endoteliales, bajo condiciones fisiológicas, es fundamental para la activación del complejo proteico NF-kB, cuya tarea es regular la respuesta inmune en presencia de cáncer por medio de la activación de factores pro-apoptóticos en células neoplásicas (123, 124) sin embargo diversos estudios han demostrado que las células que conforman el tejido cancerígeno secretan TLR-4 en cáncer de mama, cáncer de cuello uterino y cáncer de pulmón, adquieren la capacidad de promover la carcinogénesis, el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, además de un incremento en la señalización de NF-kB parte de células cancerígenas promueve la generación de elementos anti-apoptóticos y tumorogénicos. En etapas más avanzadas de la enfermedad se da un aumento en la interleucina-8 (IL-8) (específicamente en células neoplásicas A549 en cáncer de pulmón) la cual es relacionada directamente con el proceso de metástasis (120, 124, 125).

2.1. Etapas de desarrollo de cáncer: iniciación, promoción y progresión.

El desarrollo de cáncer en un individuo es resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, epigenéticas a nivel molecular que afectan el desarrollo normal de las actividades

intercelulares que gobiernan la proliferación y supervivencia de las células, dichas alteraciones pueden ser ocasionadas por factores individuales del organismo como lo son los defectos hereditarios en los genes o en alguno de los sistemas de reparación del ADN, así como la presentación de polimorfismos genéticos específicos que provoquen que las células acumulen una gran cantidad de mutaciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos el desarrollo de cáncer se da por la constante exposición a factores físicos, químicos y biológicos algunos son: el tabaquismo, adquisición de enfermedades virales como el VPH, o la hepatitis C, la exposición a radiación UV o rayos X, el alcoholismo, aunado a una dieta inadecuada o la carencia de actividad física, por mencionar algunos.

El proceso de carcinogénesis puede dividirse en tres etapas, la iniciación, la promoción y la progresión (126, 127, 128, 129, 130, 131).

2.1.1.1. Iniciación

El periodo de iniciación de la enfermedad ocurre a nivel genómico y las alteraciones pueden desencadenar tumores benignos y malignos, sin embargo las deleciones, amplificaciones y duplicaciones genéticas pueden modificar el fenotipo inicial del cáncer, convirtiendo el tejido de benigno a maligno, durante la etapa de iniciación se da lugar a la oncogénesis.

La oncogénesis es el proceso que inicia y promueve el desarrollo de una neoplasia mediante la alteración a la maquinaria celular por acción de oncogenes. Diversos estudios han demostrado que la expresión de oncogenes determinara el tipo de neoplasia que se manifestara en el organismo, además la manifestación de los oncogenes no se ve necesariamente ligada de manera inmediata a la expresión o aparición de una masa tumoral o procesos de metástasis, por lo que estas células degeneradas pueden permanecer latentes por un periodo de tiempo indefinido para después proliferar e inclusive invadir otros órganos y sistemas (105,132, 133, 134, 135). Un oncogén es derivado de la mutación de un alelo en un gen normal, dicho gen puede transformar su célula portadora convirtiéndola de una célula normal a una célula maligna y dando así origen a la célula primordial maligna en un proceso neoplásico. Por ejemplo en condiciones fisiológicas el gen RAS participa en las vías de señalización responsables de la multiplicación celular, pero cuando funge como oncogen ocasiona una multiplicación descontrolada de las células tumorales, contribuyendo al crecimiento del tumor y su posterior diseminación (136).

Los oncogenes se clasifican por el tipo de mutación y proceso celular afectado, actualmente son reconocidas tres alteraciones que se relacionan con el desarrollo de cáncer (137, 138).

Alteración a proto-oncogene: un protooncogén es un gen que en condiciones fisiológicas participa en el crecimiento y multiplicación celular, sin embargo si sufre una mutación, genera un desequilibrio en cuanto a la actividad de multiplicación celular, lo que ocasiona una proliferación acelerada y anormal de las células, aumentando las probabilidades de mutación.

Alteración en los genes de regulación de la apoptosis: la afección de las proteínas de inducción apoptóticas como las pertenecientes a la familia Bcl-2 generan una inhibición del proceso natural de muerte programada lo que aumenta las probabilidades de desarrollo de células neoplásicas (118, 137).

Alteración a los genes de reparación del ADN dañado: Cuando las alteraciones ocasionadas por la exposición a agentes genotóxicos como la luz ultravioleta o la incorrecta replicación del ADN no son corregidas pueden generar cambios en la expresión genética y una desregulación en el crecimiento celular que puede resultar en un tumor.

Adicionalmente existen otras mutaciones como las alteraciones a los de genes de supresión tumoral. Un gen supresor de tumores tiene como función codificar proteínas que regulen la división celular, por ejemplo, la p53. El silenciamiento de estos genes originado por una mutación resulta en la pérdida de la homeostasis celular individual y como resultado la célula experimenta un desarrollo desequilibrado que puede desencadenar cáncer o contribuir a su proliferación acelerada.

Los mecanismos de regulación y mantenimiento de la homeostasis celular llegan a verse comprometidos por causa de mutaciones esporádicas o hereditarias que se dan por igual tanto en células sanas como en células tumorales, en células tumorales pueden generar patologías más agresivas o una proliferación celular y metástasis más acelerada, la mutación del gen se da en función de la proteína afectada, teniendo así una sustitución, delección o una inserción que afectan a un solo nucleótido o debido a la interacción de una cantidad mayor de genes se puede dar una alteración mayor en regiones más extensas de un cromosoma (118, 138).

Diversas investigaciones han demostrado que las EVs derivadas de células cancerígenas que portan alteraciones en el gen RAS-3 inducen la migración y proliferación del tejido degenerado, así mismo estas EVs llegan a transportar material molecular específico como ligandos, proteínas y secuencias genéticas específicas que pueden expresar fenotipos diferentes al fenotipo de origen. Por ejemplo, el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) contribuye a la tumorigénesis mediante la evasión de la respuesta inmune o proteínas virales de naturaleza pro-oncogénica como la proteína latente de la membrana 1 del virus de Epstein-Barr (LMP-1), cuya expresión no solo contribuye de igual manera a la evasión del sistema inmune, sino que también induce la diferenciación celular y facilita la metástasis (139,140).

2.1.2.Promoción

La promoción tumoral es el proceso que induce el crecimiento descontrolado de las células neoplásicas para establecer o generar un tumor primario, durante esta etapa la progenie celular del tumor primario adquiere ventajas de supervivencia que les permiten incrementar su capacidad de proliferación y adquirir otras características de los hallmarks del cáncer.

Una de las características distintivas del cáncer es la angiogénesis, la cuál, es definida como el proceso de formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes. Este proceso se encuentra habitualmente inhibido y solo se activa durante situaciones esporádicas, tales como; el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas o el desarrollo de cáncer (141, 142). La formación de tejido requiere de una red vascular que proporcione el soporte necesario para el transporte y entrega de nutrientes y oxígeno, en condiciones fisiológicas esta red va a madurar y a conformarse

jerárquicamente por arterias, capilares y venas (143), sin embargo, dicha jerarquía se pierde durante el desarrollo de tejido neoplásico y da lugar a una desorganización morfológicamente incomprendida hasta la actualidad, así mismo, la angiogénesis durante el desarrollo de la masa tumoral es crucial, ya que además de transportar material molecular para el desarrollo del tumor (nutrientes) también formará la vía de transporte de exosomas a los tejidos diana durante la metástasis (141, 143). Diversos estudios señalan que es la hipoxia un posible promotor de la activación de la angiogénesis en el desarrollo cancerígeno (144, 145). La hipoxia induce los mecanismos adaptativos de modulación de la célula estromal. Dicho mecanismo se encarga de promover la supervivencia y posterior diseminación de células malignas (145).

Diversos estudios han reportado que exosomas cargados con familias específicas de miRNA tales como miRNA-182-5p promueven la angiogénesis bajo condiciones de hipoxia en glioblastoma, así mismo la sobreexpresión de estas moléculas en exosomas libres es un indicativo del estado de la enfermedad, teniendo así una expresión baja en una etapa temprana de la enfermedad, y una sobreexpresión en etapas avanzadas. También el transporte de otras familias o compuestos de elementos biológicamente activos como las citocinas o ciertas proteínas llegan a promover la angiogénesis, de manera directa (haciendo promoción del proceso directamente en el tejido) o indirectamente (bloqueando reguladores celulares, así como el sistema inmune para facilitar la progresión del tumor), por ejemplo la E-cadherina soluble ubicada en la superficie de exosomas derivados de cáncer de ovario induce la señalización de B-catenina y el factor nuclear- κ -B cuya interacción con células endoteliales promueve la angiogénesis tanto in vitro como in vivo (121,132, 146, 147).

De manera experimental, la inoculación de exosomas obtenidos tanto de líneas celulares cancerígenas, como de los aislados de fluidos periféricos (sangre y orina) de pacientes con cáncer, demostraron poseer capacidades pro-angiogénicas en tejido sano, además de que se observó una mayor vascularización en gliomas en comparación con otro tipo de tumores (148, 149).

Una característica de la célula cancerosa es la capacidad de proliferar sin control. Se conocen múltiples alteraciones en mecanismos que regulan la proliferación celular, y uno de los factores más estudiados que producen estas alteraciones es la mutación del gen p53. Durante el ciclo celular existen puntos de control que se encargan de verificar la correcta replicación e integridad del genoma, sin embargo si el gen p53 se encuentra silenciado o mutado por acción de los oncogenes, las tasas de mutación y la probabilidad de generar inestabilidad genómica y una supervivencia de células degeneradas con potencial tumoral aumenta drásticamente, así mismo las células mutadas llegan a liberar EVs con la carga molecular necesaria para inactivar e inducir a la mutación de células sanas y así evitar retrasos en cuanto al desarrollo de la masa tumoral (150, 151, 152, 153). Durante la proliferación de la masa tumoral las EVs se encargan de transportar componentes biológicamente activos que anularan la capacidad de respuesta inmune del organismo y de ser el caso, comenzaran a migrar de manera selectiva a órganos diana para comenzar a preparar el tejido para la metástasis.

El contenido de los exosomas emitidos por el tumor primario va a variar de acuerdo al tipo de cáncer y a su sitio de arribo, por ejemplo en el cáncer de mama cuando se disemina en el mismo órgano se secreta miR-105 asociado a EVs para regular de manera negativa la proteína ZO-1 afectando así las uniones estrechas en las monocapas endoteliales tanto en el tumor primario como en sitios de arribo de las EVs con el fin de aumentar la permeabilidad vascular y así facilitar la intravasación y extravasación de las células tumorales, por otro lado cuando estas EVs llegan a cerebro secretan miR-181c asociado a EVs, originando la destrucción de la barrera hematocefálica mediante la localización anormal de la actina por medio de la regulación negativa de la proteína quinasa-1 dependiente de 3- fosfoinosítido (PDPK1), resultando en la facilitación de invasión al órgano y promoviendo en etapas posteriores de la invasión una metástasis más eficiente.

Diversos estudios han demostrado que los exosomas al transportar elementos tales como los miRNA, que contribuyen a una proliferación acelerada de la masa tumoral. Además, elementos como los factores inducibles de hipoxia (HIF) contribuyen a una secreción mayor de exosomas cargados con miRNA, el rápido desarrollo tumoral no va a la par con el desarrollo vascular del tejido por lo que se generan zonas de hipoxia la cual activará el factor HIF, y por lo tanto habrá mayor emisión de exosomas y por lo tanto una proliferación tumoral acelerada, y una emisión de EVs pro-metastásica mayor (121, 141, 143, 145, 146, 154, 155).

2.1.3. Progresión

La progresión es la última etapa de la carcinogénesis, durante esta etapa se da la transformación de una masa tumoral benigna a una maligna, por lo que las células que conforman al tejido tumoral adquieren la capacidad de migrar, invadir y realizar metástasis a otros tejidos, dicha etapa se caracteriza por la proteólisis, la pérdida de adherencia celular, la colonización al órgano diana y el reinicio de la angiogenesis.

La proteólisis es la degradación de proteínas mediante enzimas llamadas peptidasas, y es considerada un paso previo a la metástasis. La actividad proteolítica es necesaria para la degradación de la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés) y la migración de las células tumorales. Diversos estudios han demostrado que existe una sobreexpresión de enzimas en casi todas las células del ambiente tumoral. En células cancerosas puede estimular la producción de proteasas en células vecinas; estimular la autoproducción por parte de la célula de sus propias enzimas proteolíticas e inclusive producir factores que promuevan o desactiven a las proteasas presentes localmente (156, 157, 158). Trabajos recientes han demostrado que las EV's llevan como carga, así como en la superficie moléculas con actividad enzimática proteolítica, que incluyen a las metaloproteinasas de matriz (MMPs por sus siglas en inglés) solubles y de superficie; convertasas ancladas en la superficie celular (ADAMs) y convertasas solubles con motivos de trombospondin (ADAMTSs) además de la enzima degradadora de insulina (IDE), sialidasa y heparanasa, entre otras. Estas moléculas exosomales conservan su actividad enzimática y en conjunto pueden degradar una gran variedad de sustratos presentes en la matriz extracelular (ECM) y los espacios extracelulares. En particular, se ha

demostrado que las metaloproteasas de EVs pueden degradar a sus substratos dentro de células blanco y en la ECM, y participan en el proceso de progresión tumoral en cáncer de mama, ovario, cáncer de cuello y melanoma (159, 160, 161).

En cuanto a la adherencia celular es la capacidad que tienen las células de unirse a otras células o elementos del medio externo. Las proteínas que regulan estas interacciones son denominadas moléculas de adhesión y se clasifican en cuatro familias; Cadherinas, Integrinas, selectinas e inmunoglobulinas (162, 163).

Las moléculas de adhesión facilitan la señalización externa con la señalización interna de la célula por lo que son responsables de las respuestas intercelulares, procesos de organización citoesquelética, respuestas intracelulares y de expresión genética. Durante los procesos oncogénicos las células van perdiendo la capacidad de adherencia, ya sea por mutaciones directas en el genoma o por una disminución de la expresión de las proteínas,

por ejemplo la E-Cadherina es regulada negativamente debido a la expresión de factores represores de E-Cadherina por parte de las células tumorales como los factores de transcripción Snail, ZEB-1, ZEB-2 y E47, así mismo durante la transición epitelio-mesenquimal existen alteraciones a elementos como el E-Pal, la caja CCAAT y en regiones ricas en guanina-citocina que limitan la actividad transcripcional del promotor de E-Cadherina, dichos elementos en condiciones fisiológicas regulan positivamente la actividad epitelial y son factores que favorecen al promotor de E-Cadherina. Esta carencia de adherencia favorece a la motilidad celular individual por lo que es considerado un factor que no solo favorece a la rápida evolución del tumor, sino que también contribuye al proceso de metástasis cuando la tasa de proliferación de las células tumorales es alta (128, 162, 164).

Durante la migración celular los exosomas transportan elementos capaces de inhibir la respuesta inmune, por ejemplo, mediante la desregulación de la IL-2 para inhibir la activación de células T, también se reduce la proliferación de células TCD8+ y se altera la maquinaria celular de las células “*natural killer*” (NK) para reducir su citotoxicidad mediante la presentación del ligando NKG2D. Durante su diseminación por el organismo, los exosomas derivados de tejido tumoral se llegan a acoplar a células libres, diezmando progresivamente la respuesta inmune antes de concretar el proceso de metástasis, generando así un ambiente idóneo para la invasión posterior (165, 166).

Así mismo el transporte de miRNA por parte de las EVs va a determinar la capacidad de apoptosis, migración celular y proliferación de la masa tumoral además de que determinará de manera específica la capacidad de anclaje a las células del órgano diana (167).

2.2. Tropismo y biodistribución de las EVs liberadas por células cancerosas

Las EVs derivadas de células cancerosas se caracterizan por tener ligandos de unión selectiva que actúan tanto intrínsecamente como extrínsecamente de la masa tumoral (6). Los estudios existentes sobre el tropismo y biodistribución de EVs durante la progresión del cáncer se centran en la capacidad

de los exosomas para transferir compuestos biológicamente activos a órganos distantes para la preparación del tejido durante las fases iniciales de la metástasis.

Diversos estudios han demostrado que los exosomas derivados de células cancerígenas inducen la fuga vascular, la inflamación y el reclutamiento de células progenitoras pertenecientes de la médula ósea durante la formación de nichos antes y durante la metástasis, por lo que son considerados organotrópicos (168).

Las integrinas (ITG) exosomales son los elementos de adherencia celular más abundantes en la superficie exosomal, así mismo, se ha demostrado que las expresiones de integrinas dirigen la colonización de órganos mediante la fusión con células diana en el tejido e inclusive pueden inducir estos cambios a órganos sanos para transformarlos en nichos metastásicos adecuados para la metástasis. Los exosomas dirigen de manera selectiva la colonización de órganos mediante la fusión con células diana, como se mencionó anteriormente, son de naturaleza organotrópica por lo que existirá un acoplamiento de compatibilidad entre las células emisoras tumorales y las células receptoras en el tejido (162, 168).

De manera experimental Peinado H. Et al. demostró el potencial de los exosomas para alterar a las células derivadas de la médula ósea y con ello su capacidad para mediar la metástasis, para ello aisló mediante microscopia electrónica y reconocimiento de marcadores moleculares exosomas circundantes melanoma metastásico de pacientes humanos y descubrió que durante las etapas progresivas de la metástasis, la etapa IV resultó tener una deficiencia proteica en comparación a otras etapas de la metástasis, sin embargo esto dota a los exosomas una ventaja de supervivencia y con ello una capacidad de invasión organotrópica mayor, posteriormente se utilizaron líneas celulares de melanoma metastásico de ratón (B16-F10) y humano (SK-Mel28/-202/-265/-35) y se descubrió que los niveles de la proteína TYRP2 (específica de melanoma) aumentaron durante el estadio metastásico IV, así mismo se estableció la TYRP2 como una firma molecular específica presente en melanomas avanzados y como un indicador de enfermedad metastásica.

Una vez establecida la supervivencia de los exosomas y las firmas moleculares presentes en etapas avanzadas de la enfermedad y durante la metástasis se procedió a experimentar con modelos murinos en donde se inocularon exosomas de líneas celulares altamente metastásicas como la B16-F10 en donde se pudo observar la educación por medio de las células derivadas de la médula ósea a través del receptor MET, así mismo estos exosomas indujeron fugas vasculares en sitios premetastásicos y reprogramaron a los progenitores de la médula ósea hacia la expresión de un fenotipo provasculogénico. Los exosomas derivados de tumores promovieron la movilización y educación de células medulares y con ello se vio un incremento en la vascularización, invasión y metástasis del tumor, además la preparación de células medulares llega a aumentar la carga tumoral metastásica y la distribución exosomal en tejidos diana inclusive para tumores con baja capacidad metastásica (168).

Otros estudios han confirmado que la emisión de exosomas derivados de líneas celulares prometastásicas como la SK Mel (presente en melanoma), la MCF-7 (presente en cáncer de mama) y

la AsPc-1 (presente en adenocarcinoma pancreático) llegan a multiplicar hasta 20 veces la capacidad de invasión organotrópica, y que la emisión de exosomas por parte del tumor primario no es limitante a la fase de metástasis y pueden llegar a ser liberados en el organismo desde las primeras etapas de oncogénesis con el fin de ir preparando el tejido receptor durante la etapa posterior correspondiente a la metástasis, cabe destacar que los exosomas pueden llegar y acoplarse a tejidos con los que no se comparte un tropismo pero no afectaran la homeostasis del tejido, principalmente porque al no compartir un tropismo, no se tendrá la maquinaria molecular necesaria para realizar un cambio y en segundo lugar porque la cantidad de exosomas que llegue y se acople exitosamente a las células del tejido será mínima y no generara un cambio (162, 168).

La tabla 3 muestra los resultados de diversos estudios en ratones inoculados con exosomas marcados por fluorescencia derivados de líneas celulares cancerígenas que contienen elementos con capacidad de estimulación metastásica específica como los miRNA, con el fin de determinar la biodistribución y captación de exosomas en órganos distantes, también se muestran las líneas celulares prometastásicas en humanos las cuales fueron obtenidas a partir de análisis clínicos.

Tabla 3. Se muestra los exosomas derivados de las líneas celulares que inducen un proceso metastásico y su órgano diana (tabla obtenida a partir de la bibliografía; 10, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175).

Liberación de exosomas de líneas celulares experimentales (ratón) y clínicas (humanos) y el tropismo existente.	
Tropismo	Línea celular
Cáncer de mama, tropismo por Pulmón y hueso	Experimental: BoM2, LM2, CN34-LM1, CN34-BoM1, MDA-MB-231 MDA-B02, MDA-MB-468. Clínica: MDA-MB-231, MCF-7, SUM1315, MDA-MB-468.
Cáncer de páncreas tropismo por Hígado	Clínica: BxPC-3 y HPAF-II
Cáncer de próstata tropismo por Hueso	Experimental: PC-3, LNCap, MDA-PCa-2b, VCap
Exosomas de líneas celulares presentes durante la progresión del cáncer que llegan a realizar metástasis	
Cáncer de próstata	CD44+/CD24-CSC
Cáncer de mama	Líneas celulares primarias metastásicas y no metastásicas de seno
Cáncer de pulmón	Líneas celulares de pulmón

El organotropismo es un término utilizado para definir la afinidad que tiene una sustancia, molécula o microorganismo por un tejido específico, los exosomas derivados de tejidos tumorales presentan de manera superficial integrinas que se unirán de manera específica a receptores superficiales en las células de los tejidos que conforman el órgano diana, por ejemplo, los exosomas tumorales que contengan ITGa6b4 e ITGa6b1 estarán relacionados con el proceso de metástasis en pulmones, mientras que la presencia de ITGb3 se relacionara con la diseminación metastásica en el cerebro. El organotropismo de los exosomas puede llegar a ser utilizado como una herramienta terapéutica para la mitigación, combate y prevención de la diseminación metastásica a otros órganos o durante la etapa proliferativa del tumor (10).

2.3. Metástasis

La metástasis es definida como la diseminación de células cancerígenas de un tumor primario a órganos o tejidos distantes del punto de origen para formar una nueva masa tumoral en el sitio de arribo (176). Una vez que el tumor paso por todas sus etapas de desarrollo (Iniciación, promoción y progresión) llega al punto de culminación denominado metástasis, este fenómeno involucra diferentes procesos:

- Transición epitelio-mesénquimal (EMT por sus siglas en inglés) en donde las células epiteliales son modificadas para convertirse en células mesenquimales perdiendo así su polaridad y capacidad de adherencia. Desde el punto de vista molecular se pierde la expresión de E-cadherina, la capacidad de unión celular y la polaridad apicobasal, lo que las dota de capacidad migratoria, además del incremento en la expresión de vimentina que dará cierta rigidez estructural a la célula al momento de transportarse (177).
- Degradación de la matriz extracelular da lugar a la migración e invasión de las células tumorales debido a la secreción de catepsinas pertenecientes a la familia de la cisteína-proteinasas, específicamente las catepsinas B, L y D, intervienen en el proceso degenerativo del tejido celular y durante el desarrollo neoplásico. De manera concreta la catepsina B se encarga de degradar los componentes de la matriz extracelular, facilitando la progresión tumoral, la migración y transporte celular por medio de los vasos sanguíneos al tejido diana. Diversos estudios específicamente en cáncer colorrectal, gástrico, mamario y de vesícula biliar han detectado elevados niveles de expresión de catepsina B y están directamente relacionados con la metástasis en comparación con pacientes que presentan un desarrollo tumoral benigno (sin metástasis). Además, algunos estudios han sugerido que las MMP de tipo MMP-1, MMP-3, MMP-9 y MMP-13 también llegan a mediar la degradación de la matriz extracelular favoreciendo la migración, invasión y metástasis de las células tumorales (177, 178, 179, 180, 181, 182, 183).
- Diseminación por el torrente sanguíneo, inicialmente las células tumorales no podrán sobrevivir al sistema inmune y no podrán invadir órganos distantes debido a que carecen de la capacidad de anclaje; empero, la evolución progresiva del tumor dotara de resistencia inmunitaria y capacidad de anclaje a los componentes pro-matastásicos emitidos para poder comenzar con el proceso invasivo. Algunos

estudios han propuesto la unión a linfocitos T por parte de las células tumorales, dicho proceso es regulado por glucoproteínas como la ICAM-1, en donde el antígeno carcinoembrionario (CEA) actúa como molécula de adhesión y es la que facilitara la unión de las células entre sí y entre las células del órgano diana (178, 179, 180, 184).

- Invasión al órgano diana. Al llegar al órgano diana las células tumorales crean una unión por medio de células endoteliales ubicadas en los capilares del órgano diana gracias a moléculas de adhesión como la E-selectina, los oligosacáridos de cadena larga *sialyl-LewisX*, y la glucoproteína CD44, cuya variación v6 y v8-10 son relacionadas con la recurrencia de la enfermedad y con procesos de metástasis (180, 185, 186). Cabe resaltar que la presencia de integrinas de tipo a6b1, a6b4, avb5 y avb3 están relacionadas a la formación primaria de nichos pre-metastásicos en pulmones, hígado, cerebro y sistema óseo. Cuando las células tumorales se acoplan a las células endoteliales, deben extravasarse y atravesar la matriz extracelular por medio de moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas, posteriormente se revertirá la EMT retomando así la morfología y función de las células endoteliales, es entonces cuando se pierde la movilidad y se retoma la capacidad de crecimiento y proliferación para establecer una nueva colonia de células neoplásicas. Cabe resaltar que los componentes moleculares ubicados en la superficie exosomal como las moléculas de adhesión, pueden mediar de manera selectiva su fusión con sitios de metástasis futuras, contribuyendo así al organotropismo (10, 11, 128, 177, 187).
- Para el crecimiento y mantenimiento del tumor metastásico, este requiere de la participación de factores de crecimiento y de la inducción y reinicio del proceso formativo, por lo que se expresaran de nuevo factores angiogénicos que contribuirán a formar nuevos capilares que sustentarán al nuevo anclaje celular y el nuevo tumor quedara establecido en el órgano invadido (141, 143, 180).

El papel de las EVs durante el desarrollo y progresión de la metástasis es crucial ya que son liberadas al espacio extracelular una cantidad mayor de exosomas por parte del tumor primario. Dichos exosomas tendrán receptores moleculares que les proporcionarán cierta afinidad a órganos blanco, por lo que la colonización de nuevos nichos tumorales no se realiza al azar sino de manera organotrópica. Además, la emisión de exosomas varía de acuerdo al estado de progresión del proceso de invasión. En las últimas décadas diversos estudios se han centrado en identificar y aislar los diversos elementos y estirpes celulares presentes durante todas las etapas de desarrollo metastásico, con el fin de tener una perspectiva universal de la maquinaria molecular involucrada en el proceso, y así poder desarrollar tratamientos médicos más eficaces y menos agresivos (11, 168-187).

Si bien los estudios aún son escasos, se ha logrado identificar, a las proteínas S100A8 y S100A9 como efectores primarios de la remodelación del nicho pre-metastásico por medio de la acumulación de células parentales hematopoyéticas y macrófagos de fenotipo M2 en la fase inicial del proceso de migración y desarrollo primario de la nueva masa tumoral (188, 189). La tabla 4 muestra los elementos transportados por exosomas durante el proceso de metástasis.

Tabla 4. Elementos transportados por exosomas durante el proceso de metástasis.

(11, 64, 67, 68, 188, 189)

Elemento con actividad biológica	Función	Células o tejidos diana	Etapas metastásicas
VEGF, TGFB	Inducción de la angiogénesis	Células escamosas de esófago, próstata, vejiga y mama	
VEGF-C VEGF-D	Proliferación y supervivencia de las células cancerígenas en el órgano de arribo	Próstata y tumores de cérvix	Presentes durante todo el desarrollo de la metástasis.
MMP-9 IL-10	Proliferación de células tumorales en el sitio de arribo	Cáncer de mama, cáncer endotelial y cáncer renal	Crecimiento de la nueva masa tumoral en el sitio de arribo
Metaloproteinasas sortilina IL1-B Catepsina-B	Migración celular, proliferación en el sitio de arribo y mantenimiento de la masa tumoral	Cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de mama	Presente durante todo el desarrollo de la metástasis
Anticuerpos ITG α 6 β 4 ITG α 6 β 1	Promueven la adhesión tumoral de los EVs a los fibroblastos residentes en el pulmón y las células epiteliales	Pulmón	Presente durante la etapa de diseminación metastásica y arribo al órgano diana
Anticuerpo ITG α v β 5	Promueve la adhesión a las células de Kupffer	Hígado	Durante la mediación del tropismo hepático
Anticuerpo ITG β 3	Regula los procesos metastásicos	Cerebro	

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; TGFB: factor de crecimiento transformante B; VEGF (C, D): factor de crecimiento endotelial vascular; MMP 9: metaloproteidasa de matriz- 9; IL-10: interleucina 10; IL1-B: interleucina 1 beta; ITG α 6 β 4: integrina alfa6 beta4; ITG α 6 β 1: integrina alfa6 beta1; ITG α v β 5: integrina α v β 5; ITG β 3: integrina beta 3.

3. EVs COMO VEHICULOS PARA TERAPIAS CONTRA EL CANCER

Debido a su capacidad de transporte y su origen celular, las EVs son los candidatos perfectos para el desarrollo de nuevas técnicas de liberación de fármacos, incluyendo aquellos fármacos para el tratamiento, desaceleración y erradicación de diversos tipos de cáncer.

De manera experimental se han desarrollado técnicas y mecanismos de liberación de fármacos empaquetados en “vehículos” o “transportadores” como los liposomas o en nanopartículas sintéticas. Estos transportadores artificiales son creados a partir de polímeros biodegradables como el ácido poliláctico-co-glicólico (PGLA), el colágeno, o el dextran. Sin embargo, las limitantes de estas técnicas son significativamente mayores en comparación al uso de exosomas, por ejemplo; la inestabilidad

estructural, la toxicidad acumulativa por administraciones repetitivas, la degradación anticipada del fármaco o la estructura que lo contiene, y la limitada especificidad orgánica, además de que al tratarse de componentes sintéticos no poseen receptores celulares para la unión orgánica específica por lo que es necesaria la asistencia por medio de imagen para la correcta administración en el tejido de interés (190, 191, 192).

El uso de exosomas como vehículos transportadores de fármacos para el tratamiento de diversas patologías ha demostrado ser una herramienta en desarrollo con un amplio potencial. Gracias a que los exosomas son producidos por las células tanto en condiciones fisiológicas, como en condiciones de enfermedad, pueden ser utilizados para la detección oportuna del desarrollo de alguna patología desde etapas iniciales (6, 8, 56).

De manera experimental Zitvogel et al., (1998) al administrar exosomas derivados de células dendríticas aisladas del desarrollo tumoral, logró inducir la activación de linfocitos T citotóxicos para el tumor *in vivo*, por lo que demostró que la administración simple de exosomas (sin modificaciones) contrarrestaron el crecimiento y proliferación de la masa tumoral e inclusive llegaron a erradicar el tumor en su totalidad en un modelo murino (165, 193).

Además de la administración de exosomas en condiciones fisiológicas para revertir en su totalidad alguna patología de naturaleza tumoral, las investigaciones actuales se centran en dos usos potenciales para combatir el cáncer mediante el uso de exosomas. Por un lado, se desarrolla la edición de la estructura molecular del exosoma para la entrega de fármacos y por el otro lado se busca la edición del contenido exosomal biológicamente activo (genes, proteínas, lípidos, etc.) para inhibir y retrasar el desarrollo de la masa tumoral ya sea durante la proliferación primaria o durante la diseminación metastásica (6, 8, 56).

Los experimentos que se centran en modificar el contenido exosomal buscan modificar el interior y/o exterior de la vesícula para la entrega de fármacos en el tumor u órgano de interés gracias a que el potencial terapéutico de las EVs llega a abarcar todo el desarrollo tumoral incluida la etapa metastásica. Además de las ventajas ya antes mencionadas, son contados los elementos que pueden llegar a atravesar la barrera hematocefálica (BBB en inglés) por ejemplo para la administración farmacológica en casos de glioblastoma primario en el sistema nervioso. Sin embargo a pesar de todas las ventajas que pueden llegar a presentar los exosomas, es necesaria la modificación de los receptores superficiales de la vesícula debido a que diversos experimentos reportan que se da un tropismo selectivo hacia hígado y bazo cuando los exosomas son introducidos por vía intravenosa, razón por la cual el, Cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) péptido (c(RGDyK)) es utilizado como ligando en quimioterapias debido a la afinidad con las integrinas $\alpha v \beta 3$, los cuales, se sobreexpresan en la superficie endotelial de tumores de pulmón, próstata y en glioblastoma (194).

A pesar de los grandes avances en el conocimiento sobre EVs y específicamente sobre exosomas, aún no se han logrado desarrollar terapias para combatir a todos los tipos de cáncer con sus variaciones y aún menos el empaquetamiento farmacológico mediante exosomas de los tratamientos existentes. La tabla 5 muestra las vesículas aplicadas en ensayos clínicos y su contenido terapéutico para algunos tipos de cáncer.

Tabla 5. EVs cargadas con medicamentos terapéuticos contra algún tipo de cáncer (tabla obtenida a partir de bibliografía; 6, 19, 179, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201).

Fármaco	Tipo de EVs	Tipo de patología	Función
Paclitaxel y Dexorubicina	Exosomas	Cáncer de mamá Cáncer cerebral (probado en embriones de peces cebra con cáncer cerebral)	Reducieron el tamaño del tumor en comparación con la administración libre del medicamento
Metotrexato	Exosomas	Glioblastoma	Se indujo la apoptosis de las células cancerosas y se logró ampliar el periodo de vida de los organismos de prueba (ratones)
Doxorubicina	Exosomas	Cáncer de mama y de ovario	Ayuda a detener el proceso de proliferación celular maligna y al ser introducida por medio de exosomas se redujo el riesgo citotóxico al miocardio, al igual que otros efectos secundarios
Curcumina	Exosomas	Glioblastoma	Es un compuesto natural que forma parte de los polifenoles, con efectos anti-tumorales que experimentalmente ha inducido la apoptosis de células microgliales malignas
Etoposide Carboplatino Irinotecán	Exosomas	Carcinoma hepatocelular	Ayudan a la secreción de exosomas derivados del tumor que contienen proteínas de choque térmico que se encargan de mediar la actividad de células tipo NK (natural killer) en contra del carcinoma en formación
Trastuzumab	Exosomas	Cáncer de mamá	Inhibe la proliferación de las células cancerígenas HER-2 +, por lo que se ve detenido el incremento de la masa tumoral

Por otro lado, la modificación parcial de los componentes biológicamente activos de las EVs (RNA, proteínas, lípidos, etc.) han demostrado ser también un blanco de investigación, esto se logra mediante la transferencia de proteínas citoplasmáticas y de membrana. Por ejemplo, el bloqueo de los antígenos asociados a melanoma tipo 1 (mage-1), que en condiciones fisiológicas la expresión de estas proteínas se encuentra inhibida por la hipermetilación de su gen promotor, pero, cuando se da el desarrollo

tumoral, ocurre una acetilación de las histonas y desmetilación del ADN originado la expresión de *mage-1* la cual funge como un inhibidor de la proteína p53 cuya función es regular la transcripción de genes relacionados con la reparación o eliminación de células dañadas, favoreciendo así la probabilidad de desarrollar un tumor (6, 202).

Diversos estudios han demostrado que los EVs derivados de tumores poseen la capacidad de presentar antígenos a células dendríticas y activar de manera eficiente las células T citotóxicas mediadas por estas últimas, en contra del mismo tumor, por ejemplo, en el caso del melanoma maligno o del cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Por otro lado, de manera experimental las células del sistema inmune como las células T que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR) han demostrado liberar un alto contenido de componentes citotóxicos que inhiben el crecimiento tumoral. Sin embargo, las células CAR-T que liberan a los exosomas que contienen de manera superficial el CAR pueden llegar a desencadenar el síndrome de liberación de citosinas (CRS) y el síndrome de encefalopatía relacionada con CAR-T, por lo que en casos aplicados a la clínica lo que se busca es aislar de manera selectiva los exosomas ya que la eficacia como tratamiento para el cáncer otorga beneficios considerables como la baja toxicidad. La generación de los exosomas CAR por medio de donantes sanos y la producción de vesículas libres de célula resulta mucho más segura que la administración completa de células CAR-T funcionales (201, 203, 204, 205).

4. TECNICAS DE PURIFICACIÓN Y DE VALIDACIÓN DE EVs PARA SU USO EN TERAPIA

4.1. Purificación de EVs

El uso de EVs como agentes terapéuticos ha demostrado ser una vía en desarrollo prometedora para la entrega de fármacos durante el proceso de desarrollo de algún tipo de cáncer. El primer paso es la obtención de las EVs, y gracias a los estudios realizados en 2017 por la investigadora Federica Caponnetto y col., (2017) sabemos que la técnica de obtención y aislamiento de exosomas es relevante ya que ésta determina las propiedades físicas de la vesícula, así como el tamaño, lo cual puede determinar la capacidad de carga molecular y la distribución en el organismo (206).

Las técnicas de purificación en las que se realizan centrifugaciones se rigen bajo un mismo principio que consiste en realizar una serie de centrifugaciones a diferentes velocidades para ir eliminando los componentes y fragmentos celulares que no son de nuestro interés, además diversos estudios sustentan el uso de estabilizadores moleculares entre ciclo y ciclo de centrifugado para que las EVs de interés no se degrade o la pérdida de material molecular sea mínima y así poder obtener cantidades significativas para el estudio. El tampón de fosfato sódico o PBS (por sus siglas en inglés) es la solución predilecta tanto para estabilizar a las EVs entre cada ciclo de centrifugado como para resuspender nuestra solución antes de pasar al siguiente ciclo (194, 200, 207, 208, 209) (figura 3, inciso A).

Actualmente la técnica más utilizada para el aislamiento de exosomas es la centrifugación diferencial como la describió inicialmente Théry y col., (2006). La técnica consiste en eliminar de manera progresiva varias impurezas mediante el uso de una serie de centrifugaciones a diferentes velocidades,

comenzando con una de baja velocidad ($\sim 300 \times g$) para eliminar las células, y termina con ultracentrifugación ($\sim 100000 g$) para sedimentar las vesículas (2001).

Una modificación de la técnica anterior es la centrifugación en gradiente de densidad la cual puede eliminar otros contaminantes, como las proteínas. La utilidad de este método depende de las diferencias en tamaños y densidades de diversas sustancias y partículas; y varios tipos de gradientes pueden ser utilizados. Por ejemplo, el gradiente más comúnmente utilizado es la sacarosa. Sin embargo, la sacarosa no funciona para aislar EVs de saliva debido a la naturaleza viscosa de la muestra, por lo que se usa en su lugar el iodixanol (210, 211).

La técnica de centrifugación con gradiente de densidad presenta la desventaja de consumir mucho tiempo en el procedimiento, además de que el costo de los equipos es más elevado; sin embargo, resulta ser más eficiente para purificar EVs en comparación a la técnica de ultracentrifugación (212).

Las EVs son purificadas de fluidos corporales y del sobrenadante de células en cultivo y las técnicas usadas para su aislamiento varían dependiendo del origen de las EVs, del objetivo del experimento, y del equipo o los medios disponibles para hacerlo.

La Cromatografía de exclusión de tamaño es una técnica de purificación líquida basada en la exclusión de las moléculas por su diferencia de tamaño en donde las moléculas más pequeñas pueden atravesar la mayoría de los poros en un gel y se eluyen cerca de la fase estacionaria, mientras que las moléculas más grandes al no poder atravesar la porosidad específica del gel se eluyen antes de la banda de disolvente o cerca del límite de exclusión de la columna (213, 214) (figura 3, inciso B).

El aislamiento de EVs se puede llevar a cabo también mediante la precipitación con polímeros, usando diversos agentes, tales como, especies de polietilenglicol (PEG). Aunque algunos estudios utilizan aún la metodología tradicional la cual consiste en una filtración y una serie de ciclos de centrifugado con lavados de PBS.

Otro método empleado es la captura por inmutioafinidad es la única técnica que permite aislar subpoblaciones de vesículas dependiendo de la expresión de marcadores de superficie que éstas presentan. Esta técnica permite una alta pureza de EVs dependiendo del marcador empleado además de que es fácil de usar. Sin embargo, la desventaja de esta es que al ser demasiado específica en cuanto a la captura de EVs se genera un sesgo en cuanto a la identificación de otros componentes con potencial biológico, además, el diseño del sustrato para la captura de EVs debe ser bastante específico para el análisis que se realizará, para las pruebas de verificación y que no afecte la sensibilidad de las pruebas posteriores como la de ELISA (215) (figura 3, inciso C).

Para la validación de las EVs en terapia se deben realizar varias pruebas en muestras pequeñas obtenidas a partir de la muestra madre obtenida del proceso de separación; en concreto se utilizan pruebas de cuantificación para determinar si la vesícula aislada será útil para la inoculación del medicamento o para su modificación genética. La tabla 6 muestra algunas de las pruebas realizadas para la validación de EVs y su posterior uso en pruebas clínicas.

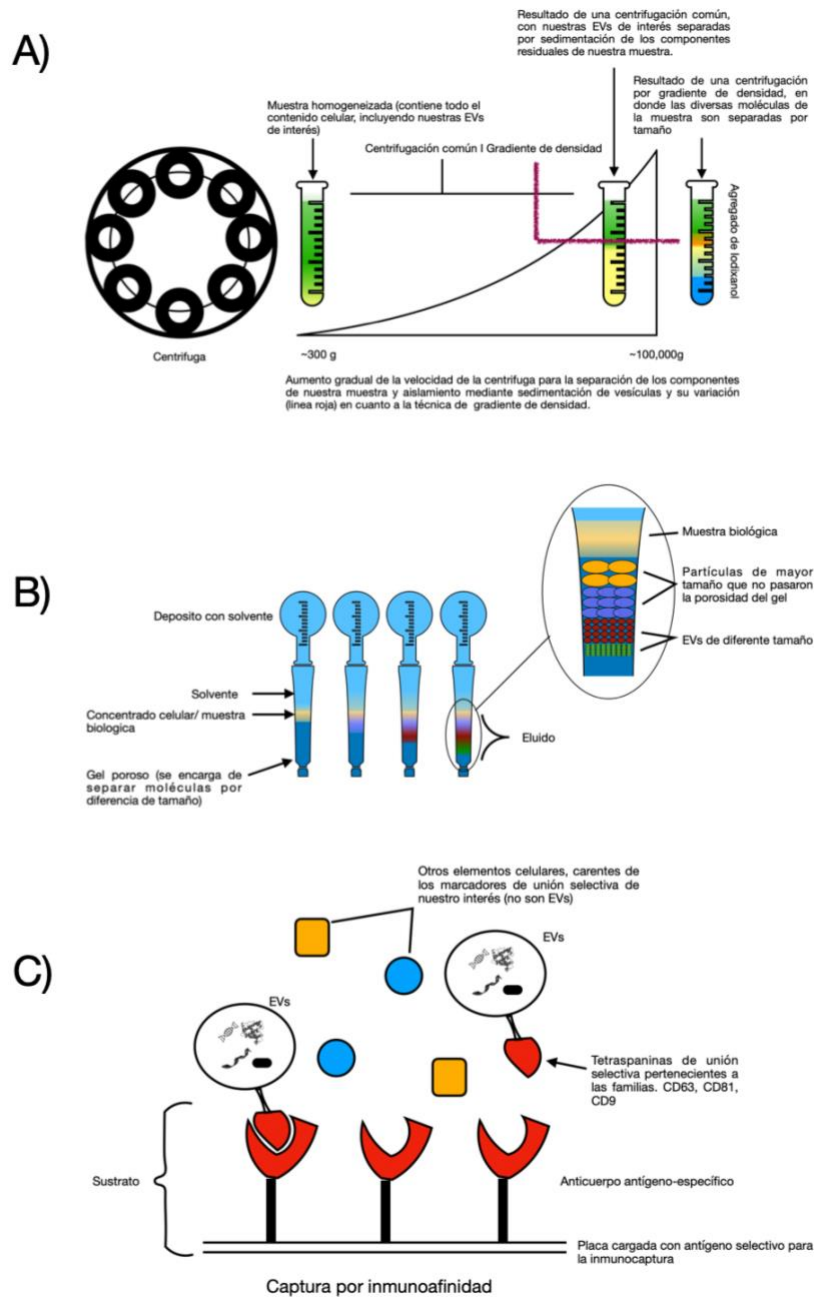


Figura 3. Esquemización de las diferentes formas de purificación de las EV's. A) Ultracentrifugación: Aumento gradual de velocidad en tubos de ensayo con muestra de interés, en donde la velocidad separará los componentes de la muestra homogénea por la diferencia de densidades que la componen, la línea roja del esquema representa la variación correspondiente a centrifugación con gradiente de densidad; B) Cromatografía por exclusión de tamaño: es una técnica que separa moléculas disueltas en una solución, dichas moléculas se irán separando en el gel poroso de acuerdo a su diferencia de tamaño; C) Captura por inmunoespecificidad: permite aislar poblaciones de EVs mediante la unión de tetraspaninas presentes en la superficie de las

EV's a anticuerpos específicos anclados en una placa precargada, resultando en el aislamiento específico de alta pureza de las EV's de nuestro interés.

Tabla 6, pruebas realizadas a EVs para su validación en usos terapéuticos (tabla basada en la bibliografía; 19, 216, 217, 218).

Prueba realizada	Propósito
Exclusión de tamaño	Permite separar las EVs de otro tipo de componentes moleculares que puedan contaminar nuestra muestra (19, 216, 218).
Captura por inmutuafinidad	Ayuda a separar las EVs viables para el proceso de inoculación farmacológica o modificación del contenido biológicamente activo (19, 218).
Métodos de precipitación ExoQuick	Permite aislar de manera cuantitativa las EVs de mayor rendimiento a partir de muestras relativamente pequeñas (19, 217).
Análisis de dispersión de luz dinámica	Determina la distribución de tamaño de la población de EV's mediante las fluctuaciones de intensidad de luz de las EV's en una solución. Dicho análisis complementa los estudios por exclusión de tamaños (19).
Análisis de seguimiento	Determina el tamaño y la concentración de EV's de acuerdo al seguimiento del movimiento browniano de las partículas en suspensión (19, 217).
Resonancia de plasmones superficiales	Ayuda a la detección de las interacciones moleculares que ocurren en una interfaz metal/dieléctrica para el análisis de la compatibilidad con moléculas de captura selectiva (19).

Una vez realizadas y superadas estas pruebas se puede pasar a la siguiente fase, que es la modificación de la vesícula para su uso en la clínica.

4.2. Validación o caracterización de EVs

Para validar el uso de EV's purificadas ya sea en la clínica o de manera experimental se deben realizar pruebas de control que verifiquen la presencia de los marcadores de unión selectiva en la superficie de la vesícula, así como la normalidad morfológica, funcional y de contenido molecular de la misma (219, 220).

Para las pruebas de marcadores de superficie se realizan dos protocolos.

Uno de los métodos empleados es Western blot: este encarga de detectar de manera selectiva marcadores superficiales de EV's por ejemplo moléculas pertenecientes a la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), sin embargo, si los marcadores de la vesícula de nuestro interés carecen de las

tetraspaninas antes mencionadas será necesaria la adición de un agente reductor al protocolo para la determinación de los marcadores internos de EVs, como por ejemplo, los componentes de los complejos ESCRT (TSG101, ALIX, etc.) u otros marcadores de la vía endosomal (221, 222).

Adicionalmente el uso de la técnica de Citometría de flujo para determinar las características morfológicas y la presencia de los marcadores moleculares en nuestra solución muestra, empero el análisis de moléculas pequeñas (50-150nm) resulta complicado por lo que es necesaria la modificación del protocolo, por ejemplo, el uso de fosfatidilserina con esferas magnéticas para el conteo de exosomas o las EV's de nuestro interés. En comparación con la técnica de western blot, la citometría de flujo tiene la ventaja de identificar marcadores específicos de la superficie celular mediante la tinción celular y así poder identificar enfermedades como el cáncer (223, 224).

Para el rastreo de nanopartículas se utiliza el equipo nanosight para determinar partículas de entre 10-1000 nm así como su concentración en una muestra suspendida (225, 226), mientras que la aplicación de técnicas de microscopía electrónica ayuda a determinar y validar la forma de la EV. (208)

5. Avances en la ingeniería o modificación artificial de EVs para su uso en terapia

La modificación o carga del contenido vesicular es un proceso que debe realizarse sobre las EV's aisladas y validadas obtenidas a partir de una línea celular cultivada. La carga farmacológica de las EVs puede realizarse durante la biogénesis de éstas o posterior al aislamiento de manera activa o pasiva. Debido a la versatilidad de las EVs podremos introducir fármacos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica, además de proteínas, ADN y RNA.

Para la carga terapéutica de las EVs existen diversos métodos eficaces para cargar a las vesículas. De manera general existe la carga vesicular exógena o directa y la carga vesicular endógena.

1. Carga exógena o directa. Se caracteriza por la carga de la vesícula en aislamiento, esta forma de carga se subdivide en dos categorías, la activa y la pasiva (201).

1.1.Carga activa: se utiliza la técnica de electroporación o la adición de un surfactante para generar un recambio del contenido de las EV's, en este caso la vesícula se encuentra rodeada de la sustancia que queremos introducir, después se incuba por un tiempo (depende de la sustancia de interés) para que la vesícula regrese a su estado de normalidad y finalmente se elimina el exceso residual de nuestra sustancia de interés que no pudo ser absorbida por la vesícula (figura 4, inciso A) (201, 227, 228). Otro método de carga activa es la sonicación en donde se utilizan EVs inmersas en la sustancia de interés y se hace el uso de ciclos de sonido para modificar las propiedades estructurales de la vesícula para introducir el fármaco sin dejar secuelas que comprometan su funcionamiento (figura 4, inciso C) (220, 227).

1.2. Carga pasiva: se realiza una incubación conjunta de la vesícula y la sustancia de interés, en donde se puede o no hacer el uso de una saponina para facilitar la absorción del compuesto (figura 4, inciso B) (201, 207).

También existen otras técnicas, como los ciclos de congelación y descongelación, y la técnica extrusión; sin embargo, de manera experimental y a pesar de que la vesícula tiende a aumentar de tamaño y por lo tanto a tener mayor capacidad de carga (en el caso específico de la técnica de congelación y descongelación), la eficacia en cuanto a la capacidad de entrega se ve diezmada en comparación a las técnicas mencionadas anteriormente, principalmente por las deformaciones que sufre la vesícula ocasionadas por la naturaleza de las técnicas en donde se limita la capacidad de movilidad por el tamaño o en el caso específico del uso de sonicación y métodos de extrusión se dan deformaciones morfológicas que no permiten el acoplamiento entre la vesícula y la célula receptora (201, 207).

Para optimizar la biodistribución de nuestras EV's de interés es necesario preparar la superficie vesicular con los marcadores moleculares de acoplamiento a nuestro órgano objetivo y con ello asegurar un mayor porcentaje de entrega de fármacos y/o de elementos biológicamente activos, además la aplicación de la técnica debe procurar el cuidado estructural tanto de la vesícula, como de la sustancia cargada en ella (201, 228, 229).

Para la preparación de la superficie vesicular existen dos métodos, las modificaciones covalentes, en donde se agregan moléculas a través una ciclo adición para generar nuevos enlaces químicos específicos entre la vesícula y la parte receptora (célula de interés) y las reacciones no covalentes en donde la interacción se va a dar mediante relaciones o cargas electroestáticas o inserciones hidrofóbicas (201, 229, 230).

2. Carga endógena: En este caso la célula de origen de nuestra vesícula incorpora la carga de interés antes de la liberación al medio extracelular, esto se logra mediante técnicas de ingeniería genética o mediante la transfección transitoria de las células donantes (figura 4, inciso D) (228, 229, 231).

En la aplicación clínica de las EVs es relevante la forma de administración de las vesículas. Diversos estudios han sugerido maneras de administración no invasivas como la administración oral, la cual presenta ventajas significativas en tumores de riesgo que se encuentran ubicados en órganos imprescindibles para la vida (cerebro, corazón, etc.) o de acceso limitado, sin embargo, en modelos experimentales también se ha descrito la efectividad en vías de administración intravenosa, la vía intratumoral e intraperitoneal, cuya ventaja principal es la acelerada reducción del tumor en un lapso menor de tiempo (196, 231, 232, 233).

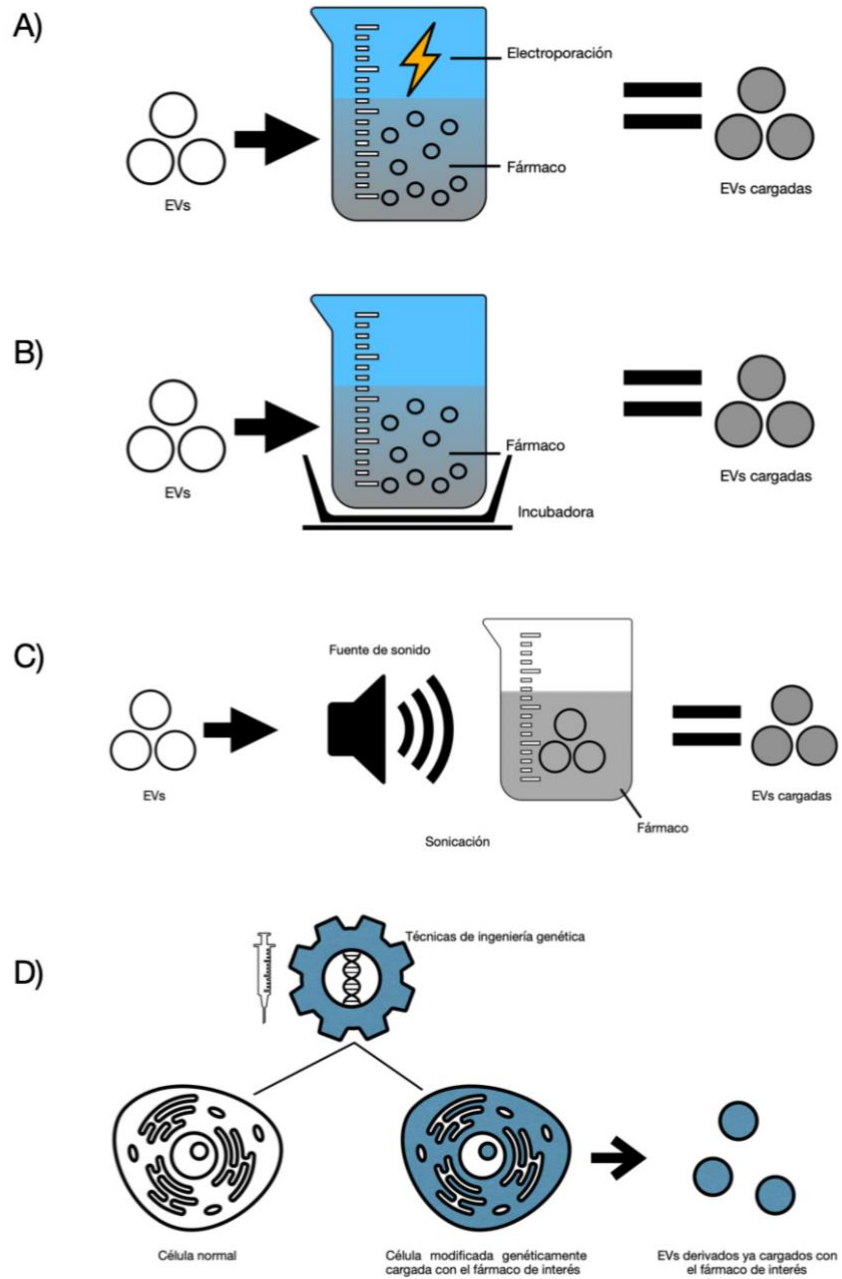


Figura 4. Representación esquemática de algunos de los métodos de carga o modificación artificial de las EVs; A) Electroporación: Mediante la aplicación de impulsos eléctricos las EVs permiten la entrada del material que las rodea (fármaco) y de esta manera quedan cargadas; B) Incubación: Incubación de EVs inmersas en el fármaco de interés, este tipo de carga es

perteneciente a la carga de EVs de forma pasiva; C) Sonicación: Uso de sonido mediante el cual las vibraciones permiten modificar de manera temporal las propiedades de la superficie de las EVs, dejando pasar libremente el fármaco y cargándolo en la EVs; D) Carga endógena: en la cual mediante técnicas de ingeniería genética se modifica la célula primordial para que las EVs emitidas ya estén cargadas con el fármaco de interés.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El estudio de las vesículas extracelulares ha demostrado ser un campo fértil de investigación que ha ido en auge en las últimas décadas, sobre todo por su potencial uso clínico y experimental para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Esta revisión engloba generalidades que abarcan desde su descubrimiento y funcionamiento, hasta técnicas actuales de purificación, uso de manera experimental y su potencial uso en la aplicación clínica. De manera aplicada se están llevando a cabo estudios de monitoreo de EVs en fluidos corporales para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer, y experimentalmente se han identificado las líneas celulares de las que derivan EV's presentes durante el desarrollo del cáncer así como durante su fase metastásica, principalmente en; cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hueso, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y sus tropismos, así mismo, se ha modificado el contenido vesicular en modelos animales con el fin de cargar fármacos como por ejemplo el paclitaxel y la doxorubicina para el tratamiento de cáncer de mama y cáncer cerebral (probado en embriones de peces cebra) o el metotrexato y la curcumina para glioblastoma en modelos murinos, también se ha experimentado con la modificación del contenido molecular de las EV's para bloquear o retrasar los procesos de proliferación del cáncer. Si bien los estudios son consistentes aún queda mucho por investigar, sobre todo en cuanto a las formas de obtención y modificación para hacer tratamientos asequibles y sin riesgos.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
2. Couch, Y., Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lötvall, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Théry, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. (2021). A brief history of nearly EV-everything - The rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 10(14), e12144. <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>

3. Wolf P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 13(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
4. Crawford N. (1971). The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *British journal of haematology*, 21(1), 53–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1971.tb03416.x>
5. Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D., & Ritter, T. (2015). Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(5), 812–823. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.44>
6. Tarasov, V. V., Svistunov, A. A., Chubarev, V. N., Dostdar, S. A., Sokolov, A. V., Brzecka, A., Sukocheva, O., Neganova, M. E., Klochkov, S. G., Somasundaram, S. G., Kirkland, C. E., & Aliev, G. (2021). Extracellular vesicles in cancer nanomedicine. *Seminars in cancer biology*, 69, 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.017>
7. Sedgwick, A. E., & D'Souza-Schorey, C. (2018). The biology of extracellular microvesicles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 19(5), 319–327. <https://doi.org/10.1111/tra.12558>
8. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
9. Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer cell*, 30(6), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>
10. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>

11. Urabe, F., Patil, K., Ramm, G. A., Ochiya, T., & Soekmadji, C. (2021). Extracellular vesicles in the development of organ-specific metastasis. *Journal of extracellular vesicles*, 10(9), e12125. <https://doi.org/10.1002/jev2.12125>
12. Bai, S., Wang, Z., Wang, M., Li, J., Wei, Y., Xu, R., & Du, J. (2022). Tumor-Derived Exosomes Modulate Primary Site Tumor Metastasis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 752818. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.752818>
13. International Society for Extracellular Vesicles, (2022), About the International Society for Extracellular Vesicles, ISEV, <https://isev.memberclicks.net/>
14. Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>
15. Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M. T., Molina, H., Martin, A. B., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C. M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., Wang, H., ... Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature cell biology*, 20(3), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>
16. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell biology*, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
17. Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 75(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
18. Li M. (2021). The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 26(5-6), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01667-z>
19. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9, 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>

20. Babst M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.008>
21. Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
22. Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology*, 19(2), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
23. Fourcade, O., Simon, M. F., Viodé, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournié, B., Sarda, L., & Chap, H. (1995). Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 80(6), 919–927. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90295-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90295-3)
24. Phan, T. K., Ozkocak, D. C., & Poon, I. K. H. (2020). Unleashing the therapeutic potential of apoptotic bodies. *Biochemical Society transactions*, 48(5), 2079–2088. <https://doi.org/10.1042/BST20200225>
25. García Garre Elisa, Luengo-Gil Ginés, de la Morena Barrios Pilar, Ayala de la Peña Francisco. (2016). Microvesículas en cáncer de mama, *Revista de Senología y Patología Mamaria- Journal of Breast Science*. Volumen 29, 125-131. DOI: 10.1016/j.senol.2016.06.005
26. van Genderen, H. O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., & Reutelingsperger, C. P. (2008). Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(6), 953–963. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.030>
27. van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
28. Feng, L., Vujicic, S., Dietrich, M. E., Litbarg, N., Setty, S., Antoni, A., Rauch, J., & Levine, J. S. (2018). Repeated exposure of epithelial cells to apoptotic cells induces the specific selection of an adaptive phenotype: Implications for tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, 293(26), 10245–10263. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001290>

29. Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7)
30. E. Miñambres García, M.López Hoyos. (2004). Apoptosis: implicaciones en Medicina Intensiva. *Medicina Intensiva*. Volumen. 28. Número. 6. 319-328. <https://www.medintensiva.org/es-apoptosis-implicaciones-medicina-intensiva-articulo-13065473>
31. Pérez Machado, J., & Lie Concepción, A. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay*, 18(2), 138-153. Recuperado de <http://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/572/965>
32. Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(5), 328–335. <https://doi.org/10.1038/nrm3335>
33. Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*, 126(Pt 24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
34. Hanson, P. I., & Cashikar, A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 337–362. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>
35. Ren, X., Kloer, D. P., Kim, Y. C., Ghirlando, R., Saidi, L. F., Hummer, G., & Hurley, J. H. (2009). Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Structure (London, England : 1993)*, 17(3), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.01.012>
36. Larios, J., Mercier, V., Roux, A., & Gruenberg, J. (2020). ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *The Journal of cell biology*, 219(3), e201904113. <https://doi.org/10.1083/jcb.201904113>
37. Han, Q. F., Li, W. J., Hu, K. S., Gao, J., Zhai, W. L., Yang, J. H., & Zhang, S. J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular cancer*, 21(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
38. Edgar, J. R., Eden, E. R., & Futter, C. E. (2014). Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 15(2), 197–211. <https://doi.org/10.1111/tra.12139>

39. Taylor, J., & Bebawy, M. (2019). Proteins Regulating Microvesicle Biogenesis and Multidrug Resistance in Cancer. *Proteomics*, 19(1-2), e1800165. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800165>
40. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological reviews*, 83(3), 731–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
41. Daleke D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of lipid research*, 44(2), 233–242. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200019-JLR200>
42. Daleke D. L. (2007). Phospholipid flippases. *The Journal of biological chemistry*, 282(2), 821–825. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600035200>
43. Williamson P. (2016). Phospholipid Scramblases. *Lipid insights*, 8(Suppl 1), 41–44. <https://doi.org/10.4137/LPI.S31785>
44. Gurunathan, S., Kang, M. H., Qasim, M., Khan, K., & Kim, J. H. (2021). Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. *International journal of nanomedicine*, 16, 3357–3383. <https://doi.org/10.2147/IJN.S310357>
45. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487–1495. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>
46. Delgado Coello Blanca Alicia, (2016), La Asimetría de la Membrana Plasmática y se Relevancia para la Célula. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 35(4):97-101, <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2016/reb164b.pdf>
47. Valenti, R., Huber, V., Iero, M., Filipazzi, P., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2007). Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer research*, 67(7), 2912–2915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0520>
48. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22–27.
49. Schlienger, S., Campbell, S., & Claing, A. (2014). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Molecular biology of the cell*, 25(1), 17–29. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0335>

50. Atkin-Smith, G. K., & Poon, I. K. H. (2017). Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends in cell biology*, 27(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.011>
51. Caruso, S., & Poon, I. K. H. (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Frontiers in immunology*, 9, 1486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01486>
52. Pazo Cid, R. A., Álvarez Alejandro, M., Cebollero de Miguel, A., Agustín, M. J., Martínez Lostao, L., Anel Bernal, A., Pérez Gracia, J. L., Antón Torres, A. (2012), Apoptosis. *Cáncer & Co, REGIO. Revista Internacional de Grupos en Investigación en Oncología*, Vol.1.Núm1. 23-28, <https://www.elsevier.es/es-revista-regio-revista-internacional-grupos-investigacion-339-articulo-apoptosis-cancer-co-X225364501243094X>
53. Almasan, A., & Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine & growth factor reviews*, 14(3-4), 337–348. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(03\)00029-7](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(03)00029-7)
54. Labi, V., Grespi, F., Baumgartner, F., & Villunger, A. (2008). Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy?. *Cell death and differentiation*, 15(6), 977–987. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.37>
55. Peitsch, M. C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H. R., Mannherz, H. G., & Tschopp, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *The EMBO journal*, 12(1), 371–377. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05666.x>
56. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
57. Pathan, M., Fonseka, P., Chitti, S. V., Kang, T., Sanwlani, R., Van Deun, J., Hendrix, A., & Mathivanan, S. (2019). Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic acids research*, 47(D1), D516–D519. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1029>
58. Tesselaar, M. E., Romijn, F. P., Van Der Linden, I. K., Prins, F. A., Bertina, R. M., & Osanto, S. (2007). Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 5(3), 520–527. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x>

59. Nomura, S., Niki, M., Nisizawa, T., Tamaki, T., & Shimizu, M. (2015). Microparticles as Biomarkers of Blood Coagulation in Cancer. *Biomarkers in cancer*, 7, 51–56. <https://doi.org/10.4137/BIC.S30347>
60. Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., & Johns, T. G. (2013). The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *The FEBS journal*, 280(21), 5350–5370. <https://doi.org/10.1111/febs.12393>
61. Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews. Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
62. Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, 73(10), 1907–1920. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
63. Maji, S., Chaudhary, P., Akopova, I., Nguyen, P. M., Hare, R. J., Gryczynski, I., & Vishwanatha, J. K. (2017). Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis. *Molecular cancer research : MCR*, 15(1), 93–105. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0163>
64. Rong, L., Li, R., Li, S., & Luo, R. (2016). Immunosuppression of breast cancer cells mediated by transforming growth factor- β in exosomes from cancer cells. *Oncology letters*, 11(1), 500–504. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3841>
65. Gonzalez-King, H., García, N. A., Ontoria-Oviedo, I., Ciria, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2017). Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(7), 1747–1759. <https://doi.org/10.1002/stem.2618>
66. Choi, D. S., Park, J. O., Jang, S. C., Yoon, Y. J., Jung, J. W., Choi, D. Y., Kim, J. W., Kang, J. S., Park, J., Hwang, D., Lee, K. H., Park, S. H., Kim, Y. K., Desiderio, D. M., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2011). Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics*, 11(13), 2745–2751. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100022>
67. Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr, Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>

68. Giusti, I., Delle Monache, S., Di Francesco, M., Sanità, P., D'Ascenzo, S., Gravina, G. L., Festuccia, C., & Dolo, V. (2016). From glioblastoma to endothelial cells through extracellular vesicles: messages for angiogenesis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 12743–12753. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5165-0>
69. Wilson, C. M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., & Jauberteau, M. O. (2014). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *Journal of cell science*, 127(Pt 18), 3983–3997. <https://doi.org/10.1242/jcs.149336>
70. Reddy, V. S., Madala, S. K., Trinath, J., & Reddy, G. B. (2018). Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function. *Cell stress & chaperones*, 23(3), 441–454. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0856-z>
71. Wyciszkievicz, A., Kalinowska-Lyszczarz, A., Nowakowski, B., Kaźmierczak, K., Osztynowicz, K., & Michalak, S. (2019). Expression of small heat shock proteins in exosomes from patients with gynecologic cancers. *Scientific reports*, 9(1), 9817. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46221-9>
72. Wang, J., De Veirman, K., Faict, S., Frassanito, M. A., Ribatti, D., Vacca, A., & Menu, E. (2016). Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *The Journal of pathology*, 239(2), 162–173. <https://doi.org/10.1002/path.4712>
73. Chan, Y. K., Zhang, H., Liu, P., Tsao, S. W., Lung, M. L., Mak, N. K., Ngok-Shun Wong, R., & Ying-Kit Yue, P. (2015). Proteomic analysis of exosomes from nasopharyngeal carcinoma cell identifies intercellular transfer of angiogenic proteins. *International journal of cancer*, 137(8), 1830–1841. <https://doi.org/10.1002/ijc.29562>
74. You, Y., Shan, Y., Chen, J., Yue, H., You, B., Shi, S., Li, X., & Cao, X. (2015). Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Cancer science*, 106(12), 1669–1677. <https://doi.org/10.1111/cas.12818>
75. You, B., Cao, X., Shao, X., Ni, H., Shi, S., Shan, Y., Gu, Z., & You, Y. (2016). Clinical and biological significance of HAX-1 overexpression in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 7(11), 12505–12524. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7274>
76. Göran Ronquist K. (2019). Extracellular vesicles and energy metabolism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 488, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.044>

77. Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M. L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., & Fais, S. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS one*, 4(4), e5219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005219>
78. Thompson, C. A., Purushothaman, A., Ramani, V. C., Vlodayky, I., & Sanderson, R. D. (2013). Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *The Journal of biological chemistry*, 288(14), 10093–10099. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.444562>
79. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., & Fais, S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), 34211–34222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>
80. Yuyama, K., Yamamoto, N., & Yanagisawa, K. (2008). Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *Journal of neurochemistry*, 105(1), 217–224. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05128.x>
81. Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of lipid research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>
82. Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2016). Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 81, 275–280. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030932>
83. Beckham, C. J., Olsen, J., Yin, P. N., Wu, C. H., Ting, H. J., Hagen, F. K., Scosyrev, E., Messing, E. M., & Lee, Y. F. (2014). Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Del1 and facilitate cancer progression. *The Journal of urology*, 192(2), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.02.035>
84. Cappellesso, R., Tinazzi, A., Giurici, T., Simonato, F., Guzzardo, V., Ventura, L., Crescenzi, M., Chiarelli, S., & Fassina, A. (2014). Programmed cell death 4 and microRNA 21 inverse expression is maintained in cells and exosomes from ovarian serous carcinoma effusions. *Cancer cytopathology*, 122(9), 685–693. <https://doi.org/10.1002/cncy.21442>

85. Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8(4), 220–232. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
86. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., & D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of cell science*, 123(Pt 10), 1603–1611. <https://doi.org/10.1242/jcs.064386>
87. Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., Hood, L., & Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *The Prostate*, 56(2), 150–161. <https://doi.org/10.1002/pros.10255>
88. Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugière, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*, 52(12), 1690–1697. <https://doi.org/10.1136/gut.52.12.1690>
89. Banfi, C., Brioschi, M., Wait, R., Begum, S., Gianazza, E., Pirillo, A., Mussoni, L., & Tremoli, E. (2005). Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics*, 5(17), 4443–4455. <https://doi.org/10.1002/pmic.200402017>
90. Hegmans, J. P., Bard, M. P., Hemmes, A., Luider, T. M., Kleijmeer, M. J., Prins, J. B., Zitvogel, L., Burgers, S. A., Hoogsteden, H. C., & Lambrecht, B. N. (2004). Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *The American journal of pathology*, 164(5), 1807–1815. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63739-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63739-X)
91. Jin, M., Drwal, G., Bourgeois, T., Saltz, J., & Wu, H. M. (2005). Distinct proteome features of plasma microparticles. *Proteomics*, 5(7), 940–1952. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401057>
92. Pisitkun, T., Shen, R. F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
93. Garcia, B. A., Smalley, D. M., Cho, H., Shabanowitz, J., Ley, K., & Hunt, D. F. (2005). The platelet microparticle proteome. *Journal of proteome research*, 4(5), 1516–1521. <https://doi.org/10.1021/pr0500760>
94. Miguet, L., Pacaud, K., Felden, C., Hugel, B., Martinez, M. C., Freyssinet, J. M., Herbrecht, R., Potier, N., van Dorsselaer, A., & Mauvieux, L. (2006). Proteomic analysis of malignant lymphocyte

- membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics*, 6(1), 153–171. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500133>
95. Mears, R., Craven, R. A., Hanrahan, S., Totty, N., Upton, C., Young, S. L., Patel, P., Selby, P. J., & Banks, R. E. (2004). Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(12), 4019–4031. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400876>
96. Angelucci, A., D'Ascenzo, S., Festuccia, C., Gravina, G. L., Bologna, M., Dolo, V., & Pavan, A. (2000). Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clinical & experimental metastasis*, 18(2), 163–170. <https://doi.org/10.1023/a:1006778000173>
97. Ginestra, A., La Placa, M. D., Saladino, F., Cassarà, D., Nagase, H., & Vittorelli, M. L. (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer research*, 18(5A), 3433–3437.
98. Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., Ratajczak, M. Z., & Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 55(7), 808–818. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0075-9>
99. Kim, C. W., Lee, H. M., Lee, T. H., Kang, C., Kleinman, H. K., & Gho, Y. S. (2002). Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer research*, 62(21), 6312–6317.
100. Dolo, V., Ginestra, A., Cassarà, D., Violini, S., Lucania, G., Torrisi, M. R., Nagase, H., Canevari, S., Pavan, A., & Vittorelli, M. L. (1998). Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer research*, 58(19), 4468–4474.
101. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current biology : CB*, 19(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>
102. Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K., & Keski-Oja, J. (2008). Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *Journal of cellular biochemistry*, 105(5), 1211–1218. <https://doi.org/10.1002/jcb.21923>

103. Giusti, I., D'Ascenzo, S., Millimaggi, D., Taraboletti, G., Carta, G., Franceschini, N., Pavan, A., & Dolo, V. (2008). Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 10(5), 481–488. <https://doi.org/10.1593/neo.08178>
104. Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Giusti, I., Marchetti, D., Borsotti, P., Millimaggi, D., Giavazzi, R., Pavan, A., & Dolo, V. (2006). Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 8(2), 96–103. <https://doi.org/10.1593/neo.05583>
105. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*, 10(5), 619–624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>
106. Anido, J., Scaltriti, M., Bech Serra, J. J., Santiago Josefatz, B., Todo, F. R., Baselga, J., & Arribas, J. (2006). Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *The EMBO journal*, 25(13), 3234–3244. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601191>
107. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., & Fais, S. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine*, 195(10), 1303–1316. <https://doi.org/10.1084/jem.20011624>
108. Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregini, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128(7), 1796–1804. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.045>
109. Ardila-Osorio, H., Clause, B., Mishal, Z., Wiels, J., Tursz, T., & Busson, P. (1999). Evidence of LMP1-TRAF3 interactions in glycosphingolipid-rich complexes of lymphoblastoid and nasopharyngeal carcinoma cells. *International journal of cancer*, 81(4), 645–649. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990517\)81:4<645::aid-ijc22>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990517)81:4<645::aid-ijc22>3.0.co;2-0)
110. Millimaggi, D., Mari, M., D'Ascenzo, S., Carosa, E., Jannini, E. A., Zucker, S., Carta, G., Pavan, A., & Dolo, V. (2007). Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 9(4), 349–357. <https://doi.org/10.1593/neo.07133>

111. Zwicker, J. I., Liebman, H. A., Neuberg, D., Lacroix, R., Bauer, K. A., Furie, B. C., & Furie, B. (2009). Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(22), 6830–6840. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0371>
112. Paluch, E., Piel, M., Prost, J., Bornens, M., & Sykes, C. (2005). Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophysical journal*, 89(1), 724–733. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.060590>
113. McConnell, R. E., Higginbotham, J. N., Shifrin, D. A., Jr, Tabb, D. L., Coffey, R. J., & Tyska, M. J. (2009). The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *The Journal of cell biology*, 185(7), 1285–1298. <https://doi.org/10.1083/jcb.200902147>
114. Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., & Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *The Journal of biological chemistry*, 278(13), 10963–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200>
115. Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., & Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American journal of pathology*, 160(2), 673–680. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64887-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64887-0)
116. Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology*, 81(10), 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.02.011>
117. Bott, A., Erdem, N., Lerrer, S., Hotz-Wagenblatt, A., Breunig, C., Abnaof, K., Wörner, A., Wilhelm, H., Münstermann, E., Ben-Baruch, A., & Wiemann, S. (2017). miRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A. *Oncotarget*, 8(27), 43897–43914. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14915>
118. Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., & Aguayo-González, A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70. Recuperado en 04 de agosto de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000100008&lng=es&tlng=es.

119. Organización mundial de la salud, (2 de febrero 2022), Cancer, recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
120. Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology*, 5(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>
121. Ortiz-Quintero B. (2020). Extracellular MicroRNAs as Intercellular Mediators and Noninvasive Biomarkers of Cancer. *Cancers*, 12(11), 3455. <https://doi.org/10.3390/cancers12113455>
122. Wiklander, O. P., Nordin, J. Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Smith, C. I., Le Blanc, K., Macchiarini, P., Jungebluth, P., Wood, M. J., & Andaloussi, S. E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 26316. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26316>
123. Galluzzi, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2012). Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*, 1(5), 699–716. <https://doi.org/10.4161/onci.20696>
124. Wang, J., Lin, D., Peng, H., Shao, J., & Gu, J. (2014). Cancer-derived immunoglobulin G promotes LPS-induced proinflammatory cytokine production via binding to TLR4 in cervical cancer cells. *Oncotarget*, 5(20), 9727–9743. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2359>
125. He, W., Liu, Q., Wang, L., Chen, W., Li, N., & Cao, X. (2007). TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular immunology*, 44(11), 2850–2859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.01.022>
126. Kreeger, P. K., & Lauffenburger, D. A. (2010). Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, 31(1), 2–8. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp261>
127. Michor, F., Liphardt, J., Ferrari, M., & Widom, J. (2011). What does physics have to do with cancer?. *Nature reviews. Cancer*, 11(9), 657–670. <https://doi.org/10.1038/nrc3092>
128. Zúñiga Cerón, L. F., Freyre Bernal, S. I., Navia Amézquita, C. A. y Saavedra Torres, J. S. (2014). Adhesión celular: el ensamblaje de la vía al cáncer. *Morfología*, 6(2). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/morfologia/article/view/46048>

129. Civetta, María Teresa Martín de, & Civetta, Julio Domingo. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53(5), 405-414. Recuperado en 30 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342011000500008&lng=es&tlng=es.
130. Rosero G, Carol Yovanna, Corredor, Mauricio, & Mejía O, Lizeth. (2016). Polimorfismos en genes implicados en el desarrollo de cáncer gástrico: revisión. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 31(4), 391-402. Retrieved September 30, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572016000400009&lng=en&tlng=es.
131. Rodríguez F, Lourdes, Jurado L, Francisco, Reyes E, Jorge Alberto. (2000). La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral/ Proteolysis in the invasion and metastases of tumoral cell. *Rev.Inst.Nac.Cancerol.(Méx)*; 46(1):33-46. Recuperado de, <https://www.medigraphic.com/pdfs/cancer/ca-2000/ca001f.pdf>
132. Deng, Z., Rong, Y., Teng, Y., Zhuang, X., Samykutty, A., Mu, J., Zhang, L., Cao, P., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H. G. (2017). Exosomes miR-126a released from MDSC induced by DOX treatment promotes lung metastasis. *Oncogene*, 36(5), 639–651. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.229>
133. National Human Genome Research Institute, (2022), Oncogén, recuperado de, <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Oncogen>
134. Massagué, J., & Ganesh, K. (2021). Metastasis-Initiating Cells and Ecosystems. *Cancer discovery*, 11(4), 971–994. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0010>
135. Díaz-Peromingo, J. A., Sánchez-Leira, J., García-Suárez, M. F., Molinos-Castro, S., Pesqueira-Fontán, P., & Gayol-Fernández, M. C. (2009). ¿Metastasis tardía, tumor latente o ambas cosas? *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 97–100. doi:10.1016/s0304-4858(09)74659-1
136. Instituto Nacional del Cáncer, (octubre 2023). Gen HRAS. Recuperado de, <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/gen-hras>
137. Alberts.B. (2010). Capitulo 20, Cancer. *Biología Molecular de la Celula* (5ta. Edición), editorial Omega, pp. 1205-1269
138. Peinado, M. Á. (1996). *Genes supresores en el desarrollo del cáncer*. Barcelona

139. Chulpanova, D. S., Pukhalskaia, T. V., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2022). Contribution of Tumor-Derived Extracellular Vesicles to Malignant Transformation of Normal Cells. *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 9(6), 245. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9060245>
140. Chennakrishnaiah, S., Tsering, T., Gregory, C., Tawil, N., Spinelli, C., Montermini, L., Karatzas, N., Aprikian, S., Choi, D., Klewes, L., Mai, S., & Rak, J. (2020). Extracellular vesicles from genetically unstable, oncogene-driven cancer cells trigger micronuclei formation in endothelial cells. *Scientific reports*, 10(1), 8532. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65640-7>
141. Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
142. Instituto Nacional del Cáncer, (septiembre 2022), Angiogénesis, recuperado de, <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/angiogenesis>
143. Shchor, K., & Evan, G. (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer?. *Cancer research*, 67(15), 7059–7061. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2053>
144. Hsu, Y. L., Hung, J. Y., Chang, W. A., Lin, Y. S., Pan, Y. C., Tsai, P. H., Wu, C. Y., & Kuo, P. L. (2017). Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*, 36(34), 4929–4942. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.105>
145. Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., & Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7312–7317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110>
146. Li, J., Yuan, H., Xu, H., Zhao, H., & Xiong, N. (2020). Hypoxic Cancer-Secreted Exosomal miR-182-5p Promotes Glioblastoma Angiogenesis by Targeting Kruppel-like Factor 2 and 4. *Molecular cancer research : MCR*, 18(8), 1218–1231. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0725>
147. Huang, M., Lei, Y., Zhong, Y., Chung, C., Wang, M., Hu, M., & Deng, L. (2021). New Insights Into the Regulatory Roles of Extracellular Vesicles in Tumor Angiogenesis and Their Clinical Implications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 791882. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.791882>

148. Arroyo-Campuzano, M., & Zazueta, C. (2021). Trascendencia de los exosomas en la cardiología: heraldos de la cardioprotección [Significance of exosomes in cardiology: heralds of cardioprotection]. *Archivos de cardiología de Mexico*, 91(1), 105–113. <https://doi.org/10.24875/ACM.20000335>
149. Olejarz, W., Kubiak-Tomaszewska, G., Chrzanowska, A., & Lorenc, T. (2020). Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5840. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165840>
150. Jones, R. J., Chen, Q., Voorhees, P. M., Young, K. H., Bruey-Sedano, N., Yang, D., & Orłowski, R. Z. (2008). Inhibition of the p53 E3 ligase HDM-2 induces apoptosis and DNA damage--independent p53 phosphorylation in mantle cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(17), 5416–5425. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0150>
151. Cha, D. J., Franklin, J. L., Dou, Y., Liu, Q., Higginbotham, J. N., Demory Beckler, M., Weaver, A. M., Vickers, K., Prasad, N., Levy, S., Zhang, B., Coffey, R. J., & Patton, J. G. (2015). KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *eLife*, 4, e07197. <https://doi.org/10.7554/eLife.07197>
152. Zhang, S., Carlsen, L., Hernandez Borrero, L., Seyhan, A. A., Tian, X., & El-Deiry, W. S. (2022). Advanced Strategies for Therapeutic Targeting of Wild-Type and Mutant p53 in Cancer. *Biomolecules*, 12(4), 548. <https://doi.org/10.3390/biom12040548>
153. Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C. E., & Madrid-Marina, V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas [Regulation of the cell cycle and the development of cancer: therapeutic prospects]. *Salud publica de Mexico*, 39(5), 451–462.
154. Wang S. E. (2020). Extracellular Vesicles and Metastasis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(7), a037275. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037275>
155. Tominaga, N., Kosaka, N., Ono, M., Katsuda, T., Yoshioka, Y., Tamura, K., Lötvall, J., Nakagama, H., & Ochiya, T. (2015). Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nature communications*, 6, 6716. <https://doi.org/10.1038/ncomms7716>
156. Danø, K., Andreasen, P. A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S., & Skriver, L. (1985). Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Advances in cancer research*, 44, 139–266. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60028-7](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60028-7)

157. Osuala, K. O., Ji, K., Mattingly, R. R., & Sloane, B. F. (2019). Breast Cancer: Proteolysis and Migration. *Advances in experimental medicine and biology*, 1152, 401–411. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_21
158. Rodríguez Fragoso L. Jurado-León Francisco R, Reyes-Esparza Jorge A. (2000), La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral, *Rev. Inst. Nac. Cancerol. (Mex)* recuperado en (2022), <https://www.medigraphic.com/pdfs/cancer/ca-2000/ca001f.pdf>
159. Sanderson, R. D., Bandari, S. K., & Vlodavsky, I. (2019). Proteases and glycosidases on the surface of exosomes: Newly discovered mechanisms for extracellular remodeling. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 75-76, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.007>
160. Shimoda, M., & Khokha, R. (2017). Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1864(11 Pt A), 1989–2000. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.027>
161. Amor López, A., Mazariegos, M. S., Capuano, A., Ximénez-Embún, P., Hergueta-Redondo, M., Recio, J. Á., Muñoz, E., Al-Shahrour, F., Muñoz, J., Megías, D., Doliana, R., Spessotto, P., & Peinado, H. (2021). Inactivation of EMILIN-1 by Proteolysis and Secretion in Small Extracellular Vesicles Favors Melanoma Progression and Metastasis. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7406. <https://doi.org/10.3390/ijms22147406>
162. Janiszewska, M., Primi, M. C., & Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of biological chemistry*, 295(8), 2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007759>
163. Cui, M., Huang, J., Zhang, S., Liu, Q., Liao, Q., & Qiu, X. (2021). Immunoglobulin Expression in Cancer Cells and Its Critical Roles in Tumorigenesis. *Frontiers in immunology*, 12, 613530. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.613530>
164. Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., & Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392(6672), 190–193. <https://doi.org/10.1038/32433>
165. Maravillas-Montero, J. L., & Martínez-Cortés, I. (2017). Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas [Regulation

- of immune responses by exosomes derived from antigen presenting cells]. *Revista alergía Mexico* (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993), 64(4), 463–476. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.285>
166. Chaput, N., & Théry, C. (2011). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in immunopathology*, 33(5), 419–440. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0233-9>
167. Jerez, S., Araya, H., Hevia, D., Irrarrázaval, C. E., Thaler, R., van Wijnen, A. J., & Galindo, M. (2019). Extracellular vesicles from osteosarcoma cell lines contain miRNAs associated with cell adhesion and apoptosis. *Gene*, 710, 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.005>
168. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., ... 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>
169. Croset, M., & Clézardin, P. (2015). Chapter 41-MicroRNA-mediated regulation of bone metastasis formation: from primary tumors to skeleton. In Elsevier eBooks (pp. 479–489). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416721-6.00041-8>
170. Tavazoie, S. F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P. D., Gerald, W. L., & Massagué, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 451(7175), 147–152. <https://doi.org/10.1038/nature06487>
171. Peng, X., Guo, W., Liu, T., Wang, X., Tu, X., Xiong, D., Chen, S., Lai, Y., Du, H., Chen, G., Liu, G., Tang, Y., Huang, S., & Zou, X. (2011). Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PloS one*, 6(5), e20341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020341>
172. Huang, Q., Gumireddy, K., Schrier, M., le Sage, C., Nagel, R., Nair, S., Egan, D. A., Li, A., Huang, G., Klein-Szanto, A. J., Gimotty, P. A., Katsaros, D., Coukos, G., Zhang, L., Puré, E., & Agami, R. (2008). The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nature cell biology*, 10(2), 202–210. <https://doi.org/10.1038/ncb1681>
173. Saini, S., Majid, S., Yamamura, S., Tabatabai, L., Suh, S. O., Shahryari, V., Chen, Y., Deng, G., Tanaka, Y., & Dahiya, R. (2011). Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and

Metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(16), 5287–5298. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2619>

174. Liu, S., Goldstein, R. H., Scepanky, E. M., & Rosenblatt, M. (2009). Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Cancer research*, 69(22), 8742–8751. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1541>
175. Liu, C., Kelnar, K., Liu, B., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Li, H., Patrawala, L., Yan, H., Jeter, C., Honorio, S., Wiggins, J. F., Bader, A. G., Fagin, R., Brown, D., & Tang, D. G. (2011). The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nature medicine*, 17(2), 211–215. <https://doi.org/10.1038/nm.2284>
176. Instituto Nacional del Cáncer, (noviembre 2022), Metástasis, recuperado de, <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/metastasis>
177. Bai, S., Wei, Y., Liu, R., Xu, R., Xiang, L., & Du, J. (2022). Role of tumour-derived exosomes in metastasis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 147, 112657. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112657>
178. Bogenrieder, T., & Herlyn, M. (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 22(42), 6524–6536. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206757>
179. Vicent, S., Luis-Ravelo, D., Antón, I., Hernández, I., Martínez, S., Rivas, J. de las, Gúrpide, A., & Lecanda, F.. (2006). Las metástasis óseas del cáncer. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 29(2), 177-187. Recuperado en 24 de noviembre de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000300002&lng=es&tlng=es.
180. J.Hernández Calvo, D.Padilla, G.Ortega, JM.Ramia, R.Pardo, J.Martín, A.López, T.Cubo, (2000) *Biología molecular del proceso metastásico del cáncer colorrectal*, *Cirugía Española*, Vol.68. Núm.6. recuperado de. <https://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-biologia-molecular-del-proceso-metastasisico-13887>
181. Schwartz M. K. (1995). Tissue cathepsins as tumor markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 237(1-2), 67–78. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06065-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)06065-1)
182. Hirano, T., & Takeuchi, S. (1994). Serum cathepsin-B levels and urinary-excretion of cathepsin-B in the patients with colorectal-cancer - possible indicators for tumor malignancy. *International journal of oncology*, 4(1), 151–153. <https://doi.org/10.3892/ijo.4.1.151>

183. Khan, A., Krishna, M., Baker, S. P., & Banner, B. F. (1998). Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(8), 704–708.
184. Téllez-Ávila, Félix Ignacio, & García-Osogobio, Sandra Minerva. (2005). El antígeno carcinoembrionario: a propósito de un viejo conocido. *Revista de investigación clínica*, 57(6), 814–819. Recuperado en 14 de diciembre de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000600007&lng=es&tlng=es.
185. O'Hanlon, D. M., Fitzsimons, H., Lynch, J., Tormey, S., Malone, C., & Given, H. F. (2002). Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 38(17), 2252–2257. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)00218-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00218-6)
186. Kitayama, J., Tsuno, N., Sunami, E., Osada, T., Muto, T., & Nagawa, H. (2000). E-selectin can mediate the arrest type of adhesion of colon cancer cells under physiological shear flow. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 36(1), 121–127. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(99\)00228-2](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00228-2)
187. Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2016). Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicalscience*, 10, 617. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.617>
188. Solís-Martínez, R., Hernández-Flores, G., Ochoa-Carrillo, F. J., Ortiz-Lazareno, P., & Bravo-Cuellar, A. (2015). Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.03.001>
189. Carrillo Ochoa Francisco J. Bravo-Cuellar A., (2015), Los macrófagos, ángeles o demonios, Instituto Nacional de Cancerología, Vol.12. Núm.1. pp.1-3, recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-los-macrofagos-angeles-o-demonios-X1665920113933087>
190. Rovira, J., Diekmann, F., Campistol, J. M., & Ramírez-Bajo, M. J. (2017). Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica. *Nefrología : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*, 37(2), 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2016.04.006>

191. Navarro G., Cabral P., Malanga A., & Savio E. (2008). Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 37(2), 212-223. Retrieved January 17, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182008000200009&lng=en&tlng=es.
192. Man, F., Gawne, P. J., & T M de Rosales, R. (2019). Nuclear imaging of liposomal drug delivery systems: A critical review of radiolabelling methods and applications in nanomedicine. *Advanced drug delivery reviews*, 143, 134–160. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.012>
193. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>
194. Zhu, Q., Ling, X., Yang, Y., Zhang, J., Li, Q., Niu, X., Hu, G., Chen, B., Li, H., Wang, Y., & Deng, Z. (2019). Embryonic Stem Cells-Derived Exosomes Endowed with Targeting Properties as Chemotherapeutics Delivery Vehicles for Glioblastoma Therapy. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 6(6), 1801899. <https://doi.org/10.1002/advs.201801899>
195. Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R. C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., Miller, D., & Zhang, H. G. (2011). Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(10), 1769–1779. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.164>
196. Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J., & Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383–2390. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>
197. Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., Yin, V. P., Lockman, P., & Bai, S. (2015). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharmaceutical research*, 32(6), 2003–2014. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1593-y>
198. 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 : official journal of the Controlled Release Society, 192, 262–270.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.042>

199. Lv, L. H., Wan, Y. L., Lin, Y., Zhang, W., Yang, M., Li, G. L., Lin, H. M., Shang, C. Z., Chen, Y. J., & Min, J. (2012). Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 287(19), 15874–15885.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340588>
200. 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., & Batrakova, 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>
201. Stavrou, A., & Ortiz, A. (2022). Extracellular Vesicles: A Novel Tool in Nanomedicine and Cancer Treatment. *Cancers*, 14(18), 4450. <https://doi.org/10.3390/cancers14184450>
202. Sarmiento-Rubiano Luz A. (2015). Antígenos asociados a tumores y su potencial uso en el tratamiento del cáncer. *Revista Salud Uninorte*, 31(1), 118-137. Retrieved February 11, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522015000100013&lng=en&tlng=es.
203. André, F., Chaput, N., Scharz, N. E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D. H., Tursz, T., Amigorena, S., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(4), 2126–2136. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2126>
204. Pitt, J. M., André, F., Amigorena, S., Soria, J. C., Eggermont, A., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2016). Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1224–1232. <https://doi.org/10.1172/JCI81137>
205. Fu, W., Lei, C., Liu, S., Cui, Y., Wang, C., Qian, K., Li, T., Shen, Y., Fan, X., Lin, F., Ding, M., Pan, M., Ye, X., Yang, Y., & Hu, S. (2019). CAR exosomes derived from effector CAR-T cells have potent antitumour effects and low toxicity. *Nature communications*, 10(1), 4355.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12321-3>

206. Caponnetto, F., Manini, I., Skrap, M., Palmari-Pallag, T., Di Loreto, C., Beltrami, A. P., Cesselli, D., & Ferrari, E. (2017). Size-dependent cellular uptake of exosomes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 13(3), 1011–1020. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.12.009>
207. Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 207, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>
208. Orozco-Romero, María de J., Borja-Urby R., Ponce-Castañeda M.V., & Durán-Figueroa, Noé V. (2016). Aislamiento y caracterización celular de exosomas de plasma para su uso como biomarcadores de diagnóstico. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 50(4), 783-790. Recuperado en 11 de febrero de 2023, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572016000400026&lng=es&tlng=es.
209. Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., & Théry, C. (2012). Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of extracellular vesicles*, 1, 10.3402/jev.v1i0.18397. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397>
210. Iwai, K., Yamamoto, S., Yoshida, M., & Shiba, K. (2017). Isolation of Extracellular Vesicles in Saliva Using Density Gradient Ultracentrifugation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1660, 343–350. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_27
211. Iwai, K., Minamisawa, T., Suga, K., Yajima, Y., & Shiba, K. (2016). Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. *Journal of extracellular vesicles*, 5, 30829. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.30829>
212. Zhang, Z., Wang, C., Li, T., Liu, Z., & Li, L. (2014). Comparison of ultracentrifugation and density gradient separation methods for isolating Tca8113 human tongue cancer cell line-derived exosomes. *Oncology letters*, 8(4), 1701–1706. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2373>
213. Striegel AM, Kirkland JJ, Yau WW, Bly DD (2009) Modern sizeexclusion liquid chromatography, 2nd edn. Wiley, New York recuperado de: <https://content.e-bookshelf.de/media/reading/L-572781-0f848cc0b6.pdf>

214. Uliyanchenko E. (2014). Size-exclusion chromatography-from high-performance to ultra-performance. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(25), 6087–6094. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8041-z>
215. Zarovni, N., Corrado, A., Guazzi, P., Zocco, D., Lari, E., Radano, G., Muhhina, J., Fondelli, C., Gavrilova, J., & Chiesi, A. (2015). Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods (San Diego, Calif.)*, 87, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.028>
216. 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*, Chapter 3, . <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
217. Oosthuyzen, W., Sime, N. E., Ivy, J. R., Turtle, E. J., Street, J. M., Pound, J., Bath, L. E., Webb, D. J., Gregory, C. D., Bailey, M. A., & Dear, J. W. (2013). Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis. *The Journal of physiology*, 591(23), 5833–5842. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264069>
218. Muller, L., Hong, C. S., Stolz, D. B., Watkins, S. C., & Whiteside, T. L. (2014). Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of immunological methods*, 411, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.06.007>
219. Zhang, H., & Lyden, D. (2019). Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nature protocols*, 14(4), 1027–1053. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0126-x>
220. Cabeza, L., Perazzoli, G., Peña, M., Cepero, A., Luque, C., Melguizo, C., & Prados, J. (2020). Cancer therapy based on extracellular vesicles as drug delivery vehicles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 327, 296–315. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.018>.
221. Kowal, E. J. K., Ter-Ovanesyan, D., Regev, A., & Church, G. M. (2017). Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1660, 143–152. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_12
222. Menck, K., Bleckmann, A., Schulz, M., Ries, L., & Binder, C. (2017). Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (119), 55057. <https://doi.org/10.3791/55057>

223. Fujifilm Wako Chemicals U.S.A Corporation, (2020) Detección por Citometría de Flujo Convencional, Altamente Sensible, de Vesículas Extracelulares Capturadas Mediante Fosfatidilserina (PS), Fujifilm, recuperado de <https://www.wakolatinamerica.com/blog-reactivos/noticias-wako/post/deteccion-por-citometria-de-flujo-convencional-altamente-sensible-de-vesiculas-extracelulares-captur>
224. Barrera Ramírez L.M., Drago Serrano, MA. E., Pérez Ramos J., Sainz Espuñes, Teresita Del R., Zamora Ana C., Gómez Arroyo, F., & Mendoza Pérez F. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55. Recuperado en 17 de marzo de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000100007&lng=es&tlng=es.
225. Malvern Panalytical, (2023), Análisis y seguimiento de nanopartículas, Malvern Panalytical, recuperado de <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis#:~:text=El%20An%C3%A1lisis%20de%20rastreo%20de,muestras%20en%20una%20suspensi%C3%B3n%20%C3%ADquida>.
226. Malvern Panalytical, (2023), NanoSight NS300, Malvern Panalytical, recuperado de <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/nanosight-range/nanosight-ns300>
227. Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Yuan, D., Deygen, I., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2018). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 14(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.011>
228. Lamichhane, T. N., Raiker, R. S., & Jay, S. M. (2015). Exogenous DNA Loading into Extracellular Vesicles via Electroporation is Size-Dependent and Enables Limited Gene Delivery. *Molecular pharmaceutics*, 12(10), 3650–3657. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00364>
229. Rayamajhi, S., & Aryal, S. (2020). Surface functionalization strategies of extracellular vesicles. *Journal of materials chemistry. B*, 8(21), 4552–4569. <https://doi.org/10.1039/d0tb00744g>
230. Giacobino, C., Canta, M., Fornaguera, C., Borrós, S., & Cauda, V. (2021). Extracellular Vesicles and Their Current Role in Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(9), 2280. <https://doi.org/10.3390/cancers13092280>

231. Johnsen, K. B., Gudbergsson, J. M., Skov, M. N., Pilgaard, L., Moos, T., & Duroux, M. (2014). A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*, 1846(1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.005>
232. Bryniarski, K., Ptak, W., Jayakumar, A., Püllmann, K., Caplan, M. J., Chairoungdua, A., Lu, J., Adams, B. D., Sikora, E., Nazimek, K., Marquez, S., Kleinstein, S. H., Sangwung, P., Iwakiri, Y., Delgado, E., Redegeld, F., Blokhuis, B. R., Wojcikowski, J., Daniel, A. W., Groot Kormelink, T., ... Askenase, P. W. (2013). Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132(1), 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.048>
233. Mizrak, A., Bolukbasi, M. F., Ozdener, G. B., Brenner, G. J., Madlener, S., Erkan, E. P., Ströbel, T., Breakefield, X. O., & Saydam, O. (2013). Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1), 101–108. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.161>