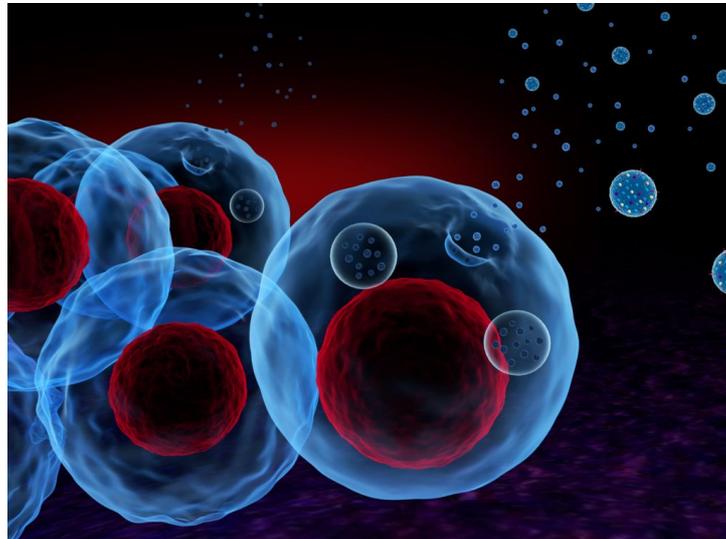




UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



EFECTO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN EL ENVEJECIMIENTO.



Marta Fernández Muñoz



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

**EFFECTO DE LAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES EN EL ENVEJECIMIENTO.**

Marta Fernández Muñoz.

Tutora: Ángela del Carmen Fontán Lozano.

Departamento de fisiología.

Revisión bibliográfica.

Sevilla, julio 2022.

RESUMEN.

El envejecimiento se trata de un proceso biológico complejo que conlleva a un deterioro progresivo del organismo asociado a la edad. Se han identificado nueve procesos interconectados que caracterizan al envejecimiento. Además, existe evidencia de que las alteraciones en un tejido producidas por el envejecimiento pueden transmitirse a otros tejidos. En este proceso intervienen las vesículas extracelulares. Se tratan de estructuras delimitadas por una bicapa lipídica, de tamaño nanométrico que son secretadas por todas las células del organismo y presentes en la mayoría de fluidos corporales. Existen tres tipos de vesículas extracelulares en función de su biogénesis y tamaño: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Estas vesículas son un importante mecanismo de comunicación intercelular ya que participan en la transmisión de biomoléculas entre las células. En el contexto del envejecimiento, estas vesículas son capaces de promover su progresión mediante la entrega de información nociva desde células envejecidas a células sanas. Dada su participación en los procesos que regulan el envejecimiento, las vesículas extracelulares también están vinculadas a la progresión de enfermedades relacionadas con la edad, entre las que destacan las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer. En estas patologías las vesículas extracelulares secretadas por las células afectadas median procesos de comunicación en los que promueven la progresión de la enfermedad. La comprensión de los mecanismos por los cuales las vesículas participan en el transcurso de dichas enfermedades ha esclarecido nuevas estrategias de terapias basadas en vesículas extracelulares. Estas se presentan potencialmente útiles y con ventajas frente a otras terapias. Además, dada su localización generalizada y su participación en el transporte de moléculas patológicas, también presentan utilidad como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades en las que la detección temprana y el tratamiento precoz son determinantes en la evolución de la enfermedad.

Palabras clave: vesículas extracelulares; envejecimiento; enfermedades relacionadas con la edad; terapias; biomarcadores.

Índice de abreviaturas.

- **ARD:** enfermedades relacionadas con la edad; de sus siglas en inglés "Age-Related diseases".
- **A β :** proteína β -amiloide.
- **BHE:** barrera hematoencefálica.
- **CD:** antígenos de diferenciación; de sus siglas en inglés "clusters of differentiation"
- **DAMP:** patrones moleculares asociados al daño mitocondrial, de sus siglas en inglés "damage-associated mitochondrial patterns".
- **DDR:** respuesta al daño en el ADN; de sus siglas en inglés "DNA damage response".
- **EA:** enfermedad de Alzheimer.
- **EC:** células endoteliales; de sus siglas en inglés "endothelial cells".
- **EP:** enfermedad de Parkinson.
- **EPC:** células progenitoras endoteliales; de sus siglas en inglés "Endothelial Progenitor Cells"
- **ERO:** especies reactivas de oxígeno.
- **ESCRT:** complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte; de sus siglas en inglés "Endosomal Sorting Complexes Required for Transport"
- **GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina.
- **HSP:** proteínas de choque térmico; de sus siglas en inglés "heat shock proteins".
- **ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular 1; de sus siglas en inglés "Intercellular Adhesion Molecule 1".
- **ILV:** vesículas intraluminales; de sus siglas en inglés "intraluminal vesicles".
- **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; de sus siglas en inglés "low density lipoproteins".
- **LDLox:** lipoproteínas de baja densidad oxidadas; de sus siglas en inglés "low density lipoproteins oxidized".
- **NF- κ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; de sus siglas en inglés "Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
- **MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad; de sus siglas en inglés "Major Histocompatibility Complex".
- **miARN:** micro ARN.
- **MSC:** células madre mesenquimales; de sus siglas en inglés "Mesenchymal Stem Cells".
- **mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero; de sus siglas en inglés "mammalian Target of Rapamycin"
- **MV:** microvesículas.
- **MVB:** cuerpos multivesiculares; de sus siglas en inglés "Multivesicular Bodies".
- **ncARN:** ARN no codificante.
- **PD-L:** ligando para muerte programada; de sus siglas en inglés "Programmed Death-ligand".
- **SASP:** fenotipo secretor asociado a la senescencia; de sus siglas en inglés "Senescence-Associated Secretory Phenotype".
- **siARN:** ARN de interferencia pequeño; de sus siglas en inglés "small interfering RNA".
- **SNC:** sistema nervioso central.
- **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α ; de sus siglas en inglés "tumor necrosis factor".
- **VE:** vesículas extracelulares.
- **α -syn:** α sinucleína.

Índice.

1. Introducción.	4
1.1. Envejecimiento.	4
1.2. Vesículas extracelulares.	8
2. Objetivos.	11
3. Metodología.	12
4. Resultados y discusión.	13
4.1. Papel de las vesículas extracelulares en el envejecimiento.	13
4.2. Vesículas extracelulares en las enfermedades relacionadas con la edad.	16
4.2.1. Vesículas extracelulares y enfermedades cardiovasculares.	16
4.2.1. Vesículas extracelulares y enfermedades neurodegenerativas.	18
4.2.1. Vesículas extracelulares y cáncer.	21
4.3. Aplicaciones de VE en el en el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad.	22
4.3.1 Uso de VE como biomarcadores.	22
4.3.2 Uso terapéutico de las VE.	24
5. Conclusiones.	29
6. Bibliografía.	30

1. Introducción.

1.1 Envejecimiento.

El envejecimiento es considerado el principal factor de riesgo asociado a la aparición de enfermedades. La tendencia creciente en el número de personas que envejecen hace que aumente la prevalencia de estas patologías, lo que supone un aumento de la morbilidad además de un gran coste económico en términos sanitarios (Kirkland y Tchkonja 2017).

El envejecimiento se trata de un fenómeno biológico complejo que se produce por la acumulación de daños celulares irreparables en los distintos tejidos, que conllevan a un deterioro progresivo del funcionamiento del organismo asociado a la edad (Niccoli y Partridge 2012). Como resultado aparecen cambios biológicos típicos del envejecimiento manifestados como un deterioro en los sistemas sensoriales (vista, oído, gusto, tacto y olfato) y en sistemas orgánicos como el sistema cardiaco, respiratorio, excretor, digestivo y locomotor (Kritsilis et al. 2018). Por lo tanto, con la edad aumenta la probabilidad de aparición de patologías relacionadas con el envejecimiento como enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Mohamad Kamal et al. 2020).

Se han identificado nueve procesos biológicos que caracterizan el envejecimiento: inestabilidad genómica, desgaste de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, células senescentes, agotamiento de células madre y alteración de la comunicación intercelular (López-Otín et al. 2013; Aunan et al. 2016). No se sabe por completo cual es el porcentaje de contribución de cada uno de ellos en la progresión del envejecimiento (Kulkarni et al. 2020), y además existe una mayor complejidad ya que estos procesos están interconectados y, errores en un proceso puede tener una repercusión directa o indirecta en otros (Fakouri et al. 2019). Estos pueden agruparse en tres categorías interconectadas: causas del daño, respuestas al daño y responsables de los cambios fenotípicos del envejecimiento (Figura 1) (López-Otín et al. 2013; Aunan et al. 2016).



Figura 1. Procesos que intervienen en el envejecimiento e interconexión entre ellos. En un primer escalón se encuentran las causas del daño (inestabilidad genómica, desgaste de telómeros, alteraciones epigenéticas y pérdida de proteostásis), como consecuencia de ellas aparecen las respuestas al daño (desregulación de nutrientes, disfunción mitocondrial y senescencia celular) y finalmente como resultado de estas aparecen las alteraciones responsables de los principales cambios fenotípicos del envejecimiento (agotamiento de células madre y alteración en la comunicación intercelular) (Modificado de Aunan et al. 2016)

La inestabilidad genómica, el desgaste de telómeros, las alteraciones epigenéticas y la pérdida de proteostásis son considerados mecanismos biológicos **causantes del daño** (Aunan et al. 2016).

La inestabilidad genómica se produce por una acumulación de daños en el ADN causados tanto por factores endógenos (ej.: especies reactivas de oxígeno (ERO)) como exógenos (ej.: radiaciones). Normalmente estos daños pueden corregirse gracias a los mecanismos de reparación del ADN, pero a medida que se envejece también aparecen defectos en estos mecanismos, provocando la acumulación de daños en el material genético (Li et al. 2021). Estas lesiones en el ADN pueden desencadenar mutaciones y fallos en la replicación y transcripción, activando así la llamada respuesta al daño en el ADN (DDR), encargada de la reparación de este o, si no fuera posible, de la apoptosis o senescencia celular, para evitar la transmisión del daño. La inestabilidad genómica es una causa y no una consecuencia del envejecimiento y esto puede probarse atendiendo a síndromes en los que una mutación en el ADN conduce a un envejecimiento prematuro, como por ejemplo el síndrome de Werner (Niedernhofer et al. 2018).

Los telómeros son secuencias repetitivas de nucleótidos de los extremos de los cromosomas. Estos extremos se acortan en cada ciclo de replicación y la ADN polimerasa no es capaz de extenderlos. Solo es posible gracias a la enzima telomerasa, pero la mayoría de las células somáticas no la expresan. Por tanto, con la edad se producirá un desgaste progresivo de los telómeros típico del envejecimiento (da Costa et al. 2016). Este acortamiento es fisiológicamente

normal con la edad y solo supone un problema cuando la longitud de estos alcanza el límite de Hayflick, ya que se desencadenan daños en el ADN y senescencia celular (Li et al. 2021).

Las alteraciones epigenéticas son cambios en la expresión de genes sin afectar a la secuencia de bases del ADN. Incluyen cambios en la metilación del ADN, cambios en modificaciones postraduccionales de histonas, remodelación de la cromatina y alteraciones en la expresión de determinados ARN no codificantes (ncARN) (Kane y Sinclair 2019). Generalmente se considera que con la edad las células sufren una hipometilación del ADN. Todas estas alteraciones epigenéticas provocan una alteración en la homeostasis celular y tienen una contribución causal al envejecimiento y a la aparición prematura de enfermedades asociadas al envejecimiento (ARD) (Siametis et al. 2021).

El mantenimiento de la proteostasis, es decir, de la homeostasis del proteoma celular se consigue gracias a mecanismos regulados y coordinados que aseguran la correcta síntesis de proteínas, plegamiento, tráfico y la degradación de polipéptidos no funcionales para evitar su acumulación. Esta red de proteostasis restaura alteraciones no deseadas en el proteoma permitiendo que las células dispongan de las proteínas necesarias y evitando que se formen agregados de proteínas mal plegadas. Esto se consigue gracias al plegamiento mediado por chaperonas, a la degradación vía proteasoma y a la autofagia (Labbadia y Morimoto 2015). Sin embargo, con la edad se produce un deterioro progresivo de estos mecanismos, por lo que se produce una acumulación de proteínas mal plegadas, característico de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (Klaips et al. 2018).

La segunda categoría incluye mecanismos que se producen como **respuestas al daño** y son la desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial y senescencia celular. Se ha visto que estos mecanismos son beneficiosos a baja intensidad, pero a alta intensidad causan el efecto contrario, inducen el envejecimiento y tienen un papel importante en el desarrollo de enfermedades (Aunan et al. 2016).

En la vejez los sistemas sensores de detección de nutrientes se pierden o se regulan a la baja. Esto provoca un deterioro metabólico que implica principalmente una disminución de la sensibilidad a insulina, aumento de grasa visceral y disminución de masa magra. En consecuencia, se favorece la aparición de trastornos cardiovasculares o metabólicos, enfermedades neurodegenerativas, atrofia muscular y cáncer (López-Otín et al. 2013; Aunan et al. 2016). La vía insulina-IGF1 (factor de crecimiento similar a insulina) es uno de los sistemas de detección de nutrientes y su atenuación es una buena estrategia para retardar el envejecimiento (Pyo et al. 2020).

Las mitocondrias son los principales productores de ERO gracias a la cadena transportadora de electrones. Se ha demostrado que, por debajo de un umbral, estos ralentizan el envejecimiento, ya que activan vías de homeostasis celular. Sin embargo, a medida que aumenta la edad, también lo hace la producción de ERO en un intento de compensar el deterioro progresivo asociado al envejecimiento. Cuando los niveles de ERO superan un umbral se desencadena el efecto contrario: se produce disfunción mitocondrial, aumenta aún más la producción de ERO, se promueve la apoptosis y la inflamación y se agrava el daño asociado a la edad (Li et al. 2021).

La senescencia celular consiste en la detención irreversible del ciclo celular y, por tanto, de la proliferación celular (Regulski 2017). Esto es debido a la expresión de genes inhibidores del ciclo celular. Los que principalmente expresan las células senescentes son los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina (CDKI) p21 y p16 (Campisi y d'Adda di Fagagna 2007). En individuos jóvenes se trata de un mecanismo de protección, donde las células dañadas adquieren este estado de senescencia para evitar que continúen dividiéndose, pudiendo desencadenar carcinogénesis. Estas células senescentes se van eliminando gracias al sistema inmune, lo que favorece la regeneración de tejidos y la homeostasis corporal. Sin embargo, con el envejecimiento las células senescentes van acumulándose en los tejidos, como resultado tanto de una mayor producción de estas, dado el incremento de daños celulares con la edad, como por una reducción en su eliminación por la disminución de la funcionalidad del sistema inmune, conocida como inmunosenescencia. (Yin et al. 2021). Estas células se mantienen metabólicamente activas y adquieren un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) que hace que secreten moléculas perjudiciales, como citocinas proinflamatorias, que alteran la función de tejidos y promueven el envejecimiento y las enfermedades asociadas al mismo (Schumacher et al. 2021)

Finalmente, la última categoría agrupa a los principales **responsables de los cambios fenotípicos del envejecimiento**: agotamiento de células madre y alteración en la comunicación intercelular (Aunan et al. 2016).

El agotamiento de células madre supone la disminución de la capacidad regenerativa de los tejidos y por tanto de la pérdida de función de órganos y la aparición de patologías. Se produce como consecuencia de la DDR (Schumacher et al. 2021). Así el agotamiento de células madre hematopoyéticas conduce a la aparición de anemias, la disminución de células madre mesenquimales, a osteoporosis, el agotamiento de células madre intestinales, a una disminución de la función intestinal y el agotamiento de células madre musculares puede conducir a sarcopenia. Todas estas son características comunes del envejecimiento lo que sugiere que las células madre tienen un papel importante en el mismo (Li et al. 2021).

Por último, en el envejecimiento además de alteraciones celulares, también se producen alteraciones en la comunicación intercelular. La comunicación intercelular tiene un papel clave en el envejecimiento al regular los niveles neuroendocrinos, endocrinos y neuronales. Estas señalizaciones tienden a desregularse con la edad a medida que aumenta la inflamación y disminuye la vigilancia inmunológica (Li et al. 2021). Por ejemplo, la reducción de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) está relacionada con el envejecimiento. Esta disminución se produce porque la inflamación activa al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) que, al controlar la transcripción del ADN, en el hipotálamo provoca una disminución de GnRH, lo que predispone al organismo a la aparición de patologías asociadas a la vejez (Zhang et al. 2013). La inflamación es una situación definida por un estado proinflamatorio de bajo grado, caracterizado por una alta secreción de citocinas proinflamatorias, autofagia alterada y aumento de la señalización del NF-kB (principal regulador de las respuestas inflamatorias), unido a una disminución de la funcionalidad del sistema inmune frente a patógenos (Salminen et al. 2012).

Además de todos estos mecanismos que participan en la progresión del envejecimiento, existe evidencia de que las alteraciones en un tejido provocadas por el envejecimiento pueden transmitirse a otros tejidos y así propagar el mismo. Las vesículas extracelulares tienen un papel clave en este proceso (Yin et al. 2021).

1.2 Vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares (VE) son partículas de entre 40 y 1000 nm de diámetro aproximadamente, y hasta 5000 nm si hablamos de cuerpos apoptóticos. Se tratan de estructuras sin núcleo, delimitadas por una bicapa lipídica (Cavalcanti et al. 2021), que son liberadas por todas las células y están presentes en la mayoría de los fluidos corporales (sangre, orina, lágrimas, semen, líquido sinovial y leche materna) (Gupta et al. 2021), por lo que se trata de un importante método de comunicación intercelular (Raposo y Stoorvogel 2013). Clásicamente, las vesículas extracelulares se pueden clasificar según su tamaño y su biogénesis en los tres grupos que se detallan a continuación (Figura 2), aunque actualmente están definiéndose nuevos y más estandarizados criterios de clasificación. Dada la heterogeneidad dentro de las VE, a lo largo de esta revisión utilizaremos el término VE en general, excepto cuando se especifique un tipo de vesícula concretamente.

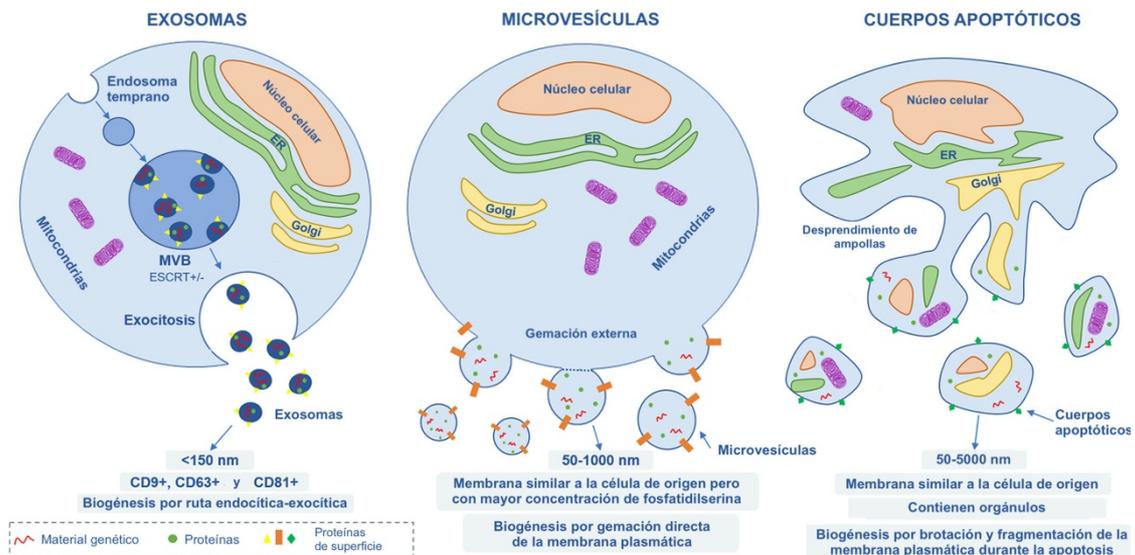


Figura 2. Biogénesis y composición de los distintos tipos de VE. Los exosomas tienen un tamaño de entre 40 y 150 nm y se forman mediante una ruta en endocitosis-exocitosis, pasando por la formación de MVB. Su formación puede ser dependiente o independiente de ESCRT y su carga se compone principalmente por proteínas ESCRT en caso de formación dependiente de estas y proteínas CD9, CD63 y CD81 entre otras, además de lípidos y material genético. Las microvesículas tienen un tamaño de hasta 1000 nm, se forman por gemación externa y desprendimiento directo de la membrana plasmática. Su membrana es rica en fosfatidilserina y presenta proteínas de superficie. El contenido incluye material genético, y distintos tipos de proteínas entre las que destacan las tetrasplaninas. Los cuerpos apoptóticos tienen un tamaño de hasta 5000 nm y se forman por desprendimiento directo de la membrana celular durante la apoptosis pudiendo contener orgánulos celulares (Modificado de Cabeza et al. 2020).

- **Exosomas o nanovesículas**, aquellas que tienen un diámetro entre 40 a 150 nm (Cavalcanti et al. 2021), rango de tamaño de virus (Liu et al. 2020). Los exosomas se forman a través una ruta de endocitosis-exocitosis. En primer lugar, las células forman endosomas tempranos a partir de una pequeña porción de citoplasma, estos maduran hasta endosomas tardíos (Stoorvogel et al. 1991) y posteriormente se forman cuerpos multivesiculares (MVB) compuestos por vesículas intraluminales (ILV) formadas por gemación interna de la membrana endosomal. Finalmente, estos MVB pueden degradarse vía lisosomal (Doyle y Wang 2019) o fusionarse con la membrana celular y liberar los ILV como exosomas al espacio extracelular (Abels y Breakefield 2016). Una vez ahí, los exosomas pueden tomar tres vías distintas para interactuar con las células receptoras y liberar su contenido: fusión directa con la membrana celular, endocitosis o adhesión a la superficie celular mediante la interacción ligando-receptor (Tkach y Théry 2016). No se conocen bien los factores que determinan el destino de estas vesículas, sin embargo, hay estudios que demuestran que los niveles de colesterol de estas influyen en su destino. Así, exosomas con altos niveles de colesterol son secretados y los que carecen de este se degradan mediante lisosomas (Raposo y Stoorvogel 2013; Doyle y Wang 2019). El contenido de estas vesículas incluye proteínas, ácidos nucleicos y lípidos y este dependerá de la célula fuente de la que provengan. Existen exosomas dependientes de complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte (ESCRT) e independientes de ESCRT. En los primeros, entre sus proteínas se

encuentran proteínas ESCRT y sus accesorias, ya que su formación y transporte está regulado por estas. También se componen de antígenos de diferenciación (CD) CD63, CD9, CD81, principalmente, que son proteínas transmembrana llamadas tetraspaninas (Doyle y Wang 2019). Además, pueden contener proteínas componentes del citoesqueleto, anexinas y proteínas GTPasas de fusión de membranas (RAB) (implicadas transporte en la membrana intracelular) y proteínas de choque térmico (HSP) 70 y 90. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I también se encuentran en los exosomas de la mayoría de los tipos de células as generalmente es similar a la de la membrana plasmática de la célula originaria. Se ha determinado un enriquecimiento en los exosomas con respecto a la célula fuente de colesterol, fosfatidilserina, glucoesfingolípidos, gangliósidos esfingomielina y ceramida. Y por el contrario una menor proporción de fosfatidilcolina y diacilglicerol (Zaborowski et al. 2015; Skotland et al. 2017; Novoa-Herrán 2021). En cuanto al material genético, pueden contener ADN, aunque es más común la presencia de pequeños fragmentos de ARN que incluye ARNm, y ARN no codificante como ARN ribosómico, ARN de transferencia, micro ARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (siARN)... (Abels y Breakefield 2016).

- **Ectosomas o microvesículas**, tienen un diámetro de hasta 1000 nm (Cavalcanti et al. 2021), rango de tamaño de bacterias (Liu et al. 2020). Se generan por gemación externa y desprendimiento directo de la membrana plasmática al espacio extracelular (Mathieu et al. 2019). Una vez en el espacio extracelular interactúan con las células receptoras mediante interacciones específicas ligando-receptor gracias a la presencia de proteínas de superficie presentes en las membranas de las vesículas (Keshtkar et al. 2018). El contenido de estas vesículas también será diferente dependiendo de su célula fuente, pero en general, las proteínas contenidas en estas microvesículas, debido a su modo de formación, son principalmente, proteínas citosólicas y de la membrana, como las tetraspaninas. Además, aparecen proteínas del citoesqueleto (actina y tubulina), integrinas, proteínas de choque térmico, y otras proteínas glicosiladas o fosforiladas. Las proteínas del citoesqueleto que se encuentran en este tipo de VE provienen de su célula de origen y aparecen debido a su modo de formación y para permitirles una mejor permeabilidad asegurando su integridad estructural (Ullah et al. 2020). No pueden contener proteínas específicas de orgánulos celulares, ya que estos no están involucrados en su biogénesis (Doyle y Wang 2019). En cuanto a la fracción lipídica se ha determinado un enriquecimiento en estas vesículas en colesterol, diacilglicerol, fosfatidilserina y ceramida respecto a la célula fuente (Novoa-Herrán 2021). El contenido en material genético es similar al de los exosomas, es decir, principalmente pequeños fragmentos de ARN, y especialmente ricos en miARN (Abels y Breakefield 2016).

- **Cuerpos apoptóticos**, con un diámetro de hasta 5000 nm, rango de tamaño de plaquetas (Liu et al. 2020). Estos son fragmentos de mayor tamaño que se desprenden de células que se

encuentran en las últimas etapas de la apoptosis, mediante la formación de vesículas y evaginación de la membrana celular (Cheng y Hill 2022), para facilitar la eliminación de restos celulares. La formación de cuerpos apoptóticos es un mecanismo que usa la célula para evitar que salgan al exterior celular componentes tóxicos, enzimáticamente activos o inmunogénicos de la célula, que podrían provocar la destrucción de otras células, inflamación o reacciones inmunogénicas (Kalra et al. 2016). Una vez formados, los cuerpos apoptóticos expresan en su superficie receptores de células fagocíticas, lo que permitirá su captación y degradación por estas últimas (Elmore 2007). El contenido de estos también depende de la célula de la que provenga, pero es muy distinto a las anteriores vesículas, puesto que pueden contener orgánulos intactos. Por lo tanto, contendrán en gran cantidad proteínas asociadas a orgánulos como el núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (como histonas y HSP60) (Doyle y Wang 2019). El contenido en lípidos de los cuerpos apoptóticos no ha sido determinado con exactitud (Novoa-Herrán 2021).

Se sabe que las VE participan en la comunicación intercelular mediante el transporte de moléculas bioactivas desde una célula fuente hasta una célula diana. Este sistema de comunicación debe mantenerse bien coordinado para un correcto funcionamiento del organismo. Las VE permiten la transmisión de señales a las células receptoras mediante la información contenida en ellas. La señal entregada dependerá de la célula de la que derive la vesícula. Por tanto, en determinadas ocasiones, en las que las células se encuentran un estado envejecido o dañado, las VE liberadas tendrán efectos negativos en las células receptoras, pudiendo inducir daño celular en ellas y propagando así el envejecimiento (Monti et al. 2021). Además, esta situación adquiere una mayor importancia por el hecho de que las células senescentes (cuya cantidad se ve aumentada con la edad) liberan un mayor número de VE, que serán absorbidas por el resto de células (Robbins 2017).

Por tanto, dado que, en un ambiente celular envejecido, las VE favorecen la progresión del envejecimiento gracias a la transmisión de señales nocivas entre las células, es importante estudiar el papel de estas en los distintos procesos que participan en el envejecimiento. Igualmente, las VE pueden transmitir señales beneficiosas si derivan de células sanas como las células madre, por lo que también es interesante estudiar la posible utilidad terapéutica de dichas vesículas (Lananna y Imai 2021).

2. Objetivos.

Dado el creciente interés por las vesículas extracelulares en los últimos años, el objetivo general de esta revisión bibliográfica es recopilar información actualizada acerca del papel de las vesículas extracelulares en el envejecimiento y su implicación en enfermedades relacionadas con

la edad, así como su posible utilización terapéutica y su uso potencial como biomarcadores. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Describir que es el envejecimiento y cuáles son los mecanismos biológicos que lo caracterizan.
- Describir que son las VE, los tipos, biogénesis, contenido y destino tras su liberación.
- Exponer el papel de las VE en los procesos que intervienen en el envejecimiento y en las enfermedades asociadas a este.
- Determinar el potencial terapéutico de las VE, especialmente en ARD, así como el empleo como biomarcadores.

3. Metodología.

Para la realización de esta revisión bibliográfica se han consultado bases de datos científicas como Pubmed/Medline y Mendeley principalmente, en las que se ha podido acceder a los artículos gracias al acceso institucional a través de la Universidad de Sevilla, además de la herramienta “Google Scholar”. Se han examinado preferentemente artículos publicados en los últimos años, aunque también se han incluido algunos artículos anteriores en los que se exponen conocimientos más básicos.

Los términos de búsqueda han sido “extracellular vesicles”, “exosomes”, “apoptotic bodies”, “aging”, “cellular senescence”, “aged-related diseases”, “cardiovascular”, “neurodegenerative”, “cancer”, “therapeutic” solos o en combinación.

Además, inicialmente se consultó la última edición del libro Fundamentos de Fisiopatología – Porth, disponible en CRAI Antonio de Ulloa, para tener una visión general y conocer mejor las bases del envejecimiento.

Simultáneamente, se utilizó el gestor bibliográfico Mendeley, que permitió agrupar toda la bibliografía utilizada y generar las referencias de forma automática siguiendo el estilo Vancouver (autor, fecha).

Para la creación de unas imágenes se utilizó el programa BioRender, disponible en línea. Otras imágenes se modificaron sobre la original traduciéndolas e incluyendo u omitiendo información.

4. Resultados y discusión.

4.1 Papel de las vesículas extracelulares en el envejecimiento.

El envejecimiento, como se ha visto, está mediado por numerosos procesos biológicos tanto celulares como intercelulares. Además, existe una interconexión entre ellos en el que cobran especial importancia las vesículas extracelulares, ya que son las encargadas del intercambio de moléculas bioactivas entre las células (Figura 3). Inicialmente no se prestó mucha atención a las vesículas extracelulares ya que se pensaba que eran una herramienta para la eliminación de “basura celular”. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que se trata de un importante mecanismo de comunicación intercelular entre tejidos y órganos tanto cercanos como lejanos (Monti et al. 2021).

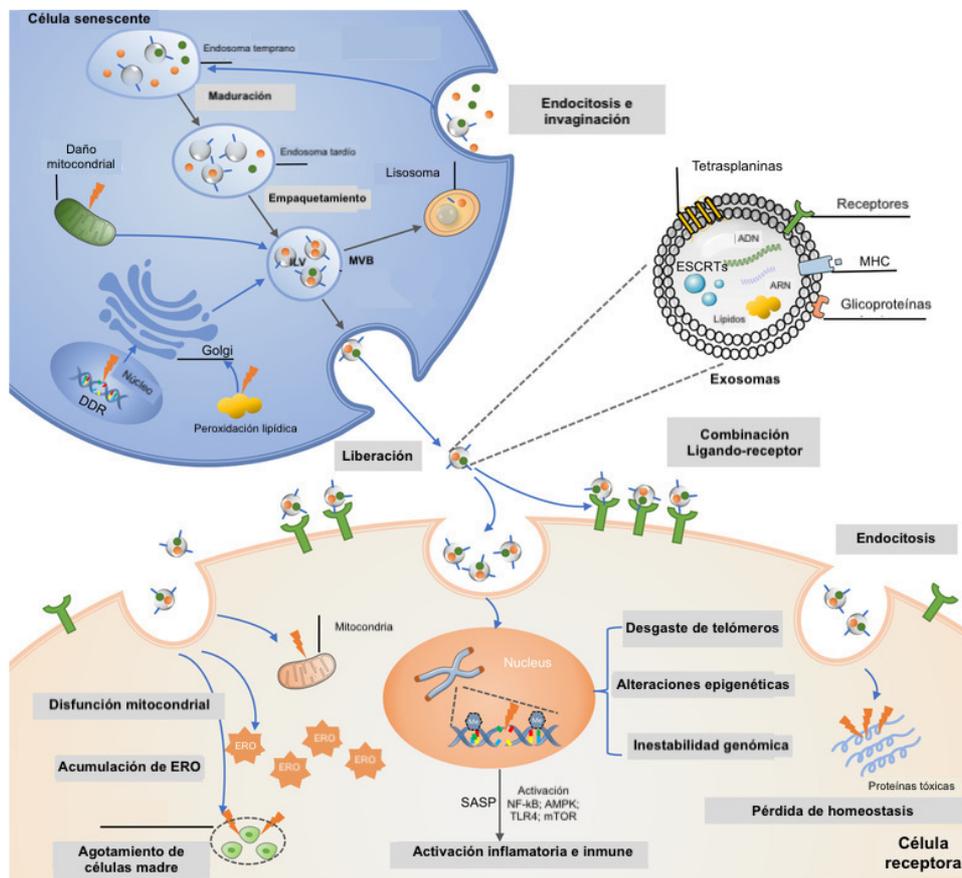


Figura 3. Papel de las VE en el microambiente del envejecimiento. Los niveles de VE derivadas de SASP pueden aumentar debido a daños en el ADN, peroxidación lipídica o daños en las mitocondrias que se producen en el envejecimiento. Estas VE interactúan con células receptoras por endocitosis o vía ligando-receptor, liberan su contenido y pueden transmitirles el estado envejecido (o de senescencia) de la célula fuente a través de la inestabilidad genómica, alteraciones epigenéticas, desgaste de telómeros, desregulación de la proteostasis y la detección de nutrientes, activación inflamatoria e inmune, disfunción mitocondrial y agotamiento de células madre. Se utilizan los exosomas como ejemplo explicativo, aunque es aplicable también a microvesículas (Modificado de Yin et al. 2021).

Durante el envejecimiento y especialmente en células senescentes se produce una mayor secreción de VE relacionadas con el mismo. Esto puede explicarse ya que la secreción de VE que contienen moléculas dañinas para la célula, especialmente ADN citosólico, es una forma de eliminarlas y es necesaria para la supervivencia celular ya que si no se induciría la apoptosis celular (Takasugi 2018). Estas VE son componentes del SASP, caracterizado por una gran secreción de moléculas como citocinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas (Monti et al. 2021).

La alteración del contenido de estas VE y el aumento en su secreción se debe a la acumulación de daños en la célula. Estos pueden ser debidos a la disfunción mitocondrial y peroxidación lipídica, que provoca un aumento en los niveles de ERO y en consecuencia se genera un gran estrés oxidativo, o a lesiones irreparables en el ADN que desencadenan la DDR. La célula dañada entra en estado de senescencia y libera gran cantidad de VE del SASP. La producción de estas VE se basa en p53 y p65, ya que se ha visto que su inhibición reduce la liberación de vesículas. Estas VE al interactuar con las células receptoras, por interacción específica ligando-receptor o por endocitosis, liberan su contenido y este hace su efecto en las células. La consecuencia de la transmisión de VE de una célula envejecida a otra sana será la transmisión del estado de envejecimiento o de senescencia (Yin et al. 2021).

Este estado de envejecimiento celular puede adquirirse de varias formas, aunque en realidad todos estos procesos están interconectados. Cuando el contenido de las VE se dirige al núcleo celular puede desencadenarse alteraciones epigenéticas, inestabilidad genómica y desgaste de los telómeros (Yin et al. 2021). Con el desgaste de los telómeros aumentan los niveles de expresión de ARN con repeticiones teloméricas (TERRA), cuya función es la protección de los extremos de los cromosomas, tanto libre en las células como englobado en VE (Takasugi 2018). Las VE transportan TERRA desde los telómeros disfuncionales al espacio extracelular y entonces se desencadena una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos al reconocer estas VE, para eliminar a las células con telómeros desgastados (Wang y Lieberman 2016). Además, las VE pueden transportar distintos tipos de ncARN, como miARN, desde células dañadas hasta células sanas, lo que les hace partícipes de la transmisión célula-célula de la inestabilidad genómica (Bao et al. 2021) y las alteraciones epigenéticas (Behbahani et al. 2016).

El contenido de las VE también puede provocar una desregulación en la proteostasis en las células receptoras. Existen dos mecanismos por los cuales las VE derivadas de células envejecidas pueden promover la desregulación de la homeostasis de las proteínas: el transporte de agregados proteicos disfuncionales provenientes de la célula de origen a través de las VE o la inhibición de la proteostasis en la célula receptora. En ambos casos el resultado final sería una acumulación de

agregados proteicos, provenientes de la célula envejecida, en la célula inicialmente sana. Este depósito de proteínas celulares es una característica típica de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, que son patologías asociadas al envejecimiento (Guix 2020; Yin et al. 2021).

Por otro lado, el contenido perjudicial de estas VE puede afectar a las mitocondrias de la célula receptora provocando su disfunción, en consecuencia, se producirá una mayor liberación de ERO y se ocasionará su acumulación y un elevado estrés oxidativo, induciendo senescencia en la célula receptora. Las células senescentes con mitocondrias disfuncionales pueden liberar VE cargadas con ADN mitocondrial. Estas actúan como patrones moleculares asociados al daño mitocondrial (DAMP). El aumento de los niveles de DAMP intracelular favorece la inestabilidad genómica, mientras que un aumento de los niveles de VE cargadas con ADN mitocondrial extracelular provoca el reconocimiento de los patrones generando una respuesta inmunitaria e inflamatoria (Yin et al. 2021).

Asimismo, todos estos procesos, al participar en la disfunción celular, también contribuyen a la activación de fenómenos inflamatorios e inmunitarios. Las VE pueden desencadenarlos a través de las vías de activación del gen NF- κ B, de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) en tejido adiposo, del receptor de reconocimiento de patrones TLR4 o de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) en células madre mesenquimales (Mato-Basalo et al. 2022).

Finalmente, las VE derivadas del SASP pueden inducir el agotamiento de células madre. Esto se desencadena porque el contenido de las VE provoca daños en las células madre que hacen que estas entren en estado de senescencia o de apoptosis. Esto puede justificarse mediante estudios en los que la incubación de vesículas derivadas de células madre jóvenes con vesículas derivadas de células madre envejecidas induce un estado de senescencia en las inicialmente sanas por la activación de la vía mTOR (Fafián-Labora et al. 2020). El agotamiento de células madre supone la incapacidad para la regeneración de tejidos y para mantener la homeostasis, por tanto, se trata de un mecanismo importante en la progresión del envejecimiento (Robbins 2017).

Debido a la gran variedad y complejidad de las cargas de las VE, las funciones que estas tienen en el entorno del envejecimiento se ha visto que son muy diversas. Pero, lo que está claro es que las VE participan en la transmisión del envejecimiento a través de la comunicación célula-célula. Estas tienen la capacidad de transformar el estado de la célula receptora mediante el traspaso de la información contenida en su carga. Por tanto, las VE derivadas de células envejecidas son capaces de transmitir este estado de envejecimiento en las células receptoras y así favorecer su propagación (Yin et al. 2021).

4.2. Vesículas extracelulares en las enfermedades relacionadas con la edad.

El envejecimiento en si no es una enfermedad, pero si se trata de un factor de riesgo para las ARD (Krisiko y Radman 2019). Las ARD más prevalentes en países desarrollados son las enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración y el cáncer (Niccoli y Partridge 2012).

Numerosos estudios han determinado que las VE tienen un papel importante en el contexto de estas enfermedades, ya que participan en su progreso. Además, una vez conocida la implicación de las VE en el transcurso de la enfermedad estas podrían usarse como una estrategia terapéutica (Hill 2019).

4.2.1. Vesículas extracelulares y enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo. Las dos formas más destacadas son la enfermedad coronaria y el accidente cerebrovascular. Entre los factores de riesgo se encuentran la edad y patologías cuya incidencia aumenta con la edad como la obesidad, diabetes mellitus tipo II e hipertensión arterial (Niccoli y Partridge 2012; Buford 2016; Chatterjee et al. 2020; Fazeli et al. 2020). Con la edad aumenta la probabilidad de sufrir un infarto agudo de miocardio y de morir a causa de él (Niccoli y Partridge 2012).

La aterosclerosis es la principal causa común de las enfermedades cardiovasculares. Consiste en la acumulación de placas fibroadiposas en la capa íntima arterial. Estas producen un estrechamiento en la luz de las arterias obstruyendo el flujo sanguíneo. En ocasiones pueden romperse y formar un coágulo de sangre. La oclusión de los vasos provoca isquemia, que contribuye a la aparición de accidentes cerebrovasculares (Libby et al. 2019).

Se han observado vesículas extracelulares en placas de ateroma y niveles circulantes aumentados en pacientes con aterosclerosis, lo que evidencia la implicación de las VE en el progreso de la enfermedad, desde su inicio hasta etapas más tardías (Figura 4) (Giró et al. 2021).

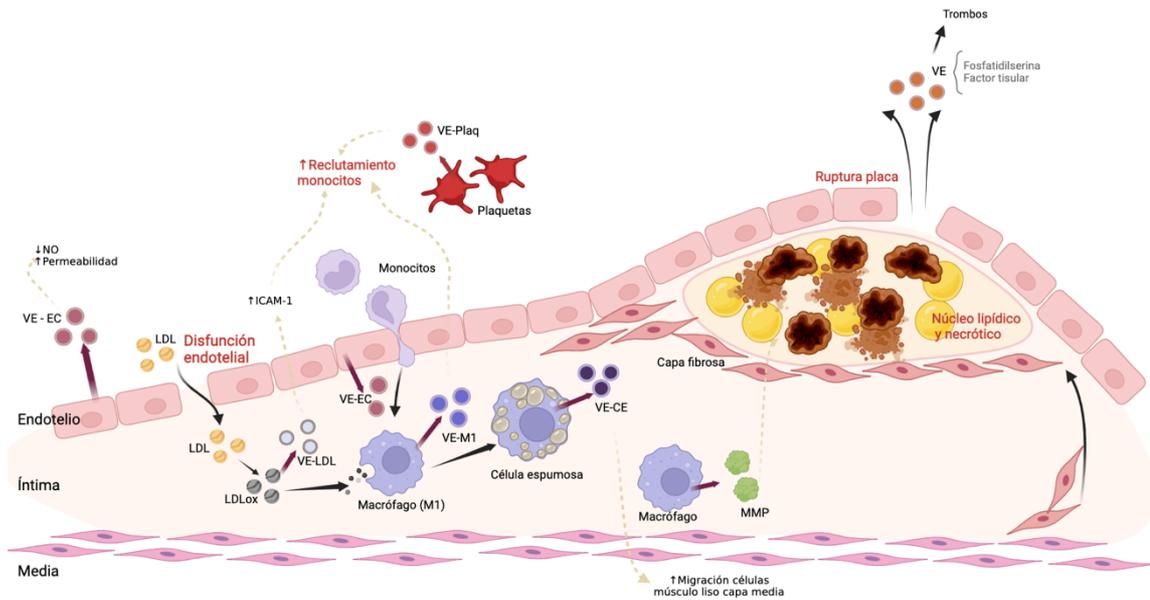


Figura 4. Papel de las VE en la progresión de la placa aterosclerótica. En presencia de factores de riesgo, las EC liberan VE que favorecen la disfunción endotelial. Esto conduce a la inclusión de LDL que se oxida. Tanto las LDLox, las plaquetas como las EC liberan VE que promueven el reclutamiento de monocitos y su diferenciación a macrófagos con fenotipo proinflamatorio. Estos ingieren LDLox y se convierten en células espumosas, que liberan VE favoreciendo la migración de células de músculo liso de la capa media para formar, paralelamente a la formación de un núcleo lipídico y necrótico, una capa fibrosa sobre la placa (elaboración propia con BioRender, basada en (Libby et al. 2019; Charla et al. 2020; Giró et al. 2021; Coly y Boulanger 2022)).

La aterosclerosis se inicia con una disfunción endotelial. Las VE y más comúnmente las microvesículas (MV) circulantes derivadas de células endoteliales (EC) provocan la disfunción del endotelio al disminuir la producción de óxido nítrico y aumentar la permeabilidad (Paone et al. 2019). Esta disfunción endotelial permite la incorporación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial, donde se oxida pasando a LDL oxidada (LDLox). Estas moléculas liberan VE que promueven un aumento de los niveles de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), por lo que se fomenta el reclutamiento de monocitos (Fu et al. 2017). Las plaquetas también liberan VE que promueven el reclutamiento y adhesión de monocitos. Además, la persistencia de factores de riesgo (hipertensión, hiperglucemia, obesidad, inflamación...) favorece igualmente el reclutamiento de monocitos en el lugar de la lesión (Giró et al. 2021).

Estos monocitos se diferencian a macrófagos y adquieren un fenotipo proinflamatorio llamado M1. Las EC en presencia de LDLox secretan VE que colaboran en la transformación del fenotipo de los macrófagos. Asimismo, estos macrófagos también secretan VE que favorecen la acumulación de más macrófagos (Coly y Boulanger 2022). Estos ingieren LDL oxidada sin ningún tipo de regulación y se convierten en células espumosas. Igualmente, también liberan VE que promueven la proliferación y migración de células de músculo liso desde la capa media a la íntima (Yang et al. 2021).

Esta migración de células de músculo liso provoca la formación de una capa fibrosa sobre la placa, que le confiere estabilidad. La liberación de VE por las EC promueve la diferenciación de estas células musculares hacia un fenotipo caracterizado por una mayor proliferación y migración. En engrosamiento de placa se produce en para aumentar su estabilidad (Charla et al. 2020).

Sin embargo, la lesión progresa hacia el crecimiento de un núcleo lipídico y necrótico formado por la muerte por necrosis de células espumosas y de músculo liso. La presencia de este núcleo de células muertas desencadena una respuesta inflamatoria que provoca la liberación por los macrófagos de metalopreinasas de matriz (MMP) que participan en la degradación y ruptura de la placa (Charla et al. 2020).

Al romperse, las VE contenidas en la placa quedan expuestas y, dado que en su superficie se encuentran factores necesarios para la coagulación (como el factor tisular), desencadenan la activación plaquetaria. Además, el enriquecimiento de sus superficies en fosfatidilserina contribuye a la producción de trombina. Por lo que, finalmente se favorece la formación de trombos en el lugar de la lesión. (Hutcheson y Aikawa 2018).

4.2.2. Vesículas extracelulares y enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas y estructuras cerebrales. Las más comunes son la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) (aunque existen otras como la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple) y la edad es el principal factor de riesgo de ambas. En estas enfermedades es común la acumulación de proteínas no funcionales en distintas zonas del cerebro. A medida que se envejece, estas proteínas afectan más a las neuronas más viejas, tanto porque son más sensibles a ellas, como porque tienen una menor capacidad para degradarlas (Niccoli y Partridge 2012).

El conocimiento actual manifiesta la participación de las VE en la patología de las enfermedades neurodegenerativas. Esto se apoya en el hecho de que en estas enfermedades las proteínas mal plegadas se extienden a diferentes regiones del cerebro (Figura 5) , lo que alude a que en el progreso de la enfermedad se produce la comunicación intercelular entre neuronas y células gliales de dichas proteínas (Hill 2019).

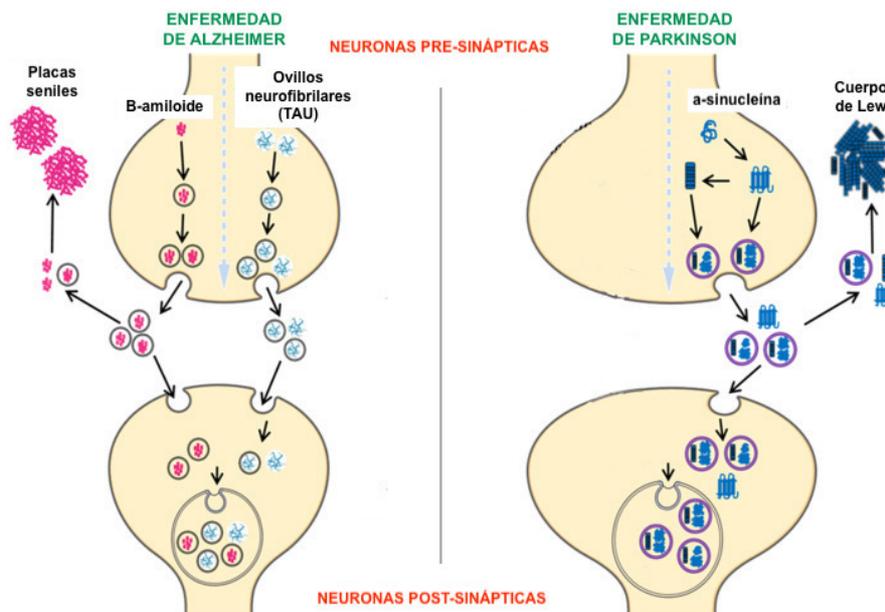


Figura 5. Transmisión de VE entre células del SNC en EA y EP. En la EA se secretan VE cargadas con A β y VE cargadas con TAU. En la EP se secretan VE cargadas con α -syn. En ambos casos estas VE transportan estas proteínas patológicas hacia otras células sanas favoreciendo la propagación de ambas enfermedades (Modificado de Rastogi et al. 2021).

La mayoría de las células del sistema nervioso central (SNC) (neuronas, microglía, oligodendrocitos y astrocitos) liberan VE (Xiao et al. 2021). Estas vesículas transportan con su contenido las proteínas mal plegadas contribuyendo a su propagación por el cerebro, por lo que cooperan en el progreso de las enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, se ha visto que la carga de miARN también se altera con la enfermedad y puede transferirse a otras células modulando la expresión génica a nivel postranscripcional (Hill 2019). A continuación, nos centraremos en la EA y EP y la implicación que tienen las VE en ellas, ya que son las más prevalentes.

La **enfermedad de Alzheimer** es la enfermedad neurodegenerativa que afecta a más personas en el mundo. Se manifiesta como demencia, deterioro cognitivo y pérdida de memoria. Está generada por la acumulación extracelular de proteína β -amiloide (A β) formando las llamadas placas seniles y la agregación intracelular de la proteína TAU anormalmente fosforilada formando ovillos neurofibrilares (Jan et al. 2017). En una situación de EA las células del SNC liberan al espacio extracelular VE que envuelven las proteínas citadas anteriormente y son capaces de transportarlas a otras zonas del cerebro, entre neuronas y células gliales, favoreciendo la progresión de la enfermedad. No se ha determinado qué células son las que liberan estas VE neurotóxicas, pero se ha propuesto microglía y astrocitos (Gao et al. 2021). La neurotoxicidad de estas VE se basa en que sus lípidos promueven la formación de A β soluble a partir de A β insoluble extracelular (Croese y Furlan 2018) y la transportan hacia las placas seniles (Quek y Hill 2017). Además, las VE pequeñas (exosomas) son capaces de propagar la proteína TAU entre las células,

principalmente hacia las interneuronas gabaérgicas del hipocampo. La transmisión de TAU a través de VE se ve favorecida frente a la de TAU libre (Ruan 2022). La expresión de varios tipos de miARN se ve disminuida, como por ejemplo miARN-29 (Jahangard et al. 2020). Por otro lado, también el contenido de estas VE incluye ceramida y factor de respuesta proapoptótico (PAR-4) que inducen la apoptosis de astrocitos. Además, participan en la desregulación de Ca^{2+} neuronal, por lo que la función mitocondrial se ve afectada, disminuyendo la capacidad neuronal de resistir daños (Yuan et al. 2021).

La **enfermedad de Parkinson** es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. Se caracteriza por hipocinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. La enfermedad aparece por la degradación de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra debido al depósito de una proteína mal plegada, α -sinucleína (α -syn), formando agregados llamados cuerpos de Lewy (Jan et al. 2017). Las VE liberadas al espacio extracelular por las células del SNC en el contexto de esta enfermedad promueven la transmisión y agregación de α -syn. Las VE transportan esta proteína entre neuronas, astrocitos y microglía favoreciendo la expansión de la enfermedad. Además, los agregados de α -syn contenidos en exosomas producen una mayor neurotoxicidad que los libres, ya que la asociación con exosomas facilita la absorción por la célula receptora (Croese y Furlan 2018). La acumulación de α -syn en células gliales promueve la inflamación de estas, que puede extenderse a otras células gliales o neuronas. Además, estas células liberarán también VE cargadas con MHC-II, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y citocinas proinflamatorias que estimulan la apoptosis neuronal (Yuan et al. 2021). Se ha visto que exosomas del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EP indujeron la agregación de α -syn en una línea celular sana, lo que confirma que, las VE pueden transferir señales que favorecen la progresión de la EP (Stuendl et al. 2016).

Han et al. estudiaron el efecto de la inyección de VE aislados del suero de pacientes con EP a ratones sanos. El resultado fue la inducción de la enfermedad en estos últimos. Se desencadenó la degeneración neuronal por agregación de α -syn, activación microglial y elevación de los niveles de citocinas proinflamatorias. Esto confirma que en un contexto de EP, las vesículas se cargan con α -syn patológica y factores inflamatorios (como TNF- α e interleucinas 1β (IL- 1β)) y puede transferirse a otras células propagando la neurodegeneración. Estos resultados evidencian que la comunicación a través de VE juega un papel importante en la patogenia de la EP y, por extensión, en las enfermedades neurodegenerativas (Han et al. 2019).

4.2.3. Vesículas extracelulares y cáncer.

El cáncer es una enfermedad asociada al envejecimiento en el que la edad es el principal factor de riesgo (Chatsirisupachai et al. 2019). Opuestamente a las enfermedades presentadas anteriormente, que se caracterizan por senescencia celular y un aumento de la apoptosis, el cáncer se caracteriza por una proliferación celular descontrolada porque las células no responden a los puntos de control. Los factores de riesgo del cáncer incluyen antecedentes familiares, exposición a sustancias nocivas (ej.: tabaco, radiaciones, virus del papiloma...) y la edad. El motivo por el cual con el envejecimiento aumenta el riesgo de desarrollar cáncer puede deberse a la acumulación de daños celulares o a la mayor susceptibilidad ante las mutaciones oncogénicas (Niccoli y Partridge 2012).

Se ha descubierto que las VE tienen gran participación en el entorno tumoral. Las células cancerosas liberan VE que participan en la comunicación intercelular entre otras células cancerosas y células sanas. Estas vesículas actúan promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular en las células receptoras por lo que son un mecanismo que refuerza el crecimiento del tumor. Las VE participan en varios procesos relacionados con el cáncer: progresión del cáncer, metástasis, inmunosupresión y quimiorresistencia (Figura 6) (Chang et al. 2021).

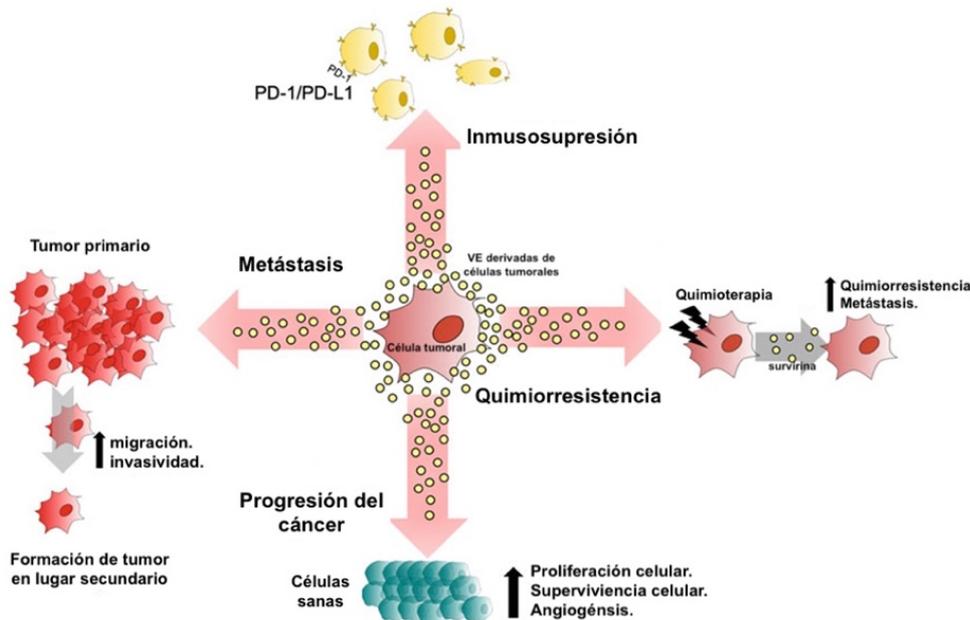


Figura 6. Implicaciones de las vesículas extracelulares derivadas de células cancerosas. Las VE participan en la progresión del cáncer por varios mecanismos: un aumento de la angiogénesis que deriva en una mayor proliferación celular; la inmunosupresión gracias al enriquecimiento de las VE en PD-L1; y el favorecimiento de la metástasis por un aumento en la migración de células. Además de la aparición de resistencias a los fármacos quimioterápicos utilizados para el tratamiento (Modificado de Chang et al. 2021)

En cuanto a la progresión del tumor, las VE derivadas de células tumorales pueden promover la angiogénesis mediante un aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y la formación de nuevos vasos sanguíneos gracias a este, favorece el crecimiento del tejido canceroso (Chang et al. 2021). Por otro lado, también promueven la metástasis. Estas vesículas derivadas de células cancerígenas contienen oncoproteínas y fragmentos de ARN oncogénicos que pueden transferirse a células vecinas sanas e inducir ahí la formación de una zona con las condiciones óptimas para la formación de un segundo tumor, llamada nicho pre-metastásico (Cheng y Hill 2022). Además, también agilizan la metástasis facilitando el proceso de migración de células cancerosas desde el entorno de un tumor primario hacia una localización secundaria (Becker et al. 2016). Asimismo, también participan en la inmunosupresión, tanto del entorno del tumor como sistémica. Se ha visto que las VE derivadas de células cancerosas están enriquecidas en ligando para muerte programada (PD-L1). Este activa al receptor de muerte programada (PD-1) y provoca la disfunción de las células inmunitarias. (Chang et al. 2021). Por último, las VE también están implicadas en la resistencia a quimioterápicos. Esto se basa en la hipótesis de que las células cancerosas tratadas con agentes quimioterápicos liberan gran cantidad de VE cargadas con survivina, una proteína que promueve la supervivencia celular. Al interactuar con otras células cancerosas les transfiere la proteína y posteriormente el fármaco aplicado ya no sería efectivo contra esa célula (Kreger et al. 2016; Chang et al. 2021).

Un estudio que prueba esta transferencia de información es el realizado por Yoon et al. en el que se trataron células epiteliales gástricas sanas con exosomas derivados de células cancerosas gástricas. El resultado fue un aumento de la viabilidad celular y una inhibición de la senescencia y apoptosis, lo que llevó a un gran crecimiento en el número de células. Además, se vio aumentada la expresión y la actividad de la telomerasa en las células tratadas. Esto sugiere que los exosomas derivados de las células tumorales pueden inducir la cancerización de las células sanas cercanas, promoviendo la progresión del tumor (Yoon et al. 2022).

4.3 Aplicaciones de VE en el en el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad.

4.3.1 Uso de VE como biomarcadores.

Un biomarcador es una sustancia medible y evaluable objetivamente que se utiliza como un indicador de un proceso fisiológico, patológico o de respuesta a farmacoterapia (Lee et al. 2019). La localización de las VE en todos los fluidos corporales en los que se han examinado hasta el momento las convierte en candidatos ideales a biomarcadores, por su gran accesibilidad (Doyle y Wang 2019) y su participación en la comunicación intercelular (DeCastro et al. 2021).

La función principal de los biomarcadores de enfermedades es permitir la detección temprana de las patologías, así como la determinación del pronóstico de la enfermedad. Esto se basa en que las VE secretadas por las células son capaces de reflejar la extensión de la lesión, lo que permite el abordaje de la patología en sus etapas más tempranas y en consecuencia la obtención de resultados más favorables. El contenido de las VE circulantes cambia en individuos enfermos en comparación con los sanos (Barile y Vassalli 2017), lo que permite el diagnóstico temprano de ARD, especialmente útil en las enfermedades neurodegenerativas (DeCastro et al. 2021). Estas se aíslan de los distintos fluidos y se analiza su perfil de proteínas y genes expresados en busca de biomarcadores de enfermedades. Para ello se compara el perfil proteómico y genómico obtenido con el expresado por fluidos de individuos sanos (Figura 7) (Mathivanan et al. 2010).

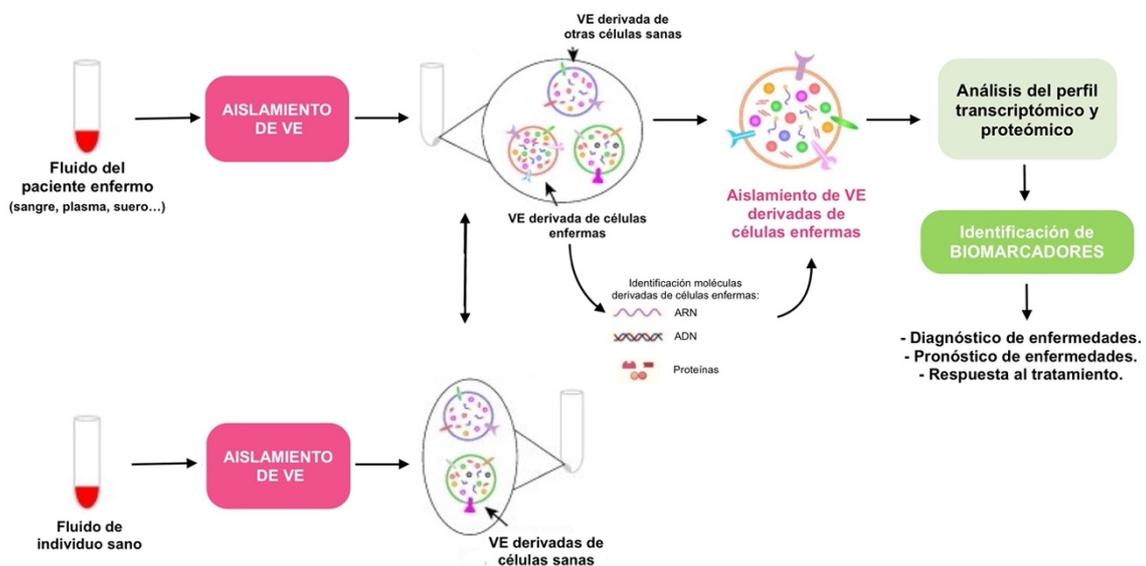


Figura 7. Obtención de biomarcadores derivados de VE. Los fluidos de un paciente enfermo contienen gran variedad de VE circulantes. Entre ellas se encuentran VE derivadas de células sanas y VE derivadas de las células enfermas implicadas en la patología, entre otras. El aislamiento de las VE, el análisis de su expresión de moléculas derivadas de enfermedades (ARN, ADN y proteínas) y su comparación con VE aisladas de individuos sanos, permite identificar biomarcadores útiles para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, así como para la monitorización de la respuesta a tratamientos (Elaboración propia basada en Mathivanan et al. 2010).

Por ejemplo, en la EA, el diagnóstico se produce cuando se manifiestan los síntomas de la enfermedad, en una etapa avanzada de la misma. Esto es debido a que no se conocen biomarcadores eficientes para el diagnóstico temprano de EA, por lo que se detecta cuando ya existe un deterioro cognitivo importante. Se ha determinado que los pacientes con EA presentan menores niveles en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) de exosomas con miARN-193b. Por lo que la medición de estos permite detectar la EA en sus primeras etapas y diferenciarla de un deterioro cognitivo leve (con mayores niveles de miARN-193b en exosomas circulantes) (Croese

y Furlan 2018). Además, también es posible el diagnóstico y la determinación del estado de la enfermedad mediante la detección de VE enriquecidas en las proteínas responsables de esta (A β y TAU) (Schou et al. 2020). Es decir, las VE tienen potencial para ser usadas en “biopsia líquida” para establecer el estado de progresión de la enfermedad (Zhou et al. 2020). Del mismo modo es posible el uso de VE como biomarcadores de EP, ya que se ha determinado un enriquecimiento en α -syn en VE circulantes de pacientes con EP y su detección elevada en sangre podría servir como diagnóstico de la patología (Doyle y Wang 2019).

La aplicación de VE como biomarcadores también puede ser de gran utilidad en cáncer, ya que la detección en etapas tempranas y la administración de un tratamiento precoz podría evitar la metástasis y aumentar la supervivencia de los pacientes (Bhat et al. 2021). Muchas VE circulantes están enriquecidas con fragmentos de ARNm asociados con el cáncer y análisis de estas VE podría permitir la detección temprana de determinados tumores (Cheng y Hill 2022).

Además, las VE también se pueden usar para monitorizar la respuesta del organismo a un determinado tratamiento farmacoterapéutico. Los niveles del marcador dependen del estado de progresión de la enfermedad. Por lo tanto, con la administración de un tratamiento eficaz cabría esperar un cambio en los niveles del biomarcador. Estos cambios se pueden monitorizar y así determinar la eficacia del tratamiento (Doyle y Wang 2019).

4.3.2. Uso terapéutico de VE.

El interés por las posibilidades terapéuticas que ofrecen las VE, en especial los exosomas por su menor tamaño, ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos años. La participación de estas en numerosos procesos relacionados con el envejecimiento las sitúa como un objetivo alentador para el desarrollo de nuevas terapias basadas en VE. Se trata de un campo aun en investigación, pero ya se ha visto que su uso puede ser ventajoso debido sus características. Presentan una baja inmunogenicidad, una gran estabilidad, posibilidad de almacenamiento, gran tolerancia, la posibilidad de modificar a las células diana según su contenido y la capacidad para atravesar barreras biológicas, entre las que destaca la barrera hematoencefálica (BHE). Esta última característica es especialmente ventajosa en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, en las que el desarrollo de nuevas terapias está limitado por la imposibilidad de la mayoría de las moléculas para cruzar la BHE (Pardridge 2012). Además, su tamaño nanométrico evita que sean reconocidos por el sistema fagocítico nuclear, mejorando la estabilidad de la carga en la circulación (Cui et al. 2021) y en consecuencia también la eficacia de la entrega en las células diana (Jan et al. 2017).

Se sabe que la administración de células madre mesenquimales (MSC) derivadas de distintos tejidos como la médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo es beneficiosa para el tratamiento de enfermedades, sobre todo para la regeneración de tejidos, ya que se injertan en el tejido dañado y comienzan a diferenciarse sustituyendo a las células dañadas. No obstante, se llegó a la conclusión de que el 98% de sus efectos positivos provenían de su secretoma (es decir, el conjunto de biomoléculas que una célula secreta al exterior celular y que depende de su expresión génica) (Bang y Kim 2022), en el que se incluían VE y factores solubles paracrinos. Así, se pensó en la posibilidad de, en lugar de administrar las células madre directamente, usar VE derivadas de MSC. Estas vesículas presentan las mismas propiedades inmunorreguladoras y regenerativas de las MSC (Wiklander et al. 2019), y ya existe amplia evidencia de la eficacia del uso de VE derivadas de células madre como herramienta terapéutica, por lo que cada vez es más cercana la posibilidad del empleo de estas VE en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad como las enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, entre otras (Figura 8) (el Andaloussi et al. 2013; Das y Kale 2021).

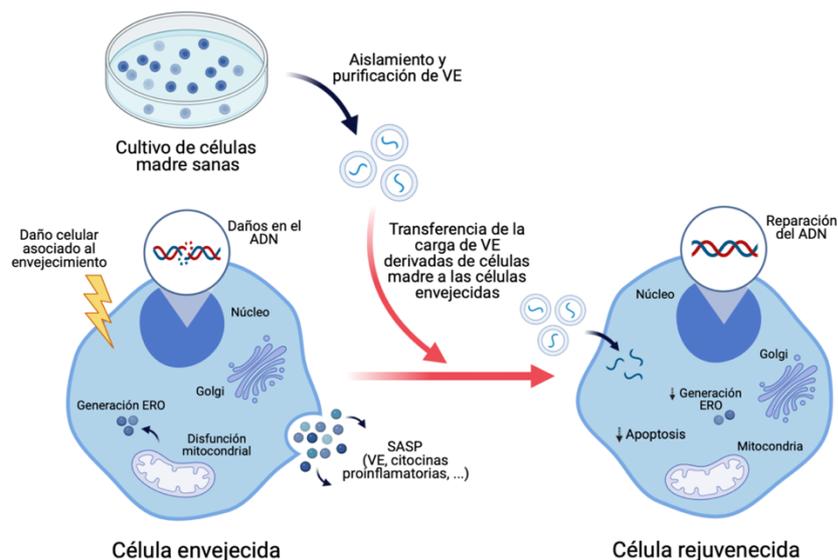


Figura 8. Transferencia de VE derivadas de células madre sanas a células envejecidas. Una propuesta de terapia con VE consiste en el tratamiento de células envejecidas (caracterizadas por daños en el ADN, disfunción mitocondrial, alta generación de ERO, gran liberación de factores de SASP, etc.) con VE derivadas de células madre sanas. Se consiguen efectos beneficiosos como la reparación del ADN, la disminución de la apoptosis y la disminución de la generación de ERO (Elaboración propia con BioRender, basada en Das y Kale 2021).

Sin embargo, dependiendo de la fuente de MSC, la carga y los efectos en la célula diana serán distintos, incluso en el contexto de la misma enfermedad. Por ejemplo, el contenido de miARN varía mucho entre las tres fuentes principales de MSC (médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo). Por lo tanto, esta heterogeneidad plantea la posibilidad de buscar otras fuentes más ideales de células madre para cada patología (Bang y Kim 2022), por ejemplo, células

progenitoras endoteliales para infarto de miocardio, aunque será necesaria la realización de pruebas adicionales (Wiklander et al. 2019).

Dado que la estructura de las VE está basada en fosfolípidos, crean un entorno ideal para la incorporación de moléculas para su transporte (Herrmann et al. 2021). Las VE pueden cargarse de forma endógena o exógena (Figura 9). La carga endógena consiste en modificar genéticamente a la célula fuente para que sobreexpresen la proteína o ARN que se desea incorporar en las VE y estas lo harán naturalmente durante su formación. Posteriormente se procede al aislamiento y purificación (Elsharkasy et al. 2020). La carga exógena se basa en la incorporación del contenido (pequeños fármacos, ARN o proteínas) en las VE una vez aisladas en el exterior (Oliveira et al. 2021).

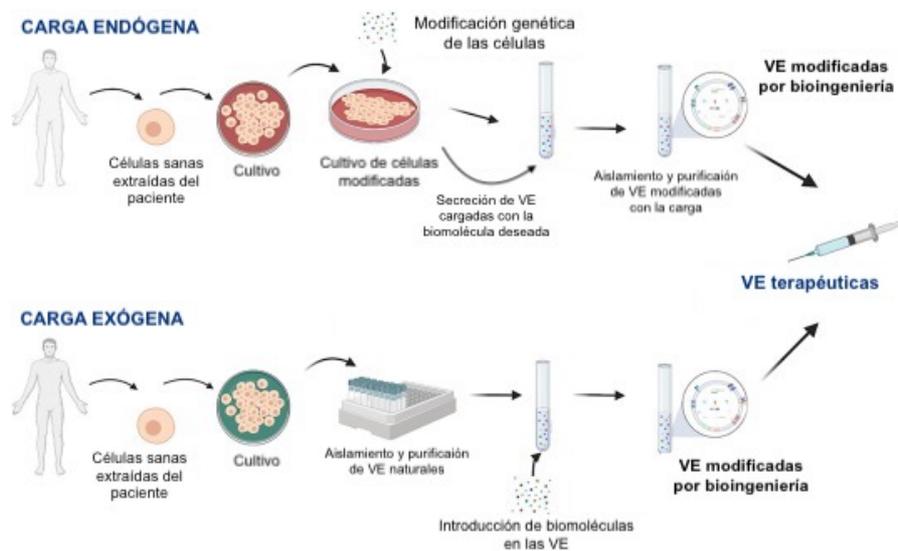


Figura 9. Métodos de carga de VE mediante bioingeniería. La carga endógena se consigue al modificar genéticamente las células para que secreten las VE ya cargadas con la biomolécula deseada y posteriormente se aíslan para su uso terapéutico. En carga exógena primero se procede al aislamiento de VE naturales secretadas por células sanas y a continuación se introduce la biomolécula (fármacos, ARN, proteínas...) que se desee (Oliveira et al. 2021).

La posibilidad de modificación de las VE mediante técnicas de ingeniería molecular supone una gran ventaja para su uso en terapéutica, ya que así se mejoran las propiedades de las VE y las hace más eficaces en el tratamiento de enfermedades. Las principales posibilidades de modificación de las VE (aunque existen otras posibles transformaciones) mediante ingeniería son la modificación de la carga y la expresión de moléculas de superficie, además de la combinación de ambas (Wu et al. 2021).

Las VE pueden cargarse con biomoléculas, fármacos o material genético con una intención terapéutica. Por ejemplo, la carga de exosomas con fármacos que originalmente no pueden atravesar la BHE (como doxorubicina o catalasa) permitiría solventar esta limitación y ampliar la posible aplicación de biomoléculas para tratamiento de enfermedades del SNC. Además de

permitir el paso por la BHE, también pueden limitar los efectos secundarios de determinados fármacos como el paclitaxel, en el que su uso como antitumoral está restringido por la aparición de reacciones adversas dependientes de la dosis. También mejoran la estabilidad y biodisponibilidad de moléculas que, libres, la presentan disminuida, lo que limita su utilización terapéutica, como la curcumina. La carga con material genético como ADN o ARN las convierte en agentes de terapia génica, lo que les permite modificar la información genética alterada de las células receptoras y así tratar diversas enfermedades (Zhang et al. 2020).

Por otro lado, también podrían modificarse para que expresen moléculas de superficie específicas. Por ejemplo, la incorporación de ligandos de superficie específicos para un determinado receptor expresado en las células diana permite dirigir a las VE selectivamente a estas células. Se produce una interacción específica ligando-receptor que hace que aumente la eficacia del tratamiento (Wiklander et al. 2019).

Para poner de manifiesto el potencial terapéutico de las VE se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se usan VE derivadas de distintas células, con o sin modificaciones por bioingeniería, en el tratamiento de determinadas enfermedades. A continuación, se revisarán algunos ejemplos de propuestas de terapias basadas en VE para el tratamiento de ARD y los resultados obtenidos.

Bai et al. demostraron los beneficios del empleo de exosomas derivados de células progenitoras endoteliales (EPC) como tratamiento de la aterosclerosis causada por diabetes mellitus. Descubrieron que de los 10 miARN más expresados en estas VE, la mayoría participan en la aterosclerosis, algunos con efectos negativos impulsando la aparición de aterosclerosis y otros con un efecto beneficioso para el control de la patología. El experimento consistió en la inyección por vía intravenosa de exosomas derivados de EPC en modelos de ratón con diabetes aterosclerótica. Tras el tratamiento con estas vesículas, se observó que el efecto general fue una disminución de la placa de ateroma y de los factores inflamatorios, además de una disminución del estrés oxidativo y una mejora en la vasodilatación, lo que conllevó a una mejora en la disfunción endotelial y en la aterosclerosis (Bai et al. 2020).

En la actualidad, no existe ningún tratamiento eficaz contra la EA. Esto unido a que se trata de la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, hace de las VE una posible terapia muy prometedora (Cui et al. 2021). Jahangard et al. estudiaron el efecto de la inyección de exosomas derivados de MSC de médula ósea cargados con miARN-29b en modelos de ratas con EA (la familia de miARN-29 se regula a la baja en la EA). Se obtuvieron resultados positivos,

mostrándose una mejora en el deterioro cognitivo y de la memoria asociado a la enfermedad (Jahangard et al. 2020).

Wang et al. presentaron otro estudio en el que usaron exosomas derivados de macrófagos cargados con curcumina. La curcumina tiene propiedades beneficiosas para el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, no puede cruzar la BHE de forma libre. Esta limitación fue solventada con su inclusión en exosomas. Se realizó la inyección de los exosomas cargados con curcumina en modelos *in vivo* de ratón con EA y se obtuvieron resultados positivos. Se inhibió la fosforilación de TAU, lo que condujo a una disminución de las lesiones neuronales, un alivio del deterioro cognitivo y una mejora en los problemas de memoria asociados a la EA (Wang et al. 2019).

Por otro lado, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson Xue et al. probaron que la administración vía intraperitoneal de VE derivadas de MSC favorecieron la reversión beneficiosa de la EP en modelos de ratón con dicha enfermedad, gracias a la promoción de la angiogénesis al aumentar la expresión de ICAM-1 (Xue et al. 2021).

Otra propuesta de tratamiento para la EP consiste en la inyección de VE derivados de macrófagos cargados con catalasa (enzima antioxidante que revierte los efectos de las ERO tóxicas) en modelos de ratón con EP. Esto se basa en que en la EP se originan niveles bajos de catalasa y de super óxido dismutasa, y al producirse ERO, estas desencadenan activación de la microglía e inflamación cerebral. Por tanto, la administración de VE cargadas con catalasa puede revertir estos efectos y mejorar la neurodegeneración en la EP. Se ha visto que solo es efectivo si se inyecta la catalasa contenida en VE, no de forma libre, ya que solo así esta podrá cruzar la BHE (Haney et al. 2015; Xiao et al. 2021).

En el campo del cáncer el empleo de VE está dirigido principalmente a la modificación de exosomas mediante la carga con fármacos quimioterápicos, fragmentos de ncARN o ligandos de superficie (Oliveira et al. 2021). La carga de VE con agentes quimioterápicos permite disminuir la citotoxicidad hacia células sanas y los efectos secundarios respecto a la administración de fármaco libre. Igualmente pueden cargarse con fragmentos de ncARN como miARN, siARN, etc. Un ejemplo de propuesta de terapia contra el cáncer de páncreas consistió en el diseño de exosomas cargados con siARN que se dirigía e inhibía la expresión del gen K-Ras mutado en la mayoría de tumores pancreáticos. La administración de exosomas cargados con el siARN en modelos de ratón con cáncer de páncreas mostraron una disminución del tumor y un aumento en la supervivencia frente a los ratones control (Chang et al. 2021).

Además, también se pueden insertar ligandos específicos en las superficies de los exosomas para promover su unión a receptores sobreexpresados en células tumorales. Esto mejora la selectividad del tratamiento y proporciona una mejora en la captación del fármaco (Ma et al. 2021). Un ejemplo de este tipo de modificación fue el llevado a cabo por Tian et al. en el que se modificaron mediante ingeniería exosomas derivados de células dendríticas inmaduras para que expresaran la glicoproteína de membrana 2b asociada a lisosomas (lamp2b) fusionada con el péptido de direccionamiento iRGD para integrina α_v . Posteriormente se purificaron y se cargaron con doxorubicina. Con la incorporación del péptido de direccionamiento se consiguió dirigir al fármaco eficazmente a las células de cáncer de mama integrina α_v^+ y conseguir un mayor efecto antitumoral (Tian et al. 2014).

5. Conclusiones.

Las VE son capaces de transmitir información de una célula a otra, por tanto, en el entorno del envejecimiento, estas VE transportaran biomoléculas derivadas de células envejecidas hasta otras células. La captación de dichas VE por células sanas desencadena una transmisión del estado envejecido derivado de la célula fuente. Dado que las VE intervienen en numerosos procesos relacionados con la progresión del envejecimiento y en consecuencia de la aparición y propagación de ARD, se pensó en la posibilidad de utilizarlas como herramientas de diagnóstico e incluso terapéuticas.

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren un gran potencial terapéutico de las VE para el tratamiento de ARD debido a las ventajas derivadas de sus características intrínsecas. Sin embargo, la aplicación en clínica de terapias basadas en VE aun es un desafío debido a que, al ser un campo bastante novedoso, aun son necesarios mayores avances técnicos entorno al mismo. En primer lugar, es necesaria la aprobación estandarizada de un sistema de aislamiento y caracterización de VE que reduzca la heterogeneidad en los tipos de VE. El aislamiento de VE se ha estado llevando a cabo por ultracentrifugación, obteniéndose bajos rendimientos, por lo que sería necesario el empleo de técnicas más novedosas. Para la obtención de VE a gran escala se usan biorreactores, sin embargo, aparecen problemas relacionados con el medio empleado, que también contiene VE. Por otro lado, será necesaria la identificación del mecanismo de acción de las VE como agentes terapéuticos, así como las dosis y demás parámetros necesarios para la aplicación clínica, además de la realización de los ensayos de seguridad precisos.

En cuanto al uso como biomarcadores, es prometedor, sobre todo en patologías neurodegenerativas y cáncer, en los que una detección temprana y tratamiento precoz pueden ser determinantes para el paciente. Sin embargo, su aplicación en clínica también presenta

limitaciones. Principalmente sería necesario el desarrollo de métodos de aislamiento relativamente rápido y con alto rendimiento de las VE, además de la estandarización entre laboratorios de los procedimientos empleados para el diagnóstico. La cuantificación de VE aún sigue siendo un reto debido al pequeño tamaño de estas. Por todo esto, aunque el potencial de las VE es muy prometedor y la investigación entorno a ellas ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos años, aún se requiere de avances tecnológicos y ensayos clínicos que muestren seguridad y un balance beneficio/coste positivo.

6. Bibliografía.

- Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cel Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301–312.
- el Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347–357.
- Aubertin K, Piffoux M, Sebbagh A, Gauthier J, Silva AKA, Gazeau F. Applications thérapeutiques des vésicules extracellulaires. *M/S*. 2021;37(12):1146–1157.
- Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Søreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg*. 2016;103(2):e29–46.
- Bai S, Yin Q, Dong T, Dai F, Qin Y, Ye L, et al. Endothelial progenitor cell-derived exosomes ameliorate endothelial dysfunction in a mouse model of diabetes. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110756.
- Bang OY, Kim JE. Stem cell-derived extracellular vesicle therapy for acute brain insults and neurodegenerative diseases. *BMB Rep*. 2022;55(1):20–29.
- Bao S, Hu T, Liu J, Su J, Sun J, Ming Y, et al. Genomic instability-derived plasma extracellular vesicle-microRNA signature as a minimally invasive predictor of risk and unfavorable prognosis in breast cancer. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):22.
- Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;174:63–78.
- Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*. 2016;30(6):836–848.
- Behbahani GD, Khani S, Hosseini HM, Abbaszadeh-Goudarzi K, Nazeri S. The role of exosomes contents on genetic and epigenetic alterations of recipient cancer cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(10):1031–9.
- Bhat EA, Sajjad N, Thokar FM. Current advancement of exosomes as biomarkers for cancer diagnosis and forecasting. *Cancer Treat Research Commun*. 2021;28:100417.
- Buford TW. Hypertension and aging. *Ageing Res Rev*. 2016;26:96–111.

- Cabeza L, Perazzoli G, Peña M, Cepero A, Luque C, Melguizo C, et al. Cancer therapy based on extracellular vesicles as drug delivery vehicles. *J Control Release*. 2020;327:296–315.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729–40.
- Cavalcanti HN, Silva Filho TJ da, Queiroz LMG. Extracellular vesicles: what we know so far. *Clinical and Laboratorial Research in Dentistry*. 2021. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.2357-8041.clrd.2021.180055>
- Chang WH, Cerione RA, Antonyak MA. Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods Mol Biol*. 2021; 2174:143-170.
- Charla E, Mercer J, Maffia P, Nicklin SA. Extracellular vesicle signalling in atherosclerosis. *Cell Signal*. 2020;75:109751.
- Chatsirisupachai K, Palmer D, Ferreira S, Magalhães JP. A human tissue-specific transcriptomic analysis reveals a complex relationship between aging, cancer, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13041.
- Chatterjee A, Gerdes MW, Martinez SG. Identification of Risk Factors Associated with Obesity and Overweight—A Machine Learning Overview. *Sensors (Basel)*. 2020;20(9):2734.
- Cheng L, Hill AF. Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(5):379–399.
- Coly P, Boulanger CM. Role of extracellular vesicles in atherosclerosis: An update. *J Leukoc Biol*. 2022;111(1):51–62.
- Coly PM, Loyer X. Vésicules extracellulaires et maladies cardiovasculaires. *M/S*. 2021;37(12):1119–24.
- da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev*. 2016;29:90–112.
- Croese T, Furlan R. Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med*. 2018;60:52–61.
- Cui G hong, Zhu J, Wang Y chao, Wu J, Liu J ren, Guo H dong. Effects of exosomal miRNAs in the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2021;200:111593.
- Dai J, Su Y, Zhong S, Cong L, Liu B, Yang J, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):145.
- Das M, Kale V. Involvement of extracellular vesicles in aging process and their beneficial effects in alleviating aging-associated symptoms. *Cell Biol Int*. 2021;45(12):2403–2419.
- DeCastro J, Littig J, Chou PP, Mack-Onyeike J, Srinivasan A, Conboy MJ, et al. The Microfluidic Toolbox for Analyzing Exosome Biomarkers of Aging. *Molecules*. 2021;26(3):535.

- Doyle L, Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7):727.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
- Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, de Jong OG, Schiffelers RM, Andaloussi S el, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:332–343.
- Fafián-Labora J, Morente-López M, Sánchez-Dopico MJ, Arntz OJ, van de Loo FAJ, de Toro J, et al. Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):13.
- Fakouri NB, Hou Y, Demarest TG, Christiansen LS, Okur MN, Mohanty JG, et al. Toward understanding genomic instability, mitochondrial dysfunction and aging. *FEBS J*. 2019;286(6):1058–1073.
- Fazeli PK, Lee H, Steinhauser ML. Aging Is a Powerful Risk Factor for Type 2 Diabetes Mellitus Independent of Body Mass Index. *Gerontology*. 2020;66(2):209–210.
- Fu Z, Zhou E, Wang X, Tian M, Kong J, Li J, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced microparticles promote endothelial monocyte adhesion via intercellular adhesion molecule 1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;313(5):C567–574.
- Gao P, Li X, Du X, Liu S, Xu Y. Diagnostic and Therapeutic Potential of Exosomes in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:790863.
- Giró O, Jiménez A, Pané A, Badimon L, Ortega E, Chiva-Blanch G. Extracellular vesicles in atherothrombosis and cardiovascular disease: Friends and foes. *Atherosclerosis*. 2021;330:61–75.
- Guix FX. The interplay between aging-associated loss of protein homeostasis and extracellular vesicles in neurodegeneration. *J Neurosci Res*. 2020;98(2):262–283.
- Gupta D, Zickler AM, el Andaloussi S. Dosing extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;178:113961.
- Han C, Xiong N, Guo X, Huang J, Ma K, Liu L, et al. Exosomes from patients with Parkinson's disease are pathological in mice. *J Mol Med*. 2019;97(9):1329–1344
- Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release*. 2015;207:18–30.
- Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*. 2021;16(7):748–759.
- Hill AF. Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. *J Neurosci*. 2019;39(47):9269–9273.

- Hutcheson JD, Aikawa E. Extracellular vesicles in cardiovascular homeostasis and disease. *Curr Opin Cardiol.* 2018;33(3):290–297.
- Jahangard Y, Monfared H, Moradi A, Zare M, Mirnajafi-Zadeh J, Mowla SJ. Therapeutic Effects of Transplanted Exosomes Containing miR-29b to a Rat Model of Alzheimer’s Disease. *Front Neurosci.* 2020;14:564.
- Jan AT, Malik MA, Rahman S, Yeo HR, Lee EJ, Abdullah TS, et al. Perspective Insights of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: A Critical Appraisal. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:317.
- Kalra H, Drummen G, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):170.
- Kane AE, Sinclair DA. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2019;54(1):61–83.
- Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):63.
- Kirkland JL, Tchkonina T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21–8.
- Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.* 2018;217(1):51–63.
- Kreger B, Johansen E, Cerione R, Antonyak M. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers (Basel).* 2016;8(12):111.
- Krisko A, Radman M. Protein damage, ageing and age-related diseases. *Open Biol.* 2019;9(3):180249.
- Kritsilis M, v. Rizou S, Koutsoudaki P, Evangelou K, Gorgoulis V, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Intl J Mol Sci.* 2018;19(10):2937.
- Kulkarni AS, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. *Cell Metab.* 2020;32(1):15–30.
- Labbadia J, Morimoto RI. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem* 2015;84(1):435–64.
- Lananna BV, Imai S. Friends and foes: Extracellular vesicles in aging and rejuvenation. *FASEB BioAdv.* 2021;3(10):787–801.
- Lee M, Ban JJ, Yang S, Im W, Kim M. The exosome of adipose-derived stem cells reduces β -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Brain Res.* 2018;1691:87–93.
- Lee S, Mankhong S, Kang JH. Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer’s Biomarkers: Opportunities and Challenges. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1728.

- Li Z, Zhang Z, Ren Y, Wang Y, Fang J, Yue H, et al. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*. 2021;22(2):165–87.
- Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–25.
- Liu Y, Shen Q, Zhang L, Xiang W. Extracellular Vesicles: Recent Developments in Aging and Reproductive Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:577084.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–1217.
- Ma Y, Dong S, Li X, Kim BYS, Yang Z, Jiang W. Extracellular Vesicles: An Emerging Nanoplatfrom for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2021;10:606906.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9–17.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010;73(10):1907-20.
- Mato-Basalo R, Lucio-Gallego S, Alarcón-Veleiro C, Sacristán-Santos M, Quintana M del PM, Morente-López M, et al. Action Mechanisms of Small Extracellular Vesicles in Inflammaging. *Life*. 2022;12(4):546.
- Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur J Cell Biol*. 2020;99(6):151108.
- Monti P, Solazzo G, Ferrari L, Bollati V. Extracellular Vesicles: Footprints of environmental exposures in the aging process? *Curr Environ Health Rep*. 2021;8(4):309-322.
- Nam G, Choi Y, Kim GB, Kim S, Kim SA, Kim I. Emerging Prospects of Exosomes for Cancer Treatment: From Conventional Therapy to Immunotherapy. *Adv Mater*. 2020;32(51):2002440.
- Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol*. 2012;22(17) R741-52.
- Niedernhofer LJ, Gurkar AU, Wang Y, Vijg J, Hoeijmakers JHJ, Robbins PD. Nuclear Genomic Instability and Aging. *Annu Rev Biochem*. 2018;87(1):295–322.
- Novoa-Herrán S. Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia. *Biomédica*. 2021;41(3):555–589.
- Oliveira C, Calmeiro J, Carrascal MA, Falcão A, Gomes C, Miguel Neves B, et al. Exosomes as new therapeutic vectors for pancreatic cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021;161:4–14.

- Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(6):1093–1106.
- Pardridge WM. Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(11):1959–1972.
- Pyo IS, Yun S, Yoon YE, Choi JW, Lee SJ. Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. *Molecules.* 2020;25(20):4649.
- Quek C, Hill AF. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(4):1178–1186.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373–383.
- Rastogi S, Sharma V, Bharti PS, Rani K, Modi GP, Nikolajeff F, et al. The Evolving Landscape of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: Exosomes Characteristics and a Promising Role in Early Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):440.
- Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds.* 2017;29(6):168-174.
- Robbins PD. Extracellular vesicles and aging. *Stem Cell Investig.* 2017;4:98.
- Ruan Z. Extracellular vesicles drive tau spreading in Alzheimer’s disease. *Neural Regen Res.* 2022;17(2):328.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging.* 2012;4(3):166–75.
- Schou AS, Nielsen JE, Askeland A, Jørgensen MM. Extracellular vesicle-associated proteins as potential biomarkers. *Adv Clin Chem.* 2020;99:1–48.
- Schumacher B, Pothof J, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature.* 2021;592(7856):695–703.
- Siametis A, Niotis G, Garinis GA. DNA Damage and the Aging Epigenome. *J Invest Dermatol.* 2021;141(4):961–7.
- Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res.* 2017;66:30–41.
- Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell.* 1991;65(3):417–427.
- Stuenkel A, Kunadt M, Kruse N, Bartels C, Moebius W, Danzer KM, et al. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies. *Brain.* 2016;139(2):481–494.
- Takasugi M. Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging Cell.* 2018;17(2):e12734.

- Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*. 2014;35(7):2383–90.
- Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016;164(6):1226–1232.
- Ullah M, Ng NN, Concepcion W, Thakor AS. Emerging role of stem cell-derived extracellular microRNAs in age-associated human diseases and in different therapies of longevity. *Ageing Res Rev*. 2020;57:100979.
- Upadhyia R, Zingg W, Shetty S, Shetty AK. Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Journal Control Release*. 2020;323:225–239.
- Wang H, Sui H, Zheng Y, Jiang Y, Shi Y, Liang J, et al. Curcumin-primed exosomes potently ameliorate cognitive function in AD mice by inhibiting hyperphosphorylation of the Tau protein through the AKT/GSK-3 β pathway. *Nanoscale*. 2019;11(15):7481–7496.
- Wang Z, Lieberman PM. The crosstalk of telomere dysfunction and inflammation through cell-free TERRA containing exosomes. *RNA Biol*. 2016;13(8):690–695.
- Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötvall J, Breakefield XO, el Andaloussi S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med*. 2019;11(492):eaav8521.
- Wu P, Zhang B, Ocansey DKW, Xu W, Qian H. Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. *Biomaterials*. 2021;269:120467.
- Xiao Y, Wang SK, Zhang Y, Rostami A, Kenkare A, Casella G, et al. Role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*. 2021;201:102022.
- Xue C, Li X, Ba L, Zhang M, Yang Y, Gao Y, et al. MSC-Derived Exosomes can Enhance the Angiogenesis of Human Brain MECs and Show Therapeutic Potential in a Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Aging Dis*. 2021;12(5):1211.
- Yang J, Zou X, Jose PA, Zeng C. Extracellular vesicles: Potential impact on cardiovascular diseases. *Adv Clin Chem* 2021;105:49–100.
- Yin Y, Chen H, Wang Y, Zhang L, Wang X. Roles of extracellular vesicles in the aging microenvironment and age-related diseases. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(12):e12154.
- Yoon JH, Choi BJ, Nam SW, Park WS. Gastric cancer exosomes contribute to the field cancerization of gastric epithelial cells surrounding gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2022;25(3):490–502.
- Yuan Q, Li X dong, Zhang S miao, Wang H wei, Wang Y liang. Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases: Insights and new perspectives. *Genes Dis*. 2021;8(2):124–132.
- Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*. 2015;65(8):783–797.

- Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211–216.
- Zhang H, Wu J, Wu J, Fan Q, Zhou J, Wu J, et al. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice. *J Nanobiotechnology*. 2019;17(1):29.
- Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomed*. 2020;15:6917–34.
- Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):144.