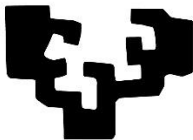


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FARMAZIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE FARMACIA

GRADU AMAIERAKO LANA

**EXOSOMEN ERABILERA MINBIZIAREN AURKAKO AGENTE
TERAPEUTIKOEN GARRAIATZAILE BEKTORIZATU GISA:
KARGA METODOAK ETA INTERES KLINIKOA.**

Farmaziako Gradua

2022 / 2023 Ikasturtea

Egilea

Marina López Díez

AURKIBIDEA

LABURDURAK	I
LABURPENA.....	II
1 SARRERA	1
2 HELBURUAK.....	2
3 GARAPENA	2
3.1 EXOSOMAK MINBIZIAN	2
3.1.1 Exosomen ezaugarri orokorrak	2
3.1.2 Exosomek minbizian jokatzen duten papera	4
3.1.3 Erabilera terapeutiko potentzialak	5
3.2 EXOSOMAK ISOLATZEKO ETA KARGATZEKO TEKNIKAK.....	6
3.2.1 Isolatze teknikak.....	6
3.2.1.1 Ultrazentrifugazioa.....	7
3.2.1.2 Polimero prezipitazioan oinarritutakoak	7
3.2.1.3 Tamainan oinarritutakoak.....	7
3.2.1.4 Immunoafinitate harrapaketan oinarritutakoak.....	8
3.2.2 Kargatzeko teknikak	9
3.2.2.1 Karga exogenoa.....	9
3.2.2.2 Karga endogenoa	13
3.3 MINBIZIAN EXOSOMAK KARGATZEAREN ABANTAILAK.....	14
3.3.1 Kimioterapia garraiatzen dituzten exosomak	14
3.3.2 Bestelako agente terapeutikoak garraiatzen dituzten exosomak	18
4 ONDORIOAK ETA ETORKIZUNEKO GOGOETAK	20
5 BIBLIOGRAFIA.....	21

LABURDURAK

Ab	Antigorputza
Ag	Antigenoa
CRISPR/cas9	Multzokatutako eta tarteka bateratutako errepikapen palindromiko laburrak
DARP	Ankilina-proteina errepikapenak
DC	Zelula dendritikoa
DOX	Doxorrubizina
ENZ	Enzalutamida
ESCRT	Garraiorako behar diren sailkapen endosomaleko konplexuak
EV	Besikula estrazelularrak
EXO	Exosoma
HBMS	Giza hezurmuineko zelula ama mesenkimalak
HCT-116^{5FR}	Giza kolon minbiziko zelula lerrotik 5-fluorouraziloarekiko erresistenteak diren zelulak
HER2	Giza hazkuntza faktore epidermikoaren 2 hartzailea.
HHE	Hesi hematoentzefalikoa
HIF	Hipoxia induzitzen duen faktorearen
ILV	Besikula intraluminarra
MHC	Histobateragarritasun konplexu nagusia
miRNA edo miR	Mikro azido erribonukleikoa
MMP-2/9	Matrizeko metaloproteinasa 2/9
mRNA	Azido erribonukleiko mezularia
MSC	Zelula ama mesenkimalak
mTOR	Ugaztun zeluletako rapamizina itua
MMT entsegu	Zitotoxikotasun entsegu kolorimetrikoa

MVB	Gorputz multibesikularra
MWCO	Pisu molekular bidezko mugaketa
NK	Natural Killerra
PARP	Poli(adenosina difosfato erribosa) polimerasa
PD1/PDL1	Heriotza programatuaren errezeptorea eta ligandoa
PEGP	Polietilenglikol prezipitazioa
PHD1/2	1 eta 2 motako prolil hidrolasak
PTEN	Fosfatasa eta tensina homologoa
PTX	Paklitaxela
qRT-PCR	Kuantitatiboa den denbora errealeko polimerasa erreakzio kateatua
Redcan	Minbizi Erregistroen Espainiako Sarea
SEC	Tamaina eskusio kromatografia
SKOV3	Emakume kaukasiar aszitisetik deribatutako obulutegi zelula lerroa
siRNA	Interferentzia txikiko RNA
$\Delta U(t)$	Mintzean zeharreko potentzial-diferentzia
5-FU	5-Fluorouraziloa

LABURPENA

Exosomak zelula ugariengatik sintetizatuak diren besikula estrazelularren parte dira, beste besikula mota batzuekin batera. Orain arte, ez da oso irizpide sendorik egon beraien artean ezberdintzeko, baina argi dago, besikula hauek zelulen arteko komunikazioa bideratzen dutela barnean daramatzaten osagaiak zeluletatik zeluletara garraiatuz. Horregatik, hauek isolatu eta intereseko agente terapeutikoarekin kargatzeko aukera, zelulaz askeko terapia esperantzagarria bilakatu da.

Hari beretik, intereseko agente terapeutikoarekin kargatzerakoan bi tekniken aldaera bereiztu daitezke. Alde batetik, exosomak isolatu eta jarraian agente terapeutikoa kargatzen dituztenak eta bestetik, zelula exosoma emaleei intereseko agente terapeutikoa kargatzeko aukera eman, eta ondoren, zelula hauek ekoiztutako exosoma kargatuak isolatzen dituztenak. Bata edo bestearen erabilera, kargatu nahi den agente terapeutikoaren eta burutuko den ikerketaren araberakoa da.

Amaitzeko, exosomen erabilera agente terapeutikoen garraiatzaile bektorizatu gisa, bereziki minbizi terapiarako geroz eta gehiago ikertu da. Berrikuspen honetan zehar landuko den moduan, exosomen barnean doxorribizina bezalako antitumoralen kargatzeak, terapiaren eraginkortasuna hobetzen duela azaleratu du farmako askeak duen inespezifikotasuna saihesten duelako. Ondorioz, exosomak agente antitumoralen garraiorako erabiltzea aukera oso itxaropentsua bilakatu da, egun minbizian dauden hutsune terapeutikoak betetzeko.

1 SARRERA

Gaur egun minbizia mundu mailako morbi-mortalitate kausarik garrantzitsuenetakoa da. Intzidentziari erreparatuta 2020an gehien diagnostikatutako minbiziak bular (2.261.419), birika (2.206.771) zein kolon-ondestekoak (1.931.590) izan ziren (1). Aipatutakoaz gain, 2020ean Espainiako bigarren heriotza arrazoi nagusia bilakatu zen, zirkulazio sistemako gaixotasunen atzetik soilik (2). Etorkizunari begira, Espainian 2023rako 279.260 kasu diagnostikatuko direla estimatzen da Minbizi Erregistroen Espainiako Sarearen (Redecan) kalkuluen arabera, aurreko urtearen oso antzera (3). Hala ere, Osasunaren Mundu Erakundeak plazaratutako datuen arabera minbiziagatik zendutako heren bat saihestu daitezkeen bost faktore hauengatik ematen dira: tabakoa, alkohola, obesitatea, agente infekziosoak eta erradiazio ultramorea (4). Beraz, honek berebiziko garrantzia izan dezake, kalkulatzeko baita Espainiar gizarteari 19 300 milioi euroko gastua eragiten diola gaixotasun honek, ahaztu gabe gaixo bakoitzari eta haren ingurunekoei suposatzen dien artega (5).

Minbizi prozesuari dagokionez, ulertu behar da, gorputzeko zelulak zatitu eta hil egiten direla denbora jakin batera. Aldiz, minbizi-zelulek gaitasun hori galdu eta mugarik gabe zatitzen dira, masa berriak sortuz, tumore edo neoplasia deritzenak. Gainera, zelula hauen barreiapenak gorputzean zehar metastasiak sor ditzake (6).

Tratamendua minbizi motaren, gaixoaren adinaren eta komorbilitateen arabekoa da normalean. Gaur egun, lau tratamendu nagusi bereiz daitezke: kirurgia, kimioterapia, erradioterapia eta terapia zuzendua. Minbizia kapsularatuta egotekotan ebakuntza baten bidez kentzen da eta honi kirurgia deritzo. Kimioterapia aldiz, farmakoen erabileraz baliatzean datza minbizi-zelulak hiltzeko. Erradioterapia, erradiazio bidez minbizi-zelulak hiltzen dituen tratamendu mota da. Hortaz gain, terapia zuzenduak, minbizi zeluletan sortzen diren aldaketak, hazkuntzan, zatiketean eta barreiapenean laguntzen dioten horiek, erasotzen dituzten tratamenduak hartzen ditu barnean. Bertan, antigorputz monoklonalak, tirosina kinasa inhibitzaileak, ugaztun zeluletan rapamizina ituaren (mTOR) inhibitzaileak, ziklinen inhibitzaileak, poli(adenosina difosfato erribosa) polimerasa (PARP) inhibitzaileak, farmako antiangiogenikoak, hormonoterapiak eta immunoterapiak daude. Bukatzeko, aurreko sailkapenetik at tratamendu fotodinamikoa eta hipertermia bidezko terapiak aurki daitezke, haien izenek garbi azaleratzen duten moduan, argia eta tenperatura altuaz baliatuz minbizi-zelulak hiltzeko terapiak dira hurrenez hurren (7).

Minbizirako tratamenduek eritasunaren konplexutasunarengatik hainbat oztopo topatzen dituzte. Hala nola, itu farmakologikoarekin erlazionatutako erresistentziak eta farmakoak itu diren zeluletara iristeko zailtasunak (8,9). Are gehiago, mikro azido erribonukleikoek (miRNA edo miR), RNA mezulariek (mRNA), proteinek edota medikamentu kimikoek administrazio

modu konbentzionalak erabiltzean askotan ez dituzte esperotako emaitzak eskuratzen. Adibidez, miRNA erraz degradatzen da, proteinek berezko konformazioa galtzen dute haien funtzionalitatea galduz eta medikamentuek maiz zelula osasuntsuetan toxikotasun altua sortzen dute haien selektibitate faltarengatik. Beraz, exosomen erabilera agente terapeutikoen garraiatzaile gisa arazo hauek saihesteko aukera izan daiteke (10).

Exosomak besikula estrazelularren (EV) barnean sailkatzen dira ektosoma eta gorputz apoptotikoekin batera besteak beste. Besikula txiki hauek, zelulen barnean sortu eta gune estrazelularrera askatzen dira komunikazio interzelularrean funtzio garrantzitsua jokatuz. Horregatik, zeluletatik isolatu eta kargatzea aukera izan daiteke terapia bektorizatu gisa. Gainera, beraien espezifikotasun, egonkortasun, barnerapen gaitasun eta moldagarritasun potentzialek prozesu hau erraztu dezakete (11).

2 HELBURUAK

Gaur egungo terapia farmakologikoaren mugak kontuan izanik, Gradu Amaierako Lan bibliografiko honen helburua exosomak agente antineoplasikoen garraiatzaile bektorizatu gisa erabiltzearen estrategia eta balio terapeutikoa lantzea da; izan ere, azken urteetan terapian erabiltzearen ideia indarra hartzen ari da. Horretarako, exosomek minbizian jokatzen duten papera, angiogenesisia edota metastasien sorrera erraztuz; isolatu eta kargatzeko teknika endogenoak zein exogenoak eta azken urteetan burututako ikerketek ekarritako abantailen azpi atalak landuko dira.

Metodologia aldetik Pubmed, Scopus eta Google Scholar bezalako datu baseetan eskuragarri dauden artikuluen berrikuspina egingo da. Hitz-gakoak sartuz –*exosomes, malignant tumor, loading technique, drug delivery, therapy*– bilaketa bolearra burutuko da literatura zientifikoa aurkitzeko eta ondoren, informazioa bildu, ebaluatu eta kudeatuko da.

3 GARAPENA

3.1 EXOSOMAK MINBIZIAN

3.1.1 Exosomen ezaugarri orokorrak

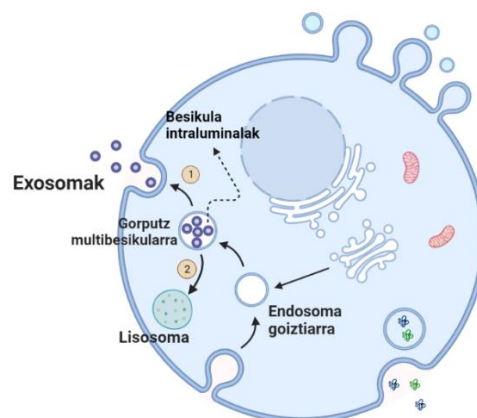
Exosomak (EXO) 30-150 nm-tako diametroa duten bigeruz lipidikoz osatutako besikula esferoideak dira. Rose Johnstone eta bere lankideek, 1983an lehenengo aldiz ardi erretikulozitoetan topatu zituzten, erretikulozitoen heltze prozesuan transferrina hartzaileen errezeptoreei jarraipena egiten ari zirela. Aurkikuntza honi esker ohartu ziren globulu gorri

helduetan exosomen bidez transferrina hartzaileen galera gertatzen zela (12–14). Hasieran, zaila zen besikula hauek gorputz apoptotikoetatik bereiztea eta une horretan, garrantzi biologiko gabeko hondakin zelular moduan hartu zituzten; hala ere, ondorengo ikerketek plazaratu zuten besikula hauek, egun exosoma bezala ezagutzen direnak, funtzio biologiko ugari betetzen zituztela hainbat prozesuetan (15).

EV hauek egoera fisiologiko zein patologikoetan askatzen dira eta eginkizun garrantzitsuak betetzen dituzte zelulen arteko komunikazio eta erregulazio epigenetikoan ezinbestekoak diren osagai bioaktiboak garraiatuz, hala nola, lipidoak, proteinak, DNA eta RNA bezalakoak. Edozein kasutan ere, exosomak behin jariatuta, gune interstizialetik zirkulaziora doaz eta komunikazio lokalean (parakrinoa) edo distalean (sistemikoa) parte hartzen dute seinale biologikoak garraiatuz. Horregatik, organoen eta zelulen arteko komunikazio sisteman garrantzitsuak dira (16).

Oraindik orain egindako ikerketetan ikusi da ia zelula guztiek exosomak ekoiztu ditzaketela; horien adibide, zelula ama mesenkimalak (MSC), T eta B zelulak, makrofagoak, zelula dendritikoak (DC) eta natural killerrak (NK) dira (12). Ondorioz, plasman, gernuan, jariapen bronkialean, amarengandiko esnean, likido amniotikoan eta limfan topatu ditzakegu besteak beste (17).

Biogenesiari dagokionez, mintz plasmatikotik endozitosiz inbaginaturako endosomen bidez garatzen hasten dira. Sortutako endosoma goiztiar hauetan, sustantzia bioaktiboak metatzen hasi eta endosoma berantiarrak bilakatzen dira. Ondoren, hauek egitura endosomiko multibesikularren (MVB) barnean multzokatuko dira eta momentu horretan, barneko besikulak besikula intraluminal (ILV) izena hartuko dute. Prozesua amaitzeko, ILVak dauzkaten MVBak lisosomekin fusionatu daitezke degradazio bide bat jarraitzeko edo prozesu exozitosiko baten bidez zelularen mintz plasmatikorekin fusionatu eta exosomak askatu ditzakete gune estrazelularrera (1. irudia) (12,16).



1. irudia. Exosomen biogenesi prozesua.

Orain arte, proteina eta lipido ugari deskribatu dira exosomen biogenesi parte hartzaile bezala. Horietako batzuk, Rab proteinak dira, besikulen trafikoa erregulatu eta exosomen sorreran parte hartzen dutenak. Horretaz gain, garraiorako behar diren sailkapen endosomaleko konplexuak (ESCRT, ingelesezko laburdura) lau azpiunitatetan banatzen dira (ESCRT-0, -I, -II y -III) eta proteina hauetako batzuk exosomen askapenean inplikaturik daude. Gainera, tetraspanina izeneko mintz-zeharreko proteinak ere topatu daitezke, exosomen komunikazioan mintzen fusioa errazten dutenak. Azkenik, lipidoak eraldatu ditzaketen hainbat entzima dituzte, esfingomielinasa bezalakoak, sortzen dituzten zeramidagatik besikulen sorrera sustatzen dutenak. Hala eta guztiz ere, zaila da exosomen sorreran parte hartzen duten osagaien funtzio zehatza ezagutzea prozesu intrazelularren parte direlako eta hauetako askok ondorioz, "*Gain-or-lost function*" ikerketak burutzerakoan emaitzak aldatu ditzakete (16).

3.1.2 Exosomek minbizian jokatzen duten papera

Exosomek zelulen arteko komunikazioan duten garrantziarengatik, tumore-zelulen eta mikroingurunearen arteko informazio transferentzian rol garrantzitsua jokatzen dute (18). Beraz, berrikuspen bibliografiko honen helburu nagusia ez bada ere, garrantzizkoa da ulertzea exosomek minbiziaren patogenesisian jokatzen duten papera.

Farmakoekiko erresistentzia, agente terapeutikoaren eraginkortasuna eta potentzia mugatzean datza. Minbizian bi eratan sailkatu daitezke farmakoekiko erresistentzia, aurretik existitzen dena (intrintsekoa) edo hartutakoa, azken hau pixkanaka minbizi zelulen mutazio genetiko eta epigenetikoengatik garatutakoa litzateke. Bertan ikusi da, exosomek paper garrantzitsua jokatzen dutela tumoreekiko espezifiko den estrategia kimioerresistentea induzitzen (19).

Aurrekoaren adibide, exosomek tratamendu kimioterapikoen gehiegizko kanporaketa eragiten dute zelula barneko kontzentrazioak gutxitzeko. Prozesu hau minbizi terapian farmakoekiko erresistentzia izateko kausa nagusia kontsideratzen da. Lehenengo, agente zitotoxikoa exosometan barneratzen da eta ondoren, exosoma hauen jariaketa burutzen da farmakoa zeluletatik kanporatua izateko. Hau frogatzeko asmoz, prostatakiko minbizian enzalutamidarekin (ENZ) tratatuak izan ziren pazienteen exosomak aztertu ziren. ENZrekiko erresistenteak ziren zeluletatik askatutako exosometan ENZ kontzentrazio nabarmen handiagoak topatu ziren ENZrekiko sentikorrek ziren zeluletatik askatutako exosomekin alderatuta. Bestalde, bular eta obulutegiko minbizi zelulak paklitaxelarekin (PTX) edo doxorribuzinarekin (DOX) tratatzean dosi menpeko exosomen jarioa ikusi zen, hots, agente terapeutikoen kontzentrazioak handitzean exosomen jarioaren handipena jazotzen zela. Gainera, exosoma hauek aztertzerakoan, farmako kontzentrazio handiak garraiatzen zituztela

topatu zen. Hala ere, exosomek farmakoekiko erresistentzia garatzeko mekanismo desberdinak dituzte (19).

Tumore garapena ere exosomek erregulatzen dute, T eta B linfzito, makrofago, NK eta tumore mikroingurunearekin elkarrekintzak erregulatuz. Adibidez, melanoma, giltzurrun eta biriketako zelula ez-txikien minbizietatik askatutako exosometan heriotza programatuaren ligandoaren (PDL1) gainespresioa ematen da. Ondorioz, T zeluletan dauden PDL1-en hartzaileekin (PD1) lotu eta erantzun immunea inaktibatzen da tumorearen garapena faboratuz. Beste adibide bat ondesteko minbizian gertatzen da; izan ere, minbizi honetako zelulek, miR203 garraiatzen duten exosomak jariatzen dituzte. Era berean, M2 motako makrofagoek tumore hazkuntza eta metastasia bultzatzeko gaitasuna dutela kontuan hartuz, miR203-ak monozitoen azken diferentziazioa burutzen du, M2 motako makrofagoen espresioa handituz (20).

Angiogenesisia, odol hodi berrien sorreran datza jatorriz existitzen direnetik abiatuta. Era honetan, ehunetan, oxigeno, nutriente eta hondakinen elkartrukea baimentzen da (21). Estimulu desberdinek angiogenesisia indusitzen dute baino nabarmenatariko bat ehunetako hipoxia da; izan ere, hipoxia gunean hipoxia indusitzen duen faktorearen (HIF) produkzioa sustatzen da (22). Hau ulertuta, birika minbiziko zeluletatik askatutako exosomek garraiatzen duten miR23-ak, proliil-hidroxilasa 1 eta 2 (PHD1/2) inhibitzen ditu, HIF1-en metaketa faboratuz eta ondorioz, zelula endotelialeetan angiogenesisia sustatzen dute. Hori gutxi balitz, miR23-ak lotura hertsietako ZO-1 proteina inhibitzen du eta, ondorioz, iragazkortasun baskularra handitzen da minbiziaren migrazio transepiteliala handituz (18).

Azkenik, metastasiak tratamenduen porrot egitearen eta gaixoen biziraupen laburtzearen arrazoia izaten dira maiz. Prozesu hau tumore primariotik beste inguruneetara minbizi zelulen barreiapenean datza. Horren haritik, birika minbizi zeluletatik askatutako exosomek metastasia faboratzen dute zelula osasuntsuek jasotzean; gene espezifiko batzuen erregulazioaren bidez inbasioan eta migrazioan garrantzia duten entzimak kodetzen dituztelako: fosfatasa eta tensina homologoa (PTEN), E-kadherinak eta matrizeko metaloproteinasak (MMP-2 eta MMP-9) (18).

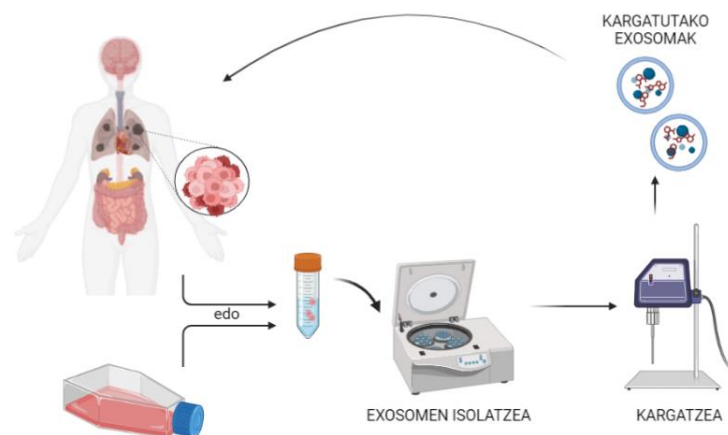
3.1.3 Erabilera terapeutiko potentzialak

Aipatutako guztiagatik, exosomen funtzio fisiopatologikoak kontuan hartuta erabilera anitz mahaigaineratu daitezke, hala nola immunoterapia alternatiba, ito terapeutiko, diagnostikorako biomarkatzaile edota kargarako garraiatzaile moduan. Azken hau berrikuspen bibliografiko honen aztergaia izanik (18).

Gainera, oso garrantzitsua da nabarmentzea exosomek tumore-zelulen arteko komunikazioa bideratzen dutela. Ondorio gisa, hauen bahitzea gerora agente terapeutikoak barnean kargatzeko oso baliagarria izan daiteke, erakusten duten berezko bektorizazio gaitasunari esker itu zeluletara jotzea erraz burutuko dutelako (2. irudia) (19).

Exosomek eragindako farmakoekiko erresistentzia gainditzeko, hurbilketa pausu bat liteke exosomak kargatzea itu-gunera bideratuak izateko. Hori dela eta, minbizi zelulek askatutako exosomak hartu daitezke, haiek isolatu eta agente antitumoralekin kargatu itu gunera bideratuak izateko (19).

Exosomak agente terapeutikoak garraiatzeko sistema moduan, geroz eta eraginkorragoak eta itxaropentsuagoak bilakatzen ari dira beraien biobateragarritasun, tamaina txikiari eta immunogenizitate baxuari esker (23). Hori gutxi balitz, aukera daukate degradazio endosomala eta lisosomala saihestu eta zuzenean haien karga zitoplasmara garraiatzeko. Are gehiago, agente terapeutikoen zirkulazio denbora luzatzeko eta hesi hematoentzefalikoa (HHE) zeharkatzeko gaitasuna aurkezten dute (24). Hala ere, exosomek gaixotasunetan duten funtzioen eta haien naturaren ezjakintasunak epe luzerako segurtasuna eta efektu terapeutikoaren jarraipena galarazten du (25,26).



2. irudia. Exosoma kargatuak prestatzeko prozesu orokorra.

3.2 EXOSOMAK ISOLATZEKO ETA KARGATZEKO TEKNIKAK

3.2.1 Isolatze teknikak

Exosomen erabilerarako isolatze teknika eraginkor eta errepikagarriak behar dira, baina exosomen tamainen, edukien, funtzioen eta jatorriaren heterogenitateak isolaketa zailtzen du. Gaur egungo isolatze metodoek, ez dituzte eraginkortasunez exosomak eta ezaugarri biofisiko antzekoak dituzten beste besikula estrazelularrak bereizten eta honen ondorioz, exosomen purifikazioa ez da erabatekoa izaten. Edonola ere, helburu eta aplikazio desberdinetarako

isolatze metodo bat edo beste aukeratu da. Jarraian horien adibideak eta haien abantailak eta desabantailak deskribatuko dira (1. taula eta 3. irudia) (12).

3.2.1.1 Ultrazentrifugazioa

Ultrazentrifugazioa erabilera zabaldua duen isolatze teknika da, hori dela-eta, banaketa eta erauzketarako *Gold Standard*-a da. Metodo honen oinarria, jatorrizko disoluzioan dauden osagaien tamaina eta dentsitate desberdintasunean dago. Horregatik, sedimentazio koefiziente baxuko osagaiak dituzten dosi handiko laginak banatzeko egokia da (12,17).

Ultrazentrifugazioa bi pausu nagusietan bereizten da, lehenengoan, zelula hilak eta tamaina handiko EVak baztertzeko, abiadura ertain-baxuko zentrifugazio jarraituko serieak jasaten dituzten laginak. Bigarrean, exosomen isolatzea lortzeko abiadura handiago batean 100.000 x g indar zentrifugoekin erauzten dira. Gauzak horrela, zentrifugazio denborak, indarrak eta errotore motak etekina eta purutasuna baldintzatzen dute. Hortaz, purutasuna hobetzeko dentsitate-gradientearen bidezko zentrifugazio aldaera garatu zen. Ultrazentrifugazioaren oinarriarekin bat egiten badu ere, aurretik zehaztutako dentsitate gradiente batean prozesua burutzen da, normalean sakarosan edo iodixanolean. Eraldaketa honek abantailak ekartzen ditu, hala ere, sakarosarekin erretrobirusak eta exosomak banatzea zaila izaten da, beraien dentsitate eta tamainaren antzekotasunagatik. Aldiz, iodixanolarekin sedimentazio abiadura gradiente nahiko desberdina da eta exosoma giza immunoeskasiaren birusa bereiztea baimentzen du (12,17).

3.2.1.2 Polimero prezipitazioan oinarritutakoak

Polimero prezipitazioan oinarritutako isolatze tekniken barnean hainbat metodo topatu daitezke: polietilenglikol prezipitazioa (PEGP), lektinek induzitutako aglutinazioa eta mikrofluidikan oinarritutako teknika (17). Normalean, PEGP erabiltzen da medio bezala eta exosomak zentrifugazio baldintzetan ekoizten dira beraien disolbagarritasuna murrizteko. Metodo honen jatorria, birusak isolatzeko teknikatik dator; izan ere, birusek eta exosomek ezaugarri biofisiko anitz partekatzen dituzte. Gainera, teknika hau erreza da erabiltzeko, denbora laburrean analisiak egiteko eta lagin kantitate handien prozesamendurako; hala ere, purutasun eta berreskurapen tasak nahiko baxuak dira. Hare gehiago, sortzen den polimeroa askotan zaila da eliminatzeko eta hau oztopo batean bihurtzen da ondoren burutzen diren analisisetarako (12).

3.2.1.3 Tamainan oinarritutakoak

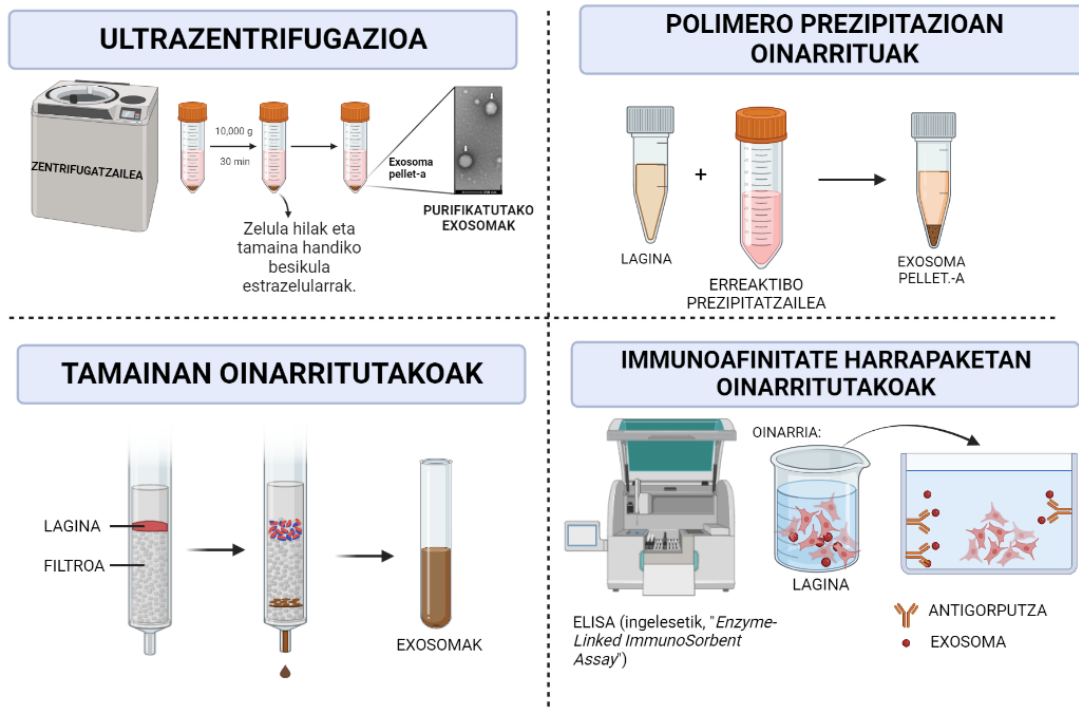
Tamainan oinarritutako isolatze teknikak, filtrazio tangenziala, tamaina eskusio kromatografia (SEC) eta ultrafiltrazioak dira besteak beste, azkeneko biak erabilera zabalenerako izanik (12,17).

SECen, lagina gel porotsu batean zehar igaroko da, makromolekulak poroetatik ezingo dira pasa eta azkarrago mugituko dira zutabeetatik; aldiz, molekula txikiak zuloxoetatik igaro eta mantsoago mugituko dira, eluzio denbora desberdinarekin. Gaur egun, metodo hau burutzeko azkarrak eta merkeak diren kit komertzialak topatu daitezke (12,17).

Ultrafiltrazio metodoan, pisu molekular desberdinak mugatzen (MWCO) dituzten mintzez baliatuz laginen osagaiak selektiboki banatuko dira; alegia, partikulek MWCO baino tamaina handiagoa badute filtroan geratuko dira eta MWCO baino txikiagoak badira filtroaren beste aldera igaroko dira. Oinarri erraza duen metodoa bada ere, erronka nagusia mintzaren buxadura saihestean datza (12,17).

3.2.1.4 Immunoafinitate harrapaketan oinarritutakoak

Immunoafinitate harrapaketan oinarritutako teknologiaren oinarria antigorputzen (Ab) erabilera datza, hain zuzen ere, exosomen gainazalean espresatzen diren antigenoei (Ag) lotzen zaizkien Ab-en erabilera. Ag-ak, exosomen mintzen gainazalean topatzen diren oparotasun handiko proteinak izan behar dira, esate baterako, ESCRT konplexuko proteinak. Ultrazentrifugazioarekin konparatuta, lagin kantitate txikiagoekin antzeko emaitzak lortzen dira eta gainera erabilera kuantitatibo eta kualitatiboa izan ditzake. Horregatik, talde honetako teknikak espezifikotasun, sentikortasun, purutasun eta etekin handia dute. Oinarri berdina partekatzen duten talde honen barnean, immunoafinitate bidezko kromatografia eta magneto immunoprezipitazioa topatzen dira (12,17).



3. irudia. Exosomak isolatzeko teknikak.

1. taula Isolaketa metodoen abantailak eta desabantailak (13).

METODOA	ABANTAILAK	DESABANTAILAK
Ultrazentrifugazioak	<ul style="list-style-type: none"> • Koste baxua • Isolatzeko erreaktiboekin kontaminazio arrisku baxua • Bolumen handiko laginetarako aproposa 	<ul style="list-style-type: none"> • Ekipamendu eskakizun handia • Denbora luzea • Kalte mekaniko potentzialak • Ez da egokia bolumen txikiko laginentzat
Exosomen polimero prezipitazioan oinarritutakoak	<ul style="list-style-type: none"> • Erabilera erreza • Lagin tamaina handi eta txikientzat • Eraginkortasun handia makina konbentzionalak erabilia 	<ul style="list-style-type: none"> • Prozesatzeko denbora luzea • Garbiketa urrats konplikatuak • Kutsadurak egon daitezke proteina agregatuekin
Tamainan oinarritutakoak	<ul style="list-style-type: none"> • Purutasun handia • Prestakuntza azkarra • Errepikagarria • Lagin guztiak prozesatzeko erabilgarria 	<ul style="list-style-type: none"> • Gailu erlatiboki garestiak • Exosomak aberasteko metodo osagarrien beharra
Immunoafinitate bidezko harrapaketa oinarritutakoak	<ul style="list-style-type: none"> • Jatorri berezietako exosomak isolatzeko egokia • Purutasun handia • Erabilera erreza • Kutsadura kimikorik gabekoa 	<ul style="list-style-type: none"> • Antigorputzen prezioa • Prozesatzeko bolumen eta etekin baxua • Exosomen eluziorako urrats gehigarriek jatorrizko egitura kaltetu dezakete.

Isolaketa burutu ostean, exosomen karakterizazioa gauzatzen da bereiztutako osagaiak exosomak direla ziurtatzeko. Ondoren, kriokontserbazioz, liofilizazioz edota atomizazioz lehortzen biltegiratuko dira (12).

3.2.2 Kargatzeko teknikak

Exosomen lumenean proteinak, lipidoak eta hainbat biomolekula topatzen dira. Horregatik, kanpoko agente terapeutikoen kargatze eraginkorrak erronka interesgarria eta zaila suposatzen du (27). Egun, agente terapeutikoak exosometan giltzarri diren bi ikuspegietatik kargatu daitezke: karga exogeno edo endogeno bidez. Segidan, exosomak kargatzeko teknika nagusienak azalduko dira haien abantaila eta desabantailak aipatuz.

3.2.2.1 Karga exogenoa (edo isolaketa ondorengoa)

Exogenoki kargatzeko metodoetan, exosomak isolatu eta jarraian karga sartzen zaie nola bide mekaniko hala kimikoetatik egindako exosomen gainazaleko zuloen bidez, eta hauen bitartez, agente terapeutikoa kargatzen da. Egia da, metodo hauen eraginkortasuna altuagoa dela

metodo endogenoekin konparatuta; hala ere, purifikatze pauso gehigarriak behar dituzte eta hauek exosomen egituraren osotasuna aldatu dezakete (28). Karga exogenoa hainbat metodoen bidez burutu daiteke: sonikazioa, elektroporazioa, inkubazioa sinplea, estrusioa, saponinen bidezko karga, desizozteko ziklo errepikatuak eta pH gradienteren metodoarekin besteak beste (4. irudia) (23).

3.2.2.1.1 Elektroporazioa

Elektroporazioa exosomen kargarako erabilera zabaldua duen teknika da. Metodo honetan, interferentzia txikiko RNA (siRNA) edo miRNA bezalako nukleotido luzeak hobetsita daude; izan ere, azido nukleikoek laguntza behar dute hesi fisikoak zeharkatzeko eta teknika honen bidez gaitasun hori eskuratzen dute (23,27). Exosomak elektroporazio bidez kargatzeko, elektroporatzailer izeneko tresna espezializatuak erabiltzen dira. Hauek, pultsu elektriko ezagunak eta pertsonalizatuak sor ditzakete esperimentuaren beharren arabera (23,29).

Elektroporazioak, pultsu elektriko labur eta anitzengatik exosomen mintzean aldi baterako zulo txikiak sortzen ditu. Aldaketa hauek ezin direnez mikroskopio bidez denbora errealean ikusi, mekanismoa ulertzeko ebidentzian oinarritu behar da. Mintzean zeharreko potentzial-diferentzia ($\Delta U(t)$) bere balio fisiologikotik 0,1etik 0,5-1,0 V-tara handitzean aldi baterako poro hidrofobikoak sortzen dira, 2 nm eta hainbat nm tarteko diametroa dutenak. Sortzen diren poro hidrofobiko handienak, hidrofiliako bilakatzen dira; izan ere, poro hidrofiliako bat sortzeko beharrezkoa den energia txikiagotu egiten delako mintzean zeharreko boltaila handitzen den heinean (23,29).

Behin poroa sortuta, exosomen iragazkortasuna handitzen da eta tamaina ertain edo txikiko agente terapeutikoak zulo horien bidez sartzen dira. Poro hidrofiliakoetatik nola pasatzen diren ez da egun zehatz mehatz ezagutzen baina ezaguna da prozesu honetan zehar elektroforesiak, elektroendo-osmosiak, difusioak eta endozitosiak paper garrantzitsua jokatzeko dutela. Azkenik, kargatu ostean exosomen mintzak haren osotasuna berreskuratzen du, zuloen itxiera hau tenperatura kontrolatuz luzatu daiteke (29).

Laburbilduz, hainbat faktorek eragiten dute teknika honen eraginkortasunean: pultsuaren luzera, indarra, forma, kontzentrazioa eta tenperatura (29). Hala eta guztiz ere, teknika hau beste teknikekin erkatuta oso erreza da garatzeko; baina egia da, oraindik ez dela ezaguna kargatzeko estrategia honek exosomen osotasuna, funtzioa eta karga/erretentzio eraginkortasunean duen eragina. Aurreko ikerketek plazaratu baitute elektroporazioak besikulen fusio edo agregazioa sor lezakeela (23).

3.2.2.1.2 *Sonikazioa*

Sonikazio teknika ultrasoinuez baliatzen da exosomen karga burutzeko. Ultrasoinuek, talkazko eta kabitaziozko uhinen bidez exosomen mintzetan poro iragankorrak sortzen dituzte, haien bidez agente terapeutikoak barneratu ahal izateko. Teknika hau hainbat osagai kargatzeko erabili daiteke: farmakoak, azido nukleikoak eta proteinak. Halaber, frogatu da sonikazioa teknika egokia dela exosomak kargatzeko hauen egituraren osotasuna eta funtzionaltasuna gehiegi kaltetu gabe (23).

Teknika honetan exosomak kargatu nahi den sustantziaren nahasketa batekin inkubetzen dira eta sonikazio-gailu baten bidez ultrasoinu pultsuetara ezartzen dira maiztasun altu batean. Ondoren, mintzaren deformazio-fasean kargazko sustantzia exosoman barneratzen da. Behin karga sartuta, purifikatze prozesu bat jasaten dute gehiegizko sustantzia ez kargatuak eliminatzeko, adibidez SEC (30).

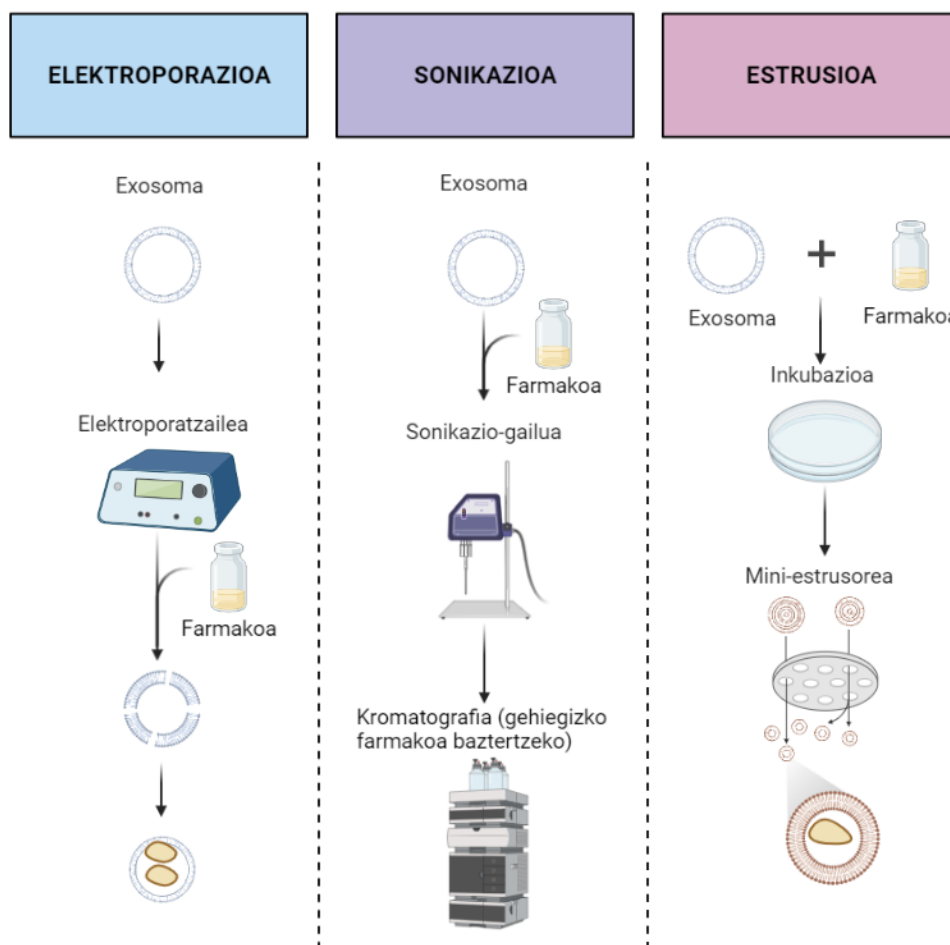
Laburbilduz, ultrasoinuak erabiltzearen abantaila nagusiak agente terapeutikoen kargaren eraginkortasun altua eta hauen askapen egokia dira, ez haatik denbora luzez erabilitako ultrasoinuak; izan ere, hauek azido nukleikoen degradazioa, exosomen agregazioa eta gainazaleko proteinen egituretan eragin ditzakete (23).

3.2.2.1.3 *Estrusioa*

Metodo honetan exosomen eta kargatu nahi den osagaiaren nahasketa bat sartzen da lipido-estrusore batean eta mintz porotsu (irekiera 100–400 nm) batean zehar igarotzen dira kargatuak izateko. Teknika honen eraginkortasunean, elkarrekintza elektrostatiokoek, mintzaren iragazkortasunak, molekulen tamainak eta agente terapeutiko/exosoma arteko proportzioak garrantzi handia hartzen dute (23).

Estrusio metodoa partikula handiagoak kargatzeko erabili daiteke. Esperimentu batean, hau frogatu zuten urrezko nanopartikulak exosometan kargatuz. Hauek batera inkubatu ziren, haien mintzen arteko elkarrekintza elektrostatiiko eta hidrofoboak lortzeko. Ondoren, indarra eraginez mini-estrusorean zehar exosomak kargatu ziren. Azkenik, ondorioztatu zen, kargaren eraginkortasuna bi osagaien arteko proportzioaren araberakoa zela batik bat. Era berean, abantaila nagusi bat plazaratu zuten beste teknikekin erkatuta, estrusioak karga uniforme eta egonkorra baimentzen zuela (31).

Metodo honen abantailarik garrantzitsuena kargaren eraginkortasun altua da. Hala ere, ikertzaileek ez daukate argi metodo honetan ezartzen diren indar mekanikoek exosomen mintzen propietateak aldatu ditzaketen ala ez (23).



4. irudia. Elektroporazio, sonikazio eta estrusio metodoen eskema.

3.2.2.1.4 Saponinen bidezko karga

Saponinak kolesterolarekin konplexuak sortuz mintzaren gainazalean zuloak eratzen dituzten agente eraginkorrak dira (23). Osagai anfipatiko hauek soluzio urtsuetan disolbatzeaz gain propietate detergente leunak dituzte. Honi esker, alde hidrofoboak exosomen mintzekin interakzionatzen du bertan barneratuz. Horregatik, saponinen kontzentrazio egokia zehaztea garrantzi handia izango du, karga eraginkortasun handiena lortzeko mintzaren osotasuna kaltetu gabe. Behin exosomak saponinen soluzioarekin nahastuta, giro tenperaturan inkubatu eta prozesua amaituko da saponinak deuseztatuz ultrazentrifugazio edo filtrazio bidez (32,33).

Saponinak prozesua amaitzean ondo deuseztatzen badira, ez dute exosomen morfologia kaltetuko. Baina konplexutasun handiko prozesua denez deuseztapena, hemolisia eta zitotoxikotasuna gerta daitezke. Horregatik, exosomak ondo purifikatzeak berebiziko garrantzia du saponinekin inkubatu ostean; hala ere, karga-eraginkortasun ratioa handia duen teknika da (23).

3.2.2.1.5 Bestelako metodoak

Aipatutako metodoetatik at, beste metodo alternatiboak ere topatu ditzakegu exosomek agente terapeutikoen garraiatzaile moduan jokatzeke, hala nola, izozte-desiozote metodoa edo inkubazio zuzenaren bidezko karga metodoa (33).

Inkubazio zuzena teknika erraza da burutzen, agente terapeutikoak eta exosomak aldi berean inkubatzean datza. Metodo honen eraginkortasuna agente terapeutikoen hidrofobizitatearen arabera da, hauen hidrofobizitateak exosomen mintzarekin elkarrekintzak sortzea baimentzen dielako. Are gehiago, kargatu nahi den medikamentuaren tamainak ere zerikusia du; geroz eta txikiagoak izan errazago barneratuko baitira. Alegia, exosomen kargaren etekina bai exosoma bai agente terapeutikoaren propietate fisiko-kimikoen arabera da, beraz, ondoriozta daiteke metodo hau etekin baxua duela eta ondorioz faktore mugatzailea izan daitekeela karga metodo hau erabili nahi izatekotan (23).

Izozte desiozote metodoaren funtsa, exosomak kargatu nahi den sustantziaren soluzio batekin giro tenperaturan inkubatu eta segidan 3 zikloz -80°C -tara izoztu eta desiozotean datza. Metodo honek, sonikazioa eta estrusioa baino karga eraginkortasun baxuagoa erakutsi arren, liposomen eta exosomen mintzen fusiorako teknika aproposena da (33,35).

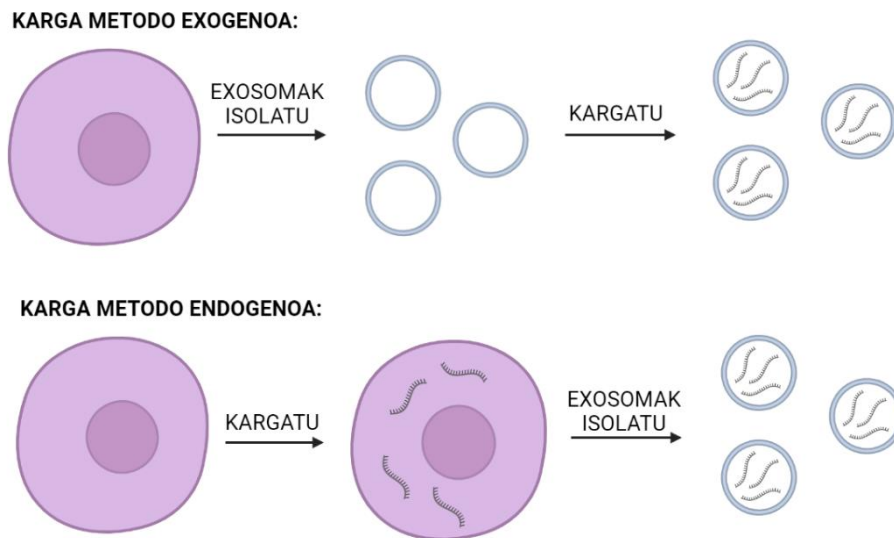
3.2.2.2 Karga endogenoa (edo aurre-isolaketa)

Kargatze metodo endogenoan, agente terapeutikoak zelula exosoma emailtan barneratzean datza, zelulek agente terapeutikoak exosomen produkzioan zuzenean barneratu dezaten. Behin zelula emaila agente terapeutikoz aberastean, exosomak ekoiztuko dira hautatutako agente terapeutiko kargarekin (5. irudia). Ondoren, exosomak isolatuko dira zelula emailen kultiboetatik. Metodo honetarako hobetsita daude tamaina molekular txikiko farmakoak, miRNA eta siRNA, hauen kargatzea oso eraginkorra baita (28).

Karga endogenoaren barruan bi metodo nabarmentzen dira bereziki. Inkubazioa eta transfekzioa. Inkubazio metodoa, zelula exosoma emaila eta farmakoaren arteko inkubazioan datza; ondoren, agente terapeutikoa garraiatzen duten exosomak isolatzeko helburuarekin. Teknika hau normalean, tamaina molekular txikiko agente terapeutikoak kargatzeko erabiltzen da, errazago gertatzen baita hauen barneraketa (23). Transfekzioa, agente transfektatzaileekin, zelula ekoizlea genetikoki modifikatzen da, intereseko agente terapeutikoa ekoiztu eta jariatzen dituen exosometan zuzenean barneratzeko. Zeluletan eragiten diren aldaketa hauek, behin-betikoak edo behin-behinekoak izan daitezke. Behin betikoa transdukzioa litzateke, birusek adibidez genomatik txertatzen dituztenean aldaketa genetikoa eta aldiz, behin-behinekoa nanopartikuletan akonplexatutako plasmidoak zelulen barnean barneratzea litzateke, genomatik txertatu gabe. Azkenik, bi tekniketarik kargatutako

exosomak gainjalkinetik jaso eta ultrazentrifugazio edo ultrafiltrazio bidez purifikatuko dira (26,34).

Aipatzekoa da, teknika hauen burutzeak denbora asko eraman dezakeela eta karga kontrolatzea zaila izaten dela. Hala ere, exosomen mintzen osotasuna mantentzea ahalbidetzen du (28).



5. irudia. Karga endogenoaren eta exogenoaren eskema orokorra.

3.3 MINBIZIAN EXOSOMAK KARGATZEAREN ABANTAILAK

Azken urteetan, exosomen isolatzeak, karakterizazioak eta karga metodoak garatzen joan diren heinean *in vivo* esperimenduak egin dira beraien erabilera terapeutiko potentziala ikertzeko asmoz. Jarraian, exosomak agente terapeutikoen garraiatzaile bektorizatu gisa burututako ikerketen emaitzak eta onura posibleak landuko dira (2. taula).

3.3.1 Kimioterapia garraiatzen dituzten exosomak

3.3.1.1 Doxorribizina

DOX luze frogatutako dosi menpeko kardiotoxikotasuna erakusten duen erabilera zabaleko tratamendu kimioterapikoa da. Ikerketa batean, bularreko minbizian DOX exosometan kargatzearen onurak aztertu ziren. Exosomen produkzioarako, heldu gabeko zelula dendritikoak erabili ziren; izan ere, CD40, histobateragarritasun konplexu nagusia (MHC)-I eta MHC-II bezalako markatzaileen gabeziatik immunogenizitate baxua adierazten zuten. Beraz, DOXekin kargatu zituzten elektroporazioz. Ondoren, BALB/c sagu eme biluzietan bular minbiziko zelulak txertatu eta tumorea garatu ostean kargatutako exosomak zain barnetik administratu zitzaizkien; emaitzetan plazaratuz, kargatutako exosoma hauek tumore

hazkuntza nabarmenki inhibitzeko gai zirela gehiegizko toxikotasuna eragin gabe. Antza denez, tumore-zelulekiko afinitate handiak bihotz zeluletara farmakoa ez iristea eragiten zuen, efektu desiragaitz kardiotoxikoak murriztuz (36).

Ordutik, ikerketa gehiago garatzen joan dira, arestian burututakoak plazaratu dute bular minbizietatik erauzitako eta jarraian inkubazioz DOXekin kargatutako exosomek giza hazkuntza faktore epidermikoaren 2 hartzailea espresatzen (HER2+) zuten zelulekiko afinitatea erakusten zutela minbizi-zelula hauek jatorriz HER2+ izan ala ez. Beraz, exosoma hauek HER2 mutazioa aurkezten duen bular minbizirako erabilera posiblea izan dezakete (37).

Beste ikerketa batean, lisosomei asoziatutako proteinak eta ankilina-proteinaren errepikapenak (LAMP2b-DARP) exosomen gainazalean espresatuz HER2+ bular minbizi zeluletara afinitatea hare gehiago handitzen zela erakutsi zen, HER2- zirenekin alderatuta. Honi esker, kontzentrazio baxuagoko dosiak administratzeko aukera izan zuten, tratamenduaren eraginkortasuna handituz. Hau frogatzeko, C57BL/6 sagu biluziei minbizi-zelulak azal azpitik barneratu eta tumorea garatu ostean, bi taldeetan banatu zituzten: elektroporazioz DOX kargatutako exosomak zain baretik jasoko zituztenak eta DOX askea jasoko zutenek. Emaizte argi eta garbi utzi zuten exosoma kargatuekin tratatuak izan ziren saguetan kardiotoxikotasun baxuagoa aurkezten zela (38).

3.3.1.2 5-Fluorouraziloa (5-FU)

Kolon-ondesteko minbizia hilkortasun-tasei erreparatuta hirugarrena da terapia zuzenduen faltagatik batik bat. Gainera, 5-FU kolon-ondesteko minbizia dutenei eraginkorra suertatzen bazaie ere, askotan kimioterapiko honekiko erresistentzia garatzen dute miR-21-en gainespresioa dela medio eta ondorioz, porrot terapeutikoa gertatzen da (39).

Gaofeng Liang eta bere lankideek, 5-FU-rekiko erresistenteak ziren giza kolon-ondesteko zelula espezifikotik (HCT-116^{5FR}) exosomak ekoiztu zituzten. Ondoren, elektroporazioz aldibereko garraioa burutu zuten, 5-FU eta miR-21 oligonukleotidoaren inhibitzailea (miR-21i) kargatuz. Erabilitako BALB/c sagu eme biluziei HCT-116^{5FR} minbizi zelulen material genetikoak transfektatu zitzaizkien tumorea garatzeko eta ondoren, datu desberdinak bildu zituzten. Alde batetik, kuantitatiboa den denbora errealeko polimerasa erreakzio kateatua (qRT-PCR) erabiliz HCT-116^{5FR} zeluletako miR-21 endogenoaren kantitatea neurtu zuten, exosoma kargatuen (EXO/miR-21i) administrazioaren ostean oligonukleotidoaren murrizpen nabarmena ikusiz. Bestetik, zitotoxikotasun sinergia frogatu zen 5-FU eta miR-21i-rekin; izan ere, karga bakarreko exosomekin edo farmako askearekin konparatuz, EXO/miR-21i/5-FU-ek apoptosi ratio handiagoa erdiesten zuten eta zelulen ugaritzeari dagokionez %82-ra inhibitzen

zuten (39). Beraz, ondorioztatu daiteke exosomaren barruan eraginkortasuna hobetzen dela bi agente terapeutikoen sinergia eta zelula erresistenteekiko tropismoa adierazten dutelako.

Kolangiokartzinoma, 5 urterako biziraupenari erreparatuta pronostiko txarreko minbizi arraro bat da. Minbizi mota honetarako tratamendu espezifikorik egon ezean, merkea eta digestio sistemarako emaitza onak erakutsi dituen 5-FU erabiltzen da. Hala ere, erdibizitza laburra (10-20 min), farmakozinetika eta toxikotasun altuagatik klinikan 5-FU-ren erabilera eta eraginkortasuna mugatuta dago. Horregatik, hauek saihesteko asmoz giza hezur-muineko zelula ama mesenkimaletatik (HBMS) ekoiztutako exosometan sonikazioz eta inkubazioz 5-FU kargatu zen. Jarraian, *in vitro* hainbat frogak egin ziren kolangiokartzinoma jatorriko zelulak erabiliz farmako askea eta HBMS-EXO/5-FU taldeen zitotoxikotasuna alderatzeko. HBMS-EXO/5-FU jaso zuen taldeak tumore-zelulen bideragarritasuna nabarmenki inhibitzen zuela ikusi zen, farmako askea jaso zuten zelulekin konparatuz (40).

Beste ikerketa batean, behi-esnetik eratorritako exosomak erabili zituzten 5-FU eta PTX konbinazioko terapia aztertzeko. Exosoma hauen erabilera aurretik, aho bidez kargatutako farmakoaren bioeskuragarritasun eta kostu-eraginkortasun ona erakutsi zutelako proposatu zen. Gainera, gainazalean azido folikoarekin (AF) funtzionalizatu zituzten eta karga sonikazio bidez gauzatu zen. Ondoren, exosoma hauen eraginkortasuna neurtzeko asmoz hainbat *in vitro* entsegu burutu ziren. Horietako bat, zitotoxikotasuna neurtzeko entsegu kolorimetrico (MTT entsegua) izan zen. Honen bidez, kargatutakoak zitotoxikotasuna nabarmen handiagoa erakutsi zuten farmako askeekin konparatuta. Azkenik, AF funtzionalizatzeak exosomak itu ziren zelulek bereganatzea erraztu zuen eta kuantitatibo zein kualitatiboki hazkuntza zelularraren inhibizio nabarmena ekarri zuen (41).

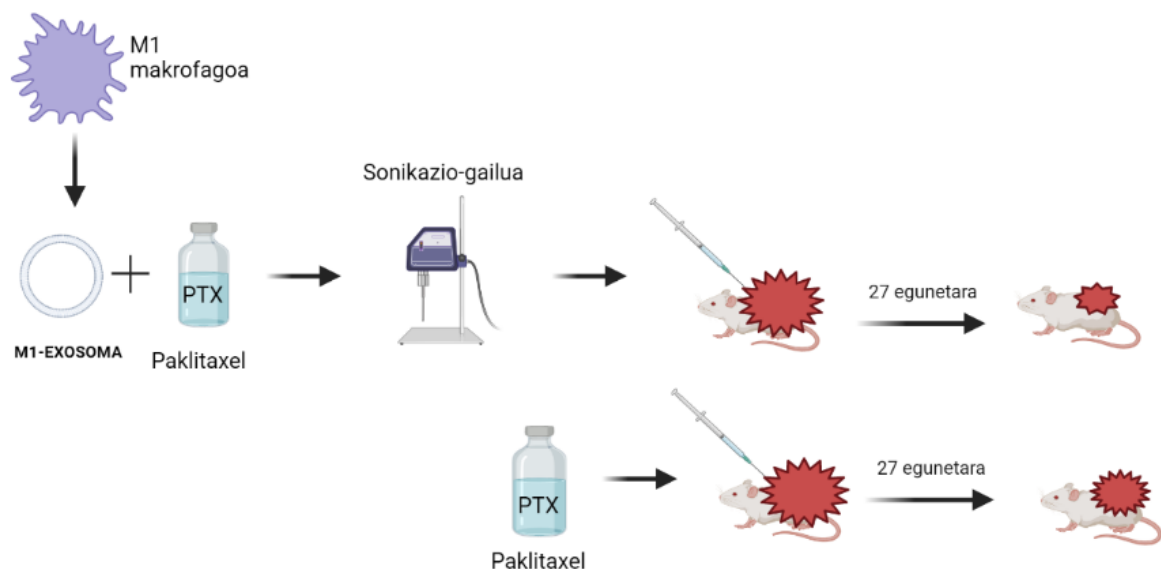
3.3.1.3 Paklitaxela

Jakina denez, aktibatutako M1 makrofagoak tumore hazkuntza inhibitzen dute hanturazko faktoreak askatuz. Beraz, hauek sortutako exosomen (M1-EXO) zein kargatutakoen eragina, agente terapeutiko gisa aztertzea proposatu zuten. Horretarako PTX kargatzea proposatu zen. Gainera, PTX askeak sortzen dituen efektu toxikoak saihesteko aukera ere frogatu nahi izan zuten. Horretarako, kargatutako exosomak (M1-EXO/PTX) prestatu zituzten sonikazio bidez (42).

In vitro M1-EXO/PTX eta PTX askeak, erakusten zuten zitotoxikotasuna neurtzeko, jatorri desberdinetako bular minbizi-zelulekin ko-kultiboa prestatu zen. Esperimentuaren ostean, M1-EXO/PTX zegoenean zitotoxikotasuna handiagoa zela PTX askea erabiltzen zenean baino ikusi zen, alegia, minbizirako agente terapeutiko eraginkorragoa bilakatzen zela exosomen barnean kargatuta zegoenean (42).

In vivo, BALB/c sagu emeei azal azpitik IV estadioko giza bular minbiziko zelulak sartu zizkieten. Ondoren, intratumoralki sagu batzuei exosoma kargatuak administratu zizkieten eta beste batzuei PTX askea hots, kontrol taldea. Bi taldeen arteko tumore bolumena 3 egunetara alderatu zen eta talde esperimentalean tumorea askoz gehiago murrizten zela ikusi zen. Hala ere, 27 egunetara tumorearen txikitzea estatistikoki esanguratsua ($p < 0.001$) izan zen. Gainera ikerketa denboran zehar, M1-EXO/PTXrekin egon ziren saguen biziraupen ratioa handitu zen (6. irudia) (42).

Horretaz gain, M1-EXO, PTX askea eta M1-EXO/PTX-en apoptosi efektuaren inhibizio gaitasuna alderatu zuten. Horretarako, apoptosiarekin erlazionatutako proteinak, c-caspasa3, *Western Blot* bidez tumore ehunetan neurtu zen, agerian utziz proteina horren handipena gertatzen zela M1-EXO/PTX tratamendua jaso zuen taldean (42).



6. irudia. Esperimentuaren laburpena.

Hari beretik, MSCetatik deribatutako exosometan kargatutako PTXa, animalietan lortutako tolerantzia ona dela eta, ate irekia utzi zituen exosomen barnean kimioterapiko desberdinen konbinazioak kargatzeko, esate baterako maiz klinikan erabiltzen den karboplatino eta PTXaren konbinazioa (43).

PTX bezalako tratamendu kimioterapiko ugariak uretan disolbagarritasun baxua aurkezten dute. Horregatik, osagai bereziak behar dituzte administraziorako, Cremophor EL® adibidez. Eszipiente honek efektu desiragaitz larriak sortu ditzake terapiaren eraginkortasuna baldintzatuz. Gauzak horrela, osagai hauek saihesteko asmoz PTX exosometan sartzea proposatu zen. Hau frogatzeko, RAW 264.7 izeneko makrofago zeluletatik erauzitako exosomak inkubazioz, elektroporazioz edo sonikazioz PTXarekin kargatu ziren. Ondoren,

C57BL/6 saguei buztan azpitik minbizi zelulak injektatu zizkieten birikako metastasiak garatu zitzen. Behin gaixotasuna garatuta, zain barnetik EXO/PTXak administratu zitzaizkien eraginkortasuna neurtzeko asmoz. Administrazio ostean batzuk sakrifikatu ziren PTX topatuz metastasietan, eta ondorioz, *in vivo* bektorizazio egokia adierazi zuten. Gaitasun antineoplasikoari dagokionez, PTX askea eta exosometan garraiatutakoa konparatu ziren azaleratuz EXO/PTX gehiago murrizten zuela tumorearen tamaina (41).

3.3.2 Bestelako agente terapeutikoak garraiatzen dituzten exosomak

3.3.2.1 miR-335-5p

Minbizi oldarkorrenen artean heriotz ugari sortzen dituen kartzinoma hepatozelularra topatzen dugu. Minbizi honen tratamendurako, gibelesko izar zelulak (LX2) transfekzio errektiboan bidez kargatu ziren, ondoren, miR-335-5p zeramaten exosomak ekoiztu zitzen. Jakinaenez, *in vivo* miRNA-ren garraioak erronka interesgarria suposatzen duela, kargako agente terapeutiko moduan miR-335-5p erabiltzea proposatu zen. miRNA hau, tumore supresore moduan jokatuz, tumore ezabapenean inplikatur dago; izan ere, gibeletik at miR-335-5p-aren gainespresioak tumorearen kolonizazio metastasikoa isilarazten du (44).

In vivo, LX2-EXO/miR-335-5p eta LX2-EXO NOD scid sagu immunodeprimitu emeen xeno-mentuetan intratumoralki injektatu zitzaizkien. Era horretan, ikerketa honen helburu nagusiak honako hauek izan ziren: minbizi-zelulek exosomak bereganatzeko gaitasuna neurtzea eta kartzinoma hepatozelularrean LX2-EXO/miR-335-5p-k agente terapeutiko moduan suposatu zezaketen abantailak aztertzea. Ikerketa ostean, alde batetik, minbiziko zelulen hazkuntza eta inbasioa gutxitzen zela ikusi zen; tratamendua jaso zutenetan tumoreak txikiagoak baitziren kontrol taldekoekin erkatuta (LX2-EXO). Bestalde, qRT-PCR bidez miR-335-5p maila altuagoak neurtu ziren gutxiago hazitako tumoreetan, alegia, tumore hazkuntza inhibitzeko balio terapeutikoa duela ondorioztatu zuten (44).

3.3.2.2 miR-145-5p

Bareko minbiziaren garapena gelditzeko asmoz giza zilbor-hesteko zelula mesenkimaletatik eratorritako exosomak erabili ziren miR-145-5p garraiatzeko; zelulak, transfekzioz kargatu ziren. Ondoren, ar BALB/c sagu biluziak erabili zituzten azal azpitik giza bareko minbizi-zelulak barnerratzeko. Tumorea garatu ostean sagu batzuei exosoma kargatuak eta besteei kargatu gabek (kontrol taldea), exosomak intratumoralki administratu zitzaizkien. Alde batetik, bareko minbizien zelulen ugaritzea eta inbasioa gutxitzea lortu zuten eta bestetik, apoptosia handitzea eta zelulen zikloa gelditzea. Exosoma kargatuekin tratatutako saguen tumorea aztertzean honen bolumenaren murrizketa ikusi zuten aldiz, kargatu gabeko exosomek ez zuten erakutsi tumore tamaina txikitzen zenik (45).

3.3.2.3 mRNA PTEN

mRNA PTEN tumore supresorea da, beraz honen administrazioak PTEN gabezia duten garun gliomen tumorearen progresioa gelditu zezakeen edo ez aztertu zen. Fibroblastoei DNA plasmidoak nanoporazio bidez transfektatu eta exosomak mRNA PTENekin ekoiztu zituzten. Exosoma hauek, beste nanopartikula sintetikoek ez bezala, erdibizitza luzea, zitotoxikotasun baxua eta HHE zeharkatzeko gaitasuna erakutsi zuten.

In vivo azterketarako C57BL/6 eta ar BALB/c sagu biluziak erabili ziren. Hauei azal azpitik, PTEN azpiespresatua zuten garun gliomako zelulak txertatu zitzaizkien minbizia garatu zezaten. Ondoren, zain barnetik EXO/mRNA PTEN tumore supresioa berrezartzeko gai zirela frogatu zen, tumore hazkuntzaren inhibizioa eta animalien biziraupena luzatu zutelako(46).

3.3.2.4 Multzokatutako eta tarteka bateratutako errepikapen palindromiko laburrak (CRISPR/Cas9)

Obulutegiko minbiziaren tratamendurako, minbizi zeluletatik askatutako exosomak CRISPR/Cas9-ekin kargatzea proposatu zen. Gene edizio teknologia honen *in vivo* erabilerak erakutsitako tolerantzia baxua eta immunogenizitatearengatik erabilera mugatua izan du. Horregatik, esperimientua burutzeko emakume kaukasiar baten aszitisetik deribatutako obulutegi minbiziko zelulen lerrotik (SKOV3) ekoiztutako exosomak erabili ziren, CRISPR/Cas9-ekin elektroporazioz kargatzeko (47).

Exosoma hauek, apoptosia bultzatuz PARP espresioa ezabatzeko gaitasuna erakutsi zuten. Beraz, kontuan izanda bularreko minbizian Iniparib bezalako PARP inhibitzaileak eta platino baten konbinazioak monoterapiarekin alderatzean tumore erantzuna eta biziraupen ratioa handitzen dutela, CRISPR/Cas9 zisplatino konbinazioarekin erabiltzea erabaki zen. Emaitzek, kimiosentikortasuna handitzen zela erakutsi zuten, sinergia zitotoxikoa erakutsiz. Gainera, garraio metodo honek eraginkortasun handia frogatu zuen agente terapeutiko honen garraiatzaile bektorizatu gisa (47) .

BALB/c sagu eme biluziei SKOV3 zelulak mentatu zitzaizkien, tumorea garatzeko eta ondoren zain barnetik exosomak edo zisplatino askearen (kontrola) dosia administratu zitzaien. Honen ostean, tumoreen tamaina eta PARPen espresioak neurtu ziren, azken hau *Western Blot* analisi bidez. Horrenbestez, hiru ondorio nagusietara heldu ziren: zelula tumoraletik askatutako exosomak zelula hauekiko tropismoa zutela, CRISPR/Cas9-ekin kargatutako exosomak minbizi ehunetan apoptosia faboratzen zutela eta azkenik, CRISPR/Cas9ek sinergia eskuratu zezakeela zisplatinoarekin (47).

2. taula. Exosoma kargatuak minbizi terapian lortutako emaitzak.

Kargarako sustantzia	Karga metodo	Exosomaren jatorria	Minbizia	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Er.
5-FU + PTX	Sonikazioa	Behi-esnetik eratorritako exosomak	Bular minbizia	Zelulen bereganatzea↑ Zelulen proliferazioa↓	-----	42
5-FU + miR-21i	Elektroporazioa	Kolon ondesteko minbizi zelula	Kolon ondesteko minbizia	Sinergia eta Apoptosia↑	Tumore tamaina ↓	40
5-FU	Inkubazio zuzena, sonikazioa	HBMS zelula	Kolangio-kartzinoma	Zelulen proliferazioa↓	-----	41
CRISPR/ Cas9 + Zisplatinoa	Elektroporazioa	Obulutegiko minbizi zelula	Obulutegiko minbizia	Sinergia eta apoptosia↑	Tumore tamaina ↓	48
DOX	Elektroporazioa	HBMS zelula	Bular minbizia	Zelulen proliferazioa↓	Tumore hazkuntza↓	39
DOX	Elektroporazioa	Zelula dendritikoa	Bular minbizia	Zelulen proliferazioa↓	Tumore hazkuntza↓	37
miR 145-5p	Transfekzioa	MSC	Bareko minbizia	Zelulen proliferazio eta inbasioa ↓	Tumore apoptosia↑	46
miR 335-5p	Transfekzioa	Izar zelula	Gibelego minbizia	Zelulen hazkuntza eta inbasioa↓	Tumore hazkuntza↓	45
PTEN mRNA	Transfekzioa	Fibroblastoa	Glioma	Zelulen proliferazioa↓	Tumore tamaina ↓	47
PTX	Sonikazioa	Makrofagoa	Lewis birika kartzinoma	Zelulen proliferazioa↓	Tumore hazkuntza ↓	43
PTX	Elektroporazioa, Sonikazioa, Inkubazio zuzena	Makrofagoa	Birikako metastasia	-----	Tumore tamaina ↓	42

Laburdurak: Doxorribizina=DOX; Giza hezurmuineko zelula ama mesenkimala = HBMS; Paklitaxela=PTX; Zelula ama mesenkimala=MSC; 5-fluorouraziloa=5-FU.

4 ONDORIOAK ETA ETORKIZUNEN GOGOETAK

Azaldu berri bezala, azken urteetan exosomek iraultza bat suposatu dute gorputzeko komunikazioa ulertzerako garaian. Era berean, zelulen arteko komunikazioa bideratzeko gaitasunaz baliatuta, agente terapeutikoen garraio bektorizatua burutzeko jarraitu beharreko pausoak eta azken ikerketetan lortutako emaitzak landu dira.

Gainera, beraien karga metodo desberdinak lantzean aukera anitzak eta eraginkorrak daudela agerian geratu dira nahiz eta oraindik hutsune nabarmenak somatzen diren, bereziki karga eraginkortasun ratioan.

Ondoren, exosomak minbiziaren tratamendurako agente terapeutikoen garraiatzaile bezala erabiltzearen abantailak landu dira. Esate baterako, ohiko terapien bidez sortzen diren arazo

askoren konponbidea izan daitezkeela frogatu baitute, erraz degradatzen diren RNA bezalako agente terapeutikoen garraio eraginkorra erakutsiz edota farmakoak askotan ituarekiko selektibitate faltagatik sortzen dituzten efektu desiragaitzak gutxituz.

Etorkizunera begira, erabilera hau aukera interesgarria izan daiteke baina klinikara iristeko, tartetik gainditu beharreko hainbat erronka topatzen dira: produkzioa eta isolaketa ez estandarizatua, eskala industrialera eramateko aukera eta biltegiatzean egonkortasuna.

Hala ere, jatorrizko minbizi zeluletatik erauzitako exosomak erabiltzen direnean exosomek erakusten duten immunogenizitate baxua eta jatorriz daukaten bektorizazio gaitasunari esker, hare eta itxaropentsuagoak bihurtzen dira. Ez hori bakarrik, *in vitro* eta *in vivo* burututako entsegu preklinikoetan frogatu dute exosoma kargatu hauek eraginkorrak direla. Gauzak horrela, etorkizun batean exosomak agente terapeutikoen garraiatzaile moduan erabiltzearen industria nabarmen garatuko dela pentsa daiteke, adibidez erabili nahi den agente terapeutikoen araberako karga metodoen estandarizazioa gauzatuz eta entsegu klinikoak burutuz.

5 BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization (WHO) [Internet]. Lyon. kontsulta 2023ko ots. 2an]. Cancer Today.[Eskuragarri: <https://gco.iarc.fr/today/>
2. Sociedad Española De Oncología Médica. Cifras del cáncer en España 2022. SEOM. 2022.
3. Red Española de Registros de Cáncer (Redecan). [Internet]. Espaina. [kontsulta 2023 ots. 2an]. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2023. Eskuragarri: <https://redecana.org>
4. Gaixotasun ez-kutsakorren ataria (ENT) [Internet].Lyon. [kontsulta 2023 ots. 2an]. Perfil de país. Eskuragarri: <https://ncdportal.org/CountryProfile/GHE110/ESP#mor1>
5. Wyman O. El impacto económico y social del cáncer en España. AECC; 2020.
6. Sociedad española de Oncología Medica (SEOM) [Internet] Espaina; 2019 [kontsulta 2023ko ots. 2an].¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?. Eskuragarri: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
7. National Institut of cancer (NCI) [Internet]. Ameriketako Estatu Batuak. [kontsulta 2023ko ots. 2an]. Treatment of cancer. Eskuragarri: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>
8. CancerQuest [Internet]. Ameriketako Estatu Batuak. [kontsulta 2023ko ots. 8an]. Resistencia a los medicamentos del cáncer. Eskuragarri: <https://www.cancerquest.org>

9. Alonso C. Mecanismos de quimiorresistencia en terapia de primera línea de cáncer de ovario epitelial. *Medwave*. 2009; 9(10).
10. Zhao X, Wu D, Ma X, Wang J, Hou W, Zhang W. Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Elsevier Masson SAS*; 2020; 128:110237.
11. Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS. Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake. *Journal of Controlled Release*. 2022. 347:533–43.
12. 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 Nanomedicine*. 2020 ;15:6917–34.
13. Yang D, Zhang W, Zhang H, Zhang F, Chen L, Ma L, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020 ; 10(8):3684–707
14. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the Transferrin Receptor during Maturation of Sheep Reticulocytes In Vitro: Selective Externalization of the Receptor. *Cell*. 1983. 33:976-977.
15. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia*. 2020; 34(12):3126–35
16. Isaac R, Reis FCG, Ying W, Olefsky JM. Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism. *Cell Metab*. 2021; 33(9):1744–62.
17. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019; 8(7).
18. Jiang C, Zhang N, Hu X, Wang H. Tumor-associated exosomes promote lung cancer metastasis through multiple mechanisms. *Mol Cancer*. 2021; 20(1).
19. Mostafazadeh M, Samadi N, Kahroba H, Baradaran B, Haiaty S, Nouri M. Potential roles and prognostic significance of exosomes in cancer drug resistance. *Cell Biosci*. 2021; 11(1):1.
20. Zhou Y, Zhang Y, Gong H, Luo S, Cui Y. The Role of Exosomes and Their Applications in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(22).
21. Olejarz W, Zyna Kubiak-Tomaszewska G, Chrzanowska A, Lorenc T. Exosomes in Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy in Cancers. *Molecular Sciences*. 2020; 21: 5840
22. Boticario C, Cascales Angosto M. Hipoxia y cáncer.. *Acad. Nac. Farm*. 2010. 76:24-34.
23. Xi XM, Chen-Meng, Xia SJ, Lu R. Drug loading techniques for exosome-based drug delivery systems., *Pharmazie*. 2021; 79 (1). 61–7.

24. Lu Y, Huang W, Li M, Zheng A. Exosome-Based Carrier for RNA Delivery: Progress and Challenges. *Pharmaceutics*. 2023; 15(2).
25. Patil SM, Sawant SS, Kunda NK. Exosomes as drug delivery systems: A brief overview and progress update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020; 1;154:259–69.
26. Sen S, Xavier J, Nitesh Kumar, Mohammad , Ahmad Z, Om, et al. Exosomes as natural nanocarrier-based drug delivery system: recent insights and future perspectives. *Biotech*. 2023; 13(3):101.
27. Kibria G, Ramos EK, Wan Y, Gius DR, Liu H. Exosomes as a Drug Delivery System in Cancer Therapy: Potential and Challenges. *Mol Pharm*. 2018;15(9):3625–33.
28. Huyan T, Li H, Peng H, Chen J, Yang R, Zhang W, et al. Extracellular Vesicles-Advanced Nanocarriers in Cancer Therapy: Progress and Achievements. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 6485–6502
29. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019; 519–25.
30. Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*. 2016; 12(3):655–64.
31. Khongkow M, Yata T, Boonrunsiman S, Ruktanonchai UR, Graham D, Namdee K. Surface modification of gold nanoparticles with neuron-targeted exosome for enhanced blood–brain barrier penetration. *Nature*. 2019; 9(1):1–9.
32. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochemistry Reviews*. 2010; 9:425–74.
33. Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen H, Yuan H, Sun D. Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery. *Nature*. 2017; 28:754–63.
34. Thermo Fisher Scientific [Internet]. [konsulta ots 27an] Transfection. Eskuragarri: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-culture/transfection.html>
35. Sato YT, Umezaki K, Sawada S, Mukai SA, Sasaki Y, Harada N, et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep*. 2016; 25(6).
36. 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.
37. Gomari H, Moghadam MF, Soleimani M. OncoTargets and Therapy Dovepress Targeted cancer therapy using engineered exosome as a natural drug delivery vehicle. *Onco Targets Ther*. 2018; 11–5753.

38. Gomari H, Moghadam MF, Soleimani M, Ghavami M, Khodashenas S. Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14:5679-5690.
39. Liang G, Zhu Y, Ali DJ, Tian T, Xu H, Si K, et al. Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer. *J Nanobiotechnology*. 2020; 18(1):10.
40. Chen M, Li Y, Ma N, Zang J. Mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with 5-Fu against cholangiocarcinoma in vitro. *Mol Med Rep*. 2022; 25(6).
41. Kumar DN, Chaudhuri A, Dehari D, Shekher A, Gupta SC, Majumdar S, et al. Combination Therapy Comprising Paclitaxel and 5-Fluorouracil by Using Folic Acid Functionalized Bovine Milk Exosomes Improves the Therapeutic Efficacy against Breast Cancers. 2022; 12(8).
42. Wang P, Wang H, Huang Q, Peng C, Yao L, Chen H, et al. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophage-mediated inflammation. *Theranostics*. 2019; 9(6):1714–27.
43. Melzer C, Rehn V, Yang Y, Bähre H, Von Der Ohe J, Hass R. Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells. *Cancers* 2019. 11:798.
44. Wang F, Li L, Piontek K, Sakaguchi M, Selaru FM. Exosome miR-335 as a Novel Therapeutic Strategy in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2017; 67(3):940-954.
45. Ding Y, Cao F, Sun H, Wang Y, Liu S, Wu Y, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Lett*. 2019; 442:351–61.
46. Yang Z, Shi J, Xie J, Wang Y, Sun J, Liu T, et al. Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation. *Nat Biomed Eng*. 2020; 4(1):69–83.
47. Kim SM, Yang Y, Oh SJ, Hong Y, Seo M, Jang M. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *Journal of Controlled Release*. 2017; 28(6):8–16.