



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

EXOSOMAS E HÍGADO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Autora:

Esther Gracia Rodríguez

Directores:

María Ángeles Navarro Ferrando
Jesús de la Osada García

Grado en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Curso 2023-2024

ÍNDICE

RESUMEN	2
PALABRAS CLAVE:	2
ABSTRACT	3
KEYWORDS	3
ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 BIOGÉNESIS.....	5
1.2 COMPONENTES:.....	6
1.3 FUNCIONES FISIOLÓGICAS	8
1.4 AISLAMIENTO.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4. RESULTADOS	11
4.1 FIBROSIS HEPÁTICA	12
4.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	13
4.3 LESIÓN HEPÁTICA AGUDA	14
4.4 HEPATITIS.....	15
4.5 INSUFICIENCIA HEPÁTICA	17
4.6 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	17
4.7 HÍGADO GRASO ALCOHÓLICO.....	18
4.8 TERAPIA.....	19
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23

ABREVIATURAS

ALD: Enfermedad hepática alcohólica.

ALF: Insuficiencia hepática aguda.

ARNm: ARN mensajero.

circRNA: ARN circular.

DILI: Lesión hepática aguda.

ESCRT: Complejos de clasificación endosmóticos necesarios para el transporte.

EV: Vesícula extracelular.

HCC: Carcinoma hepatocelular.

ILV: Vesículas intraluminales.

HSC: Célula estelar hepática.

LF: Fibrosis hepática

lncRNA: RNA largos no codificantes.

LSEC: Células endoteliales sinusoidales.

MVB: Cuerpo multivesicular.

miRNA: Micro ARN

MCS: Célula madre mesenquimal.

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico.

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica.

TDA: Enfermedad hepática alcohólica.

VHA: Virus de la hepatitis A.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C.

1.INTRODUCCIÓN

Las células son capaces de liberar vesículas extracelulares (EV), un grupo heterogéneo de compartimentos membranosos rodeados de una bicapa lipídica. Estos pueden transportar en su interior diversas moléculas con distintas funciones biológicas (1). Las EV, en función de su tamaño y origen, se pueden dividir principalmente en exosomas (30-100 nm), microvesículas (0,1-1 μm) y cuerpos apoptóticos (1-4 μm) (2).

En este trabajo nos centraremos en los exosomas, el grupo de menor tamaño. Los exosomas observados por microscopía electrónica suelen tener una forma circular o elíptica con una superficie cóncava (3). Estos son secretados por una amplia gama de tipos celulares, entre los que se encuentran las células dendríticas, células epiteliales, adipocitos, macrófagos, hepatocitos y linfocitos T y B, así como también las células tumorales (4). Los exosomas se pueden encontrar en casi todos los fluidos corporales como la orina, el plasma, la saliva, la leche materna, el semen y el líquido cefalorraquídeo, entre otros (5).

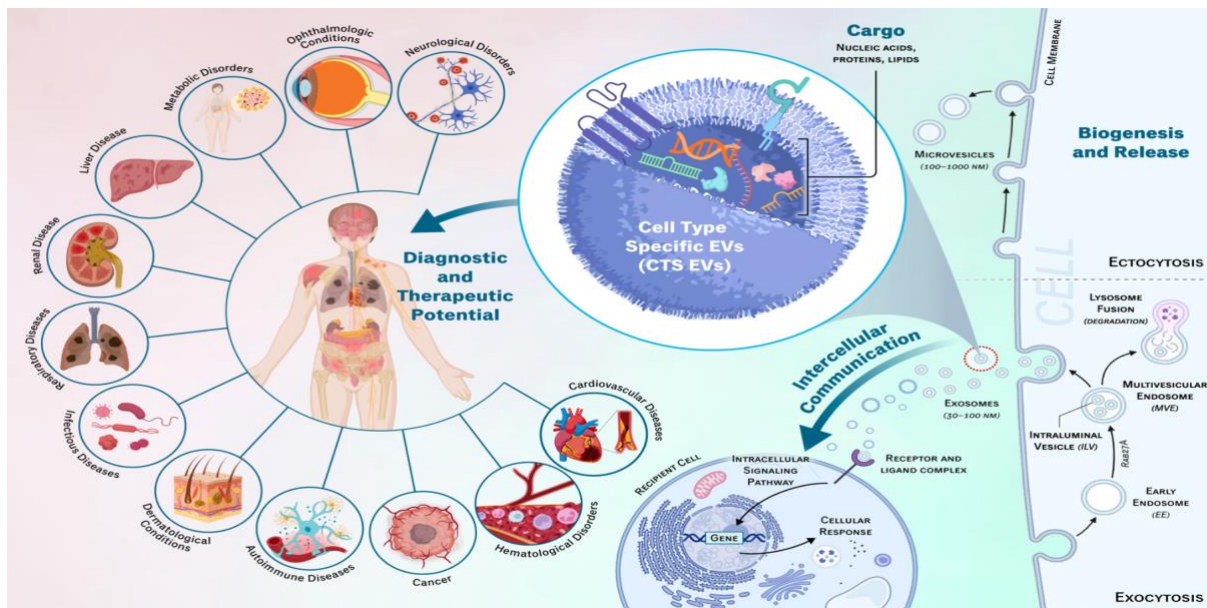


Figura 1: Estirpes celulares implicadas en la secreción de exosomas. Adaptada de la referencia 6.

1.1 BIOGÉNESIS

Los exosomas se producen mediante intrincadas vías de biogénesis, las cuales son únicas en función de sus células de origen. El proceso de biogénesis del exosoma comienza cuando la membrana celular se invagina para formar un endosoma temprano, el cual, gracias al procesamiento en el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi, se convierte en un endosoma tardío, también conocido como cuerpo multivesicular (MVB), ricos en muchas vesículas intraluminales (ILV) (6, 7). El destino principal de los MVB en la mayoría de las células es fusionarse con los lisosomas, compartimentos ácidos ricos en enzimas hidrolíticas que degradan su contenido. En base a los análisis proteómicos, algunos MVB se transportan al aparato de Golgi para su recuperación, mientras que otros MVB se fusionan con la

membrana celular para liberar las diversas vesículas intraluminales al exterior celular, que ahora pasan a llamarse exosomas (1).

Hay muchas moléculas que tienen un papel fundamental en la biogénesis y abscisión de los exosomas. Por un lado, un componente central de la biogénesis del exosoma involucra al complejo ESCRT (del inglés, endosomal sorting complex required for transport), que es la principal maquinaria molecular involucrada en la síntesis de MVB y consta de 4 complejos (1). Finalmente, la unión de la proteína VPS4 con ESCRT-III desencadena la liberación exosomal (8). El complejo ESCRT, junto con sus proteínas accesorias TSG101 (Tumor susceptibility gene 101 protein) y ALIX (ALG-2 interacting protein), que se localizan en el lado citoplasmático de la membrana endosomal, están relacionadas con la clasificación de la carga del exosoma (1). Por otro lado, existe una vía independiente de ESCRT que se basa en las balsas lipídicas de la membrana endosómica así como en las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD82, una familia de proteínas altamente conservadas que funcionan como moléculas organizadoras en las membranas biológicas y controlan funciones celulares fundamentales, incluyendo la adhesión, migración y proliferación (1).

Cabe destacar la importancia de la familia Rab-GTP (proteínas reguladoras de la guanosina trifosfatasa de Rab), que es la encargada de guiar los MVB hacia la periferia celular, donde se fusionan con la membrana celular para liberar los exosomas. (1,8). Dentro de esta familia destaca la implicación de RAB27, RAB11 y RAB35 (9). Además, los SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors), dentro de los que se encuentran SNAP23 (familia T-SNARE), así como VAMP7 y VAMP8 (V-SNARE), están también relacionados con la liberación de los exosomas. (9)

Pero, pese a todas las investigaciones, la tasa de biogénesis de los exosomas es en gran medida aún desconocida y difiere entre diferentes tipos de células y depende igualmente de su estado fisiológico o patológico.

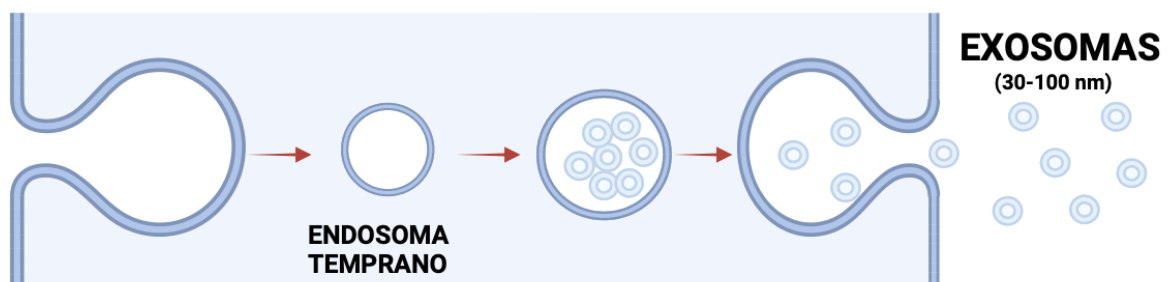


Figura 2: Biogénesis de los exosomas. Elaboración propia con Biorender.

1.2 COMPONENTES

La composición entre los distintos tipos de exosomas permite identificar su origen celular, condición fisiológica y estado de la enfermedad. Pero, pese a las diferencias, hay una serie de características en común con respecto a su composición que comparten todos los exosomas.

Componentes	Carga exosómica	Referencias
Proteínas	<u>Proteínas de transporte:</u> Anexinas, Rab 5, Rab7, flotilina. <u>Proteínas choque térmico:</u> HSP60, HSP70, HSP90, HSPA5, CCT2. <u>Enzimas metabólicas:</u> G3P-deshidrogenasa, ATPasa, GADPH, PKM2, PGK1, PDIA3. <u>Factores transducción de señales:</u> ARF1, CDC42. <u>Proteínas citoesqueléticas:</u> Actina, Miosina, Tubulina, Vimentina. <u>Proteínas productoras MVB:</u> Alix, TSG101, Clatrina. <u>Proteínas específicas de las células/inmunitarias:</u> MHC-I, MHC-II, EGFR. <u>Tetraspaninas:</u> CD9, CD10, CD26, CD53, CD63, CD81, CD82. <u>Factores adhesión:</u> MFGE8, CAM, Integrina.	1, 4, 12, 13, 16
Lípidos	Colesterol, esfingomielina, ceramida, fosfatidilserina y ácidos grasos saturados.	13, 16
ARNs	ARN ribosómico (ARNr), ARN no codificante largo (ARNnc), ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN nuclear pequeño (snRNA), microARN (ej: miR-21, miR23, miR-122).	1, 6, 13, 16, 26,
ADN	ADN doble cadena (dsDNA), ADN mitocondrial.	4, 12, 13, 16

Tabla 1: Principales constituyentes de los exosomas.

Gracias a los análisis proteómicos y genómicos, se ha revelado que los exosomas contienen una amplia variedad de moléculas bioactivas, dentro de las que encontramos ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, tal y como se ilustra en la tabla 1. El contenido exosómico puede revelar el estado funcional de la célula parental.

Independientemente del origen celular del exosoma, todos tienen una bicapa lipídica que contiene balsas lipídicas, las cuales están compuestas por colesterol, esfingolípidos, ceramida y fosfoglicéridos (10). Los lípidos no solo tienen un papel estructural fundamental en las membranas de los exosomas manteniendo la estabilidad morfológica, sino que además también están relacionados con la regulación de la biogénesis del exosoma y la comunicación celular (6).

Las proteínas no específicas son aquellas que se encuentran en la mayoría de los exosomas y son independientes del tipo de célula que los secreta. Dentro de este grupo encontramos las proteínas de superficie, como las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82) y las integrinas, las proteínas de choque térmico, las proteínas involucradas en la fusión de membranas (anexinas, Rab 5, Rab 7...), las proteínas del complejo ESCRT (Alix y TSG101) y las proteínas citoesqueléticas. Por otro lado, las proteínas específicas dependen de las células de origen de los exosomas (1, 7, 10, 11, 12, 13).

Además, los exosomas contienen gran cantidad de material genético, entre los que destacan ARNm, miRNA y pequeño ARN no codificante, que facilitan la comunicación celular y son considerados como marcadores potenciales para el diagnóstico de enfermedades (10). Los microRNA son moléculas de ARN de una sola cadena no codificante que han sido ampliamente estudiadas en los exosomas, dada su relación con el desarrollo, inmunidad y diferenciación de las células madre y el cáncer (5, 1).

Cabe destacar la importancia de los glicanos, que se encuentran normalmente como parte de las glicoproteínas y glicolípidos. Son moléculas complejas cruciales dada su implicación en la biogénesis, liberación, absorción e interacción de los exosomas con las células diana. Los diferentes tipos de glicano presentes en los exosomas pueden servir como potentes biomarcadores de condiciones patológicas (6).

El contenido de los exosomas puede variar ampliamente en función de los tipos o condiciones de las células donantes, de manera que un conjunto distinto de cargas específicas puede influir en las células receptoras y alterar los microambientes circundantes (14). Esta alteración de los componentes de los exosomas puede proporcionar potentes biomarcadores de enfermedad (15).

1.3 FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Gracias a la extensa investigación realizada sobre los exosomas, se conoce que son capaces de llevar a cabo una extensa gama de funciones fisiológicas, de entre las que destacan la importancia de su papel en el intercambio de información y transferencia de material intercelular (4, 16). Recientes estudios han revelado que los exosomas son capaces de transportar información genética entre células y a través de tejidos mediante transferencia horizontal de macromoléculas (10). Los exosomas son capaces de comunicarse con las células mediante tres mecanismos: 1) fusionarse con las membranas de las células diana, 2) unirse a los receptores y 3) entrar directamente mediante endocitosis dependiente de clatrina (4). Dadas las características de sus proteínas de superficie los exosomas muestran una especificidad alta para las células receptoras (9). La mayoría de los exosomas pueden persistir en el microambiente extracelular durante largos periodos de tiempo (17).

Por otro lado, el riesgo de aparición y progresión de ciertas enfermedades, incluyendo cáncer, afecciones autoinmunes o trastornos neurológicos entre otras, se pueden predecir mediante el estudio de la relación entre el número, el tipo, el tamaño y el contenido de los exosomas. (14) Además, los exosomas pueden ser utilizados como portadores de ciertos medicamentos, siendo así una potente esperanza para el tratamiento de múltiples enfermedades, como las enfermedades hepáticas, cardiovasculares, metabólicas e inmunitarias (16).

1.4 AISLAMIENTO

Pese al desarrollo de numerosas técnicas para poder separar de manera eficaz a los exosomas de los fluidos biológicos, hasta la fecha no se ha establecido un método estandarizado de aislamiento de exosomas (10). Las técnicas más utilizadas son la ultracentrifugación, precipitación de polímeros, cromatografía de exclusión de tamaño, ultrafiltración y captura de inmunoafinidad (18). La técnica de aislamiento debe seleccionarse de manera meticulosa según el tipo de muestra a analizar así como el propósito del estudio.

Método de aislamiento	Ventajas	Desventajas
Ultracentrifugación	<ul style="list-style-type: none"> • Alta capacidad de procesamiento. • Idónea para preparación de grandes volúmenes. • Rentable. • Aislamiento de alta pureza. • Facilidad de operación. • Óptimo para aislar partículas pequeñas bajo fuerzas centrífugas. • Método más popular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Agregación de proteínas. • Contaminación con lipoproteínas • Depende de la diferencia de densidades (la diferenciación entre exosomas y microvesículas es casi imposible).
Ultrafiltración	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción del tiempo de procesamiento. • No hace falta equipo especializado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de obstrucción que reduzca la vida útil de la membrana y el rendimiento de separación. • Baja pureza. • Actividad biológica de los exosomas disminuida.
Captura de inmutafinidad	<ul style="list-style-type: none"> • Alta especificidad. • Aislamiento de subpoblación específica de exosomas de alta pureza. 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica más cara.
Precipitación de polímeros	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil utilización. • Eficiente en el tiempo. • No requiere dispositivos especiales. • Alto rendimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación de otras sustancias solubles en agua. • Las impurezas afectan a los resultados.
Cromatografía de exclusión de tamaño	<ul style="list-style-type: none"> • Se pueden separar vesículas pequeñas y grandes. • Se eliminan contaminaciones de proteínas solubles. • Preservación actividad biológica del exosoma. • Alta pureza. Alta reproducibilidad. • Eficiencia en el tiempo y el trabajo. 	<ul style="list-style-type: none"> • La columna de aislamiento es cara. • No se pueden diferenciar exosomas y microvesículas del mismo tamaño.
Referencias: 10, 18		

Tabla 2: Perspectiva de los métodos utilizados para preparar exosomas.

Tal y como se muestra en la tabla 2, todos los métodos actuales de aislamiento de exosomas presentan ciertas ventajas y desventajas, siendo las principales limitaciones el bajo rendimiento, el largo tiempo de separación, las contaminaciones y la escasa pureza de los exosomas aislados (14, 19). Se ha sugerido combinar técnicas de aislamiento para aumentar la pureza, lo cual lleva consigo también el aumento del costo así como la disminución del rendimiento y fiabilidad (10).

Por ende, la investigación futura debe dirigirse hacia el desarrollo de procesos estandarizados que permitan el aislamiento y la caracterización de exosomas de alta pureza, lo cual beneficiará en gran medida a la investigación científica enfocada en la comprensión del papel de los exosomas.

2.OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica acerca del estado actual de investigación en los exosomas del hígado, centrándonos principalmente en su potencial para contener valiosos biomarcadores no invasivos de diagnóstico y pronóstico así como exhibir efectos terapéuticos en las condiciones experimentales y clínicas en diferentes enfermedades hepáticas.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica de los artículos disponibles en la literatura científica sobre los exosomas derivados de células hepáticas y sus posibilidades diagnósticas y terapéuticas en enfermedades hepáticas. Para la búsqueda bibliográfica se empleó el programa EndNote X7. La búsqueda inicial se realizó con las palabras clave “exosomes” y “liver”. De las referencias elegibles, fueron descartadas aquellas que no aportaban información relevante.

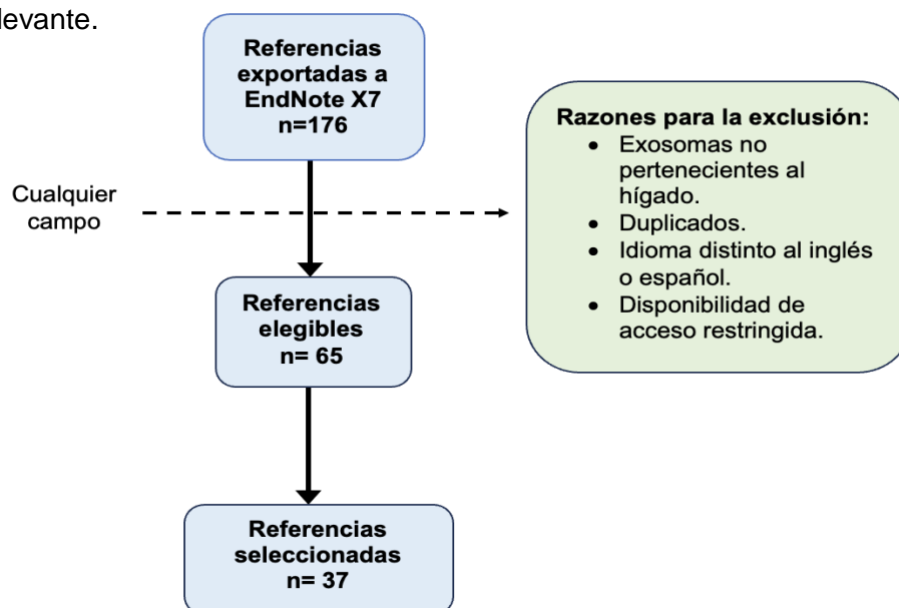


Figura 3: Diagrama de flujo de las etapas seguidas durante la selección de las referencias bibliográficas utilizadas.

4.RESULTADOS

El hígado, como órgano metabólico esencial del cuerpo, se encarga de desempeñar papeles fisiológicos críticos en el metabolismo como la desintoxicación, síntesis, digestión y almacenamiento (20). Las células parenquimales, más conocidas como hepatocitos, forman parte de aproximadamente un 80% del volumen del hígado y son las encargadas de llevar a cabo las principales funciones hepáticas (14). Los hepatocitos permanecen en estado de reposo, pero cuando se produce algún daño en el hígado son capaces de entrar en el ciclo celular y proliferar para poder repoblar las regiones lesionadas (7). En caso de que el daño hepático sea más grave, los hepatocitos liberan citoquinas y estimulan la participación en la reconstrucción del hígado de las células no parenquimales entre las que se encuentran las células estelares hepáticas (HCS), células de Kupffer, células madre hepáticas adultas y células endoteliales sinusoidales (LSEC) (3, 7, 9, 14).

Las enfermedades hepáticas tienen una alta incidencia y mortalidad en todo el mundo, siendo la causa de aproximadamente el 3,5% de muertes anuales (3, 11). En la actualidad la biopsia de hígado sigue siendo un estándar de elección en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades hepáticas, pero se trata de un procedimiento con algunas limitaciones, como su costo, la invasividad, morbilidad asociada o los errores de muestreo que pueden ocurrir al tomar muestras a una pequeña parte del tejido hepático. Además, el diagnóstico de las enfermedades hepáticas crónicas puede ser complejo debido a las distintas etapas que se dan durante su progresión.

El interés científico por el uso de exosomas como biomarcadores de las enfermedades hepáticas está en alza, ya que puede ser una alternativa de gran precisión además de no invasiva y que permita el diagnóstico temprano, lo cual mejora la tasa de supervivencia. Pero aún queda un largo camino por recorrer antes de que esta opción se convierta en una realidad, ya que hay mucho desconocimiento alrededor de cuál es su implicación en las enfermedades hepáticas y cómo aislar y purificar los exosomas. Pocos estudios han sido realizados acerca de los exosomas del hígado debido a que la mayor parte de la investigación en este campo se ha centrado principalmente en los exosomas derivados de células madre mesenquimales (14).

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
BIOPSIA DE HÍGADO	<ul style="list-style-type: none"> • Método más utilizado y conocido. • Diagnóstico y pronóstico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Errores de muestreo. • Difícil diagnosticar enfermedades crónicas con precisión. • Procedimiento invasivo. • Coste económico elevado. • Cierta tasa de morbilidad asociada.
EXOSOMAS	<ul style="list-style-type: none"> • No invasivo. • Preciso. • Permite el diagnóstico temprano. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca información. • Métodos de aislamiento y purificación aún no estandarizados. • No están claros todos los biomarcadores de cada enfermedad.
Referencias: 2, 14, 16.		

Tabla 3: Comparativa entre el uso de biopsia de hígado y exosomas para diagnosticar enfermedades hepáticas.

4.1 FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es un grave problema de salud mundial causado por la producción y acumulación excesiva de colágeno insoluble tras sufrir una lesión hepática crónica (1, 22). Es uno de los principales factores de riesgo para la aparición de carcinoma hepatocelular y puede conducir a la necesidad de un trasplante de hígado (21, 22). La gran mayoría de los estudios consultados destacan el papel protector de los exosomas contra el desarrollo de la fibrosis hepática al ser capaces de regular la activación de las células estelares hepáticas a través de ciertos micro ARN y proteínas. Pero, pese al papel beneficioso que presentan algunos compuestos que transportan los exosomas excretados por las células hepáticas, hay otros que potencian la progresión de la enfermedad, lo que los convierte en candidatos interesantes para seguir investigándolos como posibles biomarcadores.

CONTENIDO EXOSOMAS EN FIBROSIS HEPÁTICA			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLEÍCOS	Hepatocitos	miR-122 miR-155	Predictor pronóstico y promueve fibrosis hepática.
		miR-1297 miR17-92	Promueve fibrosis hepática.
		miR-103-3p	Predictor pronóstico.
		miRNA-192	Potencial biomarcador y predictor pronóstico.
		miR-222 miR-19a	Biomarcador predictivo para la fibrosis hepática inducida por VHC.
	Suero	miR-574-5p	Promueve fibrosis hepática.
		circDIDO1	Alivia fibrosis hepática.
		miR-151-3p miR-483-5p miR-532-5p miR-687	Inhibe expresión genes fibrogénicos en los HSC activados.
	Células de Kupffer	miR-690	Inhibe activación fibrogénica mediante la regulación descendente de expresión de NADK.
	HSC	miR-199-5p	Control activación células esteladas hepáticas vecinas e inhibe CCN2.
		miR-30a	Su disminución contribuye a autofagia.
		miR-128-3p	Aumentan la expresión, proliferación y migración de los genes profibrogénicos.
		miR-214	Atenúa función profibrótica de HSC activados.
	Colangiocitos	lncRNA-H19	Promueven activación células esteladas hepáticas y promueve fibrosis hepática.
	PROTEÍNAS	Hepatocitos	TLR3
Citocromo P450			Promueve apoptosis hepatocelular.
CD81 ASK1			Promueve fibrosis hepática. Asociado con gravedad.
HCS		Hif-1 CCN2	Promueven fibrosis hepática.
		Twist1	Inhibe activación células esteladas hepáticas vecinas.
		CTGF	Regula la activación y migración de HSC, así como la respuesta inmune.
		Fibrina	Predictor pronóstico y tratamiento.
REFERENCIAS: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 16, 20, 22, 30			

Tabla 4: Contenido de exosomas liberados por hígados con fibrosis hepática.

4.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR

El carcinoma hepatocelular es el tipo más común de cáncer de hígado y se ha convertido, dada su alta tasa de mortalidad y rápido desarrollo, en un grave peligro para la salud pública mundial (11, 17, 19, 23). La supervivencia de pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado es baja debido a la resistencia a los medicamentos así como la insuficiencia de donantes para realizar trasplantes de hígado (24).

CONTENIDO EXOSOMAS EN CARCINOMA HEPATICO				
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES	
ÁCIDOS NUCLEÍCOS	Célula cancerosa	miRNA-210 miR-378b miR-155	Induce angiogénesis y promueve progresión tumoral. Potenciales biomarcadores.	
		miR-146a	Promueve progresión tumoral al promover polarización M2 e inhibir función células T.	
		miR-1273F	Mejora fenotipo maligno, proliferación, migración e invasión células HCC.	
		miRNA-21	Promueven progresión tumoral al activar el gen supresor de tumores PTEN.	
		miR-223	Promueve crecimiento tumoral y metástasis.	
		miR-103	Promueve metástasis del HCC.	
		miR-135a-5p	Promueve metástasis hepática colorrectal.	
		Circ-004277	Promueve progresión tumoral y metástasis.	
	Suero	miR-12 miR-16 miR-141 miR-146 miR-18a miR-221 miR-222 miR-224 miR-101 miR-106b miR-122 miR-195 miR-30d miR-140 miR-29b miR-92a let-7miRNA	Biomarcadores y predictores pronóstico HCC.	
		miR-638	Indicador del riesgo de recaída en condiciones clínicas. Inversamente relacionado con el tamaño del tumor.	
		miR-718	Relacionado con la agresividad del tumor.	
		miR-21 miR-10b	Promueven la proliferación y la metástasis de las células cancerosas. Pueden ser utilizados como biomarcadores pronósticos y objetivos terapéuticos.	
		HSC	miR-148a-3p	Su descenso promueve HCC
	PROTEÍNAS	Células cancerosas	HGF	Promueve Resistencia tumoral
			CLEC3B	Promueve angiogénesis y progresión tumoral
			ANGT2 AFP AKT STAT5 α ERK1/2 GSK3 β Shh RRAS CLND3e Caveolina-1	Promueve progresión tumoral. Potenciales biomarcadores diagnósticos.
			S100A4	Promueve metástasis.
			TGF- β 1	
			Suero	HIF1 α
CPE				
REFERENCIAS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 20, 24, 29, 31, 32				

Tabla 5: Contenido de exosomas liberados por hígados con carcinoma hepático.

Los exosomas tienen un papel crucial en la aparición, desarrollo y metástasis del carcinoma hepático, principalmente gracias a la interacción en el microambiente a través de los exosomas entre las células hepáticas cancerosas con las células circundantes (3, 17, 25).

Los ácidos nucleicos miRNA-210, miRNA-378b, miRNA-718, miRNA-21 y miRNA-92a destacan por encima del resto dado que han demostrado estar significativamente sobreexpresados en el carcinoma hepatocelular, asociándose así con la progresión del cáncer (2). Otros estudios analizados destacan como otros miRNA presentes en los exosomas aumentan (miRNA-18a, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-224) o disminuyen (miRNA-101, miRNA-106, miRNA-122, miRNA-195) en pacientes con HCC, pero aún se desconoce si la diferencia en sus valores con respecto al contenido de los exosomas sanos es lo suficientemente significativa como para que estos puedan ser considerados como potenciales biomarcadores. Además, miRNA-12, miRNA-141 y miRNA-146 se asocian a una mala supervivencia (11).

Con respecto a las proteínas mencionadas en la tabla 5, todas aquellas que están involucradas en la progresión tumoral, como ANGT2 (recombinant angt2 protein), AFP (alpha fetoprotein), Shh (sonic hedgehog protein) o CLEC3B (C-Type Lectin Domain Family 3 Member B), entre otras, pueden tener un importante papel como biomarcadores diagnósticos y pronósticos al poder indicar el estadio de la enfermedad. A su vez, también son importantes las proteínas que promueven la metástasis, ya que son indicadoras de la gravedad del carcinoma hepatocelular.

4.3 LESIÓN HEPÁTICA AGUDA

La lesión hepática aguda, también conocida como DILI, es una disfunción hepática inducida por medicamentos o drogas que puede derivar en insuficiencia hepática aguda (11).

CONTENIDO EXOSOMAS EN DILI			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLEÍCOS	Hepatocitos	miR-122 miR-192	Potencial biomarcador. Permite la detección temprana de hepatotoxicidad de los medicamentos.
	Suero	miRNAs-122a-5p miRNAs-192-5p miRNAs-193a-3p	Biomarcadores del daño hepático.
		miR-155 miR-146a miR-125b	Regulan la inflamación en las células inmunitarias.
PROTEÍNAS	Hepatocitos	Catecolamina-metiltransferasa Arginasa 1 Citocromo P450 2E1 (CYP2d1) Fibronectina Fibrinógenos Integrina CD81 Hpsa5 FRIL1 Rap1A Alix	Biomarcadores diagnósticos de DILI.
	Suero	CES3 SLC27A2 HSP90 HSP70	Biomarcadores de la evolución del daño hepático.
REFERENCIAS: 2, 11, 33, 34			

Tabla 6: Contenido de exosomas liberados por hígados con DILI.

Se ha postulado que DILI causa cambios en los exosomas y que por ende la detección y análisis de su contenido puede ser de gran utilidad para el diagnóstico temprano. Los principales biomarcadores potenciales de DILI son miRNA-122 y miRNA-192, cuyos niveles aumentan de manera significativa y esto se puede detectar antes que otros marcadores tradicionales de lesión hepática, lo cual permite una detección temprana (11). Por otro lado, hay ciertas proteínas, como CES3 (Carboxylesterase 3), SLC27A2 (Solute Carrier Family 27 Member 2), HSP (Heat Shock Proteins), cuya concentración aumenta cuanto mayor es el daño hepático. Otras proteínas, tal y como se señalan en la tabla, podrían ser biomarcadores diagnósticos de DILI, pero hace falta más investigación para conocer la implicación de cada una de ellas en la enfermedad y su potencial importancia en el diagnóstico.

4.4 HEPATITIS

La hepatitis viral incluye como las principales manifestaciones clínicas los siguientes cinco virus: Hepatitis A, B, C, D y E. El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus de ADN circular que puede progresar a hepatitis B crónica y acabar derivando en el desarrollo de cirrosis o carcinoma hepático (1, 3, 24). El virus de la hepatitis C es un virus de ARN que se transmite a través de la sangre y puede progresar a hepatitis crónica, carcinoma hepatocelular o cirrosis (3, 24). La infección por VHB y VHC se han convertido en un problema importante para la salud mundial. Hasta la fecha se tiene poca o ninguna información acerca del papel de los exosomas en el virus de la hepatitis A, D y E.

CONTENIDO EXOSOMAS HEPATITIS B			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLEÍCOS	Hepatocitos infectados	miR-222	Potencial biomarcador.
		NOX1	Correlacionado positivamente con los índices inflamatorios de la progresión de la lesión hepática.
		miR-506-3p miR-19a miR-192	Promueve fibrosis hepática.
	Células de Kuffer	miR-690	Promueve la fibrosis.
	Suero	hsa-miR-372-3p hsa-miR-10a-5p	Indicadores sensibles a la inflamación hepática.
		miR-21	Su elevación sugiere cirrosis asociada a VHB.
		miR-18a miR-221 miR-224 miR-101 miR-106b miR-122 miR-195	Potenciales biomarcadores.
PROTEÍNAS	Hepatocitos infectados	CD81	Regula apoptosis.
	HSC	Nur77	Promueve fibrosis hepática.
	Suero	Ago2 HSP90	Transmisión virus a los hepatocitos.
		CD63	Contribuye a ensamblaje eficiente del VHB e infectividad.
REFERENCIAS: 3, 5, 11, 12, 16, 20, 26			

Tabla 7: Contenido de exosomas liberados por hígados con hepatitis B.

Los exosomas séricos contienen componentes del virus de la hepatitis B que promueven la replicación y transmisión del virus al inhibir la respuesta inmune del cuerpo, como por ejemplo las proteínas Ago2 (Protein Argonaute 2), HSP90 (Heat Shock Proteins) y CD63. El miRNA-222 es un potencial biomarcador de la hepatitis B ya que aumenta de manera significativa en los exosomas derivados de hepatocitos infectados, sobre todo en las etapas tempranas. Otros ácidos nucleicos, como miRNA-18a, miRNA-221 y miRNA-224, podrían ser de interés como biomarcadores ya que su nivel de expresión también se ve aumentado. Los NOX1 son complejos enzimáticos que constituyen las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno, por lo que la ROS derivada de NOX1 está implicada en la desregulación de la activación celular, la muerte celular y la carcinogénesis (26).

A su vez, hay ácidos nucleicos y proteínas, como miRNA-506-3p, miRNA-19a, miRNA-192, miRNA-690 y Nur77 (nuclear receptor 4A1), cuya expresión aumentada está fuertemente correlacionada con el desarrollo de fibrosis hepática asociada a VHB. El aumento de la expresión génica de miRNA-21 está relacionada con la cirrosis hepática. Es importante controlar el aumento de estos componentes para poder controlar el riesgo de que la hepatitis progrese a otras patologías y, en caso de darse la progresión, poder tratarlas de manera temprana.

HEPATITIS C			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLÉICOS	Hepatocitos infectados	miR-19a miR-192 miR-214	Comunicación de información entre hepatocitos y células no parenquimales.
	Células Kuffer	miR-690	Promueve la fibrosis.
	Suero	miR-122	Promueve la replicación y la transmisión.
		miR-21	Su elevación sugiere cirrosis asociada a VHC.
PROTEÍNAS	Hepatocitos	CD81 Ago2 HSP90 HSP70	Mejoran estabilidad y promueven transmisión virus a los hepatocitos. Potenciales biomarcadores.
		TIM-3/GAL-9	Suprime respuesta inmunitaria del cuerpo.
REFERENCIAS: 2, 3, 4, 11, 16, 20, 24			

Tabla 8: Contenido de exosomas liberados por hígados con hepatitis C.

Hay ciertos ácidos nucleicos y proteínas que mejoran la estabilidad del virus y promueven su transmisión, como miRNA-19a, miRNA-192, miRNA-122, CD81, Ago2), HSP90 o HSP70. De manera similar a lo que ocurre en la hepatitis B, la expresión elevada de miRNA-690 está relacionada con el desarrollo de fibrosis hepática asociada a VHC y el aumento de miRNA-21 está relacionado con la cirrosis hepática.

Comparando la tabla 7 y 8 podemos observar como hay ciertos miRNA (miRNA-19a, miRNA-192, miRNA-690, miRNA-21, miRNA-122) y proteínas (CD81, Ago2, HSP90), comunes en ambas enfermedades, de manera que estos podrían ser potenciales indicadores diagnósticos de la hepatitis, aunque no podríamos diferenciar su tipo. Para un diagnóstico más preciso deberemos recurrir a otras biomoléculas más específicas. Por ejemplo, miRNA-222 es un potencial biomarcador específico de la hepatitis B y miR-214 de la hepatitis C.

4.5 INSUFICIENCIA HEPÁTICA

La insuficiencia hepática aguda (ALF) es un síndrome clínico que se caracteriza por la necrosis externa de los hepatocitos y causa un grave daño al hígado (1).

CONTENIDO EXOSOMAS INSUFICIENCIA HEPATICA			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLÉICOS	Hepatocitos	miR-20a	Potencial biomarcador diagnóstico.
	Suero	miR-92a-3p miR-146a-5p	Biomarcador potencial para evaluar LF en hepatitis B crónica.
		miR-122 lncRNA-H19 miR-574-5p miR-500 miR-103-3p	Biomarcador diagnóstico potencial.
		miR-27	Biomarcador diagnóstico potencial para el LF asociado a NAFLD.
PROTEÍNAS	Hepatocitos	ALB CD63 VEGF	Biomarcador diagnóstico potencial.
	Suero	Circ-DIDO1 CD44	Biomarcador diagnóstico potencial.
REFERENCIAS: 4, 11, 16			

Tabla 9: Contenido de exosomas liberados por hígados con insuficiencia hepática.

Destacan como biomarcadores diagnósticos y pronósticos potenciales miRNA-122, cuyo nivel de expresión es inversamente proporcional al avance de la insuficiencia hepática, y lncRNA-H19, que está correlacionado positivamente con la gravedad. Hay otros ácidos nucleicos, como miRNA-92a-3p o miRNA-146a-5p que pueden ser empleados en la evaluación de ALF asociada a hepatitis B crónica. miRNA-27 es un potencial biomarcador diagnóstico de ALF asociada a NAFLD. miRNA-20a también es un interesante marcador diagnóstico a tener en cuenta. Cabe destacar la importancia como biomarcadores de ciertas proteínas, como ALB (albumin), CD63, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) o CD44, que se ven aumentadas.

4.6 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La enfermedad crónica del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se caracteriza por una excesiva acumulación de grasa en el hígado y resistencia a la insulina (1, 27, 28). Esta enfermedad empieza con esteatosis, progresa a esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y puede conducir a otras afecciones más graves como cirrosis o cáncer de hígado (20, 29).

Se ha visto que miRNA-192 puede ser un potencial biomarcador no invasivo asociado a la progresión de NAFLD, ya que sus niveles aumentan de manera significativa en los exosomas circulantes del suero en los pacientes con NAFLD avanzada. miRNA-122-5p, miRNA-27a, miRNA-199a-5p y miRNA-335-5p destacan ya que se cree que tienen una estrecha relación con la aparición del hígado graso, de manera que podrían ser detectores tempranos de la enfermedad. Concretamente, miRNA-199a-5p promueve acumulación de lípidos en el hígado y conduce a una inflamación crónica. Otros ácidos nucleicos, como miRNA-1297, miRNA-

1792 y miRNA-192-5p aceleran y agravan la progresión de la NAFLD, de manera que sería interesante estudiar su potencial como biomarcadores pronósticos.

Con respecto a las proteínas, las más interesantes a tener en cuenta como biomarcadores novedosos y eficaces para el diagnóstico y el pronóstico serían FZD7 (Frizzled Class Receptor 7) y MLK3 (mixed lineage kinase 3), cuyo nivel de expresión se ve altamente aumentado. Además, los exosomas enriquecidos con CD40L pueden actuar como biomarcadores del daño hepático por inflamación.

CONTENIDO EXOSOMAS HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLEÍCOS	Hepatocitos lipotóxicos	miR-1297 miR-1792	Aceleran progresión NAFLD.
		ADNmt miR-192-5p	Agravan la progresión de la NAFLD.
	Suero	miR-192 miR-30a miR-122-5p miR-27a-3p miR27b-3p miR-335-5p miR-34a miR-122 miR-199a-5p	Biomarcador potencial de patogénesis NAFLD.
	Células de Kupffer	miR-690	Reduce fibrosis y esteatosis.
PROTEÍNAS	Hepatocitos lipotóxicos	Proteína vascular no inflamatoria-1	Promueve angiogénesis.
		MLK3	Potencial biomarcador.
		TNF	Induce quimiotaxis de macrófagos y activación del fenotipo de la inflamación.
	Suero	FZD7 Ceramide SP1 CD40L	Potencial biomarcador para diagnóstico y pronóstico NAFLD.
REFERENCIAS: 1, 4, 5, 14, 16, 20, 24, 27, 29			

Tabla 10: Contenido de exosomas liberados por el hígado graso no alcohólico.

4.7 HÍGADO GRASO ALCOHÓLICO

La enfermedad del hígado graso alcohólico está relacionada con el consumo crónico de alcohol que se caracteriza por el daño hepático y la infiltración celular inflamatoria (20, 24). Esta enfermedad puede derivar en fibrosis o cirrosis hepática (1).

Dentro de los principales biomarcadores potenciales destacan principalmente ALT, miRNA-155, miRNA-122, miRNA-192 y miRNA-30a, ya que se ha demostrado que se encuentran elevados en exosomas séricos de ratones alimentados con elevados niveles de alcohol (24). Por tanto, estos compuestos pueden ser indicadores precoces del riesgo a desarrollar la enfermedad del hígado graso alcohólico. Otros ácidos nucleicos, como miRNA-19b pueden ser importantes tenerlos en cuenta para poder controlar si existe riesgo de que la enfermedad progrese a fibrosis hepática.

HIGADO GRASO ALCOHÓLICO			
TIPO	ORIGEN EXOSOMAS	CONTENIDO	FUNCIONES
ÁCIDOS NUCLEÍCOS	Hepatocitos	miRNA-192 miRNA-122 miRNA-30a miRNA-30b miR-130a miR-744 miR-1246 miR-309	Potenciales biomarcadores diagnóstico de ALD.
		pri-miR-1792 miR-19b miR-92	Marcador profibrótico.
	Suero	miR-155 miR-146a miR-125b	Promueve daño autofágico inducido por el alcohol
PROTEÍNAS	Hepatocitos	CCN2	Factor de crecimiento del tejido conectivo.
		CD40L	Promueve liberación factores proinflamatorios
		ITG β 1	Promueve inflamación y daño hepático.
	Suero	ALT	Aumento después de abuso de alcohol o consumo a largo plazo.
		CYP2E1	Estimula vía señalización de la apoptosis.
REFERENCIAS: 1, 4, 5, 20, 24, 34, 36			

Tabla 11: Contenido de exosomas liberados por hígado graso alcohólico.

4.8 TERAPIA

Actualmente se están investigando y desarrollando nuevos potenciales enfoques para el uso terapéutico de los exosomas para enfermedades hepáticas: 1) Entrega dirigida de medicamentos; 2) Regular la liberación de exosomas y estimular la eliminación de exosomas con moléculas dañinas; y 3) Controlar la progresión de una enfermedad mediante el uso de exosomas como biomarcadores moleculares (12, 23, 24).

Concretamente, el uso de los exosomas como medicamentos dirigidos está en el punto de mira de la investigación dado que son una gran esperanza para mejorar el diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades, como el cáncer de hígado en estado avanzado, que actualmente tienen pronósticos desfavorables.

Los exosomas presentan múltiples ventajas de gran utilidad para su empleo como medicamentos dirigidos. Comparados los exosomas con otros sistemas de administración de medicamentos, como los liposomas, son más estables, eficientes y seguros, además de que reducen la toxicidad y permiten la entrega dirigida a células diana. Además, son capaces de atravesar barreras biológicas, así como difundirse en el torrente sanguíneo y penetrar en los tejidos. También tienen buena biocompatibilidad y por ende una menor inmunogenicidad. Pero, pese al potencial de los exosomas, también presentan ciertas limitaciones que han complicado su aplicación clínica, como los bajos rendimientos y altos costos. El aislamiento de los exosomas, como ya se ha comentado anteriormente, sigue siendo un reto al no disponer de un método eficaz estandarizado. Otro problema es que la composición biológica propia de los exosomas limita la carga de medicamentos. Además, es difícil poder monitorizar la eficacia en la administración de medicamentos, así como es un desafío el control de calidad.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad. • Efectividad. • Seguridad. • Reducir la toxicidad. • Entrega dirigida. • Alta transmisibilidad. • Buena biocompatibilidad. • Baja inmunogenicidad. • Fácil accesibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo rendimiento. • Aislamiento no estandarizado. • Altos costos. • Limitación en la carga de medicamentos. • Difícil control de calidad. • Hacen falta más estudios. • Falta de conocimiento sobre propiedades y fisiopatología de los exosomas.
Referencias: 16, 29, 32, 37	

Tabla 12: Ventajas y desventajas del uso de exosomas como medicamentos dirigidos.

Es necesario continuar la investigación para poder abordar estos significativos desafíos que aún se interponen en el éxito de la aplicación clínica de los sistemas de administración de medicamentos basados en exosomas.

5. DISCUSIÓN

Como hemos visto, los ácidos nucleicos y las proteínas transportadas por los exosomas son potenciales biomarcadores para el diagnóstico temprano y tratamiento de diversas enfermedades hepáticas. Todavía hace falta resolver diversos desafíos pendientes, como los que se recogen en la tabla 13, para que el uso de los exosomas como biomarcadores, así como para el tratamiento de enfermedades se convierta en una realidad. Entre ellos hay que mencionar la ausencia de métodos de aislamiento y purificación estandarizados, así como los altos costos y la falta de conocimiento. Con respecto a las ventajas que presentan los exosomas, como ya hemos comentado, destacan que permiten un diagnóstico temprano y no invasivo, además de su potencial uso como medicamentos dirigidos y su baja inmunogenicidad.

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
DIAGNÓSTICO	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento no invasivo • Preciso • Permite el diagnóstico temprano. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca información. • Métodos de aislamiento y purificación todavía en desarrollo, aún no estandarizados. • Desconocimiento de todos los biomarcadores de cada enfermedad.
TRATAMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad. • Efectividad. • Seguridad. • Baja toxicidad. • Entrega dirigida de medicamentos. • Alta transmisibilidad. • Buena biocompatibilidad. • Baja inmunogenicidad. • Fácil accesibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo rendimiento. • Aislamiento no estandarizado. • Altos costos. • Limitación en la carga de medicamentos que pueden transportar. • Difícil control de calidad. • Necesidad de más estudios. • Falta de conocimiento.
Referencias: 2, 11, 14, 16, 24, 29, 32, 37		

Tabla 13: Ventajas y desventajas del uso de los exosomas en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hepática.

		ENFERMEDAD HEPÁTICA							
	Componentes	LF	HCC	DILI	VHB	VHC	ALF	NAFLD	TDA
		ÁCIDOS NUCLEICOS	miRNA-18a		✓		✓		
miRNA-19a	✓				✓	✓			
miRNA-21			✓			✓			
miRNA-30a								✓	✓
miRNA-101			✓		✓				
miRNA-103-3p	✓						✓		
miRNA-106			✓		✓				
miRNA-122	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
miRNA-125b				✓					✓
miRNA-146a			✓	✓					
miRNA-155	✓		✓	✓					✓
miRNA-192	✓			✓	✓	✓		✓	✓
miRNA-192-5p				✓				✓	
miRNA-195			✓		✓				
miRNA-214	✓					✓			
miRNA-221			✓		✓				
miRNA-222	✓		✓		✓				
miRNA-224			✓		✓				
miRNA-690					✓	✓		✓	
miRNA-1297	✓							✓	
miRNA-1792	✓						✓	✓	
lncRNA-H19	✓					✓			
PROTEÍNAS	Ago2				✓	✓			
	CD40L							✓	✓
	CD63				✓		✓		
	CD81	✓		✓	✓	✓			
	Citocromo P450	✓		✓					
	CNN2	✓							✓
	HIF1	✓	✓						
	HSP70			✓		✓			
HSP90				✓	✓				

Tabla 14: Proteínas y ácidos nucleicos transportados por los exosomas comunes en distintas enfermedades hepáticas.

En esta tabla se han recopilado aquellos componentes de los exosomas recogidos en las tablas 4-11 de los que hay evidencias de que aparecen en distintas enfermedades hepáticas. Por ejemplo, podemos observar dentro de los ácidos nucleicos como miRNA-122 se encuentra presente en los exosomas de todas las enfermedades hepáticas estudiadas en este trabajo, de manera que se posiciona como un potencial biomarcador, seguido por miRNA-155 y miRNA-192, que pese a no aparecer en todas las enfermedades sí son comunes en muchas. Dentro de las proteínas destaca principalmente la presencia de CD81.

Es necesario obtener más evidencias experimentales que apoyen una futura investigación clínica. Con una investigación más exhaustiva y tecnología mejorada los exosomas pueden convertirse en un futuro próximo en la opción terapéutica para tratar a los pacientes con enfermedades hepáticas.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden sacar acerca de este trabajo son las siguientes:

- Los exosomas pueden llevar a cabo una extensa gama de funciones fisiológicas, de entre las que destacan el intercambio de información y transferencia de material intercelular.
- Los mecanismos de comunicación de los exosomas tienen gran potencial como biomarcadores moleculares para el diagnóstico temprano no invasivo, pronóstico y tratamiento de las enfermedades hepáticas en la práctica clínica.
- El estudio de la relación entre el número, el tipo, el tamaño y el contenido de los exosomas puede reflejar la progresión subyacente de las enfermedades hepáticas crónicas.
- Es necesario el desarrollo de procesos estandarizados que permitan la caracterización y aislamiento de exosomas de alta pureza con el objetivo de estudiar de manera exhaustiva los genes y la función de las proteínas que transportan.
- Pese al potencial de los exosomas para ser usados como medicamentos dirigidos, presentan ciertas limitaciones que complican su aplicación clínica.

CONCLUSIONS:

The following conclusions could be drawn from the completion of this project:

- Exosomes can perform a wide range of physiological functions including information exchange and transfer of intercellular material.
- Exosome communication mechanisms have a great potential as molecular biomarkers for early non-invasive diagnosis, prognosis and treatment of liver diseases in clinical practice.
- The study of the relationship between the number, type, size and content of exosomes may reflect the underlying progression of chronic liver diseases.
- The development of standardized processes that allow the characterization and isolation of high purity exosomes is necessary in order to comprehensively study the genes and the function of the proteins they carry.
- Despite the potential of exosomes to be used as targeted drugs, they present certain limitations that complicate their clinical application.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Shen, M., Shen, Y., Fan, X., Men, R., Ye, T., & Yang, L. (2020). Roles of Macrophages and Exosomes in Liver Diseases. *Frontiers In Medicine*, 7.
- (2) Sato, K., Meng, F., Glaser, S., & Alpini, G. (2016). Exosomes in liver pathology. *Journal Of Hepatology*, 65(1), 213-221.
- (3) Zhou, H., Yan, Z., Yuan, Y., Xing, C., & Jiang, N. (2021b). The Role of Exosomes in Viral Hepatitis and Its Associated Liver Diseases. *Frontiers In Medicine*, 8.
- (4) Jiao, Y., Xu, P., Shi, H., Chen, D., & Shi, H. (2020). Advances on liver cell-derived exosomes in liver diseases. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 25(1), 15-26.
- (5) Yin, K., Li, M., Song, P., Duan, Y., Ye, W., Tang, W., Kokudo, N., Gao, Q., & Liao, R. (2023). Unraveling the Emerging Niche Role of Hepatic Stellate Cell-derived Exosomes in Liver Diseases. *Journal Of Clinical And Translational Hepatology*, 11(2), 441-451.
- (6) Amin, S., Massoumi, H., Tewari, D., Roy, A., Chaudhuri, M., Jazayerli, C., Krishan, A., Singh, M., Soleimani, M., Karaca, E. E., Mirzaei, A., Guaiquil, V. H., Rosenblatt, M. I., Djalilian, A. R., & Jalilian, E. (2024). Cell Type-Specific Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(5), 2730.
- (7) Mastoridou, E. M., Goussia, A. C., Glantzounis, G. K., Kanavaros, P., & Charchanti, A. V. (2022). Autophagy and Exosomes: Cross-Regulated Pathways Playing Major Roles in Hepatic Stellate Cells Activation and Liver Fibrosis. *Frontiers In Physiology*, 12.
- (8) Zhang, Q., Qu, Y., Zhang, Q., Li, F., Li, B., Li, Z., Dong, Y., Lu, L., & Cai, X. (2022). Exosomes derived from hepatitis B virus-infected hepatocytes promote liver fibrosis via miR-222/TFRC axis. *Cell Biology And Toxicology*, 39(2), 467-481.
- (9) Jiang, X., Wu, S., & Hu, C. (2023). A narrative review of the role of exosomes and caveolin-1 in liver diseases and cancer. *International Immunopharmacology*, 120, 110284.
- (10) Park, S. H., Lee, E. K., Yim, J., Lee, M. H., Lee, E., Lee, Y., & Seo, W. (2023). Exosomes: Nomenclature, Isolation, and Biological Roles in Liver Diseases. *Biomolecules & Therapeutics*, 31(3), 253-263.
- (11) Xie, D., Qian, B., & Li, X. (2022). Nucleic acids and proteins carried by exosomes from various sources: Potential role in liver diseases. *Frontiers In Physiology*, 13.
- (12) Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., & Larusso, N. F. (2013). Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *Journal Of Hepatology*, 59(3), 621-625.
- (13) Cai, S., Cheng, X., Pan, X., & Li, J. (2016). Emerging role of exosomes in liver physiology and pathology. *Hepatology Research*, 47(2), 194-203.
- (14) Sung, S., Kim, J., & Jung, Y. (2018). Liver-Derived Exosomes and Their Implications in Liver Pathobiology. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(12), 3715.
- (15) Motawi, T. K., Mohamed, M. R., Shahin, N. N., Ali, M. A., & Azzam, M. A. (2018). Time-course expression profile and diagnostic potential of a miRNA panel in exosomes and total serum in acute liver injury. *International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 100, 11-21.
- (16) Liu, Y., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, K., Wu, J., Gao, P., & Zhang, C. (2023). Exosomes in liver fibrosis: The role of modulating hepatic stellate cells and immune cells, and prospects for clinical applications. *Frontiers In Immunology*, 14.
- (17) Rios-Colon, L., Arthur, E., Niture, S., Qi, Q., Moore, J. T., & Kumar, D. (2020). The Role of Exosomes in the Crosstalk between Adipocytes and Liver Cancer Cells. *Cells*, 9(9), 1988.

- (18) Thacker, S. E., Nautiyal, M., Otieno, M. A., Watkins, P. B., & Mosedale, M. (2018). Optimized Methods to Explore the Mechanistic and Biomarker Potential of Hepatocyte-Derived Exosomes in Drug-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences*, *163*(1), 92-100.
- (19) Liu, J., Xiao, P., Jiang, W., Wang, Y., & Huang, Y. (2022). Diagnostic value of exosomes in patients with liver cancer: a systematic review. *Clinical & Translational Oncology*, *24*(12), 2285-2294.
- (20) Wang, C., Liu, J., Yan, Y., & Tan, Y. (2022). Role of Exosomes in Chronic Liver Disease Development and Their Potential Clinical Applications. *Journal Of Immunology Research*, *2022*, 1-15.
- (21) Wang, N., Li, X., Zhong, Z., Qiu, Y., Liu, S., Wu, H., Tang, X., Chen, C., Fu, Y., Chen, Q., Guo, T., Li, J., Zhang, S., Zern, M. A., Ma, K., Wang, B., Ou, Y., Gu, W., Cao, J., . . . Duan, Y. (2021). 3D hESC exosomes enriched with miR-6766-3p ameliorates liver fibrosis by attenuating activated stellate cells through targeting the TGF β RII-SMADS pathway. *Journal Of Nanobiotechnology*, *19*(1).
- (22) Shen, J., Cao, J., Chen, M., & Zhang, Y. (2023). Recent advances in the role of exosomes in liver fibrosis. *Journal Of Gastroenterology And Hepatology*, *38*(7), 1083-1088.
- (23) Mo, J., Da, X., Li, Q., Huang, J., Lu, L., & Lu, H. (2022). The Study of Exosomes-Encapsulated mPEG-PLGA Polymer Drug-Loaded Particles for Targeted Therapy of Liver Cancer. *Journal Of Oncology*, *2022*, 1-10.
- (24) Ding, J., Wang, J., & Chen, J. (2021). Exosomes as therapeutic vehicles in liver diseases. *Annals Of Translational Medicine*, *9*(8), 735.
- (25) Ouyang, Y., Tang, Y., Fu, L., Peng, S., Wu, W., Tan, D., & Fu, X. (2020). Exosomes secreted by chronic hepatitis B patients with PNALT and liver inflammation grade \geq A2 promoted the progression of liver cancer by transferring miR-25-3p to inhibit the co-expression of TCF21 and HHIP. *Cell Proliferation*, *53*(7).
- (26) Chen, J., Xu, Q., Zhang, Y., & Zhang, H. (2020). RNA Profiling Analysis of the Serum Exosomes Derived from Patients with Chronic Hepatitis and Acute-on-chronic Liver Failure Caused By HBV. *Scientific Reports*, *10*(1).
- (27) Zhang, J., & Pan, H. (2021). microRNA profiles of serum exosomes derived from children with nonalcoholic fatty liver. *Genes And Genomics/Genes & Genomics*, *44*(7), 879-888.
- (28) Scavo, M. P., Negro, R., Arrè, V., Depalo, N., Carrieri, L., Rizzi, F., Mastrogiacomo, R., Serino, G., Notarnicola, M., De Nunzio, V., Lippolis, T., Pesole, P. L., Coletta, S., Armentano, R., Curri, M. L., & Giannelli, G. (2023). The oleic/palmitic acid imbalance in exosomes isolated from NAFLD patients induces necroptosis of liver cells via the elongase-6/RIP-1 pathway. *Cell Death And Disease*, *14*(9).
- (29) Ding, J., Xu, C., Xu, M., He, X., Li, W., & He, F. (2023). Emerging role of engineered exosomes in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal Of Hepatology*, *15*(3), 386-392.
- (30) Fang, P., Pan, C., Lin, W., Li, J., Huang, S., Zhou, G., Du, W., & Li, Q. (2020). ASK1 Enhances Angiotensin II-Induced Liver Fibrosis In Vitro by Mediating Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Exosomes. *Mediators Of Inflammation*, *2020*, 1-17.
- (31) Fründt, T., Krause, L., Hussey, E., Steinbach, B., Köhler, D., Von Felden, J., Schulze, K., Lohse, A. W., Wege, H., & Schwarzenbach, H. (2021). Diagnostic and Prognostic Value of miR-16, miR-146a, miR-192 and miR-221 in Exosomes of Hepatocellular Carcinoma and Liver Cirrhosis Patients. *Cancers*, *13*(10), 2484.
- (32) Mohan, P. B., Rajpurohit, S., Musunuri, B., Bhat, G., Lochan, R., & Shetty, S. (2023). Exosomes in chronic liver disease. *Clinica Chimica Acta*, *540*, 117215.

- (33) Holman, N. S., Mosedale, M., Wolf, K. K., LeCluyse, E. L., & Watkins, P. B. (2016). Subtoxic Alterations in Hepatocyte-Derived Exosomes: An Early Step in Drug-Induced Liver Injury? *Toxicological Sciences*, *151*(2), 365-375.
- (34) Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K., & Szabo, G. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*, *56*(5), 1946-1957.
- (35) Yin, M., Ding, X., Yin, S., Wang, L., Zhang, K., Chen, Y., Liu, R., Zhu, C., & Li, W. (2023). Exosomes from hepatitis B virus-infected hepatocytes activate hepatic stellate cells and aggravate liver fibrosis through the miR-506-3p/Nur77 pathway. *Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology*, *37*(10).
- (36) Momen-Heravi, F., Bala, S., Kodys, K., & Szabo, G. (2015). Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Scientific Reports*, *5*(1).
- (37) Fooladi, A. A. I., & Hosseini, H. M. (2014). Biological Functions of Exosomes in the Liver in Health and Disease. *Hepatitis Monthly*, *14*(4).