

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Campus Monterrey

Escuela de Ingeniería y Ciencias



Nanovesículas similares a exosomas (NVEs) vegetales para mejorar la entrega dirigida de carotenoides

Tesis presentada por

Anahí Guadalupe Cisneros Pardo

sometida a la

Escuela de Ingeniería y Ciencias

como un requisito parcial para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

en

Biotecnología

Monterrey Nuevo León, 15 de Junio de 2022

## **Dedicatoria**

A mi esposo, Juan Ángel quien a lo largo de este camino siempre estuvo a mi lado animándome y apoyándome cuando más lo necesitaba, acompañándome en los días y las noches que hicieron falta para terminar este proyecto. Sé que juntos podemos cumplir muchas metas más.

## **Reconocimientos**

Quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que hicieron posible este proyecto, principalmente a mis excelentes asesores el Dr. José González Valdez y la Dra. Perla Ramos Parra quienes siempre estuvieron al pendiente a cualquier hora y en cada etapa, así como a la Dra. Marilena Antunes y el Dr. Alberto Mejía por ser parte del comité evaluador del este trabajo. Así mismo, agradezco a Raquel Acuña y Javier Donoso por sus consejos y ayuda. Un agradecimiento especial a Fanny de los Santos por contestar mis llamadas en domingo y tener un gran interés en este trabajo, sin tu guía las cosas no hubieran salido tan bien.

De igual manera expreso mi agradecimiento hacia el Tecnológico de Monterrey por la beca escolar otorgada para cursar este posgrado, al CONACyT por la beca de manutención, y a la empresa Industrial Orgánica S.A de C.V. por la donación del material usado en este trabajo. Cada persona e institución aquí mencionadas formaron la base en la que se construyó y se pudo llevar a cabo este proyecto por lo que estaré eternamente agradecida.

# Nanovesículas similares a exosomas (NVEs) vegetales para mejorar la entrega dirigida de carotenoides

por

Anahí Guadalupe Cisneros Pardo

## Resumen

Los carotenoides juegan un papel importante en la salud ocular al tener la capacidad de proteger a la retina de lesiones fotoquímicas. Sin embargo, existen diversos obstáculos para proveer un efecto terapéutico específico en el tejido, por lo que existe la necesidad de buscar nuevas alternativas que permitan incrementar su biodisponibilidad, como los son las nanovesículas extracelulares similares a exosomas (NVEs) de origen vegetal, las cuales desempeñan un papel importante en la comunicación celular. Con lo anterior, se generó la hipótesis de que la carga mediante electroporación de las NVEs derivadas de jugo y callo de zanahoria con carotenoides podría incrementar la eficiencia de suministro además de la biodisponibilidad de estos compuestos. La metodología desarrollada constó de tres fases principales: La primera, referente al establecimiento del material inicial para la obtención de las NVEs, seleccionándose jugo y callos de zanahoria. La segunda fase consistió en el aislamiento, purificación, caracterización y carga con carotenoides de las NVEs. Finalmente, la tercera fase tuvo como objetivo el ensayo de bioactividad de carotenoides en la línea celular ARPE-19 del epitelio pigmentario de la retina humana utilizando estas nanovesículas. Dentro de los principales resultados se obtuvieron NVEs aislados mediante ultracentrifugación de un tamaño entre 231 y 1631 nm, y una carga del potencial zeta negativo entre 1.26 y 11.13 mV. Se obtuvo el perfil de los carotenoides nativos en los NVEs de jugo de zanahoria en donde se encontraron hasta 12 carotenoides, siendo identificadas 3 xantófilas y 5 carotenos. Se evaluaron 4 métodos de carga distintos y se obtuvo como resultado que la electroporación (200 mV, 50  $\mu$ F) tuvo una mayor eficiencia de carga (80%) para zeaxantina. En el ensayo de

viabilidad celular para analizar el efecto antioxidante de los carotenoides, se obtuvo que las NVEs derivadas de callo cargadas con xantófilas presentan una mayor protección (< 95%) contra agentes oxidantes en comparación con las NVEs derivadas de jugo cargadas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son considerados de alto impacto debido al creciente interés en encontrar nuevas formas de administración de biocompuestos que tengan propiedades terapéuticas, que puedan potencialmente producirse a gran escala y que sean provenientes de una fuente segura para el consumo humano, de modo que los productos a base de zanahoria, como los NVEs, podrían ser considerados como una atractiva posibilidad para dichas necesidades.

### **Palabras Clave**

Nanovesículas extracelulares, Zanahoria, Carotenoides, Xantófilas, Degeneración macular relacionada con la edad (DMRE).

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de los carotenos más abundantes en la naturaleza.....	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura de las xantófilas luteína y zeaxantina.....	<b>27</b>
<b>Figura 3.</b> Descripción gráfica de las tres principales etapas de experimentación.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b> Identificación y caracterización de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo de zanahoria.....	<b>37</b>
<b>Figura 5.</b> Identificación y caracterización de nano vesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de callo de zanahoria.....	<b>38</b>
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD del perfil de carotenoides de las nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo de zanahoria .....	<b>41</b>
<b>Figura 7.</b> Eficiencia de carga de xantófilas zeaxantina y luteína (85:15) en nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivados de jugo y callo de zanahoria mediante electroporación a 200 mV y 50 $\mu$ F.....	<b>43</b>
<b>Figura 8.</b> Ensayo de bioactividad de las diferentes formulaciones de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) de jugo y callo de zanahoria a las 24 h de coincubación con la línea celular ARPE-19 y el agente oxidante ( $H_2O_2$ ).....	<b>46</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivados de plantas, aplicaciones potenciales y patologías involucradas.....	<b>22</b>
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las técnicas de aislamiento y purificación de las nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivados de plantas reportadas recientemente.....	<b>25</b>
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de voltaje y capacidad para cada método de carga de las nanovesículas similares a exosomas (NVEs) mediante electroporación.....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> Gradiente no lineal de las fases A y B utilizado en HPLC-DAD.....	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos evaluados en el ensayo de viabilidad celular.....	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> Caracterización cromatográfica y espectroscópicas de los carotenoides de las nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo de zanahoria.....	<b>40</b>
<b>Tabla 7.</b> Eficiencia de carga de las xantofilas zeaxantina y luteína (85:15) en nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivados jugo de zanahoria mediante distintos métodos de carga.....	<b>42</b>

## Tabla de Contenido

Resumen.....	6
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tablas.....	9
1. Introducción.....	12
1.1 Definición del problema y contexto.....	15
1.2 Hipótesis y Preguntas de investigación.....	17
1.3 Objetivos y Estrategia de solución.....	18
1.4 Estructura de la Tesis.....	19
2. Marco Teórico.....	20
2.1 Aplicaciones de NVEs derivadas de plantas.....	20
2.2 Técnicas de aislamiento y purificación NVEs provenientes de plantas.....	24
2.3 Rol de las xantófilas en la salud.....	27
2.4 Biodisponibilidad de los carotenoides.....	28
3. Metodología.....	30
3.1 Aislamiento y purificación de NVEs de jugo de zanahoria.....	31
3.2 Establecimiento del cultivo celular de callo de zanahoria.....	31
3.3 Aislamiento y purificación de las NVEs de callo de zanahoria.....	32
3.4 Caracterización de las NVEs.....	32
3.5 Análisis tamaño de partícula y carga superficial.....	33
3.6 Carga de las NVEs y análisis de la eficiencia de carga obtenida.....	33
3.7 Caracterización de Carotenoides.....	33
3.8 Determinación de viabilidad celular.....	35
3.8 Análisis Estadístico.....	36
4. Resultados y discusión.....	37
4.1 Caracterización de las NVEs.....	37
4.2 Evaluación del perfil de carotenoides en NVEs.....	39
4.3 Evaluación de la eficiencia de carga de carotenoides en NVEs.....	42
4.4 Análisis del efecto antioxidante de las NVEs en células oculares ARPE-19.....	44
5. Conclusiones y Perspectivas.....	48
Bibliografía.....	51
Anexos.....	59
Anexo A. Abreviaciones.....	59



Anexo B. Espectros de los carotenoides obtenidos del extracto de las NVEs derivadas de jugo de zanahoria .....	60
Vita .....	62

# Nanovesículas similares a exosomas (NVEs) vegetales para mejorar la entrega dirigida de carotenoides

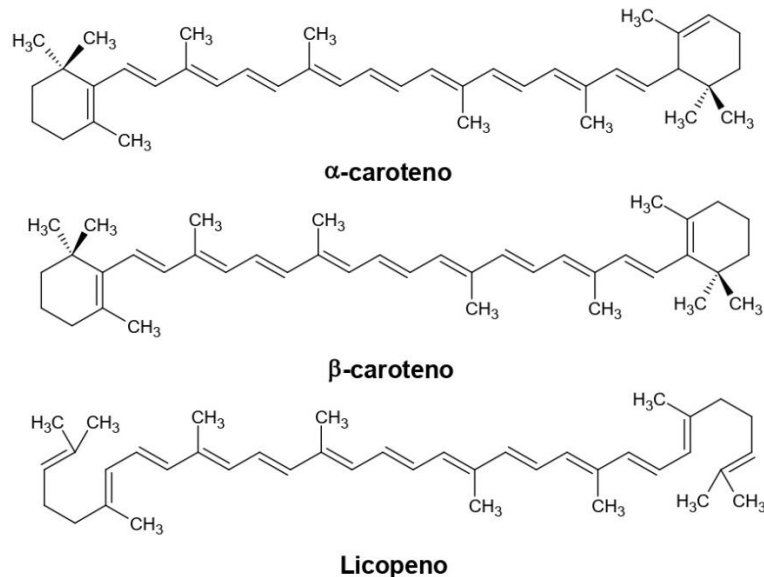
## 1. Introducción

Los carotenoides son compuestos liposolubles que se encuentran de forma natural en algas, bacterias, hongos y plantas y son los pigmentos responsables de los colores amarillo, naranja, rojo y púrpura brillantes encontrados en ellos. Estas moléculas forman parte de la familia de los tetraterpenoides, es decir que contienen 40 átomos de carbono. La mayoría de los carotenoides se construyen a partir de ocho unidades de isopreno (Maoka, 2020), los enlaces C=C conjugados en muchos de estos compuestos les confieren la capacidad de interactuar con radicales libres y el oxígeno reactivo y, por lo tanto, actúan como antioxidantes efectivos (Young & Lowe, 2018). No obstante, debido a que los humanos no pueden sintetizar carotenoides de manera natural, es importante consumir frutas y verduras con un alto nivel de estos fitoquímicos para mantener un buen estado de salud (Eggersdorfer & Wyss, 2018).

En este contexto, la actividad antioxidante se ha descrito como una de las propiedades funcionales más importantes de los carotenoides, debido a que los radicales libres provocan cambios en las células que producen estrés oxidativo que ha sido relacionado con algunos tipos de cáncer, afecciones inflamatorias, aterosclerosis y la pérdida de la visión, entre otros padecimientos (Lobo *et al.*, 2010). Al día de hoy, se conocen más de 1,100 carotenoides (Yabuzaki, 2017) con actividades específicas que tienen un gran impacto dentro de la industria médica, farmacéutica y alimentaria. Sin embargo, solo algunos se producen sintéticamente a escala industrial.

Los carotenoides se dividen en dos grupos: carotenos, hidrocarburos los cuales no contienen oxígeno; y xantofilas, que contienen átomos de oxígeno en grupos funcionales hidroxilo, carbonilo y carboxílico (Maoka, 2020). Los carotenos más comunes son el  $\alpha$ -caroteno, el  $\beta$ -caroteno y el licopeno (**Figura 1**). Los dos primeros son precursores de la vitamina A que se encuentra con frecuencia en las frutas y verduras amarillas y anaranjadas, mientras que el licopeno se puede encontrar en frutos como el tomate y confiere adicionalmente algunos beneficios cardiovasculares (Mozos *et al.*, 2018). Por otro lado, en los últimos años se han reportado alrededor de 800 nuevas xantófilas y se

sabe que juegan diversos roles biológicos. Por ejemplo, la  $\beta$ -criptoxantina, que junto con algunos carotenos es un precursor de la vitamina A, tiene también un efecto anabólico sobre el metabolismo óseo, estimulando la formación de hueso osteoblástico e inhibiendo la reabsorción ósea osteoclástica (Yamaguchi, 2012). También la luteína y la zeaxantina son pigmentos que forman parte de la región central de la retina llamada mácula y pueden prevenir algunas enfermedades oculares (Arunkumar *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Estructura de los carotenos más abundantes en la naturaleza

Una de estas enfermedades oculares es conocida como Degeneración Macular Relacionada con la Edad (DMRE), actualmente es la responsable de la pérdida de vista total del 8.7% de la población mundial y se proyecta que esta cifra aumente casi al doble para el 2040 (Wong *et al.*, 2020). La DMRE afecta la porción de la retina responsable de la agudeza visual de alta resolución que permite a una persona ver detalles finos, leer, conducir y reconocer rostros. Uno de sus primeros síntomas es la aparición de drusas, que son pequeños depósitos de material extracelular, que se localizan entre las células pigmentarias de la retina y la zona interna de la membrana de Bruch y se presentan como lesiones pálidas y amarillentas (Lim & Guymer, 2007).

Esta enfermedad se clasifica en dos tipos, no vascular y neovascular. La primera se caracteriza por tener drusas que generan grandes áreas de atrofia retinaria que se extiende al centro de la macula y la segunda es caracterizada por el desarrollo de

neovascularización coroidea, lo que puede provocar hemorragias sub-retinianas y desprendimiento del epitelio pigmentario, entre otros efectos (Lim & Guymer, 2007).

Dentro del cuerpo humano, los pigmentos maculares, luteína, zeaxantina y *meso*-zeaxantina, se encuentran acumulados en el ojo, específicamente en la fovea, que es el centro del campo visual en donde se reciben los rayos de luz. Ahí, estos pigmentos tienen la capacidad de absorber la luz de alta energía y longitud de onda corta en forma de luz azul, protegiendo a la retina de lesiones fotoquímicas y actuando como antioxidantes que neutralizan el oxígeno reactivo y las especies reactivas del oxígeno (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Por ello, se ha demostrado que la suplementación de estos carotenoides podría ayudar a prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades retinarias como la DMRE (Sauer *et al.*, 2019).

Los exosomas, pertenecientes a las familias de vesículas extracelulares (VE), son partículas esféricas de tamaño nanométrico formadas por una membrana con bicapa lipídica y que juegan un papel importante en la comunicación celular. (Akuma *et al.*, 2019). Específicamente en plantas, los orígenes potenciales de la producción de VEs son los cuerpos multivesiculares (MVB), los organelos positivos para exoquistes, vacuolas y autofagosomas. Las VEs derivados de plantas funcionan principalmente como transporte intracelular de materiales que promueven el crecimiento y el desarrollo, la respuesta de defensa y la simbiosis planta-microbio.(Cui *et al.*, 2020). Las nanovesículas extraídas de plantas que existen incluyen una amplia gama de estructuras unidas a la membrana, incluidas las vesículas extracelulares e intracelulares naturales, que se encuentran en las plantas y liposomas sintéticos o nanovectores derivados de moléculas derivadas de plantas. Las nanovesículas derivadas de plantas, por otro lado, son de particular interés debido a su posible utilidad como acarreadores naturales de diferentes compuestos. En términos estructurales, contienen antioxidantes, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos secundarios; además cuentan con una membrana enriquecida con lípidos que incluye una variedad de antioxidantes biodisponibles, lo que los convierte en una alternativa viable para el transporte de antioxidantes sintéticos. Además, debido a que son aislados de alimentos que forman parte de la ingesta diaria, las nanovesículas derivadas de plantas tienen un alto nivel de biocompatibilidad y potencial para la síntesis a gran escala. (Logozzi *et al.*, 2022).

En este trabajo se propone un sistema de entrega novedoso que utiliza nanovesículas extracelulares similares a exosomas (NVEs) derivadas de plantas a partir de jugo y callos de zanahoria para la entrega de las xantófilas zeaxantina y luteína a células oculares, con el fin de proteger los compuestos para su entrega. En comparación con otras estructuras de entrega sintetizadas artificialmente, las NVEs provenientes de plantas pueden evolucionar para convertirse en un portador natural de fármacos específicos, protegiendo sustancias recubiertas para dirigirse a células y/o tejidos específicos (Akuma *et al.*, 2019).

## 1.1 Definición del problema y contexto

Actualmente existe una gran cantidad de evidencia científica que sustenta los efectos terapéuticos que tienen los carotenoides obtenidos a través de la dieta sobre la salud humana. No obstante, un tema importante a considerar es la biodisponibilidad final de estos compuestos, ya que, al provenir de los alimentos ingeridos, los compuestos pueden estar expuestos a procesos de cocción a altas temperaturas que disminuyen su concentración en las preparaciones, en donde la biodisponibilidad dependiendo del tipo de cocción del alimento varía entre 4 y 25%, mientras que en alimentos crudos se tiene reportada una biodisponibilidad de hasta 52% (Reif *et al.*, 2014). Adicionalmente, una vez ingeridos los carotenoides tienen que pasar a través de las diferentes etapas del proceso digestivo en donde también sufren degradaciones importantes.

Tras la ingesta, los carotenoides forman micelas lipídicas que pueden ser absorbidas por los enterocitos del intestino a través de proteínas de membrana. Una vez en los enterocitos, los carotenoides ingresan al sistema linfático para ser entregados al hígado, pero algunos carotenoides pueden ser absorbidos por los tejidos periféricos. Los carotenoides que lograron llegar al hígado luego se empaquetan en lipoproteínas para viajar a través del torrente sanguíneo. En este proceso circulatorio, las xantófilas se transportan principalmente en el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Moran *et al.*, 2018).

Adicionalmente, entre los obstáculos que tienen que atravesar estas moléculas bioactivas está la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE está formada por el endotelio y los vasos sanguíneos y regula la entrada de sustancias al cerebro, permitiendo el

ingreso de moléculas necesarias para la vida como el agua, oxígeno y dióxido de carbono e impidiendo el paso de bacterias y sustancias nocivas. Esta barrera es la que dificulta la llegada de fármacos al cerebro. Las técnicas más utilizadas para penetrar esta barrera son el uso de agentes biológicamente activos como los neuro receptores, pero se siguen investigando nuevos sistemas de nanoadministración para la suplementación dirigida de fármacos (Schroeder, 1998).

En el ojo, existe una barrera similar a la BHE denominada barrera hematorretiniana (BHR), que está formada por el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la membrana de Bruch, en donde uniones estrechas entre las células epiteliales y el endotelio vascular proporciona un control estricto sobre la entrada y salida de sustancias para mantener la integridad de la retina (Cunha-Vaz *et al.*, 2011) (Rome, 2019). Por lo tanto, al comprender los factores que afectan la permeabilidad de dicha barrera, se pueden desarrollar métodos de administración específicos que sean capaces de cruzar esta barrera de manera eficiente para tener un aumento en la actividad de moléculas como los carotenoides, los cuales tienen que superar varios obstáculos fisiológicos para tener un efecto terapéutico en tejidos específicos.

Por consiguiente, las NVEs derivados de plantas pueden ser un sistema de administración novedoso, natural y seguro, que potencialmente puede aumentar la biodisponibilidad de estos compuestos en tejidos específicos al aprovechar las características estructurales de su membrana. Estas, en primera instancia facilitarían la entrada en células de mamíferos, sin los problemas que se pudieran generar al usar VEs de origen humano, que al ser uno de los procesos de barrido de nuestro cuerpo, con frecuencia transportan elementos potencialmente dañinos, como sustancias químicas derivadas de tumores, ácidos nucleicos extraños y agentes transmisibles. Adicionalmente, las NVEs comparten características similares con otras vesículas como tamaño, carga y contenido de lípidos, dando resultado funciones comparables entre ellas, incluida la de un sistema de administración natural entre especies (Logozzi *et al.*, 2022).

## 1.2 Hipótesis y Preguntas de investigación

La hipótesis por probar en este trabajo es:

“La entrega *in vitro* de carotenoides a través de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo y callos de zanahoria en una línea celular ocular presenta una mayor biodisponibilidad y mejora en la función que la entrega de los mismos compuestos sin acarreador”.

Por lo tanto, las preguntas de investigación que pretenden responderse con este trabajo son las siguientes:

- ¿Cuáles son las condiciones de cultivo (fitohormonas, composición de medio, entre otros) que generarán un callo a partir de hojas y raíces de plantas de zanahoria?
- ¿Presentarán las NVEs aisladas de jugo y callo de zanahoria una morfología, tamaño y carga superficial similar a otras NVEs reportadas?
- ¿Qué técnica de carga (difusión pasiva o electroporación) presenta los rendimientos más altos en el atrapamiento de carotenoides en las NVEs?
- ¿Qué parámetros de carga mediante electroporación resultan en una mayor eficiencia de carga?
- ¿Cuáles son las características morfológicas más importantes de las NVEs como sistema de entrega para los tejidos oculares?
- ¿Existe diferencia entre los perfiles de carotenoides de las NVEs en función de su origen (jugo o callo)?
- ¿Tienen los carotenoides y xantófilas entregadas por las NVEs una mayor protección antioxidante en la línea celular ARPE-19 que los entregados sin acarreador?

### 1.3 Objetivos y Estrategia de solución

El objetivo general de este trabajo es comparar la entrega de carotenoides a través de NVEs derivadas de plantas contra su entrega convencional a una línea celular ocular. Como se ha mencionado, los carotenoides son moléculas lipofílicas que necesitan cruzar varios obstáculos como la barrera hematoencefálica y el epitelio pigmentario de la retina para tener actividad en este tejido específico y todo ello puede disminuir su biodisponibilidad final.

Los objetivos particulares por alcanzar en la realización de este trabajo de investigación son:

- Caracterizar el procedimiento de extracción de NVEs a partir de jugo de zanahoria.
- Establecer un cultivo de callos de zanahoria para aislar NVEs derivadas de plantas.
- Caracterizar las NVEs de jugo y callo de zanahoria en cuestión de morfología, tamaño y carga superficial.
- Cargar mediante electroporación las NVEs derivadas de jugo con las xantófilas luteína y zeaxantina, moléculas de la familia de los carotenoides que juegan un papel importante en la salud ocular, para después extrapolar esos procedimientos en la carga de NVEs provenientes de callos.
- Realizar la caracterización de carotenoides nativos y cargados con xantófilas de NVEs mediante HPLC-DAD.
- Probar la actividad biológica *in vitro* de las NVEs en una línea celular ocular.



## **1.4 Estructura de la Tesis**

El presente documento está organizado de la siguiente manera. En el Capítulo 1, se plantea el problema de investigación y se formula la hipótesis principal de este trabajo y las preguntas de investigación que se pretenden responder con este proyecto además de exponer los objetivos. Posteriormente, en el Capítulo 2 se establecerán las bases teóricas sobre las que se sustenta este proyecto. A continuación, en Capítulo 3 se detallan los procedimientos experimentales que se siguieron para cumplir con los objetivos. En el Capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos y discusión de los mismos a lo largo del proceso experimental. Finalmente, en el Capítulo 5, se describen las conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros.

## 2. Marco Teórico

Este capítulo explorará el estado del arte y se divide en tres temas principales. En primer lugar, se describen las aplicaciones de los nanovesículas extracelulares derivadas de plantas. Así mismo, se describen brevemente las técnicas más utilizadas para su aislamiento. Finalmente se aborda el papel de las xantófilas en la salud humana.

### 2.1 Aplicaciones de NVEs derivadas de plantas

El tema de las nanovesículas naturales es actualmente muy popular sobre todo de aquellas provenientes de tejidos y fluidos de mamíferos comúnmente llamados exosomas. Sin embargo, el interés sobre la caracterización y aplicaciones de nanovesículas de origen vegetal ha ido en aumento en los últimos cinco años principalmente de aquellas que se obtienen del jugo de frutas y otros vegetales. En la **Tabla 1**, se muestran las principales frutas y vegetales de las que se han aislado NVEs y se enlistan también los principales efectos terapéuticos y las enfermedades en las que se han estudiado.

Principalmente se han aislado nanovesículas del género *citrus*, en donde la toronja y el limón han sido de mayor interés. De igual forma, gran parte de los esfuerzos en el tema de nanovesículas vegetales ha sido para elucidar los micro-ARNs (Xiao *et al.*, 2018) y proteínas que contienen nativamente. De hecho, al compararlas con el proteoma de exosomas de mamíferos se descubrió que existe una gran similitud entre ambas por lo que realizar la caracterización de las proteínas endógenas puede ser una gran herramienta para la caracterización de nanovesículas independientemente de su origen (Rome, 2019).

Una de las características más importantes de las NVEs derivadas de plantas es su habilidad para transportar y proteger agentes con propiedades terapéuticas. Se cree que la metilación de los micro-ARNs en plantas juega un papel importante para aumentar su estabilidad en entornos hostiles (Perut *et al.*, 2021). Así mismo, mediante análisis genómicos se puede lograr predecir relaciones entre los micro-ARNs derivados de plantas y los posibles genes a los que van dirigidos en mamíferos. En donde los principales hallazgos sugieren que las NVEs de plantas están involucrados en la

respuesta inmune mediante efectos antiinflamatorios y que también pueden tener un papel importante en vías relacionadas con el cáncer (Xiao *et al.*, 2018), lo que abre camino a la posibilidad de encontrar nuevas terapias anticancerígenas en tejidos específicos.

Si bien la capacidad de cargar las nanovesículas con agentes terapéuticos poco solubles o que son fácilmente degradables no ha sido ampliamente explotada, algunos ejemplos encontrados sobre la encapsulación de compuestos se centra sobre todo en agentes utilizados en tratamientos de cáncer como el 5-fluoracilo (Yang *et al.*, 2021) y la doxorubicina (You *et al.*, 2021), los cuales tienen un peso molecular de 130 y 523 g/mol respectivamente, lo que indica que las NVEs son capaces de encapsular moléculas de gran tamaño. Se tienen registros de que estas vesículas ayudan a mejorar la biodisponibilidad y absorción celular ya que pueden unirse a agentes hidrófobos logrando que puedan cruzar las barreras fisiológicas en los mamíferos sin la desventaja de inducir respuesta inflamatoria o necrosis (Garaeva *et al.*, 2021).

Hablando específicamente sobre las NVEs derivadas de zanahoria, Mu *et al.* (2014) han demostrado que estas vesículas funcionan como medio de comunicación con células intestinales en mamíferos, particularmente con macrófagos intestinales y células madre. También sugieren que hay diferencia entre la polaridad de los perfiles de migración de lípidos de nanovesículas derivadas de frutas y de raíces como lo es la zanahoria.

Adicionalmente, se ha demostrado que las NVEs derivadas de zanahoria logran inducir moléculas inmunosupresoras como la citocina IL-10, la cual es conocida por sus propiedades antiinflamatorias y que son capaces de inducir la translocación nuclear de Nrf2 en macrófagos RAW 264.7 (Mu *et al.*, 2014) y en células cardiomioblásticas H9C2. Esto sirve de evidencia sobre la capacidad de suprimir la apoptosis causada por estrés oxidativo al inhibir de manera eficiente la disminución de las proteínas antioxidantes (Kim & Rhee, 2021).

**Tabla 1.** Nanovesículas similares a exosomas (NVE) derivados de plantas, aplicaciones potenciales y patologías involucradas.

<b>Frutas</b>				
<b>Fuente</b>	<b>Carga de agente terapéutico</b>	<b>Aplicación Potencial</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Referencia</b>
Clementina ( <i>Citrus clementina</i> )	-	Transporte y translocación de sustancias	-	(Stanly <i>et al.</i> , 2019)
Coco ( <i>Cocos nucifera</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	-	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Fresa ( <i>Fragaria ananassa</i> )	-	Efecto antioxidante	-	(Perut <i>et al.</i> , 2021)
Kiwi ( <i>Actinidia chinensis</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	-	(Xiao <i>et al.</i> , 2018) (Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Limón ( <i>Citrus limon</i> )	-	Efecto apoptótico	Cáncer gástrico	(Yang <i>et al.</i> , 2020) (Pocsfalvi <i>et al.</i> , 2018)
Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	-	-	-	(Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Manzana ( <i>Malus domestica</i> )	-	Transporte moléculas	Cáncer colorrectal	(Fujita <i>et al.</i> , 2018)
Melón amargo ( <i>Momordica charantia</i> )	5-fluorouracilo	Transporte de sustancias e inhibió de la proliferación de células tumorales	Carcinoma y glioma	(Yang <i>et al.</i> , 2021) (Wang <i>et al.</i> , 2022)
Melón Hami ( <i>Cucumis melo var</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	Cáncer	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Moras azules ( <i>Vaccinium Spp</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	Cáncer	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Naranja ( <i>Citrus reticulata</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	Cáncer	(Xiao <i>et al.</i> , 2018), (Pocsfalvi <i>et al.</i> , 2018), (Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Papaya ( <i>Carica papaya</i> )	-	-	-	(Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Pera ( <i>Pyrus spp</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	Cáncer	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	Cáncer	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Toronja ( <i>Citrus x paradisi</i> )	Proteína recombinante HSP70 y BSA	Transporte de sustancias, efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	Cáncer de colon y SARS-CoV-2	(Garaeva <i>et al.</i> , 2021) (Pocsfalvi <i>et al.</i> , 2018) (Kalarikkal <i>et al.</i> , 2021) (Xiao <i>et al.</i> , 2018)

**Continuación Tabla 1.** Nanovesículas similares a exosomas (NVE) derivados de plantas, aplicaciones potenciales y patologías involucradas.

<b>Verduras</b>				
<b>Fuente</b>	<b>Carga de agente terapéutico</b>	<b>Aplicación Potencial</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Referencia</b>
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	-	Efecto apoptótico	Cáncer de riñón y pulmón	(Özkan <i>et al.</i> , 2021)
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	-	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Ginseng ( <i>Panax ginseng</i> )	-	Efecto apoptótico	Melanoma	(Cao <i>et al.</i> , 2019)
Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	-	Transporte sustancias, efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	SARS-CoV-2	(Kalarikkal & Sundaram, 2021) (Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Jengibre negro ( <i>Kaempferia parviflora</i> )	-	Efecto antiinflamatorio e inhibición del crecimiento de <i>H. pylori</i>	Cáncer gástrico	(Nemidkanam & Chaichanawongsaroj, 2022)
Repollo rojo y verde ( <i>Brassica oleracea</i> )	miR-184 y doxorubicina	Efecto antiinflamatorio, inhibición de apoptosis y transporte de sustancias	Células humanas	(You <i>et al.</i> , 2021)
Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )	-	Efecto antioxidante y efecto antiinflamatorio	Infarto y Parkinson	(Kim & Rhee, 2021) (Mu <i>et al.</i> , 2014)
<b>Otras Plantas</b>				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-	-	(Y. Liu <i>et al.</i> , 2020)
<i>Brassicaceae</i>	-	-	-	(Y. Liu <i>et al.</i> , 2020)
<i>Dendropanax morbifera</i>	-	Efecto anti-melanogénico	Melanoma	(Lee <i>et al.</i> , 2020)
Soya ( <i>Glycine max</i> )	-	Efecto antiinflamatorio y vías relacionadas con cáncer	-	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)

## 2.2 Técnicas de aislamiento y purificación NVEs provenientes de plantas

Los primeros pasos que determinaran la cantidad y calidad de las nanovesículas son su aislamiento y purificación. En la **Tabla 2**, se presentan las diversas técnicas de aislamiento y purificación reportadas para cada tipo de planta. Existen diversos métodos para el aislamiento. Sin embargo, la ultracentrifugación es el método estandarizado más utilizado, ya que, al lograr llegar hasta fuerzas de  $1,000,000 \times g$  puede ser usada para separar diferentes nanopartículas. Así mismo, cuando las diferencias entre las nanovesículas y los contaminantes son pequeñas, es de gran utilidad usar gradientes de sacarosa, iodixanol, sorbitol o cloruro de cesio para aumentar la eficiencia de separación (Zhou *et al.*, 2020).

La ultrafiltración también es ampliamente utilizada con estos fines, y se basa en el principio de diferencia de tamaño, por lo que las nanovesículas pueden aislarse utilizando filtros de presión y membrana con límites de exclusión de tamaño o peso molecular definidos (Quintana *et al.*, 2015). Si bien la ultrafiltración es más rápida que la ultracentrifugación y se ha presentado como una alternativa para el aislamiento de nanovesículas naturales a mayor escala y que además presenta mayores rendimientos y niveles de pureza (Akuma *et al.*, 2019), el uso de presión podría deformar y romper vesículas que se encuentran en la mezcla, lo que puede generar otro tipo de contaminación y ruido en las muestras (Li *et al.*, 2017). Alternativamente a estos dos métodos, Kalarikkal *et al.* (2020) han desarrollado un método de purificación basado en usar diferentes concentraciones de polietilenglicol con peso molecular de 6000 g/mol (PEG 6000), eliminando la necesidad de usar un paso extra de purificación, y se reporta que se logró recuperar entre el 60 % y el 90 % de las vesículas, las cuales además exhiben características biofísicas y bioquímicas similares a los aislados mediante ultracentrifugación.

Otra de las técnicas empleadas con fines de purificación es la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) en donde las moléculas más pequeñas como ácidos nucleicos y proteínas son retenidas en la resina, mientras que las partículas más grandes viajan más rápido y pueden ser recuperadas en el flujo.

**Tabla 2.** Resumen de las técnicas de aislamiento y purificación de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de plantas reportadas recientemente.

**Frutas**

<b>Fuente</b>	<b>Método de aislamiento</b>	<b>Método de purificación</b>	<b>Referencia</b>
Clementina ( <i>Citrus clementina</i> )	Ultracentrifugación	Gradiente de sacarosa	(Stanly <i>et al.</i> , 2019)
Coco ( <i>Cocos nucifera</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Fresa ( <i>Fragaria ananassa</i> )	Centrifugación diferencial	Filtración	(Perut <i>et al.</i> , 2021)
Kiwi ( <i>Actinidia chinensis</i> )	Centrifugación diferencial	Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018), (Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Limón ( <i>Citrus x limon</i> )	Ultracentrifugación y Centrifugación diferencial	Ultracentrifugación, Diálisis y Electroforesis	(Yang <i>et al.</i> , 2020), (Pocsfalvi <i>et al.</i> , 2018), (Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	Centrifugación diferencial	Ultracentrifugación	(Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Manzana ( <i>Malus domestica</i> )		Ultracentrifugación	(Fujita <i>et al.</i> , 2018)
Melón amargo ( <i>Momordica charantia</i> )	Ultracentrifugación	Gradiente de sacarosa	(Yang <i>et al.</i> , 2021), (Wang <i>et al.</i> , 2022)
Melón Hami ( <i>Cucumis melo var</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Moras azúles ( <i>Vaccinium Spp</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Naranja ( <i>Citrus reticulata</i> )	Ultracentrifugación y Centrifugación diferencial	Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018), (Pocsfalvi <i>et al.</i> , 2018), (Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Papaya ( <i>Carica papaya</i> )	Centrifugación diferencial	Ultracentrifugación	(Logozzi <i>et al.</i> , 2021)
Pera ( <i>Pyrus spp</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)

**Continuación Tabla 2.** Resumen de las técnicas de aislamiento y purificación de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de plantas reportadas recientemente.

Toronja ( <i>Citrus x paradisi</i> )	Centrifugación diferencial, Ultracentrifugación, Precipitación a base de polietilenglicol (PEG)		(Garaeva <i>et al.</i> , 2021), (Pocsfalvi <i>et al.</i> , 2018), (Kalarikkal <i>et al.</i> , 2021), (Xiao <i>et al.</i> , 2018)
<b>Verduras</b>			
Fuente	Método de aislamiento	Método de purificación	Referencia
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	Sistema de dos fases	Filtración	(Özkan <i>et al.</i> , 2021)
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Ginseng ( <i>Panax ginseng</i> )		Ultracentrifugación	(Cao <i>et al.</i> , 2019)
Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )		Precipitación a base de polietilenglicol (PEG)	(Kalarikkal & Sundaram, 2021) (Xiao <i>et al.</i> , 2018)
Jengibre negro ( <i>Kaempferia parviflor</i> )	Ultracentrifugación	Gradiente de sacarosa	(Nemidkanam & Chaichanawongsaroj, 2022)
Repollo rojo y verde ( <i>Brassica oleracea</i> )	Cromatografía de exclusión de tamaño	Ultrafiltración	(You <i>et al.</i> , 2021)
Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )	Ultracentrifugación y Cromatografía de exclusión de tamaño	Gradiente de sacarosa y Cromatografía de exclusión de tamaño	(Kim & Rhee, 2021) (Mu <i>et al.</i> , 2014)
<b>Otras Plantas</b>			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ultracentrifugación	Gradiente de sacarosa	(Y. Liu <i>et al.</i> , 2020)
<i>Brassicaceae</i>	Ultracentrifugación	Gradiente de sacarosa	(Y. Liu <i>et al.</i> , 2020)
<i>Dendropanax morbifera</i>	Centrifugación diferencial	Filtración	(Lee <i>et al.</i> , 2020)
Soya ( <i>Glycine max</i> )		Ultracentrifugación	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)





Estas xantofilas cuentan con otros efectos en la salud humana, en un estudio donde se compara la ingesta de luteína y zeaxantina en un grupo de personas de más de 60 años, se obtuvo como resultado que cuando la ingesta de estos dos compuestos era mayor el rendimiento cognitivo en los campos de la memoria, lenguaje y función ejecutiva aumentaba también. Este efecto se puede deber principalmente a que la luteína y zeaxantina son acumuladas en las membranas de los tejidos cerebrales asumiendo un efecto protector sobre los axones (Chen *et al.*, 2022).

Así mismo, otro estudio sugiere que una alta ingesta de carotenos y xantófilas como el  $\alpha$ -caroteno, el  $\beta$ -caroteno, la  $\beta$ -criptoxantina, el licopeno, y la combinación de luteína con zeaxantina pueden estar inversamente asociados con el riesgo de padecer síntomas depresivos en adultos (Ge *et al.*, 2020). Por otro lado, se tiene evidencia que la combinación de luteína y zeaxantina en la ingesta dietética disminuye significativamente el riesgo de padecer síndrome metabólico en mujeres (Zhang *et al.*, 2021). En resumen, una serie de propiedades beneficiosas se encuentran en la luteína y zeaxantina tales como, antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras, fotoprotectoras, hepatoprotectoras, inmunomoduladoras y anticancerígenas (Khalil *et al.*, 2015).

## 2.4 Biodisponibilidad de los carotenoides

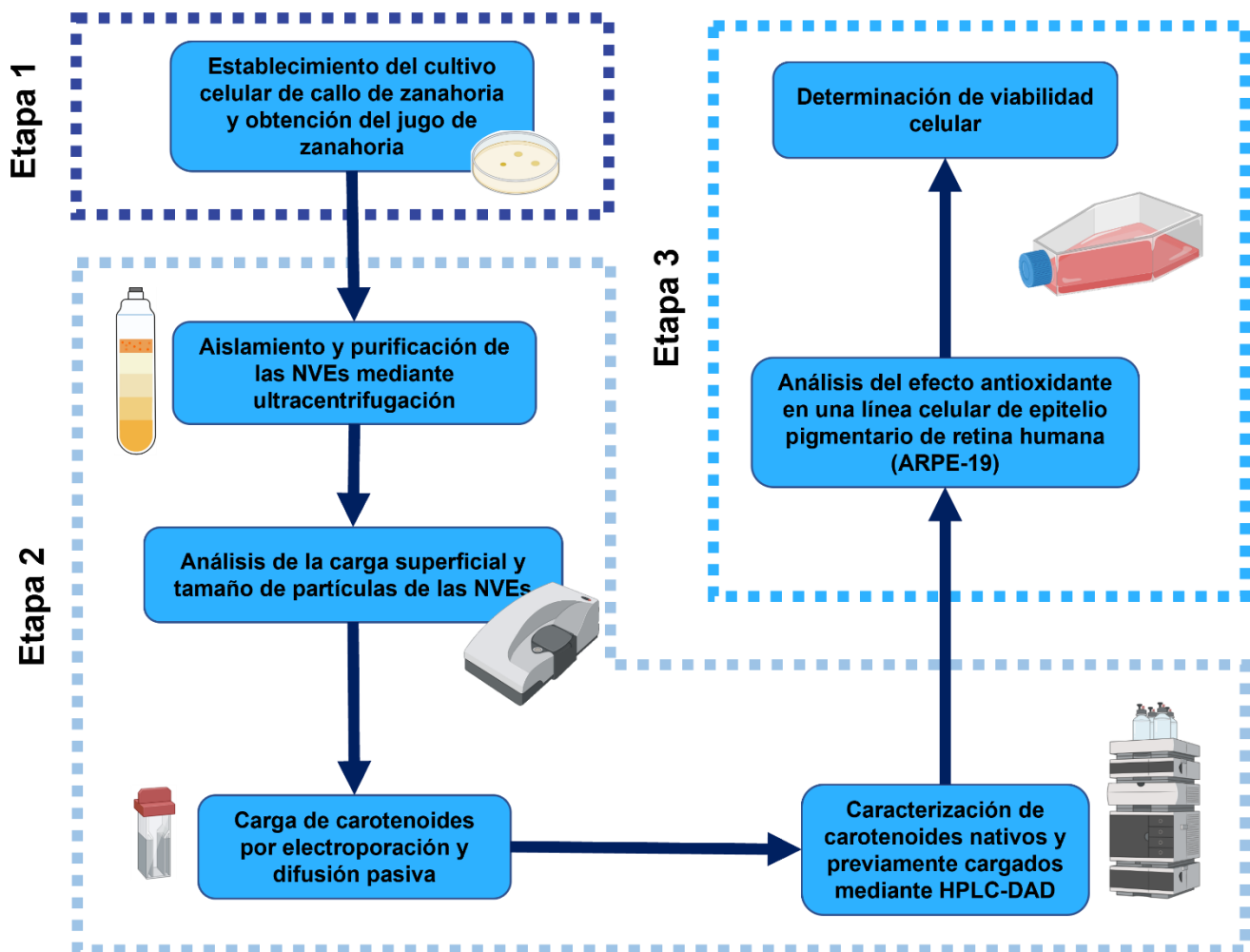
Como se ha mencionado anteriormente, los carotenoides no pueden ser producidos por los humanos, pero juegan un papel importante en procesos fisiológicos como provitaminas relacionadas con la vista y la coloración de la piel, por lo que deben ser suministrados de manera externa mediante la ingesta de alimentos como frutas y verduras o de suplementos. La absorción, el transporte y la biodisponibilidad de los carotenoides se encuentran influenciados especialmente por la cantidad, el tipo y el entorno en el que se absorben. Más aún, la biodisponibilidad de los carotenoides está influenciada por variables genéticas, la edad, el género, el estado de salud y la nutrición, o la liberación de estas moléculas en las comidas. Pero en esencia debido a su gran peso molecular, la absorción, biodisponibilidad y eficiencia de estas moléculas es muy baja (Razavi *et al.*, 2022), además de ser sensibles a la luz, a el calor, el pH y el estrés oxidativo (Toragall *et al.*, 2020).

Al ser moléculas muy hidrófobas, los carotenoides son encapsulados en el espacio interior de micelas que ayudan a mejorar su solubilidad y la absorción por la mucosa intestinal al incorporarse en quilomicrones y ser liberados en la linfa. Después de que los carotenoides son liberados, estos son transportados por lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y, en menor medida por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Por su parte, las xantófilas luteína y su isómero zeaxantina presentan una mayor polaridad en comparación con los carotenos. De hecho, al ser solubles en grasa, necesitan de esta para lograr una absorción más eficiente en el intestino delgado y así ser transportados a través del torrente sanguíneo a varios tejidos del cuerpo, en donde se almacenan principalmente en el tejido adiposo y los hepatocitos (Mrowicka *et al.*, 2022).

Estas moléculas presentan grandes efectos terapéuticos debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, pero por sus características estructurales su uso terapéutico se ve dificultado. Por ello, es necesario encontrar nuevas maneras de aumentar su estabilidad y biodisponibilidad. En este tenor, se han estudiado diversas técnicas de nanoencapsulación como las nanopartículas poliméricas, transportadores de lípidos nanoestructurados, nanoemulsiones, nanopartículas de lípidos sólidos, nanosuspensiones, liposomas de tamaño nanométrico, micelas con proteínas y polisacáridos para evaluar si se puede lograr aumentar su biodisponibilidad. Aunque se han tenido resultados positivos, se requieren encontrar alternativas que sean biocompatibles, biodegradables y no tóxicas para que sean de utilidad en las industrias alimentaria y farmacéutica (Toragall *et al.*, 2020).

### 3. Metodología

En este capítulo se presenta la metodología (**Figura 3**) de los procedimientos experimentales para cumplir con los objetivos general y específicos previamente establecidos. La metodología se planteó en tres etapas principales. La primera etapa se realizó para el establecimiento de un cultivo celular de callos de zanahoria para la obtención de las NVEs, y con la extracción de estas mismas a partir de jugo de zanahoria. En la segunda etapa se realizó el aislamiento y purificación de las NVEs, la carga con carotenoides y análisis conformacional de las mismas, seguida de la caracterización de carotenoides mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD). Por último, la tercera etapa consiste en probar las NVEs *in vitro* en una línea celular del epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19) para verificar si la entrega de los compuestos es más eficiente usando a las NVEs como método de entrega.



**Figura 3.** Descripción gráfica de las tres principales etapas de experimentación.

### 3.1 Aislamiento y purificación de NVEs de jugo de zanahoria

Las zanahorias fueron adquiridas de comercio local y enseguida fueron lavadas con extran al 20% y peladas para posteriormente obtener el jugo en un extractor comercial (T-fal, Ciudad de México, México). Se realizó el aislamiento de las nanovesículas mediante una centrifugación secuencial en una ultracentrífuga con un rotor SW 55 Ti (Beckman Coulter, Brea, CA) como se describe a continuación: 1,000 × *g* durante 10 minutos, 3,000 × *g* durante 20 minutos y 10,000 × *g* durante 40 minutos y finalmente 150,000 × *g* durante 90 minutos. El pellet obtenido después de la última ultracentrifugación se resuspendió en 3 mL de PBS (0.137M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Para la purificación de las nanovesículas se transfirió el pellet a un gradiente de sacarosa (15%/30%/45%/60%) y se centrifugó a 150,000 × *g* durante 120 minutos (Mu *et al.*, 2014). La banda entre la capa del 30%/45% se separó y se sometió a un lavado con PBS a 150,000 × *g* durante 90 minutos. El pellet nuevamente se resuspendió en 3 mL de PBS y se guardó a -80°C hasta su uso.

### 3.2 Establecimiento del cultivo celular de callo de zanahoria

Se esterilizaron semillas de zanahoria adquiridas comercialmente con 20 mL de etanol (70%) por 15 minutos, posteriormente se pasaron a 20 mL de una solución de hipoclorito de sodio (0.5%) por 10 minutos y se realizaron 3 lavados con 20 mL agua destilada (Hardegger & Sturm, 1998). Las semillas se germinaron en oscuridad a 25°C por 2 semanas en medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, pH 5.8, solidificado con 0.8% Phytigel hasta que las plantas tuvieran una longitud de 10 cm aproximadamente. Para la generación de callo, se cortaron secciones de 1 cm de raíces y hojas, se agregaron a 50 mL de medio Gamborg B5 suplementado con 1 g/L 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, pH 5.8, se mantuvo por 8 semanas en una incubadora (VWR, Radnor, PA, USA) con agitación a 26°C y 125 rpm en condiciones de oscuridad (Phillips *et al.*, 1995). Cada 4 semanas se realizó un subcultivo, decantando el 90% del medio líquido Gamborg B5 y agregando 40 mL de medio nuevo.

### 3.3 Aislamiento y purificación de las NVEs de callo de zanahoria

Se realizó lisis celular del callo generado a partir de raíz y hojas de zanahorias usando una sonda de sonicación por 2 minutos (Woith *et al.*, 2021). Posteriormente se realizó el aislamiento de las nanovesículas mediante una centrifugación secuencial en una ultracentrífuga con un rotor SW 55 Ti (Beckman Coulter, Brea, CA) como se describe a continuación: 1,000 × *g* durante 10 minutos, 3,000 × *g* durante 20 minutos y 10,000 × *g* durante 40 minutos y finalmente 150,000 × *g* durante 90 minutos. El pellet obtenido después de la última ultracentrifugación se resuspendió en 0.5 mL de PBS (0.137M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se guardó a -80°C hasta su uso.

### 3.4 Caracterización de las NVEs

La morfología se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) siguiendo la metodología descrita por Danoso-Quezada *et al.* (2020). Para ello, primero se lavaron dos veces las NVEs con agua ultrapura para quitar los excesos de sales. Después, se deshidrataron las muestras en un desecador de vidrio durante al menos 12 h y se analizaron por SEM en un equipo Zeiss EVO MA 25 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) después de ser recubiertas con polvo de oro. La concentración de las NVEs es presentada como la concentración de proteína cuantificada mediante el kit de ensayo de proteína de ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific, Rockford, IL). Para esto, se elaboró una curva de calibración de BSA en un rango de concentración de 0 a 2 mg/mL. En una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 9 µL de BSA o de las nanovesículas previamente diluidas 1:10 y 260 µL del reactivo de trabajo del kit. Posteriormente se incubó la placa a 37°C por 30 min y finalmente se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas (BioRad, Hercules, CA, USA). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

### 3.5 Análisis tamaño de partícula y carga superficial

Se realizó la medición del tamaño hidrodinámico de las partículas y la carga superficial mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando el equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Las medidas se realizaron haciendo una dilución 1:10 en PBS a pH 7.2 y 25 °C. Se realizaron tres mediciones independientes en cada caso (Mu *et al.*, 2014).

### 3.6 Carga de las NVEs y análisis de la eficiencia de carga obtenida

Para la carga de carotenoides se mezclaron las NVEs suspendidas en PBS con 1.6 µg/mL de una mezcla de las xantófilas zeaxantina/luteína (85:15) y 0.4 mL de buffer de electroporación (21% sacarosa, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.15 mM y NaCl 25 mM, pH 7.4) (Fuhrmann *et al.*, 2015). La electroporación se realizó en cubetas Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Cat. N° 1652086) equipadas con un extensor de capacitancia, con las condiciones mostradas en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Condiciones de voltaje y capacidad para cada método de carga de las NVEs mediante electroporación.

	<b>Voltaje</b>	<b>Capacitancia</b>	<b>Referencia</b>
Control	Carga Pasiva	1 h @ RT	(Donoso-Quezada <i>et al.</i> , 2020)
Carga 1	200 mV	50 uF	(Donoso-Quezada <i>et al.</i> , 2020)
Carga 2	250 mV	125 uF	(Lennaárd <i>et al.</i> , 2022)
Carga 3	200 mV	500 uF	(Fuhrmann <i>et al.</i> , 2015)

### 3.7 Caracterización de Carotenoides

La extracción de carotenoides de las NVEs de jugo de zanahoria se realizó siguiendo la metodología citada por Cuéllar-Villarreal *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Se utilizó 0.1 mL de muestra y 1 mL de solvente de extracción acetona/etanol (1:1) con BHT (0.1%) como antioxidante, posteriormente la muestra fue sonicada por 5 min y posteriormente centrifugada a 100,000 x g por 10 min. Luego el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se realizó una re-extracción del pellet como se describió previamente hasta que ya no había color visible en el pellet. Los extractos de acetona/etanol obtenidos se combinaron y se llevaron hasta sequedad utilizando un

concentrador SpeedVac (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) a temperatura ambiente (~25°C) y 30 Torr de presión. Posteriormente el extracto fue resuspendido en 2 mL de hexano y 5 mL de agua destilada para realizar una purificación de carotenoides mediante el uso de un embudo de separación, el cual se agito moderadamente por 10 segundos, se recuperó la fase orgánica (hexano) para ser llevada a sequedad en un concentrador SpeedVac a temperatura ambiente (~25°C) y 30 Torr de presión. Finalmente, la muestra se reconstituyó en 5 mL de isopropanol grado HPLC y se filtró con un acrodisco de 13 mm de nylon de 0.22µm y fue transferido a un vial de HPLC al cual se le desplazo oxígeno en espacio de cabeza utilizando nitrógeno gas grado industrial. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. Los extractos de carotenoides de las NVEs cargadas y sin carga se analizaron mediante HPLC-DAD, con una columna YMC C30 (5 µm, 4.6 mm x 150 mm) a 25°C para la separación cromatográfica de los carotenoides por medio de un gradiente no lineal (**Tabla 4**) de fase móvil A (metanol:agua, 96:4 v/v) y fase móvil B (MTBE 100%), programado a un flujo de 0.75 mL/min. El detector PDA fue programado en un barrido de 400 a 600nm y los datos fueron extraídos a una longitud de onda de 450 nm (Viacava *et al.*, 2021). Para su cuantificación se realizaron curvas de calibración utilizando estándares comerciales de zeaxantina y luteína (85:15) en un rango de 0.5-10 ppm. Los resultados fueron expresados en µg equivalentes de zeaxantina/µg de proteína.

**Tabla 4.** Gradiente no lineal de las fases A y B utilizado en HPLC-DAD.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flujo (mL/min)
	MeOH:H2O (96:4)	MTBE	
0	95	5	0.75
10	90	10	0.75
40	55	45	0.75
45	25	75	0.75
50	0	100	0.75
55	0	100	0.75



### 3.8 Determinación de viabilidad celular

Los efectos de las NVEs cargados con zeaxantina y luteína se probaron en una línea celular del epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19) (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células se cultivaron con DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con PBS al 10%, incubadas a 37°C y CO<sub>2</sub> en una atmósfera de aire humidificado al 95%. Después de que los cultivos alcanzaran la confluencia, las células se separaron con solución de tripsina EDTA y se subcultivaron en una microplaca de 96 pocillos. Para el ensayo de viabilidad celular se probaron dos controles y 5 tratamientos con dos concentraciones de carotenoides equivalentes de zeaxantina de 0.1 y 0.2 µg/mL, descritos en la **Tabla 5**, y los cuales se dejaron incubar durante una hora antes de agregar el agente oxidante. Para imitar las condiciones de estrés oxidativo, se realizó una estimulación con peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (600 µM) diluido en el buffer HBSS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se dejó en incubación por 24 horas (Han *et al.*, 2018). Después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las NVEs, solos o en combinación, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS) (Promega, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente, se agregaron 10 µL de MTS y se incubó la placa por una hora para finalmente medir la absorbancia a 490 nm.

**Tabla 5.** Tratamientos evaluados en el ensayo de viabilidad celular.

Control	Células
	Células + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tratamiento	Células + Zeaxantina/Luteína (85:15)
	Células + NVEs de jugo sin carga
	Células + NVEs de jugo cargadas
	Células + NVEs de callo sin carga
	Células + NVEs de callo cargadas

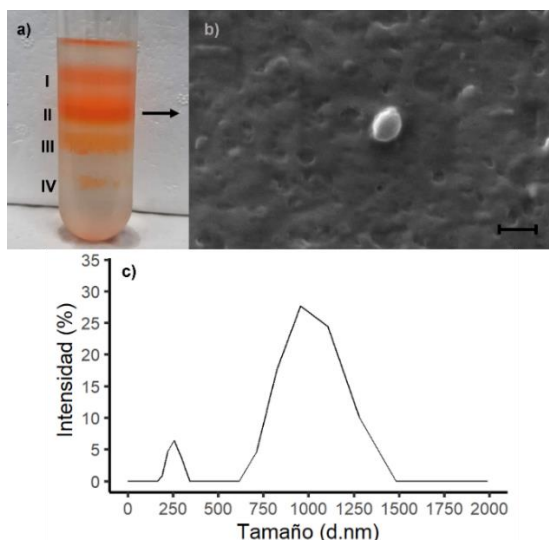
### 3.8 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software estadístico Minitab® 21.1 (Minitab, Inc., 2017, EE. UU.). Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba LSD Fisher ( $\alpha=0.05$ ). Adicionalmente se realizó un ANOVA de tres factores (concentración de carotenoides, fuente de las NVEs y tratamiento de carga), con la finalidad de discutir si el efecto observado se debe a un efecto interactivo entre las variables independientes de estudio, o bien, a un sólo factor. Todos los resultados presentados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos tres repeticiones.

## 4. Resultados y discusión

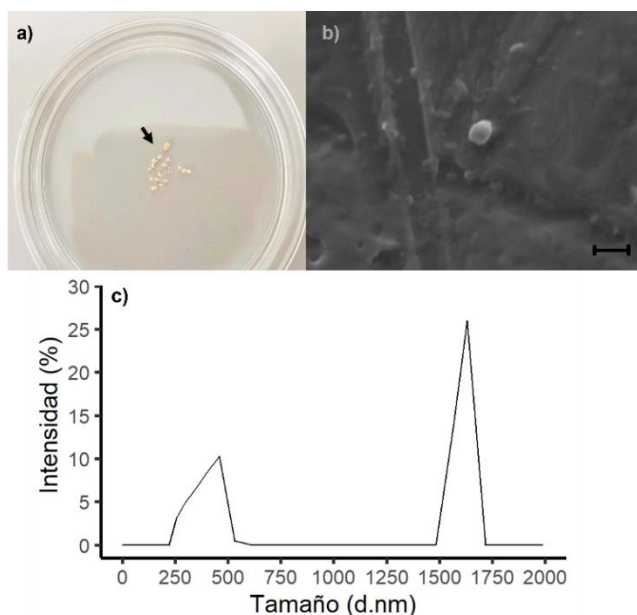
### 4.1 Caracterización de las NVEs

Mediante la técnica de ultracentrifugación se logró obtener nanovesículas de dos fuentes, jugo y callo de zanahoria. Las nanovesículas fueron caracterizadas como similares a exosomas basadas en su morfología observada mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM), distribución de tamaño y carga superficial. Las NVEs derivados de jugo de zanahoria, fueron purificadas mediante gradiente de sacarosa para eliminar partículas y proteínas que no son de interés, recuperando la banda 2 entre 35%/40% en el gradiente (**Figura 4a**), las bandas 1, 3 y 4 se excluyeron en los siguientes estudios porque la literatura consultada (Mu *et al.*, 2014) y los datos preliminares de tamaño y carga, sugieren que estas no tienen las características propias de las NVEs. La imagen del SEM muestra nanovesículas esféricas con un diámetro promedio de 647.6 nm (**Figura 4b**). Mediante el análisis de DLS se encontró que las NVEs están distribuidas en dos poblaciones de diámetro promedio de  $231.4 \pm 22.04$  nm y  $1210 \pm 219.5$  nm con una carga superficial de  $-9.85 \pm 1.04$  mV (**Figura 4c**). Estos resultados son congruentes con descripciones previas sobre NVEs derivados de jugo de zanahoria en cuanto a tamaño y morfología (Mu *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Identificación y caracterización de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo de zanahoria. a) Bandas formadas después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Los números I, II, III y IV corresponden a las bandas 15%/30%/45%/60% respectivamente. b) Análisis morfológico por SEM. La barra de escala corresponde a 200 nm. c) Distribución de tamaños de exosomas obtenidos por DLS. Dos poblaciones de diámetro promedio de  $231.4 \pm 22.04$  nm y  $1210 \pm 219.5$  nm.

Por su parte, las NVEs derivados de callo de zanahoria, fueron aisladas después de cultivar tallos y hojas de plantas de zanahoria por 3 meses para generar el callo (**Figura 5a**). Aunque la gran mayoría de NVEs son aisladas del jugo de frutas y verduras, es importante encontrar fuentes alternas para el aislamiento de este tipo de vesículas en donde se pueda tener un mayor control de las moléculas presentes de forma nativa y cuya producción sea llevada bajo condiciones ambientales controladas, lo que ayudaría a garantizar la consistencia de las NVEs y sus componentes, por lo que aislar NVEs del cultivo celular de callo presenta estas ventajas (Woith *et al.*, 2021) . La imagen del SEM muestra nanovesículas de forma esférica con un diámetro promedio de 357.5 nm (**Figura 5b**). Mediante el análisis de DLS se encontró que las nanovesículas similares a exosomas provenientes de callo están distribuidas en dos poblaciones de diámetro promedio de  $396.1 \pm 17.14$  nm y  $1631 \pm 264.9$  nm con una carga superficial de  $-1.26 \pm 0.02$  mV (**Figura 5c**). En ambos casos, las NVEs muestran una morfología esférica, con una distribución de tamaño dividida en dos poblaciones con un alto índice de polidispersidad ( $>0.65$ ) lo que indica una distribución de tamaño de partícula multimodal y con una carga superficial negativa debido a la membrana de fosfolípidos cargados negativamente (Sokolova *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Identificación y caracterización de nano vesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de callo de zanahoria. a) Cultivo celular de callo de zanahoria. b) Análisis morfológico por SEM. La barra de escala corresponde a 200 nm. c) Distribución de tamaños obtenidos por DLS. Dos poblaciones de diámetro promedio de  $396.1 \pm 17.14$  nm y  $1631 \pm 264.9$  nm.

## 4.2 Evaluación del perfil de carotenoides en NVEs

Los extractos de carotenoides de las NVEs derivadas de jugo y callo de zanahoria se caracterizaron por HPLC-DAD, los componentes encontrados se presentan en la **Tabla 6**. En la **Figura 6a**, se muestra el cromatograma del perfil de carotenoides de las NVEs derivados de jugo en donde se observan hasta 12 picos cromatográficos presentes en la muestra, para los cuales se utilizaron diferentes metodologías para identificar los compuestos, entre ellas la comparación directa con el tiempo de retención y los espectros de máxima absorción obtenidos de estándares comerciales (A); la comparación con espectros de máxima absorción reportados en literatura (B); y el orden de elución reportado en la literatura utilizando metodologías similares a las del proyecto actual (C). En el presente proyecto se logró identificar 8 carotenoides en el perfil nativo de las NVEs, de los cuales 3 son xantófilas y 5 son carotenos, siendo el *All-trans*- $\beta$ -caroteno el de mayor abundancia en una concentración de 0.44  $\mu\text{g}$  equivalentes de zeaxantina/ $\mu\text{g}$  de proteína, constituyendo el 37.7% de los carotenoides totales presentes en las NVEs. A este lo sigue el 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (0.25  $\mu\text{g}$  equivalentes de zeaxantina/ $\mu\text{g}$  de proteína) y la *All-trans*-luteína (0.11  $\mu\text{g}$  equivalentes de zeaxantina/ $\mu\text{g}$  de proteína). Esto es similar a reportes previos sobre el perfil de carotenoides en jugos de zanahoria (Purkiewicz *et al.*, 2020), lo que quiere decir que las NVEs comparten un perfil similar al de los carotenoides de la fuente de la que fueron aislados, en este caso el jugo de zanahoria. En contraste, en la **Figura 6b**, se presenta el cromatograma del extracto de los carotenoides de las NVEs derivadas de callo de zanahoria, en donde no se observa ningún pico cromatográfico, lo que indica que las NVEs derivadas de callo de zanahoria no cuentan de manera nativa con carotenoides, siendo congruente con reportes previos en literatura. En este sentido, Oleszkiewicz *et al.* (2018) reportaron que el callo obtenido *in vitro* a partir de segmentos de raíz de zanahoria presentó una tonalidad blanquecina, siendo pobre en contenido de carotenoides.

**Tabla 6.** Caracterización cromatográfica y espectroscópicas de los carotenoides de las nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo de zanahoria.

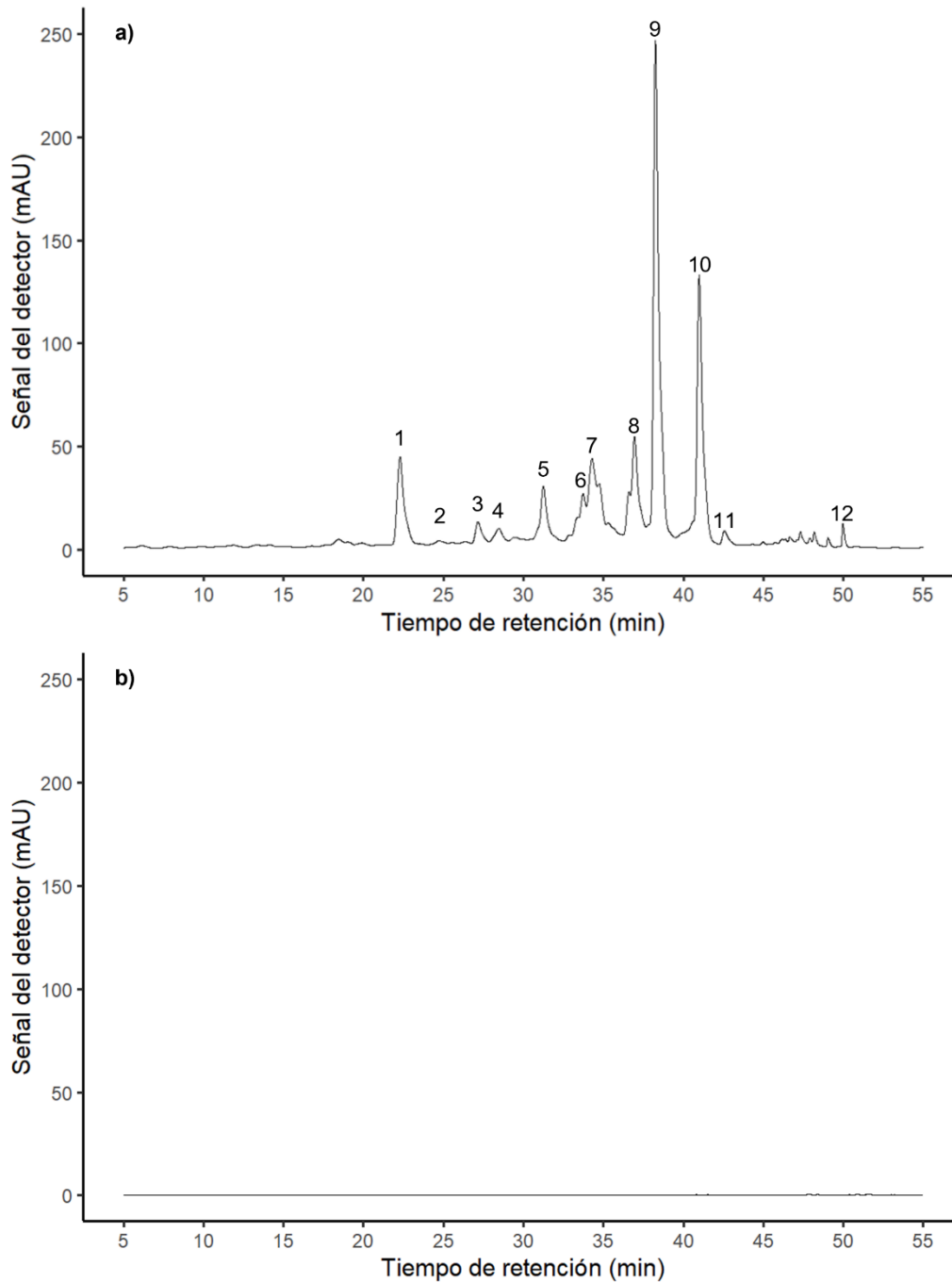
Número de pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)	% <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm)	Concentración <sup>c</sup>	Identificación tentativa	Método de Identificación <sup>d</sup>
1	22.3	6.9	424, 444, 474	0.11	All- <i>trans</i> -luteína	A, B, C
2	24.3	0.2	428, 452, 480	0.01	All- <i>trans</i> -zeaxantina	A, B, C
3	27.2	1.4	-	0.03	-	
4	28.5	1.1	-	0.02	-	
5	31.2	4.1	430, 452, 480	0.07	All- <i>trans</i> -β-criptoxantina	B, C
6	33.7	3.2	-	0.06	-	
7	34.3	5.5	338, 428, 450, 478	0.09	15- <i>cis</i> -β-caroteno	B, C
8	36.6	1.5	428, 450, 474	0.03	All- <i>trans</i> -α-caroteno	B, C
9	38.3	29.8	424, 446, 474	0.44	All- <i>trans</i> -β-caroteno	A, B, C
10	40.9	16.8	430, 452, 480	0.25	9- <i>cis</i> -β-caroteno	B, C
11	42.6	1.6	-	0.03	-	
12	49.9	0.6	444, 472, 506	0.20	All- <i>trans</i> -licopeno	A, B, C,

<sup>a</sup>Número de pico cromatográfico asignado de acuerdo con el orden de elución del cromatograma de la Figura 7<sup>a</sup>.

<sup>b</sup>Porcentaje del área del pico.

<sup>c</sup>Concentración reportando en µg equivalentes de zeaxantina/µg de proteína.

<sup>d</sup>Método de identificación utilizado: comparación directa con tiempo de retención y espectros de máxima absorción obtenidos de estándares comerciales (A); comparación con espectros de máxima absorción reportados en literatura (B); y orden de elución reportados en la literatura utilizando metodologías similares a las del proyecto actual (C) (De Rosso & Mercadante, 2007), (M. H. Liu et al., 2021), (Song et al., 2016). t<sub>R</sub>, Tiempo de retención.



**Figura 6.** Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD del perfil de carotenoides de las nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivadas de jugo de zanahoria a); y callo de zanahoria b). La identificación de los picos cromatográficos se describe en la **Tabla 6**.

### 4.3 Evaluación de la eficiencia de carga de carotenoides en NVEs

Las propiedades de carga de los carotenoides en las NVEs se estudiaron utilizando una solución de zeaxantina/luteína (85:15) a una concentración de carga de 1.2 µg/mL, ya que dentro de los pigmentos maculares, la zeaxantina es la que se encuentra en mayor proporción y tiene un efecto antioxidante potenciado en la región de la macula (Thomas & Harrison, 2016). Así mismo, según el perfil nativo de las NVEs de jugo de zanahoria (**Figura 6**), se encontró que la zeaxantina se encuentra en una concentración muy baja, representando el 0.8% de los carotenoides totales, por lo cual se decidió cargar las NVEs con una mayor proporción de zeaxantina. La mayor eficiencia de carga para zeaxantina ( $90.5 \pm 4.06$  %) se presentó cuando se utilizó la carga 1 de electroporación a 200 mV y 50 µF siendo estadísticamente significativo en comparación con los otros métodos de carga empleados (**Tabla 7**). Sin embargo, la carga 3 (200 mV, 500 µF) y el control obtenido por difusión pasiva no presentan diferencias estadísticas en la eficiencia de carga de zeaxantina ( $p > 0.05$ ). En el caso de la luteína la mayor eficiencia de carga ( $64.5 \pm 13.46$  %) se presentó cuando se utilizó electroporación a 250 mV y 125 µF (Carga 2), sin embargo, no se presentó diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) comparado con la Carga 1. Cabe resaltar que para ambos compuestos se obtuvieron buenas eficiencias de carga de la solución de zeaxantina/luteína solamente por difusión (Control) mayores al 50%, esto se podría deber a que estos compuestos son solubles en grasas (Mrowicka *et al.*, 2022) y la membrana de las NVEs está compuesta principalmente por lípidos, lo que pudo facilitar la entrada de estos compuestos a las NVEs. Sin embargo, las cargas asistidas por electroporación sí presentaron una mayor eficiencia al compararse solamente con la difusión pasiva.

**Tabla 7.** Eficiencia de carga de las xantófilas zeaxantina y luteína (85:15) en nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivados jugo de zanahoria mediante distintos métodos de carga.

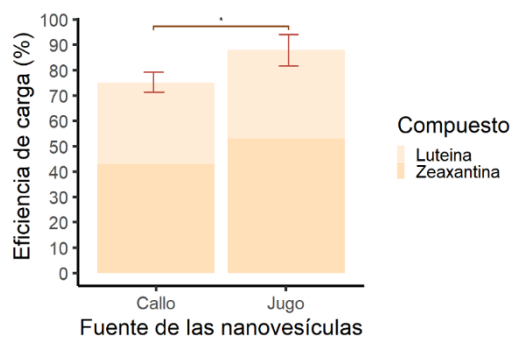
	Eficiencia de carga (%)		
	Zeaxantina	Luteína	Carotenoides totales
Control (1h, RT)	$71.5 \pm 2.6^c$	$51.8 \pm 2.2^b$	$56.1 \pm 2.8^b$
Carga 1 (200 mV, 50 µF)	$90.5 \pm 5.2^a$	$59.2 \pm 2.9^{a,b}$	$68.9 \pm 11.6^a$
Carga 2 (250 mV, 125 µF)	$78.3 \pm 4.9^b$	$64.5 \pm 12.6^a$	$63.6 \pm 4.8^{a,b}$
Carga 3 (200 mV, 500 µF)	$74.0 \pm 3.0^{b,c}$	$54.5 \pm 2.6^b$	$56.6 \pm 5.6^b$

El resultado mostrado es la media  $\pm$  DE (n=3). Letra diferente para la misma columna son significativamente diferentes (valor  $p < 0.05$ ).



Basados en los resultados de las eficiencias de carga de las NVEs derivados de jugo de zanahoria, se seleccionó la condición con mayor carga para la xantófila zeaxantina, siendo el carotenoide utilizado en mayor proporción, correspondiente a 200 mV, 50  $\mu$ F, con la finalidad de evaluar esta condición como método de carga para las NVEs derivados ahora de callo de zanahoria.

En la **Figura 7**, se puede observar que las NVEs derivados de jugo de zanahoria lograron cargar 14% más luteína y zeaxantina en combinación, comparados con las NVEs de callo. Esto es interesante debido a que las NVEs de jugo a pesar de contener carotenoides de manera nativa y de tener un tamaño de diámetro promedio menor en comparación con las derivadas de callo lograron encapsular una mayor cantidad de las xantófilas durante la carga. Esto podría deberse a diferencias en la composición de la membrana lipídica de cada NVEs, sugiriendo que posiblemente las NVEs derivadas de jugo de zanahoria permiten una mayor permeabilidad para compuestos polares como son estas xantófilas. Estudios previos han demostrado que las xantófilas, zeaxantina y luteína, tienen mayor predisposición por ciertos tipos de lípidos (Zaripheh & Erdman, 2002) (Thomas & Harrison, 2016). Más aún, considerando los valores obtenidos de carga superficial o potencial Z de las membranas de las NVEs provenientes de callo y de jugo de zanahoria (i.e.,  $-1.26 \pm 0.02$  mV y  $-9.85 \pm 1.04$  mV, respectivamente) se puede concluir que la composición lipídica de las membranas es sumamente diferente. Estas diferencias considerables en la composición afectan el microambiente eléctrico de las vesículas al momento de estar sometidas al proceso de electroporación. Sin embargo, es necesario más información sobre el perfil lipídico de los NVEs para poder elucidar el mecanismo de entrada de los carotenos y xantófilas.



**Figura 7.** Eficiencia de carga de xantófilas zeaxantina y luteína (85:15) en nanovesículas similares a exosomas (NVEs) derivados de jugo y callo de zanahoria mediante electroporación a 200 mV y 50  $\mu$ F. Las barras representan la eficiencia promedio  $\pm$  la desviación estándar (\*p-valor < 0.05).

#### 4.4 Análisis del efecto antioxidante de las NVEs en células oculares ARPE-19

Se realizó un ensayo para probar el efecto antioxidante de las NVEs cargadas con xantofilas y sin cargar basado en la viabilidad de células del epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19) debido a que se ha reportado que tienen propiedades estructurales y funcionales comparables al RPE humano (Thomas & Harrison, 2016). Para el presente estudio se evaluaron las concentraciones de 0.1 y 0.2  $\mu\text{g/L}$  de carotenoides equivalentes de zeaxantina para las NVEs derivadas de jugo y callo de zanahoria previamente cargadas con las xantófilas zeaxantina y luteína, en coincidencia con  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante (**Figura 8**). Ambas xantófilas están caracterizadas por presentar una fuerte actividad antioxidante al capturar radicales libres y contar con una estructura de doble enlace conjugado actuando como filtros contra la dañina luz azul de onda corta (Mrowicka *et al.*, 2022).

En la **Figura 8a** se puede observar que se obtuvo una mayor viabilidad celular con las NVEs provenientes de jugo sin carga en comparación con la solución de zeaxantina/luteína (85:15) y las NVEs de jugo cargadas. Sin embargo, en el tratamiento de las NVEs de jugo sin carga las células presentaron un cambio en su morfología al cambiar a un color anaranjado, lo que pudo haber interferido con la lectura de la absorbancia al realizar el ensayo de viabilidad generando una lectura mayor, lo que no implica que se haya logrado tener una mayor protección contra el agente oxidante con este tratamiento. Este cambio de color observado se puede deber a la acumulación en las células de *All-trans*- $\beta$ -caroteno, molécula que se encuentra presente en mayor abundancia de manera nativa en las NVEs derivadas de jugo en una concentración de 0.44  $\mu\text{g}$  equivalentes de zeaxantina/ $\mu\text{g}$  de proteína, y del cual se presentan solamente trazas en la retina en condiciones normales (Thomas & Harrison, 2016). En contraste, este cambio de color en las células no se presentó con ningún otro tratamiento, lo que puede deberse a que la permeabilidad en la línea celular del  $\beta$ -caroteno se ve disminuida cuando es suministrado en conjunto con algunas xantófilas como es el caso de la zeaxantina y luteína (Zaripheh & Erdman, 2002) y a que las mismas células muestran una mayor preferencia por estas xantófilas en comparación con el  $\beta$ -caroteno (During *et al.*, 2008).

Sin embargo, para tener datos con mayor certeza sobre si el  $\beta$ -caroteno presente de manera nativa en las NVEs de jugo de zanahoria presenta o no un mayor efecto protector, en comparación con las xantófilas zeaxantina y luteína, se requiere hacer un ensayo de viabilidad que no sea colorimétrico, debido a que las NVEs de jugo sin cargar presentaron una viabilidad celular del 95.7% a una concentración de 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de carotenoides equivalentes de zeaxantina, comparable con lo que se obtuvo de las NVEs de callo cargadas. Esto podría indicar que los carotenoides que se encuentran de manera natural en las NVEs de jugo, serían suficientes para proteger a las células del estrés oxidativo.

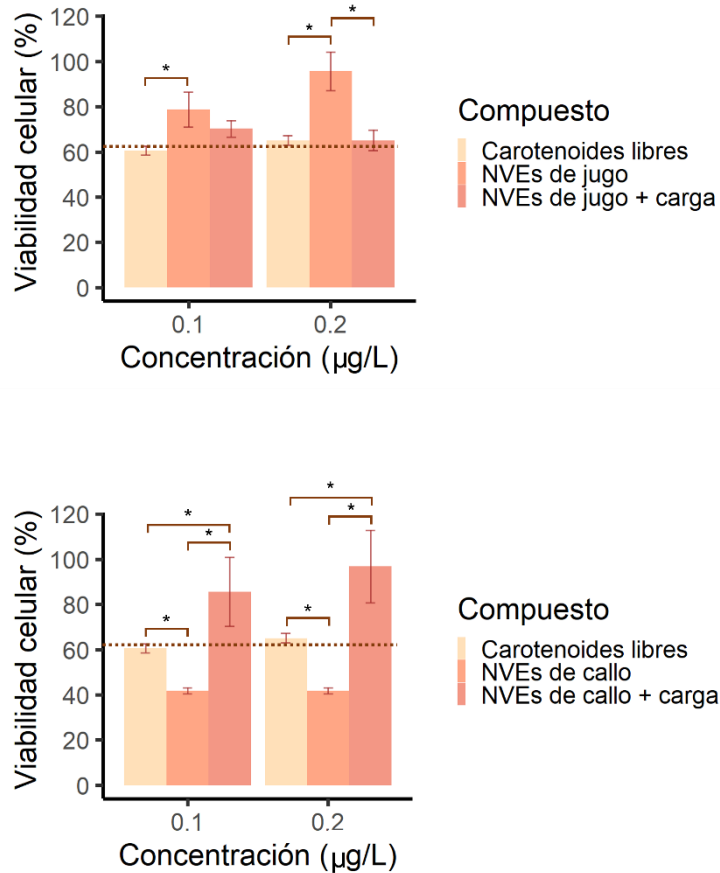
En la **Figura 8b** se puede observar la obtención de una mayor viabilidad con las NVEs derivadas de callo cargadas a una concentración de 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de carotenoides equivalentes de zeaxantina con un 96.8% de viabilidad siendo estadísticamente significativo en comparación con la solución de zeaxantina/luteína (85:15) y las NVEs de callo sin carga, pero sin diferencia significativa entre las concentraciones de 0.1 y 0.2 de ese mismo tratamiento. En el tratamiento donde se incubaron las células con el agente oxidante y las NVEs derivadas de callo sin cargar se observó una disminución de la viabilidad celular de casi el 20% comparado con las células incubadas solamente con el agente oxidante (60%), por lo que este comportamiento podría sugerir que las NVEs provenientes de callo cargadas por difusión pasiva (Control) se cargaron con cierto porcentaje del agente oxidante que se encontraba libre en el medio lo que pudo facilitar su transporte al interior de la célula disminuyendo así la viabilidad celular. Sin embargo, hacen falta más experimentos para aseverar esta hipótesis.

No obstante, al comparar los tratamientos con las NVEs cargadas derivadas de jugo y callo a una concentración de 0.2  $\mu\text{g/L}$  de carotenoides equivalentes de zeaxantina, se puede observar que las NVEs derivadas de callo presentan la mayor viabilidad celular con una diferencia significativa entre ambas ( $p < 0.05$ ) siendo 32% mayor que la viabilidad otorgada por las NVEs de jugo. Esto podría ser debido a que las células de callo que presentan un color blanquecino tienen una baja biosíntesis de carotenoides, que altera la composición de proteínas, pectinas y extensinas y disminuye los niveles en los que se encuentran presentes generando que la pared celular de estas células no tenga suficiente rigidez (Oleszkiewicz *et al.*, 2021). Esta característica puede

extrapolarse a las NVEs derivadas de callo, que presenten una membrana menos rígida facilitando el intercambio de las xantófilas previamente cargadas con la línea celular. Por otro lado, los carotenoides cargados en las NVEs de jugo de zanahoria (que probablemente presentan mayor rigidez en su membrana), se encuentran acoplados a la membrana por medio de interacciones lípido-proteína (Reszczyńska *et al.*, 2015), que presentan interacciones más fuertes y dificultan su intercambio con las células. Nuevamente, las diferencias relacionadas con la rigidez de la membrana entre las NVEs provenientes de jugo y las NVEs provenientes de callo puede relacionarse directamente con las diferencias descritas previamente sobre la carga superficial de las mismas en donde el potencial Z obtenido para las NVEs de callo es considerablemente más positivo que el observado en las NVEs provenientes de jugo de zanahoria. Por lo que, a partir de los resultados obtenidos y discutidos anteriormente, se realizó un análisis factorial, para observar cómo afecta cada variable (i.e., concentración total de carotenoides, fuente de las NVEs y tratamiento de carga) al efecto antioxidante protector sobre el agente oxidativo en las células. En esto se encontró que las variables que tienen un efecto sobre la actividad antioxidante en las células ( $p < 0.05$ ) son la fuente de las NVEs y el tratamiento de manera global mientras que la concentración empleada (i.e., 0.1 y 0.2  $\mu\text{g/L}$  de carotenoides equivalentes de zeaxantina) demostró no tener un efecto sobre la actividad antioxidante en las células, además que ninguna interacción de estas variables resultó estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

Con los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo se puede considerar que la entrega *in vitro* de carotenoides a través de NVEs derivadas de jugo y callos de zanahoria cargadas con xantófilas mediante electroporación a 200 mV y 50  $\mu\text{F}$  en la línea celular ARPE-19 presenta una mayor biodisponibilidad y mejora en la función comparado con la entrega de los mismos compuestos sin ningún tipo de acarreador. Como se ha mencionado, las NVEs derivadas de callo exhibieron un mejor funcionamiento que las NVEs derivadas de jugo. Más aún se puede inferir que las características morfológicas y fisicoquímicas de la membrana lipídica característica de cada una de las NVEs juega un papel importante en la interacción que se da con la carga de compuestos y sus interacciones en el proceso de entrega a la línea celular, facilitando en este caso el

intercambio de carotenoides entre ambas, pero con diferencias importantes que dependen de la fuente misma de las nanovesículas.



**Figura 8.** Ensayo de bioactividad de las diferentes formulaciones de nanovesículas similares a exosomas (NVEs) de jugo y callo de zanahoria a las 24 h de coincubación con la línea celular ARPE-19 y el agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Bioactividad del extracto de zeaxantina/luteína (85:15) sin vehículo, y de las NVEs sin y con carga del extracto de carotenoides derivadas de jugo (a); y callo (b) de zanahoria. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular y las barras representan el promedio de 3 réplicas ± la desviación estándar (\*p-valor<0.05). La línea punteada representa la viabilidad celular solamente con el agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## 5. Conclusiones y Perspectivas

En conclusión, se logró demostrar que se pueden aislar exitosamente nanovesículas de jugo de zanahoria, así como de un cultivo de células indiferenciadas como lo son los callos de esta misma, presentando en ambos casos características similares a otras vesículas derivadas de plantas en cuanto a morfología, tamaño y carga superficial, lo que nos permite definir las como NVEs. Se obtuvo el perfil de carotenoides nativos para las NVEs derivadas de jugo mediante HPLC-DAD identificando 12 compuestos y dando identidad a 8, en donde el caroteno y la xantófila presentes en mayor concentración son el *All-trans*- $\beta$ -caroteno y la *All-trans*-luteína con 0.44 y 0.11  $\mu\text{g}$  equivalentes a zeaxantina/ $\mu\text{g}$  de proteína, respectivamente. Además, las NVEs demostraron que son una buena opción para encapsular y transportar carotenoides, en específico luteína y zeaxantina, teniendo una eficiencia de carga superior al 50% y 70% para luteína y zeaxantina respectivamente, esto independientemente del perfil de carotenoides nativos de las NVEs. Así mismo, se logró realizar un ensayo de viabilidad celular para probar la biodisponibilidad de dichos compuestos en una línea celular del epitelio pigmentario de la retina humana (ARPE-19) que exhibe funciones comparables al RPE humano en donde la mayor viabilidad celular (> 95%) se logró utilizando las NVEs derivadas de callo previamente cargadas con xantófilas, protegiendo a las células de los efectos del agente oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2$  eficazmente.

Estos resultados demuestran que las NVEs derivadas de zanahoria son un buen vehículo para moléculas de baja biodisponibilidad como los carotenoides, que mediante sus membranas lipídicas protegen a estos compuestos de agentes externos como el pH, temperatura y luz, las cuales además aprovechan mecanismos naturales intrínsecos de su naturaleza para atravesar barreras, como la BHE y la BHR. Por ello, las NVEs pueden tener aplicaciones potenciales no solo en enfermedades retinianas como la DMRE, sino también en afecciones cardíacas y neurológicas. Más aún, al ser derivados de alimentos son parte de la dieta común en humanos y no presentan un riesgo a la salud. Igualmente, su origen presenta una alternativa interesante para su industrialización ya que existe disponibilidad suficiente de biomasa en comparación con las vesículas provenientes de células de mamífero en donde el escalamiento continúa siendo un reto importante.

No obstante, para poder determinar cuál es la mejor fuente para aislar estas NVEs hay que tomar en cuenta las ventajas y desventajas de cada una. Con los resultados obtenidos en este trabajo las NVEs derivadas de callo parecen ser la mejor opción. Algunas ventajas son que, al no tener carotenoides de manera nativa, se puede tener un mejor control y estandarización de los compuestos a cargar, en comparación con las NVEs derivadas de jugo que si cuentan con un perfil de carotenoides nativos que se puede ver alterado de acuerdo con la variedad y estado de maduración de la zanahoria al momento de hacer el jugo necesario para el aislamiento de las NVEs. Una de las desventajas que presentaron las NVEs derivadas de callo fue una menor eficiencia de carga en comparación con las NVEs de jugo, lo cual en realidad no representa un problema considerable ya que se pueden probar otras condiciones de carga por electroporación para buscar aumentar la eficiencia. Toda esta información sirve de preámbulo para futuras investigaciones.

Dentro de las perspectivas y trabajo a futuro es necesario hacer pruebas con callo derivado de otros tejidos de zanahoria para comparar si presenta un perfil de carotenoides más parecido al de las NVEs derivadas del jugo y de igual manera, verificar si en el callo blanquecino en donde no se detectaron carotenoides con el método del presente estudio, pudieran estar presentes algunos precursores de biosíntesis de carotenoides como el fitoeno y el fitoflueno, los cuales no presentan coloración alguna, y con ello confirmar si la ruta de biosíntesis se encuentra activa o no en este tipo de célula. De ser así, se tiene que corroborar también si el que las NVEs contengan carotenoides de manera nativa ayuda a aumentar la eficiencia de carga y la entrega de los mismos a tejidos específicos o qué efectos se pueden observar por la interacción de distintos carotenoides y xantófilas. En relación con la carga de carotenoides, es necesario explorar el comportamiento de las NVEs de ambas fuentes con cargas equimolares de luteína y zeaxantina, así como con otro tipo de compuestos que sean menos polares como los carotenos. Con las NVEs derivadas de callo de zanahoria sería interesante probar nuevos métodos de carga, con diferentes voltajes, pero también difusión pasiva, para poder aumentar las eficiencias de carga, así mismo probar si el agente oxidante realmente pudo cargarse en las NVEs y lo que esto puede implicar. Además, es importante caracterizar el perfil de los lípidos y moléculas presentes en la membrana de

ambos NVEs para poder elucidar de qué manera difieren entre ellas y cómo esto afecta las interacciones de los carotenoides y de las células con dicha membrana. También es importante realizar más réplicas del ensayo de bioactividad en las mismas condiciones para corroborar los datos obtenidos, además de agregar controles usando las NVEs sin el agente oxidante para asegurarnos que estas no tengan un efecto de toxicidad en las células. De igual manera, sería de utilidad realizar un ensayo de permeabilidad para verificar cuanto material de las NVEs esta entrando en las células y creando este efecto de protección contra el agente oxidante, lisando las células y verificando mediante HPLC-DAD los compuestos y las cantidades de estos que están presentes dentro de las células. Así mismo, este ensayo nos permitiría observar si los carotenoides administrados sufrieron alguna modificación estructural por parte de la célula, ya que se tienen reportes que a partir de luteína se genera *meso*-zeaxantina en el ojo (Alves-Rodrigues & Shao, 2004).



## Bibliografía

- Akuma, P., Okagu, O. D., & Udenigwe, C. C. (2019). Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00023>
- Alves-Rodrigues, A., & Shao, A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150(1), 57–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.10.031>
- Arunkumar, R., Gorusupudi, A., & Bernstein, P. S. (2020). The macular carotenoids: A biochemical overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158617>
- Avila-Roman, J., Garda-Gil, S., Rodriguez-Luna, A., Motilva, V., & Talero, E. (2021). Anti-inflammatory and anticancer effects of microalgal carotenoids. *Marine Drugs*, 19(10), 1–49. <https://doi.org/10.3390/md19100531>
- Cao, M., Yan, H., Han, X., Weng, L., Wei, Q., Sun, X., Lu, W., Wei, Q., Ye, J., Cai, X., Hu, C., Yin, X., & Cao, P. (2019). Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0817-4>
- Chen, C., Lu, Z., Zhang, D., & Li, S. (2022). The Mediation Role of the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Relationship between Lutein and Zeaxanthin and Cognitive Functions among Older Adults in the United States. *Nutrients*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/nu14030578>
- Cuéllar-Villarreal, M. del R., Ortega-Hernández, E., Becerra-Moreno, A., Welti-Chanes, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Effects of ultrasound treatment and storage time on the extractability and biosynthesis of nutraceuticals in carrot (*Daucus carota*). *Postharvest Biology and Technology*, 119, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.013>
- Cui, Y., Gao, J., He, Y., & Jiang, L. (2020). Plant extracellular vesicles. *Protoplasma*, 257(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01435-6>
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., & Lobo, C. (2011). Blood-retinal barrier. *European Journal of Ophthalmology*, 21(SUPPL.6), 3–9. <https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049>
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and quantification of

- carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5062–5072. <https://doi.org/10.1021/jf0705421>
- Donoso-Quezada, J., Guajardo-Flores, D., & González-Valdez, J. (2020). Enhanced exosome-mediated delivery of black bean phytochemicals (*Phaseolus vulgaris* L.) for cancer treatment applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110771>
- During, A., Doraiswamy, S., & Harrison, E. H. (2008). Xanthophylls are preferentially taken up compared with  $\beta$ -carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism. *Journal of Lipid Research*, 49(8), 1715–1724. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700580-JLR200>
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652(May), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
- Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R., & Stevens, M. M. (2015). Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*, 205, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.029>
- Fujita, D., Arai, T., Komori, H., Shirasaki, Y., Wakayama, T., Nakanishi, T., & Tamai, I. (2018). Apple-Derived Nanoparticles Modulate Expression of Organic-Anion-Transporting Polypeptide (OATP) 2B1 in Caco-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 15(12), 5772–5780. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00921>
- Garaeva, L., Kamyshinsky, R., Kil, Y., Varfolomeeva, E., Verlov, N., Komarova, E., Garmay, Y., Landa, S., Burdakov, V., Myasnikov, A., Vinnikov, I. A., Margulis, B., Guzhova, I., Kagansky, A., Konevega, A. L., & Shtam, T. (2021). Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells in vitro. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85833-y>
- Ge, H., Yang, T., Sun, J., & Zhang, D. (2020). Associations between dietary carotenoid intakes and the risk of depressive symptoms. *Food and Nutrition Research*, 64(1), 1–12. <https://doi.org/10.29219/fnr.v64.3920>
- Granado, F., Olmedilla, B., & Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90(3), 487–502.

<https://doi.org/10.1079/bjn2003927>

- Han, D., Wu, X., Liu, L., Shu, W., & Huang, Z. (2018). Sodium tanshinone IIA sulfonate protects ARPE-19 cells against oxidative stress by inhibiting autophagy and apoptosis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33552-2>
- Hardegger, M., & Sturm, A. (1998). Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Breeding*, 4(2), 119–127. <https://doi.org/10.1023/A:1009681725540>
- Kalarikkal, S. P., & Sundaram, G. M. (2021). Edible plant-derived exosomal microRNAs: Exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 414(November 2020), 115425. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115425>
- Khalil, A., Tazeddinova, D., Aljoumaa, K., Araigul, Z., Orazov, A., & Djabarovich, A. (2015). *The Athropocene review 1\_2*. 26(June), 1–95.
- Kim, D. K., & Rhee, W. J. (2021). Antioxidative effects of carrot-derived nanovesicles in cardiomyoblast and neuroblastoma cells. *Pharmaceutics*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081203>
- Lee, R., Ko, H. J., Kim, K., Sohn, Y., Min, S. Y., Kim, J. A., Na, D., & Yeon, J. H. (2020). Anti-melanogenic effects of extracellular vesicles derived from plant leaves and stems in mouse melanoma cells and human healthy skin. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1703480>
- Lennaárd, A. J., Mamand, D. R., Wiklander, R. J., Andaloussi, S. E. L., & Wiklander, O. P. B. (2022). Optimised electroporation for loading of extracellular vesicles with doxorubicin. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010038>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Lim, L. L., & Guymer, R. H. (2007). Age-Related macular degeneration. *Garner and Klintworth's Pathobiology of Ocular Disease (Part A)*, 371–392.
- Liu, M. H., Li, Y. F., & Chen, B. H. (2021). Inhibition of melanoma cells a375 by carotenoid extract and nanoemulsion prepared from pomelo leaves. *Plants*, 10(10),

- 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10102129>
- Liu, Y., Wu, S., Koo, Y., Yang, A., Dai, Y., Khant, H., Osman, S. R., Chowdhury, M., Wei, H., Li, Y., Court, K., Hwang, E., Wen, Y., Dasari, S. K., Nguyen, M., Tang, E. C. C., Chehab, E. W., de Val, N., Braam, J., & Sood, A. K. (2020). Characterization of and isolation methods for plant leaf nanovesicles and small extracellular vesicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *29*, 102271. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102271>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Logozzi, M., Di Raimo, R., Mizzoni, D., & Fais, S. (2021). Nanovesicles from organic agriculture-derived fruits and vegetables: Characterization and functional antioxidant content. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158170>
- Logozzi, M., Raimo, R. Di, Mizzoni, D., & Fais, S. (2022). The Potentiality of Plant-Derived Nanovesicles in Human Health — A Comparison with Human Exosomes and Artificial Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, *2*(4919).
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, *74*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Moran, N. E., Mohn, E. S., Hason, N., Erdman, J. W., & Johnson, E. J. (2018). Intrinsic and extrinsic factors impacting absorption, metabolism, and health effects of dietary carotenoids. *Advances in Nutrition*, *9*(4), 465–492. <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMY025>
- Mozos, I., Stoian, D., Caraba, A., Malainer, C., Horbanczuk, J. O., & Atanasov, A. G. (2018). Lycopene and vascular health. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00521>
- Mrowicka, M., Mrowicki, J., Kucharska, E., & Majsterek, I. (2022). Lutein and Zeaxanthin and Their Roles in Age-Related Macular Degeneration—Neurodegenerative Disease. *Nutrients*, *14*(4). <https://doi.org/10.3390/nu14040827>
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. Bin, Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., & Zhang, H. G. (2014). Interspecies communication between

- plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(7), 1561–1573. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300729>
- Nemidkanam, V., & Chaichanawongsaroj, N. (2022). Characterizing Kaempferia parviflora extracellular vesicles, a nanomedicine candidate. *PLoS ONE*, 17(1 1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262884>
- Oleszkiewicz, T., Klimek-Chodacka, M., Kruczek, M., Godel-Jędrychowska, K., Sala, K., Milewska-Hendel, A., Zubko, M., Kurczyńska, E., Qi, Y., & Baranski, R. (2021). Inhibition of carotenoid biosynthesis by crispr/cas9 triggers cell wall remodelling in carrot. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126516>
- Oleszkiewicz, T., Klimek-Chodacka, M., Milewska-Hendel, A., Zubko, M., Stróż, D., Kurczyńska, E., Boba, A., Szopa, J., & Baranski, R. (2018). Unique chromoplast organisation and carotenoid gene expression in carotenoid-rich carrot callus. *Planta*, 248(6), 1455–1471. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2988-5>
- Özkan, İ., Koçak, P., Yıldırım, M., Ünsal, N., Yılmaz, H., Telci, D., & Şahin, F. (2021). Garlic (*Allium sativum*)-derived SEVs inhibit cancer cell proliferation and induce caspase mediated apoptosis. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93876-4>
- Perut, F., Roncuzzi, L., Avnet, S., Massa, A., Zini, N., Sabbadini, S., Giampieri, F., Mezzetti, B., & Baldini, N. (2021). Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells. *Biomolecules*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom11010087>
- Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F., & Hansen, E. E. (1995). Plant Regeneration from Callus and Cell Suspension Cultures by Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81–90. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79048-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79048-5_7)
- Pocsfalvi, G., Turiák, L., Ambrosone, A., del Gaudio, P., Puska, G., Fiume, I., Silvestre, T., & Vékey, K. (2018). Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *Journal of Plant Physiology*, 229(June), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.006>
- Purkiewicz, A., Ciborska, J., Tańska, M., Narwojsz, A., Starowicz, M., Przybyłowicz, K.

- E., & Sawicki, T. (2020). The impact of the method extraction and different carrot variety on the carotenoid profile, total phenolic content and antioxidant properties of juices. *Plants*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants9121759>
- Quintana, J. F., Makepeace, B. L., Babayan, S. A., Ivens, A., Pfarr, K. M., Blaxter, M., Debrah, A., Wanji, S., Ngangyung, H. F., Bah, G. S., Tanya, V. N., Taylor, D. W., Hoerauf, A., & Buck, A. H. (2015). Extracellular *Onchocerca*-derived small RNAs in host nodules and blood. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0656-1>
- Razavi, M. S., Ebrahimnejad, P., Fatahi, Y., & Emanuele, A. D. (2022). Recent Developments of Nanostructures for the Ocular Delivery of Natural Compounds. *Frontiers in Chemistry*, 10(April), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.850757>
- Reif, C., Arrigoni, E., Baumgartner, D., Schärer, H., Nising, A. B., & Hurrell, R. F. (2014). Adaption of an in vitro digestion method to evaluate carotenoid accessibility from vegetables. *Acta Horticulturae*, 1040, 255–260. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1040.35>
- Reszczyńska, E., Welc, R., Grudzinski, W., Trebacz, K., & Gruszecki, W. I. (2015). Carotenoid binding to proteins: Modeling pigment transport to lipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 584, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.09.004>
- Rome, S. (2019). Function vesicles †. *Food and Function*, 10(2), 529–538. <https://doi.org/10.1101/472928>
- Sauer, L., Li, B., & Bernstein, P. S. (2019). Ocular Carotenoid Status in Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, 39, 95–120. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124555>
- Schroeder, U. (1998). Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(11), 1305–1307. <https://doi.org/10.1021/js980084y>
- Sokolova, V., Ludwig, A. K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P. A., Eppler, M., & Giebel, B. (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(1), 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.013>

- Song, J., Li, D., He, M., Chen, J., & Liu, C. (2016). Comparison of Carotenoid Composition in Immature and Mature Grains of Corn (*Zea Mays* L.) Varieties. *International Journal of Food Properties*, *19*(2), 351–358. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1031245>
- Stanly, C., Moubarak, M., Fiume, I., Turiák, L., & Pocsfalvi, G. (2019). Membrane transporters in citrus clementina fruit juice-derived nanovesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(24), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms20246205>
- Thomas, S. E., & Harrison, E. H. (2016). Mechanisms of selective delivery of xanthophylls to retinal pigment epithelial cells by human lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, *57*(10), 1865–1878. <https://doi.org/10.1194/jlr.M070193>
- Toragall, V., Jayapala, N., & Vallikannan, B. (2020). Chitosan-oleic acid-sodium alginate a hybrid nanocarrier as an efficient delivery system for enhancement of lutein stability and bioavailability. *International Journal of Biological Macromolecules*, *150*, 578–594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.104>
- Viacava, F., Ramos-Parra, P. A., Welte-Chanes, J., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2021). High hydrostatic pressure processing of whole carrots: Effect of static and multi-pulsed mild intensity hydrostatic pressure treatments on bioactive compounds. In *Foods* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/foods10020219>
- Wang, B., Guo, X. J., Cai, H., Zhu, Y. H., Huang, L. Y., Wang, W., Luo, L., & Qi, S. H. (2022). Momordica charantia-derived extracellular vesicles-like nanovesicles inhibited glioma proliferation, migration, and invasion by regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, *90*, 104968. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104968>
- Woith, E., Guerriero, G., Hausman, J. F., Renaut, J., Leclercq, C. C., Weise, C., Legay, S., Weng, A., & Melzig, M. F. (2021). Plant extracellular vesicles and nanovesicles: Focus on secondary metabolites, proteins and lipids with perspectives on their potential and sources. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22073719>
- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet*

- Global Health*, 2(2), e106–e116. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
- Xiao, J., Feng, S., Wang, X., Long, K., Luo, Y., Wang, Y., Ma, J., Tang, Q., Jin, L., Li, X., & Li, M. (2018). Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ*, 2018(7).  
<https://doi.org/10.7717/peerj.5186>
- Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: Structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database*, 2017(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1093/database/bax004>
- Yamaguchi, M. (2012). Role of carotenoid  $\beta$ -cryptoxanthin in bone homeostasis. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-36>
- Yang, M., Liu, X., Luo, Q., Xu, L., & Chen, F. (2020). An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00656-9>
- Yang, M., Luo, Q., Chen, X., & Chen, F. (2021). Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00995-1>
- You, J. Y., Kang, S. J., & Rhee, W. J. (2021). Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive Materials*, 6(12), 4321–4332. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.023>
- Young, A. J., & Lowe, G. L. (2018). Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants*, 7(2), 10–13. <https://doi.org/10.3390/antiox7020028>
- Zaripheh, S., & Erdman, J. W. (2002). *Symposium : Can Lutein Protect Against Chronic Disease ? Factors That Influence the Bioavailability of Xanthophylls 1 , 2*. 531–534.
- Zhang, Y., Knol, L. L., & Tan, L. (2021). Association between Dietary Lutein/Zeaxanthin Intake and Metabolic Syndrome among US Females: An Analysis of National Health and Examination Surveys 2015-2018. *Current Developments in Nutrition*, 5(10), 1–5. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab123>
- Zhou, Y., McNamara, R. P., & Dittmer, D. P. (2020). Purification methods and the presence of RNA in virus particles and extracellular vesicles. *Viruses*, 12(9), 1–15.  
<https://doi.org/10.3390/v12090917>



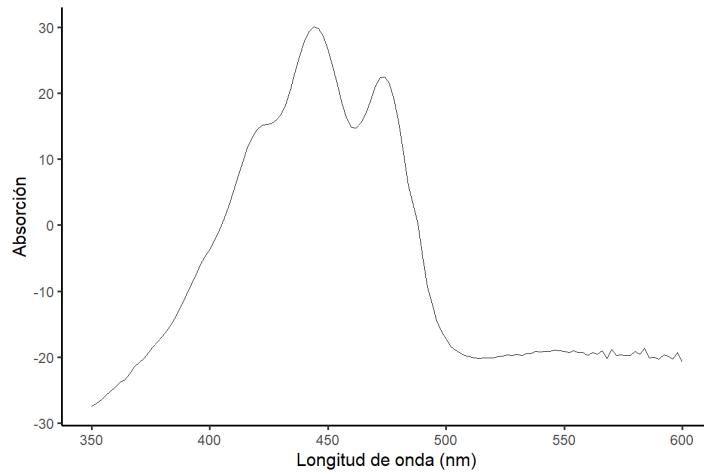
## Anexos

### Anexo A. Abreviaciones

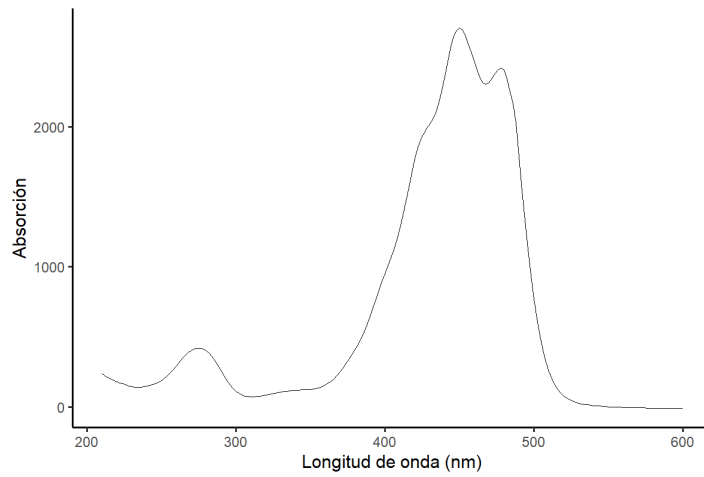
**Tabla A.1** Abreviaciones

<b>Siglas</b>	<b>Descripción</b>
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BCA	Ácido bicinconínico
BHE	Barrera hematoencefálica
BHR	Barrera hematorretiniana
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albúmina de suero bovino
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagles modificado por Dulbecco
DMRE	Degeneración macular relacionada con la edad
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MTBE	Metil ter-butil éter
MVB	Cuerpos multivesiculares
NVE	Nanovesículas extracelulares similares a exosomas
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SEM	Microscopía electrónica de barrido
VE	Vesículas extracelulares
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

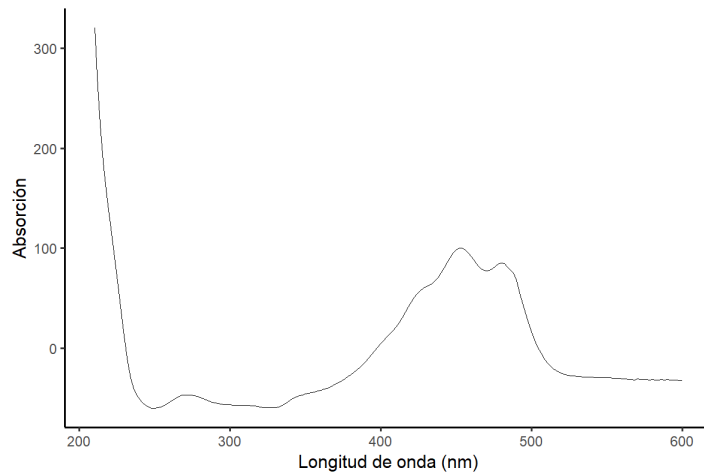
## Anexo B. Espectros de los carotenoides obtenidos del extracto de las NVEs derivadas de jugo de zanahoria



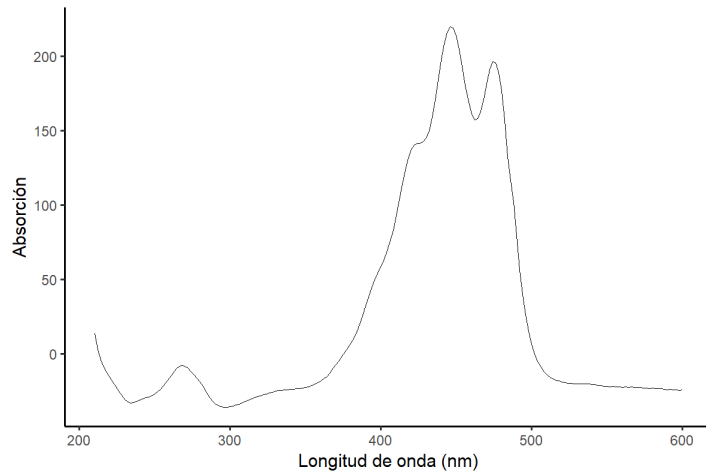
**Figura B.1** Espectro del pico 1 All-*trans*-luteína (identificación tentativa).



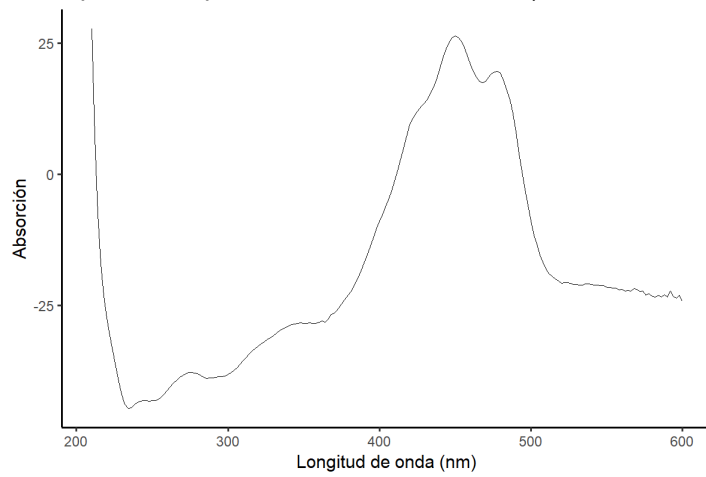
**Figura B.2** Espectro del pico 2 All-*trans*-zeaxantina (identificación tentativa).



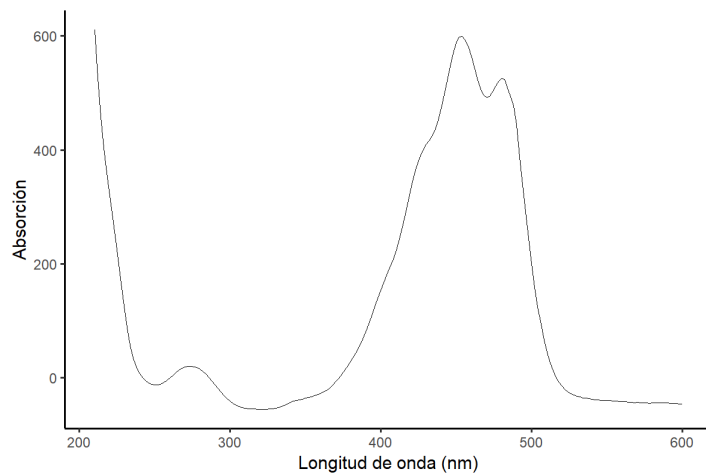
**Figura B.3** Espectro del pico 5 All-*trans*- $\beta$ -criptoxantina (identificación tentativa).



**Figura B.4** Espectro del pico 8 All-*trans*-α-caroteno (identificación tentativa).



**Figura B.5** Espectro del pico 9 All-*trans*-β-caroteno (identificación tentativa)



**Figura B.4** Espectro del pico 12 All-*trans*-licopeno (identificación tentativa).

## Vita

Anahí Guadalupe Cisneros Pardo nació el 22 de junio de 1997 en Saltillo, Coahuila. Es Ingeniera en Biotecnología egresada del Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey en el año 2020. Actualmente cursa la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología, este trabajo representa la culminación de dicho grado académico.