

Estado del arte sobre modelado de sistemas membranales celulares y su extensión a sistemas
conteniendo bicapas lipídicas: exosomas, cuerpos vesiculares y sus aplicaciones

Sara Julieth Coronado Sanabria y Johan Camilo Herrera Tarazona

Trabajo de grado para optar el título de ingeniero químico

Director:

Luz Marina Ballesteros Rueda

Ingeniera Química, MSc, Ph.D

Codirector:

Pilar Cea Mingueza

Doctora en Ciencias Universidad de Zaragoza

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2021

Contenido

	Pág.
Introducción	9
1. Objetivos	11
1.1. Objetivo general.....	11
1.2. Objetivos específicos	11
2. Metodología	11
3. Sistemas membranales celulares	12
3.1. Membranas celulares	12
3.2. Sistemas exosómicos	13
3.2.1. Exosomas	13
3.2.2. Métodos de obtención de exosomas.....	16
3.2.3. Métodos de encapsulación de exosomas.....	18
3.2.4. Técnicas para la caracterización de exosomas	19
4.3. Sistemas vesiculares	21
4.3.1. Vesículas	21
4.3.2. Métodos de preparación de vesículas.....	24
4.3.3. Técnicas de caracterización de vesículas	26
4.4. Bicapas lipídicas	28

4.4.1. Bicapas lipídicas.....	28
4.4.2. Métodos de preparación de SLB	28
4.4.3. Técnicas de caracterización de las SLB	33
5. Aplicaciones.....	34
5.1. Estudio membranal	35
5.2. Biosensores	36
5.3. Transporte y encapsulación	37
5.4. Simulación	39
6. Conclusiones	41
Referencias bibliograficas.....	43
Apéndice	62

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Métodos usados en la purificación exosómica.	17
Tabla 2. Técnicas implementadas en la caracterización exosómica.	20
Tabla 3. Métodos más usados para preparación de vesículas lipídicas.	26
Tabla 4. Técnicas adicionales implementadas en la caracterización de vesículas.	27
Tabla 5. Técnicas implementadas en la caracterización de bicapas lipídicas soportadas.....	34

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de biogenesis exosomal.	14
Figura 2. Esquema resumen de las funciones y aplicaciones de los exomas.	15
Figura 3. Esquema resumen sobre los métodos de encapsulación exosomal.	19
Figura 4. Esquema comparativo entre liposomas y exomas.	23
Figura 5. Esquema representativo de los mecanismos de ruptura vesicular.....	30
Figura 6. Esquema representativo de los mecanismos de formación de bicapas por metodologías de Langmuir-Blodgett/ Langmuir Schaefer	32

Lista de Apéndice

	Pág.
Apéndice	62
Apéndice A: Información complementaria para los sistemas exosómicos.....	62
Factores que alteran la biogénesis exosomal	62
Contenido exosómico.....	62
Métodos de obtención de exosomas	66
Encapsulación exosómica	68
Técnicas de caracterización exosómica	69
Apéndice B: Información complementaria de los sistemas vesiculares	72
Factores que afectan la preparación vesicular	72
Métodos de preparación de vesículas	72
Métodos adicionales de caracterización vesicular	75
Apéndice C: Información complementaria de bicapas lipídicas.....	78
Factores que alteran la formación de bicapas lipídicas.....	78
Modificaciones del método fusión vesicular	80
Técnicas de caracterización de bicapas lipídicas	81

Resumen

Título: Estado del arte sobre modelado de sistemas membranales celulares y su extensión a sistemas conteniendo bicapas lipídicas: exosomas, cuerpos vesiculares y sus aplicaciones.*

Autores: Johan Camilo Herrera Tarazona, Sara Julieth Coronado Sanabria.**

Palabras clave: *Sistemas membranales, exosomas, vesículas, bicapa lipídica, encapsulación.*

Descripción: El estudio del modelado de sistemas membranales celulares representa un tema de alto interés en el área clínica, y es gracias a la interdisciplinariedad evidenciada luego de realizar una exhaustiva revisión bibliográfica llevada a cabo mediante la implementación de diversas bases de datos y softwares especializados en la identificación, clasificación y organización de información. A partir de esta revisión se obtuvo información relacionada con las diferentes rutas de formación, funcionamiento, métodos de obtención, técnicas de caracterización y aplicaciones de los principales sistemas membranales celulares. Considerando la variedad de aplicaciones que se han desarrollado a medida que avanza el tiempo, se identificaron cuatro temáticas diferentes: estudio membranar, transporte y encapsulación, biosensores y simulación; enfocados en tres modelos de sistemas: exosomas, cuerpos vesiculares y bicapas lipídicas, siendo estos los sistemas que generan mayor interés encontrados en la literatura, ya que gracias a sus propiedades y funciones con miras al tratamiento y diagnóstico de enfermedades en el cuerpo humano, representa uno de los mayores retos en relación a su vida media y compatibilidad en el mismo, por lo cual, la posibilidad de funcionalizar, encapsular y combinar las propiedades de los tres sistemas mediante el estudio de los fenómenos de adsorción/desorción es clave en la resolución de dichos inconvenientes.

Abreviaturas: *Bicapa lipídica (SLB), ceramidas (CE), colesterol (COL), cuerpos multivesiculares (MVB), esfingolípidos (ES), esteroides (ST), fosfatidicolina (PC), fosfatidiserina (PS), fosfatidietilamina (PE), glicerofosfolípidos (GLY), glicosilfosfatidilinositol (GPI), gangliósidos (GL), hidratación lipídica (HL) ultracentrifugación (UC), ultrafiltración (UF), resultados de encapsulación (R.E), vesículas unilaminares pequeñas (SUVs), vesículas unilaminares grandes (LUVs) y vesículas unilaminares gigantes (GUVs)*

* Trabajo de grado.

** Facultad Ingenierías Físicoquímicas. Escuela Ingeniería Química. Directora: Luz Marina Ballesteros Rueda. Ingeniera Química, MSc, Ph.D.UIS. Codirectora: Pilar Cea Minguenza. Ph.D. Ciencias Universidad de Zaragoza.

Abstract

Title: State of the art of model cell membranes and their extension to lipid bilayer systems: exosomes, vesicular bodies and their applications *

Author(s): Johan Camilo Herrera Tarazona, Sara Julieth Coronado Sanabria.**

Key words: *Membrane systems, exosomes, vesicles, lipid bilayer, encapsulation.*

Description: The study of cell membrane systems modeling represents a topic of high interest in the clinical area and thanks to the interdisciplinarity evidenced after a thorough literature review, through the implementation of various databases and software specialized in the identification, classification and organization of information. From this review, information was obtained related to the different ways of formation, operation, methods of obtaining, characterization techniques and applications of the main cell membrane systems. Considering the variety of applications that have been developed over time, four different themes were identified: membrane study, transport and encapsulation, biosensors and simulation; focusing on three systems models: exosomes, vesicular bodies and lipid bilayers, these being the most interesting systems found in the literature, thanks to their properties and functions for the treatment and diagnosis of diseases in the human body, represents one of the biggest challenges in relation to its average life and compatibility in the same one, therefore, the possibility to functionalize, encapsulate and combine the properties of the three systems by studying adsorption/desorption phenomena is key in resolving those drawbacks.

Abbreviations: *Supported lipid bilayer (SLB), ceramides (CE), cholesterol (COL), multivesicular bodies (MVB), sphingolipids (ES), sterols (ST), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylmethylamine (PE), phospholipids glycerol (GLY), glycosylphosphatidylinositol (GPI), gangliosides (GL), lipid hydration (LH) ultracentrifugation (UC), ultrafiltration (UF), encapsulation results (E.R), small unilamellar vesicles (SUVs), large unilamellar vesicles (LUVs) and giant unilamellar vesicles (GUVs).*

* Degree work

** Faculty of Physical and Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Luz Marina Ballesteros Rueda. Chemical Engineer, MSc, Ph.D.UIS. Co-director: Pilar Cea Minguez. PhD in Science, University of Zaragoza

Introducción

La simulación de membranas biológicas (Fitts et al., 2019; Peng et al., 2015) (Watson, 2015), el desarrollo de dispositivos biomiméticos de diagnóstico, encapsulación y control en la administración de medicamentos (Peetla et al., 2009) son las áreas de estudio que hoy en día hacen parte del tema principal de investigaciones biotecnológicas con fines terapéuticos de diversas enfermedades, principalmente aquellas asociadas con el trastorno de células o tejidos, es decir, el cáncer (Fitts et al., 2019; Wang et al., 2019).

En el recorrido por encontrar nuevas alternativas terapéuticas que ayuden al tratamiento de enfermedades en el cuerpo humano, se destaca con un gran potencial el uso de sistemas vesiculares a escala nanométrica que sirvan como encapsulamiento y medio de transporte de fármacos medicinales (Sancho-Albero et al., 2020). En particular, estos vehículos son conocidos ya sea como exosomas, que son generados por las mismas células presentes en el cuerpo o bien vesículas, que son liposomas sintetizados a partir de fosfolípidos en el laboratorio. El uso de estos sistemas poseen características atractivas para llevar a cabo los tratamientos clínicos debido a su encapsulación y entrega de sustancias en sitios específicos, alto tiempo de circulación en la sangre y biocompatibilidad (Gurunathan et al., 2019). Sin embargo, presentan retos para establecerse completamente como un tratamiento tales como su reproducibilidad, bajo porcentaje de encapsulación, inmunofinidad, entre otros.

El presente escrito, abordará de manera general los aspectos más representativos de los exosomas, las vesículas y las bicapas lipídicas junto con sus métodos de fabricación, encapsulación y caracterización desde un sondeo profundo de la literatura que ayude en la contextualización,

entendimiento y vislumbramiento de ideas relacionadas con los sistemas de modelamiento celular, que permitan en un futuro el desarrollo de proyectos investigativos para el avance en esta área.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Realizar una revisión acerca del modelado de sistemas membranales celulares a partir de su formación, obtención, caracterización y sus potenciales aplicaciones en el ámbito clínico.

1.2. Objetivos específicos

Clasificar los diferentes sistemas membranales celulares reportados, con sus métodos de obtención y caracterización.

Identificar con base en la literatura, las potenciales aplicaciones de los sistemas membranales celulares.

2. Metodología

El desarrollo de la revisión bibliográfica basado en el modelado de sistemas membranales se llevó a cabo a partir de la secuencia de fases recomendada por Gómez-Luna et al. Inicialmente, mediante el uso de bases de datos y buscadores como Google académico, Elsevier, Springer, Scopus, Acs publications, Science Direct y Scielo se realizó búsqueda de información a partir de las siguientes ecuaciones: “*exosomes*”, “*liposomes*”, “*model cell membranes*”, “*nanovesicles*”, “*drugs delivery*”, “*biosensors*”, “*diseases treatment*” y “*clinic diagnosis*”. Posteriormente, teniendo en cuenta el auge en investigación del tema presentado mediante las anteriores bases de datos, se delimitó el periodo de tiempo en el que se publicaron los artículos científicos: del año 2000 al 2021. Luego se realizó la lectura previa a cada título, resumen y tabla de contenido con el fin de identificar el tema principal del artículo, para después, mediante el buscador de palabras de

Adobe Reader, analizar y comparar el número de veces que las anteriores palabras clave se encontraran en cada uno, jerarquizando los artículos de mayor a menor relevancia. Finalmente, mediante el uso del software “*Mendeley*”, se organizó y se clasificó cada artículo científico en diferentes carpetas de acuerdo su contenido, facilitando una lectura focalizada y una escritura coherentemente referenciada (Gómez-Luna et al., 2014).

3. Sistemas membranales celulares

3.1. Membranas celulares

El desarrollo e investigación del modelado de sistemas membranales, nace de la necesidad de comprender no sólo el funcionamiento de la membrana celular sino de llegar más allá, siendo capaces de simular y alterar su comportamiento de tal forma que se pueda aplicar en diferentes áreas, en las que principalmente se encuentra el área clínica. Más adelante durante esta revisión, se hará un barrido de las aplicaciones evidenciando la innovación y desarrollo en este tema, por ahora, es fundamental comprender el principio de los sistemas membranales.

Los sistemas membranales son un grupo de sistemas comprendidos por diferentes tipos de modificaciones a una de las estructuras celulares más compleja y universal en el ser vivo: las membranas celulares eucariotas, las cuales están compuestas por una bicapa lipídica que contiene una alta variedad de lípidos y proteínas transmembranales, integrales o periféricas (Cunill Semanat, 2017). Asimismo, cabe resaltar que su composición depende del tipo de membrana. Según un estudio publicado en 2008, la membrana plasmática y algunos organelos celulares como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondria, están compuestos y representan la principal fuente de producción de fosfolípidos estructurales, glicerofosfolípidos (GLY),

esfingolípidos (ES), esteroides (ST) y ceramidas (CE) principalmente. Cabe aclarar que la composición de la membrana es heterogénea y temporal, y a su vez se modifica como consecuencia de la ejecución de sus funciones o en algunos casos por una deficiencia nutricional (Van Meer et al., 2008; Zimmerberg & Gawrisch, 2006).

Como se ha mencionado, es fundamental comprender de manera general el papel de las membranas, el cual es no sólo otorgar soporte mecánico, flexibilidad y movilidad sino también actuar como barrera de difusión gracias a su anfifilicidad, regulando su semipermeabilidad para la realización de procesos biofísicos y bioquímicos como: fagocitosis, gemación, metabolismo, fusión-fisión celular, intercambio molecular mediante gradientes electroquímicos y de concentración (Watson, 2015), transmisión y transducción de señales entre el interior y exterior celular (Deamer, 2017; Lee, 2003; Penkauskas & Preta, 2019). Teniendo claro lo expuesto anteriormente, durante esta revisión bibliográfica se tratarán dos tipos de sistemas membranales: los exosomas como sistemas naturales y las vesículas y bicapas lipídicas como sistemas artificiales, debido a que, durante las dos primeras décadas del tercer milenio se evidencia un incremento favorable en el interés despertado por los sistemas mencionados.

3.2. Sistemas exosómicos

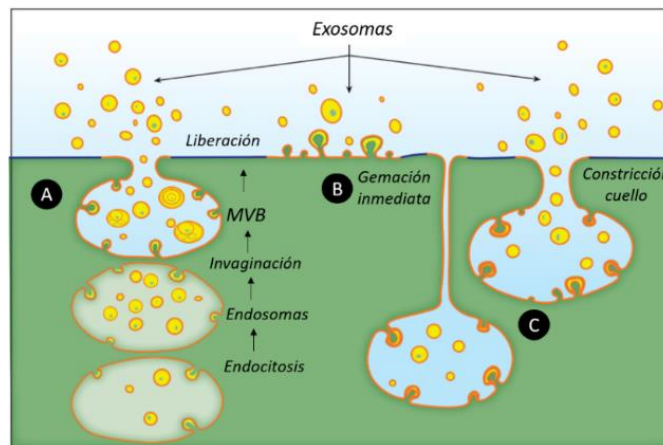
3.2.1. Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares que como su nombre lo indica, poseen un tamaño cuyo diámetro aproximado se encuentra dentro de 30 a 200 nm (Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, 2017; Pegtel & Gould, 2019a). Estas vesículas son originadas natural y mayoritariamente a partir de células eucariotas, como células madre, dendríticas, epiteliales, intestinales, neuronales, tumorales, fibroblastos y adipocitos. Asimismo, es posible encontrarlas

presentes en fluidos biológicos como líquido sinovial, leche materna, sangre, orina, saliva y líquido amniótico (Colombo et al., 2014; S. Keller et al., 2011; Palanisamy et al., 2010). Por otro lado, en cuanto su mecanismo de origen, se obtienen a partir de la fusión entre los cuerpos multivesiculares (MVB) y la membrana plasmática de las células; los MVB se forman a partir de la invaginación o gemación de las membranas de los endosomas, generados mediante el proceso endocitosis celular (ver **Figura 1.A**). Cabe aclarar, que el anterior mecanismo de biogénesis es uno de los más reportados, pero no es el único; la biogénesis de exosomas también se puede generar a partir de la liberación inmediata por gemación directa de vesículas desde la membrana plasmática (ver **Figura 1.B**) y por liberación retardada por gemación en los compartimentos conectados a la membrana plasmática intracelular, seguido de la constricción del cuello como se puede apreciar en la siguiente imagen (ver **Figura 1.C**) (Pegtel & Gould, 2019^a; Egea-Jimenez & Zimmermann, 2018). Los anteriores métodos se ven afectados por una serie de parámetros que se detallan en el **Apéndice A: factores que alteran la biogénesis exosomal**.

Figura 1

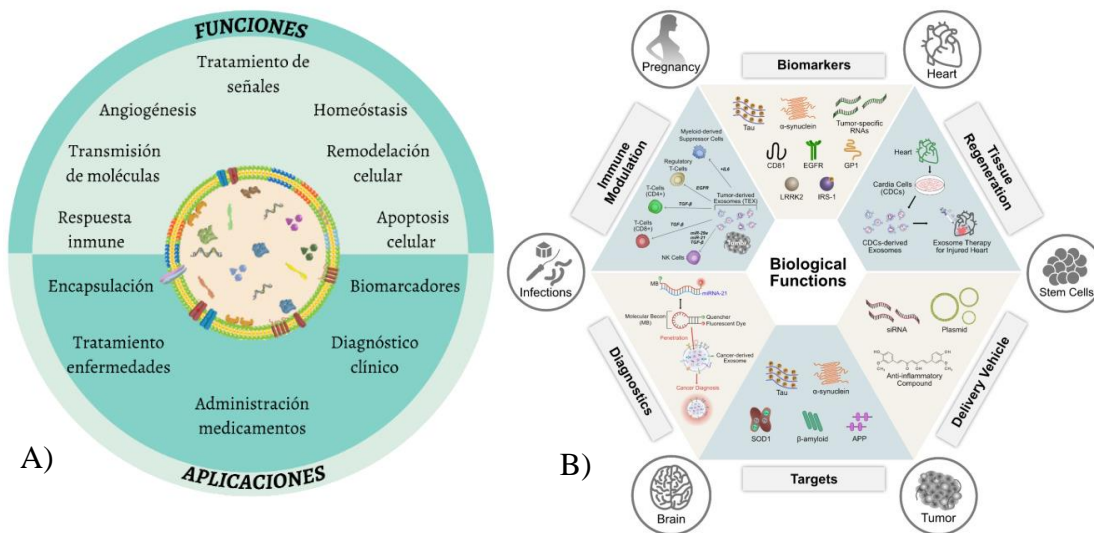
Mecanismos de biogénesis exosomal



Nota. Esquema representativo del: A) mecanismo básico de biogénesis de exosomas a partir de endocitosis celular, b) liberación inmediata de exosomas por gemación y C) liberación retardada por gemación entre compartimientos membranales. Adaptado de Pegtel & Gould, (2019).

Figura 2

Esquema resumen de las funciones y aplicaciones de los exosomas.



Nota. A) Esquema resumen de las funciones y aplicaciones de los exosomas. B) Esquema resumen acerca del contenido y biomarcadores exosomales (Para ver la imagen ampliada, ver **Figura A.2.2** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) A) Adaptado de Pegtel & Gould, (2019); Gurunathan et al., (2019). B) Tomado de Gurunathan et al., (2019).

Gracias a las propiedades de los exosomas como: la biocompatibilidad, habilidades de entrega sitio dirigida, larga circulación corporal, estabilidad estructural, encapsulación de cargos, alta penetración y biodistribución; y dependiendo de la molécula de ARN que contengan, se expresan determinados genes que desencadenan en las funciones del exosoma (ver **Figura 2.A**), siendo capaces de entregar señales combinatorias a través de la participación y agrupación de

receptores afines en la superficie, desarrollar procesos de angiogénesis o regeneración de matriz celular - vasos sanguíneos y presentación de antígenos. En adición, dentro de las funciones de los exosomas se encuentra la inflamación, homeostasis celular y apoptosis o muerte celular programada, que son repuestas del sistema inmunológico con el fin de mantener estable y compensar las alteraciones en su entorno, mediante el intercambio de materia o energía (Gurunathan et al., 2019; Shenoda & Ajit, 2016). Cabe aclarar, que dependiendo de su origen, su biología, función y heterogeneidad es diferente (Gurunathan et al., 2019; S. Keller et al., 2011). Para conocer más acerca del contenido exosómico, ver **Apéndice A: contenido exosómico**.

3.2.2. *Métodos de obtención de exosomas*

Se han postulado diferentes metodologías y protocolos para la purificación exosómica a partir de diferentes fluidos con fines investigativos y a su vez, ponerlos a prueba con el objetivo de trasladarlos más allá de la investigación, es decir, verificar su aplicabilidad en ámbitos de tratamiento clínico.

La **Tabla 1** resume los principales métodos empleados para la purificación de exosomas a partir de fluidos corporales o células parentales. Estas técnicas parten de diferentes principios que conducen a diferentes niveles de purificación y poseen ventajas que van desde una alta purificación y separación de los exosomas de lipopartículas y contaminantes, hasta tiempos cortos en su obtención. Por un lado, las técnicas de *ultracentrifugación* y *ultrafiltración* aplican principios de separación física con base en la densidad y el tamaño de los exosomas (Lobb et al., 2015; Vaswani et al., 2019), la *cromatografía por exclusión de tamaño* y *precipitación polimérica* utilizan geles y polímeros que “atrapan” los exosomas por solubilidad y afinidad en sus redes matriciales (Martins et al., 2018; Vaswani et al., 2019). Por último, la técnica de *inmunofinidad* aprovecha

la interacción ligando – receptor que existe entre las proteínas ancladas en la superficie del exosoma y la interacción con anticuerpos para luego ser separados (Greening et al., 2015).

Tabla 1

Métodos usados en la purificación exosómica.

Métodos de purificación	Principio	Ventajas	Desventajas	Referencia
Ultracentrifugación (UC)	Implementación fuerza centrífuga hasta 10 ⁶ veces el valor de la gravedad	Eliminación de lipopartículas	Alto costo instrumentación y tiempo de operación	Vaswani et al., (2019)
Ultrafiltración (UF)	Tamizado por membrana nano/micrométrica	Disminución de costos y tiempo de operación vs. UC	Bajo nivel de pureza	Lobb et al., (2015)
Cromatografía por exclusión de tamaño	Fraccionamiento en columna utilizando geles filtrantes como red matricial para atrapar exosomas	Alta pureza exosomal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Largo tiempo de operación ➤ Dilución ➤ Riesgo de contaminación 	Vaswani et al., (2019)
Precipitación polimérica	Implementación de polímeros filtrantes como red matricial para facilitar precipitación exosomal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Alta pureza ➤ No requiere equipos especializados 	Riesgo de contaminación	Martins et al., (2018)
Inmunoafinidad	Separación exosomal mediante usando perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos	Alta pureza exosomal vs. UC	Alto costo y mayor complejidad en la separación que UF	Greening et al., (2015);

Todo los métodos poseen ventajas y/o limitaciones frente a las demás y conducen a diferentes niveles de purificación de los exosomas, por lo que se recomienda según la literatura, que para el estudio de estos cuerpos nanométricos aplicados en investigación, se combinen en

conjunto diferentes técnicas con el fin de obtener exosomas lo más purificados y libres de contaminantes como sea posible, puesto que un mayor aislamiento conducirá a resultados más certeros y caracterizaciones más concretas (P. Li et al., 2017). Para un acercamiento más profundo a las técnicas mencionadas, ver **Apéndice A: métodos de obtención de exosomas**.

3.2.3. *Métodos de encapsulación de exosomas*

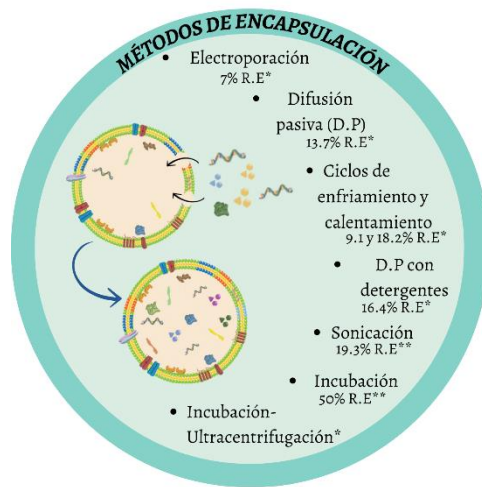
Según la literatura, existen dos rutas principales para la encapsulación de sustancias en el seno exosómico con el fin de convertirlos en vehículos para el tratamiento de enfermedades: un tratamiento a los exosomas previamente purificados y por otro lado, un tratamiento a las células excretoras de los exosomas. Los tratamientos mencionados para encapsular moléculas terapéuticas se basan en producir inestabilidad en la membrana con el fin de que en los poros formados se filtren las sustancias deseadas (Sancho-Albero et al., 2020).

En la **Figura 3** se presentan varias vías para inducir estrés en la membrana, ya sea en los exosomas o directamente en la célula excretora. Por un lado, el tratamiento a través de corriente eléctrica conocido como *electroporación* hace uso de un campo eléctrico, induciendo la formación de poros membranales por donde entran las sustancias (Lamichhane et al., 2015). Por otro lado, se han implementado procesos de encapsulación a partir de cambios bruscos de temperatura (*freeze-thaw treatment cycles*), ya sea de calentamiento o de enfriamiento. Dichos cambios repentinos no permiten que la estructura se organice adecuadamente ni que las proteínas reparadoras de la membrana actúen (Haney et al., 2015). En adición, existen tratamientos menos agresivos con la membrana celular tales como la encapsulación por *difusión pasiva*, en la cual el sistema es cargado por la diferencia de concentración entre el medio interno y externo celular (Hood et al., 2014). En

el **Apéndice A: encapsulación exosómica**, se abordan con más detalle estas y otras técnicas para la encapsulación de nanopartículas de oro.

Figura 3

Esquema resumen sobre los métodos de encapsulación exosomal.



Nota. Metodos de encapsulación de exosomas con sus respectivos R.E: Resultados de encapsulación. Adaptado de * (Sancho-Albero María et al., 2019), ** (Sancho-Albero, Encaboberzosa, et al., 2019).

3.2.4. Técnicas para la caracterización de exosomas

La caracterización exosómica es un pilar de suma importancia en el estudio de dichos cuerpos nanométricos pues conduce a la identificación, determinación y análisis de diversas propiedades tales como su morfología, distribución de tamaño, composición y encapsulación, brindando así valiosa información para entender su comportamiento.

Algunas de las propiedades exosómicas más importantes en la investigación son el tamaño, su distribución y concentración, razón por la cual se han aplicado diferentes técnicas con el fin de

obtener análisis cuantitativos. Los métodos de caracterización reportados en la literatura para llevar a cabo esta labor se muestran en la **Tabla 2**, en donde se encuentran las técnicas conocidas como *Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)*, *Dispersión dinámica de luz (DLS)*, *Detección de pulso resistivo sintonizable (TRPS)* y *Citometría de flujo (FC)*, que ya sea a través del seguimiento del movimiento browniano de las partículas o del grado de dispersión de un haz de luz, permiten la correlación y cuantificación del tamaño de partículas (Szatanek et al., 2017).

Tabla 2

Técnicas implementadas en la caracterización exosómica.

Técnica de Caracterización	Principio	Medición	Referencia
Análisis de seguimiento de nanopartículas	Seguimiento a la velocidad y movimiento browniano de las partículas	Imagen y distribución de tamaño	(Dragovic et al., 2011)
Dispersión dinámica de luz	Fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por interferencia gracias al movimiento browniano	Distribución de tamaño	(Lyu et al., 2021)
Detección de pulso resistivo sintonizable	Resistividad al paso de corriente eléctrica entre dos electrodos	Distribución de tamaño	(Anderson et al., 2015)
Citometría de flujo	Luz dispersada en múltiples ángulos de detección y nivel de fluorescencia captadas	Distribución de tamaño e intensidad fluorescente	(Szatanek et al., 2017; van der Pol et al., 2014)
Microscopía de fuerza atómica	Fuerza de interacción entre la superficie y la punta de detección	Morfología superficial	(Yuana et al., 2010)
Microscopía electrónica de barrido	Detección de electrones secundarios generados en la interacción superficie – haz de electrones incidente	Morfología espacial	(Sokolova et al., 2011)
Microscopía electrónica de transmisión	Detección de electrones transmitidos en el paso de un haz a través de la muestra	Morfología superficial	(Sancho-Albero, Encabo-Berzosa, et al., 2019)

La distribución y el tamaño de los exosomas estudiados no constituyen las únicas propiedades analizadas en el estudio de estos cuerpos, sino que deben ser complementadas con identificaciones morfológicas que brinden información de la forma, constitución y hasta la composición de los exosomas. Para esto, se han usado técnicas de microscopía de alta resolución como la *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*, que se basa en sensar las interacciones entre la superficie de los exosomas y la punta de detección que está conectada a un láser y un fotodetector, permitiendo así construir imágenes morfológicas de la muestra. Por otro lado, están las microscopías electrónicas tales como la *Microscopía electrónica de barrido (SEM)* y la *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*, las cuales a través de la interacción y posterior detección de electrones, se construyen imágenes en alta resolución que permiten llevar a cabo análisis tanto cuantitativos como cualitativos (Gurunathan et al., 2019). Para un acercamiento más profundo a las técnicas mencionadas, ver **Apéndice A: técnicas de caracterización exosómica**.

4.3. Sistemas vesiculares

4.3.1. Vesículas

Las vesículas lipídicas o también llamados liposomas, son estructuras esféricas sintetizadas en el laboratorio gracias a la disolución de lípidos, ya sean naturales o sintéticos en un medio acuoso (Torrelló et al., 2002). Con respecto a su composición, las vesículas están compuestas por una membrana y una solución acuosa o buffer. La membrana está formada por una o más bicapas lipídicas que son moléculas anfifílicas, ya que poseen una cabeza polar hidrofílica y una cola apolar hidrofóbica, permitiendo y facilitando su autoorganización y a su vez, el acoplamiento de la solución acuosa o buffer en el interior de la vesícula (Akbarzadeh et al., 2013; Torrelló et al., 2002).

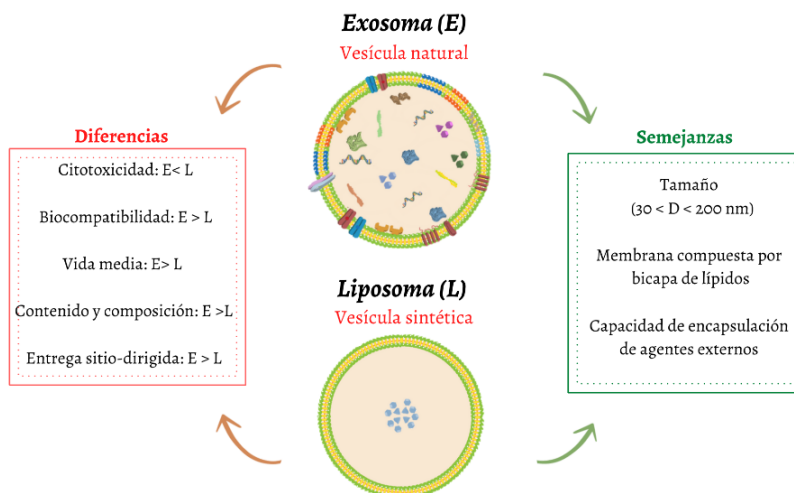
Estas estructuras se clasifican dependiendo de su lamelaridad y tamaño. Según su lamelaridad o número de bicapas se denominan en unilaminares, oligolaminares y multilaminares. Según el tamaño, se dividen en tres tipos: pequeñas unilaminares (SUVs), grandes unilaminares (LUVs) y gigantes unilaminares (GUVs), con un rango de diámetros de 20 a 200 nm, entre 200 nm – 1 μm y mayor a 1 μm respectivamente. Las vesículas unilaminares contienen una sola bicapa lipídica, que separa el contenido interno del medio externo en el que se encuentre; por otro lado, las vesículas multilaminares y oligolaminares, contienen varias bicapas concéntricas separadas entre sí por solución acuosa y se diferencian en el número de bicapas; las oligolaminares poseen de 2 a 5 bicapas y un diámetro 0,1-1 μm , en contraste con las multilaminares que contienen más de 5 bicapas y un diámetro de aproximadamente 0,5 μm . En adición, dentro de las vesículas multilaminares existen un tipo de vesículas o cuerpos multivesiculares (MVB) que poseen bicapas no concéntricas en su interior con un diámetro externo mayor a 1 μm (Akbarzadeh et al., 2013; C. Has & Sunthar, 2020a; Jesorka & Orwar, 2008).

La síntesis de vesículas lipídicas se realiza con el fin de imitar la membrana envolvente celular y exosómica para llegar a simular y entender su comportamiento; con lo anterior, es posible diagnosticar y tratar diferentes enfermedades a partir del encapsulamiento de determinados medicamentos o nanopartículas. Sin embargo, a pesar de estar caracterizados por la facilidad de fabricación, alto rendimiento y flexibilidad en la modificación de la estructura (Alavi et al., 2017), su aplicación clínica sigue siendo limitada debido a la toxicidad, falla en la especificidad del objetivo, vida media corta, baja solubilidad y riesgo de agregación durante el almacenamiento (Das et al., 2019; Soltani et al., 2015), ya que al ser vesículas sintetizadas, es decir, cuerpos extraños, son eliminados por el sistema inmunológico tan pronto este los detecta.

Teniendo en cuenta lo descrito en el párrafo anterior, es posible notar que algunas desventajas de los liposomas con respecto principalmente a la capacidad de entrega y encapsulación de medicamentos, son las ventajas descritas con anterioridad de los exosomas (ver **Figura 4**) (Fu et al., 2020), por lo cual nace la idea de sintetizar un híbrido entre las dos nanoestructuras logrando así, aprovechar las ventajas de las dos (Sato et al., 2016). Dentro de los métodos más reportados para sintetizar híbridos por medio de la fusión de membranas, se implementa el método de *ciclos de congelación y descongelación (freeze-thaw treatment cycles)*, *sonicación, extrusión e incubación* (Elkhoury et al., 2020; Fu et al., 2020; Sato et al., 2016). El tratamiento térmico con *ciclos de congelación y descongelación* resulta de gran utilidad en la fusión de las membranas, sin embargo, posee menor eficiencia de encapsulación que el método de *sonicación, incubación y extrusión*, pero aun así, los anteriores métodos inactivan las proteínas superficiales, induciendo daños en la membrana y generando agregación de nanovesículas (Fu et al., 2020; Haney et al., 2015).

Figura 4

Esquema comparativo entre liposomas y exosomas.



Nota. Esquema resumen sobre las principales semejanzas y diferencias entre liposomas y exosomas. Autores de la revisión bibliográfica basados en Sato et al., (2016); Alavi et al., (2017); Soltani et al., (2015); Das et al., (2019); Fu et al., (2020).

4.3.2. Métodos de preparación de vesículas

A través del tiempo se ha explorado ampliamente el campo de la formación de vesículas de manera sintética, es decir, a partir de fosfolípidos, proteínas y demás constituyentes con el fin de recrear a sus análogos naturales generados por sistemas vivos (Kim, 2016). Se han explorado diversas metodologías basándose en diferentes propiedades de sus constituyentes que van desde el *autoensamblaje* hasta la *formación por inducción eléctrica* (ver **Figura B.3.1.B**)

El mecanismo de la formación por *autoensamblaje* de los fosfolípidos para formar vesículas se remonta a la naturaleza de estos precursores. Debido a que los fosfolípidos son sustancias anfifílicas, se distribuyen en medio acuoso con el fin de minimizar la energía libre. Las cabezas polares por su interacción con las moléculas de agua se reorganizan estructuralmente para aumentar el área de contacto. Por otro lado, la cola hidrocarbonada al ser apolar evita a toda costa estar en contacto con las moléculas polares. Estas contribuciones de atracción – repulsión de la molécula lipídica conducen a su reorganización en conjunto con otras moléculas, induciendo la unión de las colas apolares con otras colas formando un sistema molecular: medio acuoso – cabeza – cola – cola – cabeza – medio acuoso. Esta estructura formada minimiza el área de contacto de la cadena hidrocarbonada y favorece el contacto de la parte polar con el medio y es conocida como bicapa lipídica (ver **Figura 5.E**). En este sentido, las demás moléculas de fosfolípidos presentes en el medio se conectan formando lo conocido como un disco de bicapa lipídica. Sin embargo, los discos formados son termodinámicamente inestables debido a la exposición en el borde de las

cadena de hidrocarburos, por lo que después de haber crecido hasta superar un diámetro crítico, dicha energía de borde alcanza valores considerablemente altos y el crecimiento deja de ser favorable. En este punto, otras contribuciones energéticas adquieren protagonismo como lo es la energía de curvatura, la cual favorece el crecimiento del disco en forma flexionada hasta cerrarse en él mismo. De esta manera, las contribuciones energéticas dadas por la atracción y repulsión de las moléculas anfifílicas y sus módulos elásticos encuentran un punto termodinámico y energéticamente estable, formando así las vesículas fosfolipídicas (Chandra Has & Pan, 2020; Karatekin et al., 2003). El anterior proceso de formación vesicular se ve afectado por una serie de factores, descritos en el **Apéndice B: factores que afectan la preparación vesicular**.

Se han implementado a su vez técnicas de formación nanovesicular teniendo como base el mecanismo descrito anteriormente por *autoensamblaje molecular*, como lo son: los *métodos de hidratación*, *métodos a granel (Bulk)* y *los métodos basados en electroformación*. A continuación, en la **Tabla 3** se nombran y describen algunos de los métodos más usados en la preparación de vesículas lipídicas; dentro del primer grupo se encuentran: *método de hidratación lipídica* e *hidratación asistida por lecho empacado*; en el segundo grupo, los métodos a granel están: *inyección de etanol* y *sistemas microfluídicos*; y para terminar se encuentra *la electroformación* (C. Has & Sunthar, 2020b). Para comprender más detalladamente los métodos mencionados, ver **Apéndice B: métodos de preparación de vesículas**.

Tabla 3

Métodos más usados para preparación de vesículas lipídicas.

Métodos de preparación vesicular	Principio	Características	Referencia
Hidratación lipídica (HL)	Crecimiento vesicular a partir de una bicapa fosfolipídica formada por acción del medio acuoso bajo presión de vacío	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Necesita técnicas complementarias como sonicación, extrusión, etc. ➤ Heterogeneidad en el tamaño ➤ Mayor control de la distribución de tamaño liposomal 	(C. Has & Sunthar, 2020b)
Lecho empacado	Modificación HL mediante la implementación de partículas de alúmina mejorando la transferencia de masa	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Usado en encapsulación fármacos ➤ Mayor transferencia masa vs. HL 	(Sundar & Tirumkudulu, 2014)
Inyección de etanol (IE)	Inyección de solución lípidos-etanol en solución acuosa bajo temperatura y agitación controlada	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Presencia de disolventes orgánicos residuales en las vesículas ➤ Baja eficiencia encapsulación ➤ Mayor producción de SUVs ➤ Vesículas más estables vs. HL 	(Gouda et al., 2021)
Sistemas microfluídicos	Inyección de solución lípidos-alcohol y solución acuosa por medio de un sistema de microcanales	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Producción de SUVs y LUVs ➤ Mayor transferencia masa vs. IE ➤ Alta eficiencia encapsulación 	(Jahn et al., 2010)
Electroformación	Implementación de campos eléctricos que favorecen la reorientación y flexión de bicapas en un medio electrolítico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Garantizan la unilamellaridad vesicular vs HL ➤ Mayor producción de GUVs 	(Z. Wang et al., 2013)

4.3.3. Técnicas de caracterización de vesículas

Dada la cercanía existente entre los exosomas y sus homólogas sintéticas, las técnicas que son aplicadas en las investigaciones exosómicas son válidas y adecuadas para las vesículas. Los análisis de distribución de tamaño efectuados en *DLS*, *NTA* o *FC* son también reportados y usados

en el análisis cuantitativo de la distribución de tamaño, de la misma forma que *AFM*, *SEM* y *TEM* para análisis morfológico principalmente.

Otras técnicas usadas para caracterizar vesículas (y exosomas también) se muestran en la **Tabla 4**, en donde haces de rayos X o de neutrones son bombardeados sobre su superficie y dependiendo del perfil de densidad electrónica que estos posean, se determina su cristalinidad y composición. Por otro lado, la *Resonancia* aprovecha la absorción de radiación de núcleos de fósforo o hidrógeno para determinar la composición de la muestra a analizar (Kučerka et al., 2007; Miele et al., 2021; Picas et al., 2009). Para un acercamiento más profundo a las técnicas mencionadas, ver **Apéndice B: métodos adicionales de caracterización vesicular**.

Tabla 4

Técnicas adicionales implementadas en la caracterización de vesículas.

Técnica de Caracterización	Principio	Medición	Referencia
Reflexometría de rayos X	Intensidad del haz de rayos X	Cristalinidad y composición	(Nickel, 2008)
Reflexometría de neutrones	Intensidad del haz de neutrones	Cristalinidad y composición	(Kučerka et al., 2007)
Microscopía de fluorescencia	Detección de fluorescencia	Tamaño	(Ter-Ovanesyan et al., 2017)
Resonancia magnética nuclear (RMN)	Absorción de radiación en núcleos atómicos bajo un campo magnético	Composición	(Veatch et al., 2004)

4.4. Bicapas lipídicas

4.4.1. Bicapas lipídicas

Con el objetivo de estudiar a profundidad los diferentes fenómenos de transporte, interacción y funcionamiento de las membranas celulares, se han investigado y preparado sistemas artificiales para modelar sus propiedades y así acercarse más hacia su entendimiento. Las *bicapas lipídicas soportadas (SLB)* se postulan como sistemas de estudio atractivos para la imitación de las membranas celulares debido a características tales como: estar formadas por fosfolípidos en una disposición idéntica, posibilidad de evaluar interacciones de ligando – receptor, fácilmente caracterizables a través de distintas técnicas, gran potencial para acoplar y estudiar sistemas de detección sensorial y en combinación con sistemas de microfluidos, investigar los fenómenos asociados al acoplamiento de anticuerpos con sus respectivos antígenos (Castellana & Cremer, 2006) (ver **Figura 5.E**).

4.4.2. Métodos de preparación de SLB

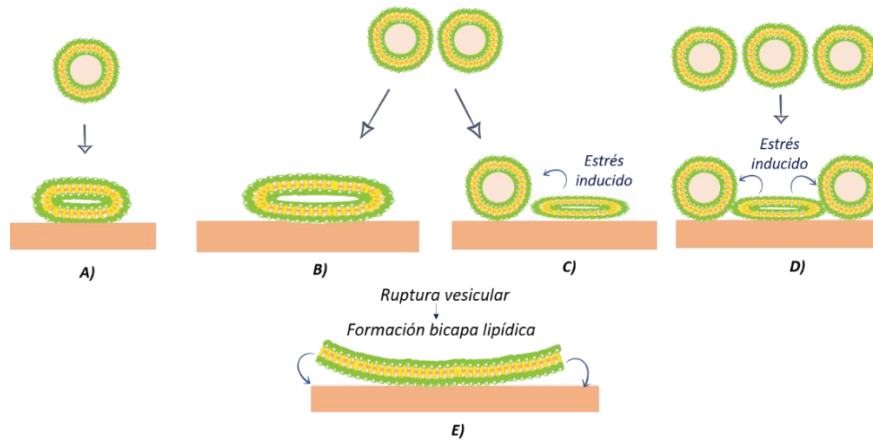
A medida que avanza el tiempo se han implementado diversos métodos para la formación de bicapas lipídicas, aplicando una amplia gama de conocimientos que abarcan el *autoensamblaje* de lípidos y el campo de la ciencia interfacial, asimismo, en algunas técnicas se evidencia la necesidad de equipos altamente especializados (Ferhan et al., 2019). Dentro de los métodos de preparación de *SLB*, se encuentran: deposición *Langmuir - Blodgett / Langmuir - Schaefer*, *fusión de vesículas*, *recubrimiento por centrifugación*, *impresión por micro contacto*, *deposición de intercambio solvente*, *micelas de surfactante lipídico*, *ensamblaje inducido por evaporación*, *deposición de colapso de burbuja* y *nanolitografía de pluma lipídica* (Hardy et al., 2013). Por su relevancia y uso, se describen los 2 primeros métodos mencionados:

4.4.2.1. Método de fusión de vesículas. Gracias a su simplicidad, versatilidad y accesibilidad, el método de fusión de vesículas se ha convertido en uno de los más implementados, ya que no requiere de equipos sofisticados para producir bicapas lipídicas de alta calidad (Hardy et al., 2013). En adición, según los reportado por varios autores, es adecuado para la investigación y simulación del comportamiento de las membranas celulares, de tal forma que es posible analizar la formación de dominios lipídicos, procesos de membrana tales como la adsorción de proteínas superficiales, el autoensamblaje de proteínas, la localización de proteínas en los límites de fase lipídica y comprender la organización celular como interacciones membrana - citoesqueleto o sinapsis inmunológica (Rebaud et al., 2014).

Esta técnica se basa en el rompimiento y posterior fusión de vesículas sobre la superficie de un soporte específico, siendo este mica, sílice, oro, óxido de titanio, entre otros. El mecanismo de fusión inicia con la deposición de una solución de pequeñas *vesículas unilamelares (SUVs)* sobre la superficie del sustrato, éstas se adhieren y adsorben, para luego de forma espontánea o por medio de la influencia de factores externos, generar su ruptura y posterior formación de parches bicapa. La adhesión y adsorción vesicular, se determina a partir del balance energético entre la energía ganada por la vesícula al adherirse a la superficie sólida y la energía de flexión o rigidez de la bicapa lipídica. Análogo a lo mencionado en los métodos de formación de vesículas, la vesícula se rompe cuando el radio de curvatura supera al radio de curvatura vesicular crítico, formando discos o parches bicapa, que posteriormente crecerán para dar lugar a la formación de una bicapa lipídica uniforme (Reviakine & Brisson, 2000). Para profundizar acerca de los factores externos ver **Apéndice C: factores que alteran la formación de bicapas lipídicas.**

Figura 5

Esquema representativo de los mecanismos de ruptura vesicular.



Nota. Esquema representativo de los mecanismos de ruptura vesicular a partir de A) una sola vesícula, B) dos vesículas formando un parche bicapa, C) una vesícula y un parche bicapa, D) dos vesículas y un parche bicapa para generar la ruptura y E) posterior formación de una bicapa lipídica uniforme. Adaptado a partir de R. P. Richter et al., (2006).

Además del mecanismo de ruptura espontánea de las vesículas, se pueden encontrar diferentes mecanismos de formación de *SLB*, dentro de los cuales se encuentran: fusión entre vesículas, fusión vesícula - parche bicapa y fusión inducida por parches bicapa, los cuales se representan en la **Figura 5** (R. P. Richter et al., 2006).

La fusión de vesículas se genera a partir del rompimiento de sus membranas como se evidencia en la **Figura 5.B**, fusionándose entre sí y generando una vesícula con mayor diámetro que al llegar a la concentración o cobertura vesicular crítica (definida por las interacciones entre vesículas sobre la superficie sólida, y debido a la tensión y estrés inducido entre membranas y la superficie) se produce la ruptura y la expansión de la bicapa sobre el sustrato. De igual forma, sucede en la imagen **C** y **D**, en donde los parches bicapa inducen el rompimiento de las vesículas

vecinas, formando así *SLB* de mayor tamaño (**E**) (Hardy et al., 2013). A medida que transcurre el tiempo, se han identificado y realizado algunas modificaciones a este método con el fin de aumentar su efectividad (ver **Apéndice C: modificaciones del método de fusión vesicular**).

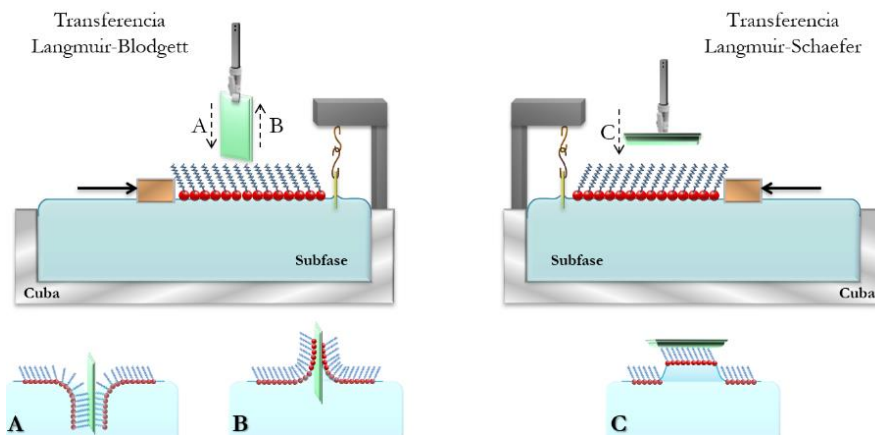
4.4.2.2. Métodos Langmuir - Blodgett y Langmuir – Schaefer. La necesidad de simular membranas celulares con mínimos defectos, controlar la simetría de la cara exterior como de la interior, la distribución lipídica, entre otras, son parámetros que conducen a la aplicación de técnicas de formación de bicapas con mayor rigurosidad y control en cada paso. Las metodologías de deposición de Langmuir – Blodgett (LB) o Langmuir – Schaefer (LS) se disponen como vía de generación de bicapas sin defectos, con alta simetría y con un control de adsorción ultra sensible gracias a la instrumentación y el principio utilizado en ellas (Girard-Egrot & Blum, 2007).

Para llevar a cabo la formación de membrana bajo estas modalidades, se debe disponer de un canal de inmersión donde estará un fluido que generalmente es agua o solución buffer y sumergir en su totalidad el sustrato a usar (ver **Figura 6**). Sobre la superficie agua – aire que existe en el canal, los fosfolípidos previamente disueltos en solventes orgánicos en su totalidad son agregados gota a gota. Al evaporar el o los solventes utilizados, los fosfolípidos estarán orientados de tal manera que la cabeza polar quede en contacto con el medio polar. Con un sistema superficial de barrido, los fosfolípidos en la interface son aglomerados controlando la presión superficial sobre el canal y posteriormente, el sustrato es emergido a una velocidad lo suficientemente lenta como para permitir el acople de los fosfolípidos en la interfase al sustrato. Este proceso de deposición corresponde a la técnica *LB* y constituye el primer paso para la formación de la membrana (ver **Figura 6.B**) (Kurniawan et al., 2018). Para completar la bicapa, se debe repetir el proceso, pero esta vez, el sustrato con la monocapa interior es sumergido al canal

con los fosfolípidos para permitir el anclaje de la monocapa exterior (ver **Figura 6.A**). Por otro lado, la técnica de deposición por *LS* posee el mismo principio, pero la deposición no se da por la emersión/sumersión en vertical del sustrato, sino que éste es aproximado a la interfase de manera totalmente horizontal (ver **Figura 6.C**). Generalmente, ambas técnicas se usan de la mano, es decir, la monocapa interior es acoplada por *LB* y la monocapa exterior por *LS* con el fin de evitar problemas de desorción al momento de acoplar la segunda monocapa por *LB* (M. Li et al., 2008).

Figura 6

Esquema representativo de los mecanismos de formación de bicapas por metodologías de Langmuir-Blodgett/ Langmuir Schaefer.



Nota. Esquema representativo de los mecanismos de formación de bicapas por: A) Inmersión Langmuir-Blodgett, B) emersión Langmuir-Blodgett y C) deposición Langmuir-Schaefer. Adaptado a partir de Ballesteros, (2012).

Si bien estas técnicas generan membranas lipídicas soportadas de alta calidad, es necesario tener un control exhaustivo de parámetros tales como la rugosidad, limpieza y velocidad de aproximación del sustrato, control constante en la presión superficial, fase lipídica, temperatura y otras más que sumadas a la sofisticada instrumentación, hacen que esta vía de formación sea

compleja (Kurniawan et al., 2018) y en adición, se han reportado problemas en la asociación proteica en la membrana debido a su desnaturalización en la interfase aire – agua (Castellana & Cremer, 2006).

4.4.3. Técnicas de caracterización de las SLB

La caracterización de las bicapas lipídicas soportadas está enfocada principalmente en la identificación de la formación de estas sobre un sustrato en específico, es decir, en corroborar que están dispuestas sobre el sustrato de manera adecuada. Entre las técnicas reportadas en su estudio, se destacan las técnicas ya mencionadas de *microscopía, fluorescencia, dispersiones de rayos*, etc. Sin embargo, en esta área se destacan nuevas técnicas tales como la *microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM)*, la *resonancia de plasmones superficiales (SPR)*, entre otras, las cuales brindan información valiosa y precisa para el estudio de este sistema lipídico.

Tanto en *EQCM* como en *elipsometría*, es posible determinar la masa adsorbida sobre el sustrato, es decir, hacer un seguimiento a la formación de la bicapa ya sea monitoreando los cambios en la frecuencia de oscilación de un piezoeléctrico o por la variación de los ángulos elipsométricos respectivamente (R. P. Richter & Brisson, 2005). Por otro lado, con la técnica de *SPR* que hace uso de láseres de He-Ne que excitan las moléculas para emitir un espectro característico, permitiendo el seguimiento de la formación de la bicapa (Tawa & Morigaki, 2005). Finalmente, el *AFM* también permite una caracterización en tiempo real de la morfología de la bicapa formada, e inclusive su progresión desde vesículas (Lind & Cárdenas, 2016). Para más detalles sobre las éstas y las técnicas mencionadas en apartados anteriores aplicadas a bicapas, ver

Apéndice C: técnicas de caracterización de bicapas lipídicas.

Tabla 5

Técnicas implementadas en la caracterización de bicapas lipídicas soportadas.

Técnica de Caracterización	Principio	Medición	Referencia
Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo	Frecuencias de oscilación de un cristal de cuarzo	Masa adsorbida y disipación de energía	(Kanazawa & Cho, 2009)
Elipsometría	Cambio de los ángulos elipsométricos asociados a la reflexión	Morfología y masa adsorbida o desorbida	(R. P. Richter & Brisson, 2005)
Resonancia de plasmones superficiales	Excitación de moléculas con láseres y monitoreo del espectro emitido	Morfología y propiedades fisicoquímicas	y (Tawa & Morigaki, 2005)
Microscopía de fuerza atómica	Fuerza de interacción entre la superficie y la punta de detección	Morfología y espesor	(Lind & Cárdenas, 2016)

5. Aplicaciones

Las membranas cumplen con un rol de suma importancia en los seres vivos al ser la capa protectora y el soporte para las células, como también el ente regulador de muchos de los procesos de intercambio y comunicación de las células con el medio exterior, otras células, tejidos y sustancias en su entorno cercano (Watson, 2015). Debido a su participación en procesos tan importantes de regulación, control y comunicación, las membranas se han establecido como objetivos de investigación claves para el entendimiento de dichos procesos, puesto que comprender e interpretar su interacción y funcionamiento, constituye la base para la formulación de sistemas de tratamiento que permitan controlarlos (Van Meer et al., 2008). Sin embargo, debido a la complejidad y la basta cantidad de compuestos que conforman una membrana real, su estudio se

dificulta en grandes proporciones, incentivando así el traslado de estas investigaciones hacia modelos más simples, pero con las características esenciales para asegurar validez y aplicabilidad en los sistemas reales, tales como los sistemas vesiculares y bicapas lipídicas soportadas. Gracias a los estudios y avances logrados con estos sistemas, se ha extrapolado este conocimiento para investigar los procesos básicos en los que la membrana celular interviene, mayoritariamente en aras de formular tratamientos terapéuticos para procedimientos clínicos, terapias para el control y recuperación de enfermedades, biosensores para la detección de sustancias y como también el transporte de compuestos activos de medicación (Siontorou et al., 2017).

5.1. Estudio membranar

La membrana celular cumple diferentes actividades tales como permitir el intercambio de sustancias, proteger y dar soporte a la célula y marcar el límite entre el medio intra y extracelular. Toda aquella sustancia que intente ingresar o salir de la célula debe pasar por la membrana, la cual, dependiendo de las necesidades celulares, afinidad y factores externos como pH o presión osmótica, permitirá o no el paso de tal compuesto. Por otro lado, la membrana no solo está compuesta por lípidos, sino que también está constituida por proteínas, enzimas y canales de intercambio que además de agregar complejidad a la membrana, cumplen funciones biológicas de suma importancia tales como la autorregulación, reparación y comunicación (Tanaka & Sackmann, 2006), las cuales han sido objeto de estudio gracias a la implementación de las membranas artificiales.

Asimismo, la distribución lipídica de la membrana no es ni homogénea, ni es la misma en las monocapas tanto interior como exterior, sino que está conformada por lo que se conoce como canales o microdominios, los cuales afectan las propiedades fisicoquímicas de la membrana

principalmente en su fluidez y permeabilidad, y propiedades biológicas al existir preferencias en las interacciones entre las proteínas ancladas y moléculas del exterior. Con esto, se han llevado a cabo estudios que han permitido evaluar tanto la funcionalización de la membrana con nuevas proteínas, enzimas y demás moléculas, con el fin de alterar la composición local de la membrana y así promover el anclaje de nuevas sustancias, controlar y regular las funciones celulares y la propagación de mensajeros (Escribá et al., 2015).

En específico, haciendo un seguimiento a el comportamiento membranar, se ha encontrado evidencia que relaciona la proliferación de células cancerígenas cuando la relación de los fosfolípidos presentes cambia (Escribá et al., 2015), la interacción de ácidos grasos en la modificación de la superficie y fallos en organelos en enfermedades cardiovasculares (Gao et al., 2020) y cambios en la fluidez membranar de las bicapas protectoras de las mitocondrias, las cuales afectan el proceso de producción de ATP y consumo de oxígeno reactivo, lo que conlleva a una oxidación lipídica, apertura de canales iónicos y daños mitocondriales que desembocan en enfermedades neurodegenerativas (Eckmann et al., 2013). Por otro lado, gracias a la flexibilidad de la membrana al anclar nuevas moléculas, ha sido posible la evaluación de canales de intercambio iónico y su papel en la regulación celular al implementar sistemas membrana – electrodos que permitan el rastreo de los iones al interior o exterior de la célula y el monitoreo de proteínas ancladas a través de mediciones de resistencia e impedancia (Tanaka & Sackmann, 2006).

5.2. Biosensores

Como la membrana lipídica se postula como una plataforma ideal para el estudio e interacción de moléculas con enzimas, proteínas, péptidos, entre otras, se ha aprovechado esta

posibilidad para formular sistemas que respondan a dichas interacciones y estímulos para así llevar un monitoreo de las funciones biológicas de la célula, los cuales son conocidos como biosensores. Estas plataformas para la detección se basan en el anclaje de las moléculas de estudio hacia ligandos previamente preparados, que con la interacción liberan una señal que relaciona la cantidad de moléculas ancladas o presentes en el medio. Para esto, se hacen uso de biomarcadores que pueden estar contenidos en el interior de un exosoma o una vesícula y al momento del anclaje, ya sea por medios espontáneos o por estímulos externos, se liberan y son sensados a través de técnicas de caracterización convencionales. Entre los marcados más utilizados se encuentran aquellos que provocan una señal ya sea en intensidad de color, fluorescencia y de tipo electroquímica o quimiluminiscente (Liu & Boyd, 2013).

Por otro lado, se han formulado detectores biológicos que permiten el monitoreo de iones como Mg^{+2} , Pb^{+2} y Zn^{+2} en tiempo real en presencia de hormonas haciendo uso de células manipuladas genéticamente en su superficie con cadenas de ADN específicas para dichos iones (Qiu et al., 2014).

5.3. Transporte y encapsulación

La idea de tratar enfermedades a partir de la administración de medicamentos específicamente en la zona de afectación ha venido en aumento debido a la posibilidad de encapsular sustancias activas que controlen su proliferación y crecimiento. Gracias a las cualidades que ofrecen los sistemas membranales celulares, éstos se postulan como vehículos para transportar enzimas, material genético como ADN y ARN, medicamentos o nanopartículas y así, a través de diversos mecanismos bioquímicos controlar la células o tejidos malignos (Chen et al., 2020).

Dentro de las características que poseen los sistemas membranales más relevantes para la encapsulación de sustancias, se encuentra la afinidad estructural con el cuerpo humano, lo que le confiere invisibilidad ante la acción del sistema inmune y largos tiempos de vida media dentro del organismo (Luk et al., 2016). Por otro lado, sus características morfológicas le permiten encapsular gran variedad de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, selectividad al entregar directamente la carga en los sitios específicos, funcionalización con material polimérico que mejoran sus propiedades mecánicas y la capacidad de responder ante estímulos o interacciones con otras moléculas, lo que permite controlar la carga y descarga de los principios activos (Tan et al., 2015).

Una significativa cantidad de sustancias han sido investigadas puesto que sus propiedades para controlar enfermedades se ven mejoradas gracias a su encapsulación, como el caso del *Doxorubicin*, un medicamento altamente usado para tratar el cáncer y que al estar encapsulado y ser entregado directamente en la zona afectada, inhibe efectivamente el crecimiento e induce a la apoptosis, es decir, a la muerte celular (Peng et al., 2015). Sin embargo, otras sustancias tales como antifúngicos, antipsicóticos e inclusive antibióticos como la *Azitromicina* han sido estudiados debido a su fuerte interacción lípido-proteína en la membrana y su afinidad por dominios bajos en esfingomelín y colesterol (Peetla et al., 2009).

De igual forma, los sistemas membranales permiten estudiar y formular nuevos medicamentos terapéuticos a través de la evaluación de factores como la toxicidad, bloqueos de canales de intercambio, cambios de permeabilidad en la membrana al contacto con el medicamento, coeficientes de partición para relacionar el nivel de encapsulación logrado (Peetla et al., 2009) y a su vez, se prestan como plataformas idóneas para evaluar parámetros que aumenten

la eficacia tanto de la encapsulación como el tratamiento, tales como: Relación lípido/droga, pH, concentración de sales y polaridad del medio, nivel de disociación, carga e interacción de los potenciales medicamentos implementados (Zucker et al., 2009).

No solo los sistemas membranales tratados en esta revisión son los utilizados para la encapsulación sino que también se estudian células directamente para aprovechar aún más su inmunocompatibilidad, como los glóbulos rojos, los cuales son tratados a través de métodos de carga como los ya mencionados en apartados anteriores, es decir, a través de *electroporación*, *ósmosis*, *incubaciones* y junto con otros, evaluar su efectividad y aplicabilidad en tratamientos clínicos (Peng et al., 2015).

5.4. Simulación

A pesar de contar con la variedad de técnicas de caracterización vesicular mencionadas anteriormente, es gracias a la implementación de determinados softwares o programas computacionales que es posible comprender, describir y modelar no sólo la estructura, organización y el funcionamiento de la membrana celular, sino también los procesos a nivel molecular que se llevan a cabo dentro de esta. Asimismo, las simulaciones representan puntos de referencia para comparar el resultado de la fase experimental con respecto a la simulación realizada, de tal forma que sea posible realizar un análisis de los parámetros experimentales utilizados para posteriormente optimizar la experimentación (Venable et al., 2019).

Los softwares son diseñados a partir de determinados algoritmos, que siguen leyes o reglas en específico modeladas matemáticamente por ecuaciones diferenciales, en función de parámetros moleculares que a su vez dependen del tipo de proceso o análisis a implementar. Dentro de los algoritmos de simulación más comunes, se encuentra la *dinámica molecular*, la cual es capaz de

describir a resolución atómica las interacciones entre la totalidad de los componentes del sistema (Marrink et al., 2019), caracterizar propiedades mecánicas de la bicapa lipídica, analizar la formación de poros en la membrana, modelar e identificar la posición y movimiento de proteínas y lípidos membranales, etc. De igual forma, además de la caracterización anterior, fenómenos de transporte y energía como calor, luz y sonido son descritos por algoritmos de simulación como: *Monte Carlo*, *dinámica de Langevin*, *mecánica cuántica molecular*, *hidrodinámica de partículas suaves*, *dinámica browniana* y *partícula disipativa*, que a su vez han sido implementados como paquetes de simulación en softwares como AMBER, CHARMM, NAMD, OpenMM, LAMMPS, DESMOND, ESPRes-So y GROMACS (Bunea et al., 2020; Marrink et al., 2019; Xu et al., 2020), los cuales se diferencian por las bases de datos, tiempo de equilibrio y parámetros que cada uno maneja, dependiendo de la cantidad y tipo de sustancias que consideren, familias de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas de medicamentos, etc. (Marrink et al., 2019). Por el ejemplo, en el caso de estudio analizado por Venable et al., se implementa el software CHARMM, el cual utiliza la variación de permeabilidad entre solutos (Ley de Overton), la razón de flujo a través de las membranas (La primera ley de Fick) o modelos de difusión molecular (Ecuación de Smoluchowski) para evaluar la permeabilidad de la membrana celular compuesta principalmente por glicerofosfolípidos, en presencia de agua y oxígeno (Venable et al., 2019).

Por otro lado, la simulación de procesos se ha usado no sólo para comprender de manera general el funcionamiento de la membrana celular sino también para analizar el efecto e interacción con otras sustancias externas, como ocurre en la encapsulación y administración de nanopartículas y medicamentos respectivamente. Ejemplo de ello, se evidencia en el estudio realizado por Pakdel et al., en donde a partir del paquete de simulación contenido en *GROMACS 5.1.2* y partiendo de *dinámica molecular*, se predice las interacciones entre el medicamento anticáncer *Doxorubicin*

con nanotubos de carbono de pared simple, y a través de *dinámica molecular dirigida* se analiza la penetración del anterior sistema de encapsulación en membranas de bicapa lipídica en presencia y ausencia de *Nicotina*; todo esto con el fin de evaluar la capacidad de penetración y administración de dicho medicamento intracelularmente. (Pakdel et al., 2020).

6. Conclusiones

Basados en la revisión bibliográfica acerca del modelado de sistemas membranales celulares, se llevó a cabo el estudio a profundidad de principalmente tres sistemas: exosomas, cuerpos vesiculares y bicapas lipídicas, y que, junto con las técnicas de caracterización usadas, propician una plataforma confiable y acertada para modelar y estudiar las membranas celulares con alto nivel de rigurosidad, dadas sus características fisicoquímicas y sus principios de funcionamiento a pesar de sus fortalezas en cuanto a la estabilidad, sensibilidad y reproducibilidad, y sus debilidades como afinidad, citotoxicidad, interferencias en las mediciones y complejidad en la preparación de las muestras. La importancia de su estudio se ve reflejado en la basta cantidad de métodos de preparación, purificación y caracterización que se han formulado, puesto que su uso combinado conduce a recrear, controlar y realizar seguimientos dinámicos de los sistemas que permiten simular los comportamientos membranales de suma importancia bajo un punto de vista práctico, tales como sus interacciones con el medio, tejidos y otras células, fenómenos de transporte, difusión de moléculas y afinidad biomolecular de anclaje.

Asimismo, la identificación hecha de las aplicaciones refleja la importancia y la relevancia del estudio de estos sistemas dado el potencial que poseen, principalmente en el ámbito clínico, dado que conocer y comprender a profundidad los fenómenos asociados a las membranas, permite abrir un camino para lograr manipularlas y controlarlas con el fin de formular tratamientos

terapéuticos focalizados, terapias genéticas y servir como plataforma para la evaluación de nuevos fármacos y diagnóstico para la identificación temprana de enfermedades. A futuro, su estudio no solo conduciría a un acercamiento a la realidad de dichos tratamientos, sino que contribuiría en grandes avances en química biomolecular, ampliando así el alcance y la aplicabilidad de esta ciencia en nuevas tecnologías terapéuticas, y adicionalmente, fomentaría la investigación hacia sistemas no estudiados, tal como la posibilidad de funcionalizar y encapsular sustancias a partir de bicapas lipídicas formadas por el rompimiento previo de exosomas mediante el control de fenómenos de adsorción/desorción.

Referencias bibliograficas

- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). *Liposome : classification , preparation , and applications*. 1–9.
- Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(1), 3–9. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.002>
- Anderson, W., Lane, R., Korbie, D., & Trau, M. (2015). Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability. *Langmuir*, 31(23), 6577–6587. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01402>
- Ballesteros, L. (2012). *Ensamblaje de moléculas orgánicas altamente conjugadas con potenciales aplicaciones en electrónica molecular*.
- Bhatia, T., Husen, P., Brewer, J., Bagatolli, L. A., Hansen, P. L., Ipsen, J. H., & Mouritsen, O. G. (2015). Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(12), 3175–3180. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.020>
- Biolin Scientific. (n.d.). *Characterization of lipid-based systems with QSense QCM-D*. 1–6.
- Booth, A. M., Fang, Y., Fallon, J. K., Yang, J. M., Hildreth, J. E. K., Gould, S. J., Sandefur, S., & Varthakavi, V. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 172(6), 923–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508014>

- Bunea, A. I., Harloff-Helleberg, S., Taboryski, R., & Nielsen, H. M. (2020). Membrane interactions in drug delivery: Model cell membranes and orthogonal techniques. *Advances in Colloid and Interface Science*, 281, 102177. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102177>
- Castellana, E. T., & Cremer, P. S. (2006). Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports*, 61(10), 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>
- Chen, Z., Wen, D., & Gu, Z. (2020). Cargo-encapsulated cells for drug delivery. *Science China Life Sciences*, 63(4), 599–601. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1653-y>
- Cho, N. J., Cho, S. J., Kwang, H. C., Glenn, J. S., & Frank, C. W. (2007). Employing an amphipathic viral peptide to create a lipid bilayer on Au and TiO₂. *Journal of the American Chemical Society*, 129(33), 10050–10051. <https://doi.org/10.1021/ja0701412>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Cunill Semanat, E. (2017). *Actividad en Membranas Modelo de Péptidos Apoptóticos*. 25–26.
- Dacic, M., Jackman, J. A., Yorulmaz, S., Zhdanov, V. P., Kasemo, B., & Cho, N. J. (2016). Influence of divalent cations on deformation and rupture of adsorbed lipid vesicles. *Langmuir*, 32(25), 6486–6495. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00439>
- Das, C. K., Jena, B. C., Banerjee, I., Das, S., Parekh, A., Bhutia, S. K., & Mandal, M. (2019). Exosome as a Novel Shuttle for Delivery of Therapeutics across Biological Barriers. In *Molecular Pharmaceutics* (Vol. 16, Issue 1, pp. 24–40). American Chemical Society.

<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00901>

de Freitas, C. F., Calori, I. R., da Silva, A. C. P., de Castro, L. V., Sato, F., Silva Pellosi, D., Tessaro, A. L., Caetano, W., & Hioka, N. (2019). PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175(September 2018), 530–544. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.031>

de Freitas, C. F., Calori, I. R., Tessaro, A. L., Caetano, W., & Hioka, N. (2019). Rapid formation of Small Unilamellar Vesicles (SUV) through low-frequency sonication: An innovative approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181(February), 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.027>

Deamer, D. (2017). The role of lipid membranes in life's origin. *Life*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/life7010005>

Dillon, S. R., Mancini, M., Rosen, A., & Schlissel, M. S. (2000). Annexin V Binds to Viable B Cells and Colocalizes with a Marker of Lipid Rafts upon B Cell Receptor Activation. *The Journal of Immunology*, 164(3), 1322–1332. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1322>

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. (n.d.). Retrieved May 7, 2021, from <http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/Ras/index.html>

Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780–788.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>

Eckmann, J., Eckert, S. H., Leuner, K., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2013). Mitochondria: Mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *45*(1), 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.009>

Egea-Jimenez, A. L., & Zimmermann, P. (2018). Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 59, Issue 9, pp. 1554–1560). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083964>

Elkhoury, K., Koçak, P., Kang, A., Arab-Tehrany, E., Ward, J. E., & Shin, S. R. (2020). Engineering smart targeting nanovesicles and their combination with hydrogels for controlled drug delivery. *Pharmaceutics*, *12*(9), 1–24. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090849>

Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J. I., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J. L., & Víg, L. (2015). Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Progress in Lipid Research*, *59*, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.003>

Ferhan, A. R., Yoon, B. K., Park, S., Sut, T. N., Chin, H., Park, J. H., Jackman, J. A., & Cho, N. J. (2019). Solvent-assisted preparation of supported lipid bilayers. *Nature Protocols*, *14*(7), 2091–2118. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0174-2>

Fitts, C. A., Ji, N., Li, Y., & Tan, C. (2019). Exploiting Exosomes in Cancer Liquid Biopsies and Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, *8*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801268>

- Fu, S., Wang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2020). Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. *NanoImpact*, 20(October), 100261. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100261>
- Gao, P., Yan, Z., & Zhu, Z. (2020). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.604240>
- Girard-Egrot, A. P., & Blum, L. J. (2007). Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, 23–74. https://doi.org/10.1007/0-387-37740-9_2
- Goksu, E. I., Hoopes, M. I., Nellis, B. A., Xing, C., Faller, R., Frank, C. W., Risbud, S. H., Satcher, J. H., & Longo, M. L. (2010). Silica xerogel/aerogel-supported lipid bilayers: Consequences of surface corrugation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1798, Issue 4, pp. 719–729). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.09.007>
- Gómez-Luna, E., Fernando-Navas, D., Aponte-Mayor, G., Luis, & Betancourt-Buitrago, A. (2014). Literature review methodology for scientific and information management, through its structuring and systematization Metodología para la revisión bibliográfica y la gestión de información de temas científicos, a través de su estructuración y sistematización. *DYNA*, 81(184), 158–163. <http://dyna.medellin.unal.edu.co/>
- Gouda, A., Sakr, O. S., Nasr, M., & Sammour, O. (2021). Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 61, p. 102174).

Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>

Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., & Simpson, R. J. (2015). A protocol for exosome isolation and characterization: Evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1295). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_15

Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>

Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release*, 207, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>

Hardy, G. J., Nayak, R., & Zauscher, S. (2013). Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(5), 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.06.004>

Has, C., & Sunthar, P. (2020a). A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 30(4), 336–365. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>

Has, C., & Sunthar, P. (2020b). A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 30(4), 336–365. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>

- Has, Chandra, & Pan, S. (2020). Vesicle formation mechanisms: an overview. *Journal of Liposome Research*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.1080/08982104.2020.1730401>
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 397–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609>
- Hood, J. L., Scott, M. J., & Wickline, S. A. (2014). Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Analytical Biochemistry*, 448(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.001>
- Ibrahim, A. G. E., Cheng, K., & Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*, 2(5), 606–619. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.04.006>
- Jahn, A., Stavis, S. M., Hong, J. S., Vreeland, W. N., Devoe, D. L., & Gaitan, M. (2010). Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. *ACS Nano*, 4(4), 2077–2087. <https://doi.org/10.1021/nn901676x>
- Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and analytical applications. In *Annual Review of Analytical Chemistry* (Vol. 1, Issue 1, pp. 801–832). Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747>
- Kanásová, M., & Nesměrák, K. (2017). Systematic review of liposomes' characterization methods. *Monatshefte Fur Chemie*, 148(9), 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-1994-9>
- Kanazawa, K., & Cho, N. J. (2009). Quartz crystal microbalance as a sensor to characterize

- macromolecular assembly dynamics. *Journal of Sensors*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/824947>
- Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P. H., & Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles: Line tension and transport. *Biophysical Journal*, 84(3), 1734–1749. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74981-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74981-9)
- Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhdanov, V. P., & Kasemo, B. (2000). Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Physical Review Letters*, 84(23), 5443–5446. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.84.5443>
- Keller, C. A., & Kasemo, B. (1998). Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal*, 75(3), 1397–1402. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)74057-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74057-3)
- Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A. K., Janssen, J. W. G., & Altevogt, P. (2011). Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *Journal of Translational Medicine*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-86>
- Kim, J. S. (2016). Liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46(4), 387–392. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0260-1>
- Kučerka, N., Nieh, M. P., Penczer, J., Harroun, T., & Katsaras, J. (2007). The study of liposomes, lamellae and membranes using neutrons and X-rays. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2006.11.006>
- Kurniawan, J., Ventrici De Souza, J. F., Dang, A. T., Liu, G. Y., & Kuhl, T. L. (2018). Preparation and Characterization of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed by Langmuir-Blodgett

- Deposition: A Tutorial. *Langmuir*, 34(51), 15622–15639.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03504>
- Lamichhane, T. N., Raiker, R. S., & Jay, S. M. (2015). Exogenous DNA loading into extracellular vesicles via electroporation is size-dependent and enables limited gene delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 12(10), 3650–3657. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00364>
- Lee, A. G. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1612, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00056-7)
- Li, J., Chen, X., Yi, J., Liu, Y., Li, D., Wang, J., Hou, D., Jiang, X., Zhang, J., Wang, J., Zen, K., Yang, F., Zhang, C. Y., & Zhang, Y. (2016). Identification and characterization of 293t cell-derived exosomes by profiling the protein, mRNA and microrna components. *PLoS ONE*, 11(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163043>
- Li, M., Chen, M., Sheepwash, E., Brosseau, C. L., Li, H., Pettinger, B., Gruler, H., & Lipkowski, J. (2008). AFM studies of solid-supported lipid bilayers formed at a Au(111) electrode surface using vesicle fusion and a combination of Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer techniques. *Langmuir*, 24(18), 10313–10323. <https://doi.org/10.1021/la800800m>
- 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>
- Lind, T. K., & Cárdenas, M. (2016). Understanding the formation of supported lipid bilayers via vesicle fusion—A case that exemplifies the need for the complementary method approach (Review). *Biointerphases*, 11(2), 020801. <https://doi.org/10.1116/1.4944830>

- Liu, Q., & Boyd, B. J. (2013). Liposomes in biosensors. *Analyst*, *138*(2), 391–409. <https://doi.org/10.1039/c2an36140j>
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1), 1–11. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>
- Luk, B. T., Fang, R. H., Hu, C. M. J., Copp, J. A., Thamphiwatana, S., Dehaini, D., Gao, W., Zhang, K., Li, S., & Zhang, L. (2016). Safe and immunocompatible nanocarriers cloaked in RBC membranes for drug delivery to treat solid tumors. *Theranostics*, *6*(7), 1004–1011. <https://doi.org/10.7150/thno.14471>
- Lyu, T. S., Ahn, Y., Im, Y. J., Kim, S. S., Lee, K. H., Kim, J., Choi, Y., Lee, D., Kang, E. S., Jin, G., Hwang, J., Lee, S. I., & Cho, J. A. (2021). The characterization of exosomes from fibrosarcoma cell and the useful usage of Dynamic Light Scattering (DLS) for their evaluation. *PLoS ONE*, *16*(11), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231994>
- Mager, M. D., & Melosh, N. A. (2007). Lipid bilayer deposition and patterning via air bubble collapse. *Langmuir*, *23*(18), 9369–9377. <https://doi.org/10.1021/la701372b>
- Maravillas-Montero, J. L., & Martínez-Cortés, I. (2017). Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas. *Revista Alergia México*, *64*(4), 463. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.285>
- Marrink, S. J., Corradi, V., Souza, P. C. T., Ingólfsson, H. I., Tieleman, D. P., & Sansom, M. S. P. (2019). Computational Modeling of Realistic Cell Membranes. *Chemical Reviews*, *119*(9), 6184–6226. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00460>

- Martins, T. S., Catita, J., Rosa, I. M., Da Cruz e Silva, O. A. B., & Henriques, A. G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198820>
- Miele, Y., Mingotaud, A. F., Caruso, E., Malacarne, M. C., Izzo, L., Lonetti, B., & Rossi, F. (2020). Hybrid giant lipid vesicles incorporating a PMMA-based copolymer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *March*, 129611. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129611>
- Miele, Y., Mingotaud, A. F., Caruso, E., Malacarne, M. C., Izzo, L., Lonetti, B., & Rossi, F. (2021). Hybrid giant lipid vesicles incorporating a PMMA-based copolymer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1865*(4), 129611. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129611>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30), 10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E., & Brisson, A. (2005). The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Letters*, *5*(2), 281–285. <https://doi.org/10.1021/nl048153y>
- Neisch, A. L., & Fehon, R. G. (2011). Ezrin, Radixin and Moesin: Key regulators of membrane-

- cortex interactions and signaling. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 377–382). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.011>
- Nickel, B. (2008). Nanostructure of supported lipid bilayers in water. *Biointerphases*, 3(3), FC40–FC46. <https://doi.org/10.1116/1.3007998>
- Pakdel, M., Raissi, H., & Shahabi, M. (2020). Predicting doxorubicin drug delivery by single-walled carbon nanotube through cell membrane in the absence and presence of nicotine molecules: a molecular dynamics simulation study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(5), 1488–1498. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1611474>
- Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J., & Wong, D. T. (2010). Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008577>
- Parkkila, P., Elderdfi, M., Bunker, A., & Viitala, T. (2018). Biophysical Characterization of Supported Lipid Bilayers Using Parallel Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Measurements. *Langmuir*, 34(27), 8081–8091. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01259>
- Peetla, C., Stine, A., & Labhasetwar, V. (2009). Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), 1264–1276. <https://doi.org/10.1021/mp9000662>
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019a). 9-038. Exosomes. *Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). 9-038. Exosomes.*
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019b). *Exosomes.*

- Peng, L. H., Zhang, Y. H., Han, L. J., Zhang, C. Z., Wu, J. H., Wang, X. R., Gao, J. Q., & Mao, Z. W. (2015). Cell Membrane Capsules for Encapsulation of Chemotherapeutic and Cancer Cell Targeting in Vivo. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(33), 18628–18637. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b05065>
- Penkauskas, T., & Preta, G. (2019). Biological applications of tethered bilayer lipid membranes. *Biochimie*, 157, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.011>
- Picas, L., Montero, M. T., Morros, A., Cabañas, M. E., Seantier, B., Milhiet, P. E., & Hernández-Borrell, J. (2009). Calcium-induced formation of subdomains in phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayers: A combined DSC, 31P NMR, and AFM study. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(14), 4648–4655. <https://doi.org/10.1021/jp8102468>
- Qiu, L., Zhang, T., Jiang, J., Wu, C., Zhu, G., You, M., Chen, X., Zhang, L., Cui, C., Yu, R., & Tan, W. (2014). Cell membrane-anchored biosensors for real-time monitoring of the cellular microenvironment. *Journal of the American Chemical Society*, 136(38), 13090–13093. <https://doi.org/10.1021/ja5047389>
- Rebaud, S., Maniti, O., & Girard-Egrot, A. P. (2014). Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations. In *Biochimie* (Vol. 107, Issue Part A, pp. 135–142). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.021>
- Reviakine, I., & Brisson, A. (2000). Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*, 16(4), 1806–1815. <https://doi.org/10.1021/la9903043>
- Richter, R., Mukhopadhyay, A., & Brisson, A. (2003a). Pathways of Lipid Vesicle Deposition on

- Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophysical Journal*, 85(5), 3035–3047. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74722-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74722-5)
- Richter, R., Mukhopadhyay, A., & Brisson, A. (2003b). Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophysical Journal*, 85(5), 3035–3047. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74722-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74722-5)
- Richter, R. P., Bérat, R., & Brisson, A. R. (2006). Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir*, 22(8), 3497–3505. <https://doi.org/10.1021/la052687c>
- Richter, R. P., & Brisson, A. (2004). QCM-D on mica for parallel QCM-D - AFM studies. *Langmuir*, 20(11), 4609–4613. <https://doi.org/10.1021/la049827n>
- Richter, R. P., & Brisson, A. R. (2005). Following the formation of supported lipid bilayers on Mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical Journal*, 88(5), 3422–3433. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053728>
- Rossetti, F. F., Bally, M., Michel, R., Textor, M., & Reviakine, I. (2005). Interactions between Titanium Dioxide and Phosphatidyl Serine-Containing Liposomes: Formation and Patterning of Supported Phospholipid Bilayers on the Surface of a Medically Relevant Material. *Langmuir*, 21(14), 6443–6450. <https://doi.org/10.1021/la0509100>
- Sancho-Albero, M., Encabo-Berzosa, M. D. M., Beltrán-Visiedo, M., Fernández-Messina, L., Sebastián, V., Sánchez-Madrid, F., Arruebo, M., Santamaría, J., & Martín-Duque, P. (2019). Efficient encapsulation of theranostic nanoparticles in cell-derived exosomes: Leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids. In *Nanoscale* (Vol. 11, Issue 40). <https://doi.org/10.1039/c9nr06183e>

- Sancho-Albero, M., Medel-Martínez, A., & Martín-Duque, P. (2020). Use of exosomes as vectors to carry advanced therapies. *RSC Advances*, *10*(40), 23975–23987. <https://doi.org/10.1039/d0ra02414g>
- Sancho-Albero, M., Rubio-Ruiz, B., Pérez-López, A. M., Sebastián, V., Martín-Duque, P., Arruebo, M., Santamaría, J., & Unciti-Broceta, A. (2019). Cancer-derived exosomes loaded with ultrathin palladium nanosheets for targeted bioorthogonal catalysis. *Nature Catalysis*, *2*(10), 864–872. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0333-4>
- Sato, Y. T., Umezaki, K., Sawada, S., Mukai, S. A., Sasaki, Y., Harada, N., Shiku, H., & Akiyoshi, K. (2016). Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Scientific Reports*, *6*(February), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep21933>
- Seantier, B., & Kasemo, B. (2009). Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption. *Langmuir*, *25*(10), 5767–5772. <https://doi.org/10.1021/la804172f>
- Shenoda, B. B., & Ajit, S. K. (2016). Modulation of immune responses by exosomes derived from antigen-presenting cells. In *Clinical Medicine Insights: Pathology* (Vol. 2016, pp. 1–8). Libertas Academica Ltd. <https://doi.org/10.4137/CPath.s39925>
- Siontorou, C. G., Nikoleli, G. P., Nikolelis, D. P., & Karapetis, S. K. (2017). Artificial lipid membranes: Past, present, and future. *Membranes*, *7*(3), 1–24. <https://doi.org/10.3390/membranes7030038>
- Sokolova, V., Ludwig, A. K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P. A., Epple, 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>
- Soltani, F., Parhiz, H., Mokhtarzadeh, A., & Ramezani, M. (2015). Synthetic and Biological Vesicular Nano-Carriers Designed for Gene Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 21(42), 6214–6235. <https://doi.org/10.2174/1381612821666151027153410>
- Sundar, S. K., & Tirumkudulu, M. S. (2014). Synthesis of sub-100-nm liposomes via hydration in a packed bed of colloidal particles. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(1), 198–205. <https://doi.org/10.1021/ie402567p>
- Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
- Tan, S., Wu, T., Zhang, D., & Zhang, Z. (2015). Cell or cell membrane-based drug delivery systems. *Theranostics*, 5(8), 863–881. <https://doi.org/10.7150/thno.11852>
- Tanaka, M., & Sackmann, E. (2006). Supported membranes as biofunctional interfaces and smart biosensor platforms. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 203(14), 3452–3462. <https://doi.org/10.1002/pssa.200622464>
- Tawa, K., & Morigaki, K. (2005). Substrate-supported phospholipid membranes studied by surface plasmon resonance and surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, 89(4), 2750–2758. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.065482>
- Ter-Ovanesyan, D., Kowal, E. J. K., Regev, A., Church, G. M., & Cocucci, E. (2017). Imaging of Isolated Extracellular Vesicles Using Fluorescence Microscopy. *Methods in Molecular*

Biology (Clifton, N.J.), 1660, 233–241. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_19

Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J., & Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383–2390. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>

Torrelló, M., Viscasillas, A., & Del Pozo, A. (2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *Offarm*, 21(9), 188–190.

van der Pol, E., Coumans, F. A. W., Grootemaat, A. E., Gardiner, C., Sargent, I. L., Harrison, P., Sturk, A., van Leeuwen, T. G., & Nieuwland, R. (2014). Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(7), 1182–1192. <https://doi.org/10.1111/jth.12602>

Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>

Vaswani, K., Mitchell, M. D., Holland, O. J., Qin Koh, Y., Hill, R. J., Harb, T., Davies, P. S. W., & Peiris, H. (2019). A Method for the Isolation of Exosomes from Human and Bovine Milk. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/5764740>

Veatch, S. L., Polozov, I. V., Gawrisch, K., & Keller, S. L. (2004). Liquid Domains in Vesicles Investigated by NMR and Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 86(5), 2910–2922. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74342-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74342-8)

Venable, R. M., Krämer, A., & Pastor, R. W. (2019). Molecular Dynamics Simulations of

- Membrane Permeability. *Chemical Reviews*, 119(9), 5954–5997.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00486>
- WANG, X. J., MU, W., & HAN, X. J. (2019). Preparation Methods for Phospholipid Vesicle Arrays and Their Applications in Biological Analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 47(8), 1134–1144. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61179-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61179-5)
- Wang, Y., Gkeka, P., Fuchs, J. E., Liedl, K. R., & Cournia, Z. (2016). DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(11), 2846–2857. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.005>
- Wang, Z., Hu, N., Yeh, L. H., Zheng, X., Yang, J., Joo, S. W., & Qian, S. (2013). Electroformation and electrofusion of giant vesicles in a microfluidic device. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.042>
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays in Biochemistry*, 59, 43–70.
<https://doi.org/10.1042/BSE0590043>
- Welker, M. W., Reichert, D., Susser, S., Sarrazin, C., Martinez, Y., Herrmann, E., Zeuzem, S., Piiper, A., & Kronenberger, B. (2012). Soluble serum CD81 is elevated in patients with chronic hepatitis c and correlates with alanine aminotransferase serum activity. *PLoS ONE*, 7(2), 30796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030796>
- Xu, Z., Gao, L., Chen, P., & Yan, L. T. (2020). Diffusive transport of nanoscale objects through cell membranes: a computational perspective. *Soft Matter*, 16(16), 3869–3881.
<https://doi.org/10.1039/c9sm02338k>
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013).

- Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 65, Issue 3, pp. 336–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
- Yuana, Y., Oosterkamp, T. H., Bahatyrova, S., Ashcroft, B., Garcia Rodriguez, P., Bertina, R. M., & Osanto, S. (2010). Atomic force microscopy: A novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(2), 315–323. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x>
- Zawisza, I., Bin, X., & Lipkowski, J. (2007). Potential-driven structural changes in Langmuir-Blodgett DMPC bilayers determined by in situ spectroelectrochemical PM IRRAS. *Langmuir*, 23(9), 5180–5194. <https://doi.org/10.1021/la063190l>
- Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. V. (2015). Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4), 319–323. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074476>
- Zimmerberg, J., & Gawrisch, K. (2006). *NatChBio_2006_Phys-Chem_membranes_Gawrisch*. 2(11), 564–567.
- Zucker, D., Marcus, D., Barenholz, Y., & Goldblum, A. (2009). Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. *Journal of Controlled Release*, 139(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.036>

Apéndice

Apéndice A: Información complementaria para los sistemas exosómicos

Factores que alteran la biogénesis exosomal

Los mecanismos de biogénesis exosomal se ven alterados por diferentes factores: uno de ellos es la forma de los lípidos presentes en la membrana, en el caso de los fosfolípidos como los lisofosfolípidos o el ácido fosfatídico; su forma cónica inversa promueve el mecanismo de biogénesis (Pegtel & Gould, 2019^a; Egea-Jimenez & Zimmermann, 2018). Por otro lado, el tipo de célula de origen altera la producción de exomas, tal como se evidencia en las células madre mesenquimales, en donde la producción de exomas es significativamente mayor que la producción dada a partir de células dendríticas inmaduras (Tian et al., 2014; Yeo et al., 2013). De igual forma sucede con la presencia de diversos estimulantes, como los son los ionóforos, encargados del transporte de cationes de calcio a través de la membrana exosomal, los cuales inducen la secreción de nanovesículas extracelulares (Gurunathan et al., 2019; Yeo et al., 2013).

Contenido exosómico

Al ser nanovesículas provenientes de células, son ricas en una amplia variedad de moléculas (ver **Figura A.2.1** Nota. Esquema representativo de la composición exosomal.). Según un estudio realizado en el 2016, se han reportado en total alrededor de 3000 proteínas presentes en diferentes exomas (J. Li et al., 2016). Cabe aclarar que, debido al tamaño de los exomas, estos no pueden contener una alta cantidad de proteínas como es el caso de los exomas secretados por presentadores de antígeno, los cuales contienen altos niveles de proteínas MHC de clase II y

proteínas co-estimuladoras, mientras que los exosomas liberados de otros tipos de células carecen de estas proteínas (Pegtel & Gould, 2019b; Shenoda & Ajit, 2016).

Para comprender y profundizar aún más en el contenido exosómico, éste se subdivide en dos subtemas: la composición de la membrana y la composición interna del exosoma.

Composición de la membrana. La membrana de los exosomas está compuesta principalmente por una bicapa de lípidos, en los cuales se encuentran ancladas covalentemente diferentes tipos de proteínas que provienen de la membrana plasmática de origen. De igual forma, la corteza interna de los exosomas es rica en proteínas que unen sus colas citoplasmáticas entre sí. Los lípidos que se encuentran ubicados en la membrana del exosoma son los encargados de formar la bicapa lipídica que representa la base de la membrana exosomal. Dentro de los lípidos reportados se encuentran ES, CE, fosfatidicolina (PC), fosfatidiserina (PS), fosfatidietilamina (PE), colesterol (COL), glicosilfosfatidilinositol (GPI) y gangliósidos (GL), dentro de los cuales PC, PE, COL y GPI hacen parte de los lípidos que se comportan como punto de anclaje de algunas proteínas (Pegtel & Gould, 2019a). En adición, cabe resaltar que según lo reportado por varios autores, la bicapa lipídica en su exterior está formada mayoritariamente por PS y PE (Booth et al., 2006; Dillon et al., 2000).

Dentro de los tipos de proteínas es posible encontrar proteínas periféricas, capaces de transmitir señales complejas autocrinas y paracrinas como las proteínas de matriz celular y las tetraspaninas (CD81, CD82, CD63, CD37), encargadas de aportar estabilidad a la membrana y de la oligomerización de otras proteínas presentes en esta (Hemler, 2003; Pegtel & Gould, 2019a). Asimismo, se encuentran proteínas internas aciladas como RAS, que desempeñan un papel muy importante en las rutas de transducción de señales implicadas en el crecimiento y la diferenciación

celular (*Dpto. Bioquímica y Biología Molecular*, n.d.), proteínas retrovirales, proteínas de transporte, proteínas inhibidoras, integrinas e integrales, donde estas últimas son las encargadas de la adhesión y entrega sitio dirigida de las señales (Pegtel & Gould, 2019a).

Composición interna del exosoma. Al ser de origen celular, el exosoma internamente contiene una amplia gama de moléculas dentro de las que se encuentran: enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y material genético. Las enzimas son las encargadas del metabolismo y modificación del contenido exosomal, mientras que las proteínas son responsables de producir células cuando se encuentran en un medio ambiente que provoca cualquier tipo de estrés (HSC70/HSP90)¹, proveer soporte interno en las células, organizar las estructuras internas e intervenir en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular, regular la transducción de señales y localizar determinadas moléculas en áreas específicas de la célula o exosoma (Scaffolding, ezrin-radixin-moesin (ERM)²)(Neisch & Fehon, 2011). De igual forma, el material genético correspondiente a las cadenas de ARN y ADN provenientes de las células de origen son las encargadas de alterar la expresión de una célula vecina y contener o expresar determinados genes (Pegtel & Gould, 2019a).

El contenido exosómico se analiza por medio de diferentes técnicas de caracterización, donde es posible encontrar biomarcadores que pueden ser proteínas, lípidos, enzimas o material genético. Los biomarcadores determinan el origen de las nanovesículas, estableciendo si provienen de células tumorales benignas o malignas, tejidos y determinados órganos, haciendo a estas

¹ HSC70/HSP90: Proteínas de choque térmico.

² ERM – Ezrin-radixin-moesin: Proteínas reguladoras de señales e intermediarias en la interacción de la membrana y corteza celular.

nanovesículas llamativas para la realización de diagnósticos clínicos y analizar el estado patológico de su origen. (Gurunathan et al., 2019) (ver **Figura A.2.2**).

Figura A.2. 1.

Esquema representativo de la composición exosomal.

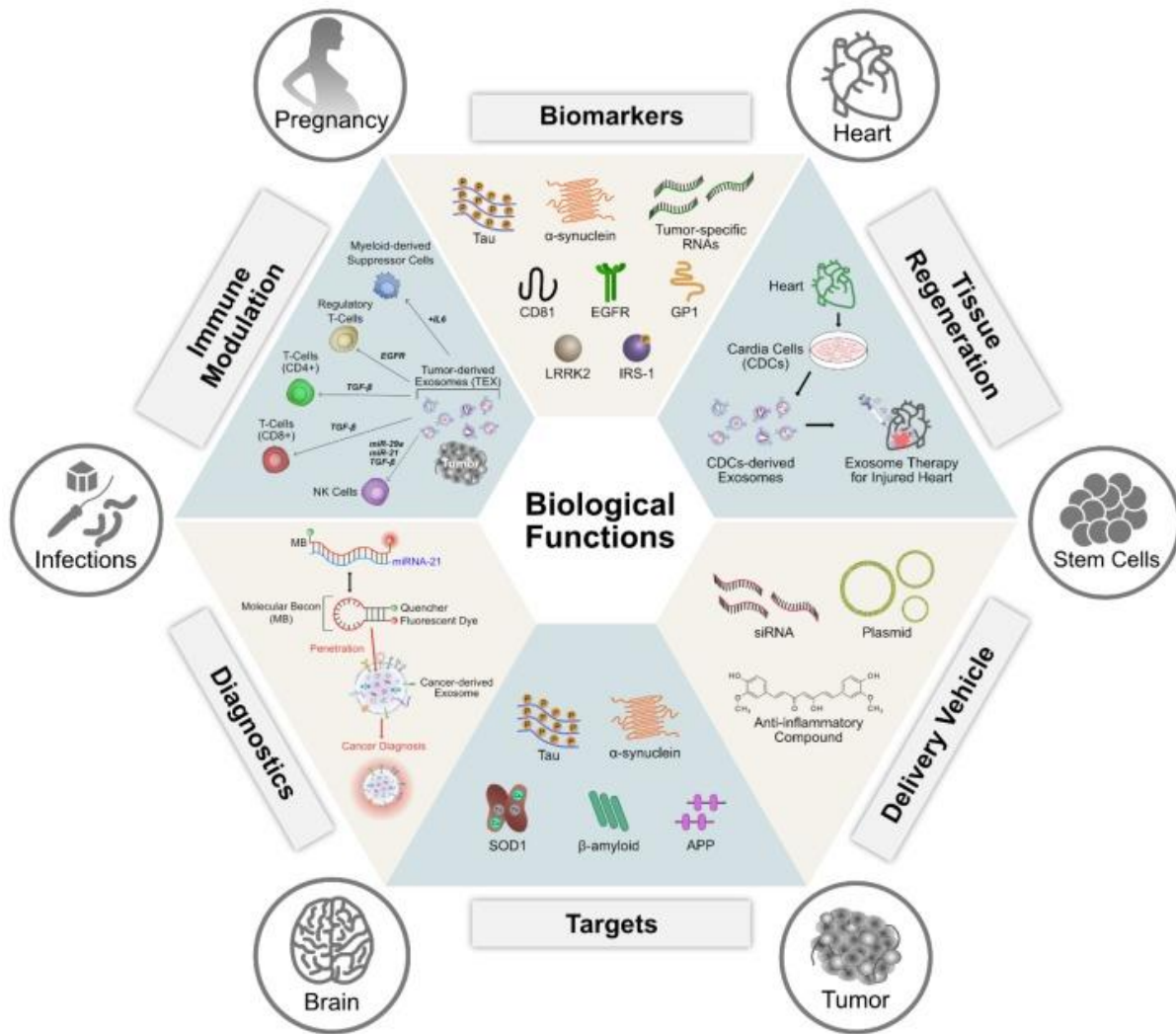


Nota. Esquema representativo de la composición exosomal. Adaptado de Pegtel & Gould, (2019^a); Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, (2017); Gurunathan et al., (2019).

En la **Figura A.2.2** es posible observar y relacionar algunos biomarcadores con su origen, por ejemplo, en el caso en el que se encuentre la proteína tetraspanina CD81, se deduce que hay fibrosis en el tejido o que hay sospecha de hepatitis C (Welker et al., 2012); asimismo, al detectar la presencia de determinadas cadenas de mi-RNA, se puede inferir que se están desarrollando células cancerígenas en el pulmón, próstata, faringe, entre otros órganos, ya que este tipo de carga participa activamente en procesos de metástasis y angiogénesis celular (Gurunathan et al., 2019; Mitchell et al., 2008).

Figura A.2. 2.

Esquema resumen acerca del contenido y biomarcadores exosomales.



Nota: Tomado de Gurunathan et al., (2019).

Métodos de obtención de exosomas

Entre la variedad de técnicas reportadas en la literatura (ver **Figura B.3.1.A**) se destacan las metodologías basadas en tratamientos de *ultracentrifugación*, en donde la muestra es sometida a fuerzas centrífugas hasta miles de veces el valor de la gravedad (Vaswani et al., 2019). Gracias a la acción de esta fuerza sobre la muestra, ésta es separada en sus constituyentes en donde es

posible la purificación exosómica de lipopartículas, complejos proteicos y contaminantes presentes. Si bien se han reportado variaciones en la técnica como la *ultracentrifugación diferencial*, en donde la muestra es ultracentrifugada en varios pasos obteniéndose exosomas más puros, la técnica sigue presentando inconvenientes a la hora de postularse como candidata para trasladarse a aplicaciones en tratamientos clínicos, debido a la cantidad excesiva de tiempo empleado para lograr una purificación aceptable y el alto costo de la instrumentación involucrada (P. Li et al., 2017).

Otras técnicas de purificación se han propuesto con el fin de minimizar el tiempo empleado en dicho proceso y reducir los costos de instrumentación, como la *ultrafiltración*, que se basa en tamizado por tamaño a través de una membrana con tamaños de poro desde la escala nanométrica hasta la micrométrica. Esta técnica, separa los exosomas presentes en la muestra por su tamaño, el cual le permite atravesar el poro de la membrana y así separarse de las demás sustancias presentes (Lobb et al., 2015). Sin embargo, este tamizado no proporciona una separación única de los exosomas de la muestra debido al pobre control que hay sobre las sustancias que pueden atravesar la membrana, puesto que independientemente de que material sea, si posee un tamaño menor al tamaño de poro, éste se filtrará y reducirá el nivel de pureza de los exosomas obtenidos (Zerlinger et al., 2015).

Nuevas técnicas han sido reportadas en la literatura para la purificación exosómica tales como la *cromatografía por exclusión de tamaño* o la *precipitación polimérica* (en inglés, descritas como *Size-Exclusion Chromatography* y *Polymer precipitation*), en donde estos son separados de la muestra haciendo uso de geles filtrantes y polímeros respectivamente (Martins et al., 2018; Vaswani et al., 2019). La separación ocurre principalmente debido a que los exosomas son

“atrapados” en las redes matriciales de las sustancias usadas. Según lo enunciado en la literatura, estas técnicas son candidatas especiales para trasladarse a aplicaciones clínicas debido a la practicidad y nivel de pureza alcanzado, aunque por otro lado, las sustancias utilizadas en la separación deben ser previamente evaluadas, puesto que pueden quedar rezagos de estas en los exosomas, que luego al entrar al cuerpo humano pueden aumentar la respuesta autoinmune inutilizando el tratamiento (Ibrahim et al., 2014).

Las técnicas mencionadas son realizadas debido a las propiedades físicas de los exosomas, por lo otro lado, cada exosoma liberado por una célula tiene asociado consigo receptores específicos los cuales son usados para guiarse y localizar los objetivos en donde deben llevar a cabo el propósito de su segregación; estos receptores en su membrana celular es la razón por la cual es método de *inmunofinidad* fue propuesto. Esta técnica aprovecha la afinidad bioquímica que existe entre las proteínas receptoras presentes en la membrana exosómica y su respectivo anticuerpo. Dependiendo de la naturaleza de los exosomas a purificar, pequeñas perlas magnéticas son recubiertas con anticuerpos con el fin de que cuando estén en contacto, los exosomas se acoplen por la interacción ligando – receptor para posteriormente ser separados del medio haciendo uso de un campo magnético externo (Greening et al., 2015).

Encapsulación exosómica

Las técnicas mencionadas fueron utilizadas por Sancho-Albero María et al. para el encapsulamiento de nanopartículas huecas de oro en exosomas producidos por células cancerígenas, con el fin de evaluar su potencial uso en tratamiento de hipertermia gracias a que el oro nanométrico absorbe radiación infrarroja. Las nanopartículas fueron sintetizadas y posteriormente cargadas por los diferentes métodos, obteniendo resultados de encapsulación del:

7% en *electroporación*, 9,1% 18,2% en *tratamiento de choque térmico*, 13,7% y 16,4% en *difusión pasiva* en ausencia y en presencia de detergentes. El uso de esta última sustancia en el medio de carga promueve la generación de poros por la interacción con el colesterol presente en la membrana. Adicionalmente, en dicho estudio hicieron uso de otras técnicas tales como la *sonicación*, en donde por medio de ultrasonido lograron encapsular las nanopartículas con una eficiencia del 19,3%. Por otro lado, los autores reportaron una significativa mejoría en la eficiencia cuando pasaron de encapsular las nanopartículas directamente en los exosomas a aplicar tratamientos en las células excretoras. Al manipular inicialmente las nanopartículas con moléculas de polietilenglicol para formar un híbrido, éstas fueron incubadas en un medio en presencia de células cancerígenas; posteriormente fueron aislados los exosomas y se determinó una eficiencia de encapsulación por encima del 50% (Sancho-Albero, Encabo-Berzosa, et al., 2019).

Finalmente, un novedoso método de encapsulación fue realizado en el 2019, en el cual iones de paladio⁺² fueron tratados en *incubación - ultracentrifugación* con exosomas derivados de células cancerígenas y que posteriormente fueron reducidos en una atmósfera de CO, con el fin de formar láminas nanoestructuradas de paladio⁰. Según los autores, el sistema exosómico reportado posee características terapéuticas atractivas para tratar el crecimiento de las células cancerígenas parentales de los exosomas (Sancho-Albero, Rubio-Ruiz, et al., 2019).

Técnicas de caracterización exosómica

En la técnica de *análisis de seguimiento (NTA)*, las lecturas de distribución de tamaño de partículas en suspensión se llevan a cabo a través de la luz dispersada por éstas y por su medida de velocidad. Sus medidas están intrínsecamente relacionadas con el movimiento Browniano que a través de correlaciones y con ayuda del seguimiento análisis de imágenes obtenidas por un sistema

microscopio-cámara, se logran obtener medidas de distribución e ilustraciones de la suspensión. Por otro lado, la técnica de *dispersión dinámica (DLS)* facilita la medición con mayor sensibilidad, basándose en las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada por las partículas en suspensión. Sin embargo, no provee imágenes en tiempo real de la solución analizada y en una distribución no homogénea de partículas, es decir, partículas de diferente tamaño se pueden inducir errores en la medición (Gurunathan et al., 2019; Szatanek et al., 2017).

La técnica de *citometría de flujo* como las 2 técnicas anteriormente mencionadas, también se basa en la luz dispersada debido al movimiento browniano de las partículas, sin embargo, las partículas medidas a través de esta técnica son marcadas con materiales fluorescentes, lo que provee de información extra para la determinación de la distribución de tamaño. El marcado de los exosomas se da a través del uso de anticuerpos que logran acoplarse a través de las interacciones ligando – receptor como se mencionó en la técnica de purificación de *inmunofluorescencia*. Gracias a esto, esta técnica no solo brinda información del tamaño sino también se logra identificar la proveniencia de los exosomas estudiados, puesto que los anticuerpos usados son escogidos para acoplarse a unos exosomas en específico, dependiendo de la célula por la cual fueron producidos (Szatanek et al., 2017).

En la técnica de *detección de pulso (TRPS)*, el tamaño de los exosomas es correlacionado con la resistividad que estos poseen al paso de la corriente eléctrica. Haciendo pasar las partículas en suspensión a través de un poro a escala nanométrica que permita el paso individual de los exosomas entre dos electrodos por los cuales fluye corriente, se inducirá una resistencia debido a la obstrucción del flujo de electrones. La intensidad de la resistividad está asociada con el tamaño de la partícula que ha pasado por el poro (Anderson et al., 2015).

En *AFM*, los exosomas son suspendidos en un sustrato soporte y posteriormente, a través de barridos de superficie, las lecturas morfológicas son tomadas en modo no contacto por el paso de una punta fluctuante. Las fuerzas de Van der Waals provocadas por la interacción entre la superficie y la punta, son leídas a través de un sistema láser – fotodetector, lo que es correlacionado para construir una imagen de la superficie analizada. Por otro lado, en *TEM* los exosomas son bombardeados por un haz de electrones en vacío, obteniendo imágenes de alta resolución con la cual se pueden determinar los diámetros, cargas y morfología de los exosomas visualizados. Sin embargo, los exosomas deben ser laboriosamente preparados para que la muestra sea utilizable bajo las condiciones del microscopio, lo que puede inducir a cambios en sus propiedades; por esto, se ha implementado esta microscopía bajo condiciones criogénicas con nitrógeno líquido, evitando pasos en la preparación de la muestra tal como la deshidratación; este congelamiento provoca que los exosomas mantengan su estado como si estuvieran en su medio natural (Szatanek et al., 2017).

En la **Figura B.3.1A** se destacan tanto los métodos de preparación como caracterización vesicular.

Apéndice B: Información complementaria de los sistemas vesiculares

Factores que afectan la preparación vesicular

El proceso de formación de vesículas se ve afectado por una serie de parámetros que alteran la energía de borde y curvatura/flexión de la bicapa lipídica. Dentro de estos factores, la temperatura juega un papel muy importante, ya que posee una relación de proporcionalidad directa con el tamaño vesicular, es decir, el aumento de temperatura ejerce un efecto positivo en la energía de borde o capacidad de las colas hidrofóbicas que forman la bicapa de estar presente en un medio acuoso, haciendo que el disco de bicapa lipídica crezca aún más, y en el punto en donde termodinámicamente la energía de borde sea mayor a la energía de curvatura, el disco se doblará y cerrará formando una vesícula de mayor diámetro. Por otro lado, la carga de los lípidos que forman la bicapa contribuye a la carga superficial de la membrana vesicular, ya que una alta concentración de lípidos cargados genera la repulsión entre sus cabezas disminuyendo las ondulaciones de la membrana y aumentando la rigidez de las vesículas. En adición, la composición de los lípidos como en el caso del colesterol, aumentan la rigidez a la flexión de las membranas con cadenas saturadas y monoinsaturadas (Chandra Has & Pan, 2020).

Métodos de preparación de vesículas

A medida que transcurren los años, se han implementado diferentes técnicas de formación nanovesicular teniendo como base el método de autoensamblaje molecular (ver **Figura B.3.1.A**), tal como el método de hidratación lipídica, el cual posee una amplia gama de variaciones que conducen a diferentes cepas de vesículas. En general, este método está basado en el crecimiento vesicular a partir de una bicapa fosfolipídica ya formada por acción del medio acuoso. Inicialmente, se deben disolver los fosfolípidos en solventes o mezclas de solventes orgánicos y

posteriormente ser expuestos a una evaporación a baja presión. Al evaporar los solventes, los fosfolípidos se organizan en múltiples bicapas en el fondo del recipiente. Finalmente, se debe agregar un medio acuoso el cuál se filtrará a través de la bicapa más externa, despegándola de las demás y por medio del crecimiento descrito anteriormente y con ayuda de fuerzas mecánicas de agitación como la sonicación, ésta cambiará su configuración morfológica por aquella termodinámicamente más estable, es decir, en vesículas (C. Has & Sunthar, 2020b).

Como se mencionó, esta técnica posee variaciones metodológicas que se reflejan en el tamaño y la distribución de las vesículas obtenidas y como también, el nivel de encapsulamiento alcanzado. Lo anterior se debe a que las vesículas pueden ser cargadas en su interior con alguna otra sustancia en el transcurso de su formación. En este sentido, estas metodologías propuestas en la literatura enuncian procesos de calentamiento funcionalizado con glicerol para aportar estabilidad vesicular, cambios bruscos en el pH o choques osmóticos en el medio con el fin de romper y reestructurar vesículas previamente formadas y a su vez, hidrataciones a temperaturas criogénicas o a través de la formación de emulsiones con cambios de los medio acuosos y aceitosos usados. Todas estas variaciones metodológicas se traducen en diferentes tamaños vesiculares que van desde 20 nm hasta varias unas pocas micras de diámetro (C. Has & Sunthar, 2020b).

Por otra parte, otras técnicas de asistencia se han propuesto para el crecimiento vesicular encadenado a la hidratación, tal como el método de lecho empacado en la cual los fosfolípidos se hacen pasar a través de un lecho con pequeñas partículas de alúmina, donde son adsorbidos y posteriormente transformados en vesículas al hacer pasar un medio acuoso (Sundar & Tirumkudulu, 2014), el método de crecimiento asistido por gel con el cual se mejora la transferencia de masa acuosa hacia los fosfolípidos con ayuda de polímeros, método de

crecimiento por irradiación, método de hidratación sobre perlas de vidrio, método de calentamiento, liofilización, entre otros más (C. Has & Sunthar, 2020b). En adición, se ha reportado el crecimiento de vesículas haciendo uso de microfluidos, con el fin de controlar la formación de las vesículas debido a las pequeñas muestras que son usadas. Sin embargo, estas metodologías pueden presentar desventajas dependiendo de la naturaleza de los fosfolípidos usados o demás factores que se discutirán en la sección posterior, que van desde bajo encapsulamiento, contaminación, baja reproducibilidad y poco control en la distribución de tamaño (C. Has & Sunthar, 2020b).

En adición al método de hidratación, existe el método de formación de vesículas haciendo uso de corriente eléctrica, conocido como electroformación (Z. Wang et al., 2013); en este método, los fosfolípidos son adecuados en múltiples bicapas como ya se mencionó, pero con la diferencia que la transición de bicapa a vesícula se da por la inducción de corriente eléctrica entre 2 electrodos en un medio electrolítico. El tránsito de corriente a través de este sistema induce la formación de un campo eléctrico que reorienta y redistribuye las cargas presentes en la bicapa, haciendo que se flexione y promoviendo la transfiguración hacia las vesículas. El tipo de corriente utilizado es preferencialmente la corriente alterna puesto que genera burbujeo adicional en el medio, lo que favorece el rompimiento de la bicapa en discos (C. Has & Sunthar, 2020b; Chandra Has & Pan, 2020).

Finalmente, el método de inyección de etanol se basa en la inyección de una solución orgánica (etanol/lípidos) a una solución acuosa/buffer, bajo estrictos parámetros de temperatura, velocidad de inyección, velocidad agitación, pH, viscosidad de la solución acuosa, entre otros. Asimismo, se han diseñado diferentes variaciones del anterior método, diseñando un sistema de

microcanales con el fin de generar una interfase de transferencia de masa entre la solución acuosa y la solución orgánica de lípidos, logrando así, la producción de SUVs y LUVs con alta eficiencia de encapsulación. Gracias a sus resultados, este método ha sido modificado para llegar a ser un proceso escalable industrialmente (Gouda et al., 2021).

Métodos adicionales de caracterización vesicular

La caracterización de las vesículas no es tarea fácil, debido a su tamaño nanométrico y composición química. Aun así, se han reportado una variedad de técnicas con las que se puede determinar la distribución de tamaño, morfología, composición química y entre otras propiedades de interés dentro de este campo de estudio (ver **Figura B.3.1.B**).

Dentro de las técnicas de caracterización implementadas, se encuentran las técnicas de microscopía tales como *AFM*, *SEM* y *TEM* (de Freitas, Calori, da Silva, et al., 2019; Reviakine & Brisson, 2000). A través de ellas es posible obtener información morfológica, diámetro y curvatura vesicular gracias a las imágenes en alta resolución y gran sensibilidad a tan pequeña escala. Por otro lado, técnicas más sencillas como la *microscopía óptica* han sido usadas para obtener imágenes a escala de las vesículas apoyándose de materiales fluorescentes (Bhatia et al., 2015), es decir, haciendo uso de marcadores, las vesículas son tinturadas para mejorar la imagen obtenida a través del microscopio y así determinar su morfología y su diámetro vesicular (Miele et al., 2020).

Por otro lado, investigadores reportan el uso de técnicas de dispersión de luz para conocer la distribución del tamaño de las vesículas formadas en sus estudios como las que fueron mencionadas en los exosomas. Sin embargo, la técnica más reportada es la *dispersión dinámica de luz (DLS)*, con la cual es posible determinar con una alta sensibilidad los diferentes posibles

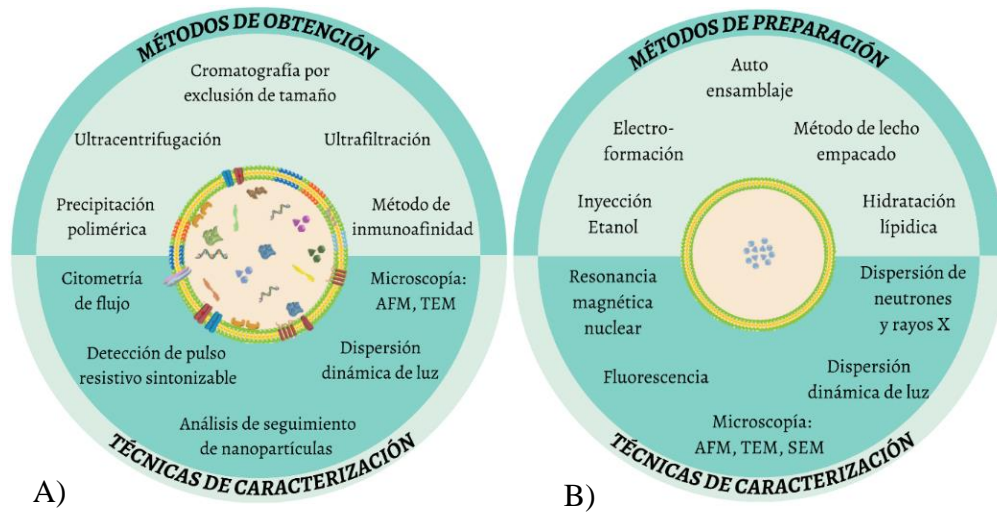
tamaños de las vesículas dispersadas en solución (de Freitas, Calori, Tessaro, et al., 2019; Kanášová & Nesměrák, 2017).

Para caracterizar las vesículas y la bicapa fosfolipídica de la cual están formadas, se han utilizado técnicas de *dispersión de rayos X* y *de neutrones* (Kučerka et al., 2007), (Nickel, 2008). Estas técnicas se basan en la cuantificación de la intensidad de un haz de rayos X / neutrones al interactuar con las moléculas de los fosfolípidos que constituyen el cuerpo de las vesículas, proveyendo información de interés en cuanto a cristalinidad, espesor y composición de la bicapa (Lind & Cárdenas, 2016). La técnica de *dispersión de neutrones* se superpone por encima de la de *rayos X* debido a que estos son capaces de atravesar más profundamente y con mayor facilidad las moléculas de la bicapa aun estando en solución (Kučerka et al., 2007). Otras técnicas para caracterizar la composición de la membrana y la presencia de dominios lipídicos son los diferentes análisis de *resonancia magnética nuclear*: basada en la detección de fósforo (Picas et al., 2009), hidrógeno (o protónica) y carbono (Miele et al., 2020).

En la **Figura B.3.1.B** se destacan tanto los métodos de preparación como caracterización vesicular.

Figura B.3. 1.

Esquema resumen acerca de A) los métodos de obtención y caracterización exosomal. B) los métodos de preparación y técnicas de caracterización vesicular.



Nota. Adaptado de A) (Vaswani et al., 2019; Lobb et al., 2015; Martins et al., 2018; Vaswani et al., 2019; Lamichhane et al., 2015; Gurunathan et al., 2019); Szatanek et al., 2017; Anderson et al., 2015). B) Reviakine & Brisson, (2000); ; Kučerka et al., (2007); Nickel, (2008); Bhatia et al., (2015); Kanásová & Nesměrák, (2017); de Freitas, Calori, da Silva, et al., (2019); Chandra Has & Pan, (2020); C. Has & Sunthar, (2020); Miele et al., (2020).

Apéndice C: Información complementaria de bicapas lipídicas

Factores que alteran la formación de bicapas lipídicas

El método de fusión de vesículas a pesar de poseer las ventajas expuestas, tiene ciertas restricciones con respecto a la naturaleza de los componentes lipídicos que la conforman. De manera análoga a los factores que alteran la preparación de vesículas, ciertos parámetros experimentales influyen en la formación de SLB, tal es el caso de la temperatura, pH, fuerza iónica, estrés osmótico, naturaleza de soporte, concentración lipídica y tamaño vesicular (Hardy et al., 2013).

La temperatura juega un papel muy importante en la estabilidad de las vesículas como en la formación de las bicapas lipídicas soportadas, ya que, si la temperatura supera la temperatura de transición (T_m) de los lípidos que la conforman, las vesículas serán inestables debido a que se llega a una fase fluida desordenada, de tal forma que las vesículas alcanzan el valor de cobertura vesicular crítica en menor tiempo, favoreciendo así su deformación y posterior formación de SLB. Por el contrario, si al obtener la SLB se disminuye la temperatura por debajo de la T_m , se obtendrá una bicapa lipídica de mayor rigidez y estabilidad. Cabe aclarar, que la temperatura de transición depende de la naturaleza de la mezcla de lípidos implementados en la preparación de las vesículas (Hardy et al., 2013; Y. Wang et al., 2016).

Al alterar el pH de la solución buffer en la que se encuentran las vesículas, se disminuyen las fuerzas electrostáticas de repulsión entre las cabezas lipídicas de la superficie de la membrana, promoviendo la atracción entre la superficie del soporte y las vesículas, como su deformación y posterior ruptura, dando lugar a la formación de SLB. De igual forma ocurre con la fuerza iónica de la solución buffer; siendo ésta alterada por una mínima concentración de cationes divalentes

como Mg^{2+} , Ca^{2+} o Sr^{2+} , los cuales se adsorben en la superficie del grupo de la cabeza hidrofílica, aumentando el potencial de la superficie lipídica y las fuerzas de atracción entre las vesículas y el sustrato sólido de carga negativa (Dacic et al., 2016; Hardy et al., 2013; Reviakine & Brisson, 2000). Por otro lado, al generar un gradiente de fuerza iónica a través de la membrana vesicular e implementar vesículas de menor tamaño (50-100nm), aumenta la tensión de la membrana, promoviendo una diferencia en la presión osmótica que da lugar a la ruptura de las vesículas y por consiguiente a la fusión y formación de SLB (Hardy et al., 2013; Seantier & Kasemo, 2009).

Por otro lado, la naturaleza del soporte desempeña un papel indispensable en la formación de bicapas, ya que es sobre la superficie de éste donde se llevará a cabo su proceso de formación, razón por la cual es importante conocer sus propiedades como la rugosidad, hidrofiliidad, carga superficial, entre otras. Con respecto a la rugosidad, según lo reportado en R. P. Richter et al., la formación de bicapas lipídicas se ve afectada a nivel nanométrico por la rugosidad del soporte, no obstante, según un estudio realizado por Mornet et al. se determinó que la bicapa se acopla idealmente a la superficie de una partícula de sílice, aún en los lugares en donde se encuentran pequeñas rugosidades a escala nanométrica (Mornet et al., 2005; R. Richter et al., 2003a).

Como se mencionó anteriormente, las propiedades fisicoquímicas de la superficie del soporte como la carga y la afinidad con agua o hidrofiliidad, propician la adhesión, movilidad y adsorción vesicular, fenómenos claves en el proceso de ruptura y fusión; tal es el caso de soportes como sílice y mica, en donde los parches bicapa formados sobre la superficie de sílice presentan ciertas restricciones de deslizamiento y movilidad, en comparación con la facilidad en el deslizamiento y desplazamiento presentada sobre los soportes de mica; esta facilidad genera la inducción de estrés adicional a la cobertura vesicular crítica, propiciando el proceso de ruptura

vesicular (R. P. Richter et al., 2006; R. P. Richter & Brisson, 2005). Asimismo, algunos autores reportan que soportes como el Au, SrTiO₂, TiO₂ y Pt desfavorecen el proceso de ruptura y fusión, dejando así a soportes a base de silicio (SiO₂, Si₃N₄, vidrio, entre otros) y mica como los más implementados por este método, por presentar menos dificultades para llevar a cabo los fenómenos de adhesión, adsorción y movilidad vesicular (C. A. Keller et al., 2000; C. A. Keller & Kasemo, 1998). Sin embargo, cabe resaltar que se han realizado algunos estudios en donde se lleva a cabo el método de fusión vesicular en soportes como Au y TiO₂, manejando estrictamente algunos de los factores externos mencionados con anterioridad, como la fuerza electrostática, funcionalización de superficie y bajo la presencia de diferencias de potencial por medio de campos eléctricos (Rossetti et al., 2005; Zawisza et al., 2007). Actualmente, se han implementado nuevos tipos de soportes mecánicamente estables con la habilidad de reducir las limitaciones de adsorción, como lo son los materiales porosos, polímeros, aerogeles, xerogeles, cristales coloides, entre otros (Goksu et al., 2010).

Modificaciones del método de fusión vesicular

A medida que transcurre el tiempo, se han realizado modificaciones a este método con el fin de aumentar su efectividad y los tipos de soportes que se pueden utilizar; una de ellas, denominada *fusión inducida por bordes bicapa*, consiste en implementar varios micro canales fluídicos, encargados de transportar solución de vesículas hacia el soporte sólido donde se encuentra la bicapa, gracias a la fuerza hidrodinámica se produce la colisión entre vesículas-bicapa propiciando así la formación de SLB uniforme de mayor tamaño (Hardy et al., 2013).

Por otra parte, con el fin de ampliar la gama de soportes implementados en el método de *fusión vesicular*, según lo propuesto por Cho et al. y Hardy et al., es posible inducir esta

fusión a partir del contacto entre la membrana lipídica y determinada concentración de péptidos anfipáticos virales (AH) en sustratos de Au, TiO₂, Cr y superficie polimérica de Nafion (Cho et al., 2007; Hardy et al., 2013); esta modificación requiere que las interacciones soporte-vesícula sean significativamente fuertes, para formar una monocapa en la superficie del soporte y resistir un lavado con solución buffer con el fin de eliminar el exceso de vesículas en la superficie, por lo cual Mager & Melosh, proponen la siguiente modificación, que requiere de menor energía de adhesión entre vesícula-soporte, denominada *deposición por colapso de burbujas* (BCD): en un soporte de alúmina (Al₂O₃), se fomenta la formación de SLB a partir de una monocapa de lípidos soportada en una burbuja de agua; esta burbuja se deposita sobre el soporte sólido para posteriormente con la aguja eliminar el aire contenido en la burbuja y formar la bicapa lipídica sobre la superficie del soporte (Hardy et al., 2013; Mager & Melosh, 2007).

Técnicas de caracterización de bicapas lipídicas

Dependiendo del principio por el cual está basado la técnica de caracterización, se pueden obtener diferente información acerca de las bicapas. En el caso de los métodos ópticos, estos proveen información relacionada con la masa seca adsorbida o desorbida, tal como es el caso de la técnica de *Elipsometría*, en donde un haz de luz es polarizado elípticamente al ser reflejados en una superficie. La medida del cambio de los ángulos elipsométricos asociados a la reflexión, brinda información acerca de la presencia de pequeñas capas adsorbidas sobre la superficie de estudio a través del tiempo. Esta capacidad de medición en tiempo real proporciona a la técnica ventajas para monitorear la formación de la bicapa sobre el sustrato y en adición, detectar si la bicapa formada es estable, es decir, que no ocurran procesos de desorción del material (R. P. Richter & Brisson, 2005).

Si bien en los apartados anteriores se mencionaron las técnicas de *reflexometría de rayos X* y *de neutrones* para la caracterización de vesículas, estas técnicas también son aplicadas en el área de las bicapas. Rayos x / neutrones monocromáticos son disparados sobre las bicapas que, dependiendo del ángulo de incidencia y de las múltiples reflexiones y transmisiones, se obtiene espectros de intensidad que son asociados a la profundidad de los perfiles de densidad de electrones / neutrones (Nickel, 2008). Estas densidades están relacionadas directamente a la estructura química, espesor, distribución y composición lipídica de la membrana. Como explicación, se reporta que éstas técnicas han sido útiles para la identificación de perfiles de composición en la formación de bicapas a partir de la fusión de vesículas, las cuales no necesariamente presentan la misma distribución de fosfolípidos en la bicapa que en la vesícula (Lind & Cárdenas, 2016).

En adición, otra técnica óptica utilizada en el estudio de las bicapas es la *resonancia de plasmones superficiales* (*SPR*, por sus siglas en inglés), en donde un láser de He-Ne incide sobre la muestra, excitando las moléculas y reflejando un espectro característico que es monitoreado por un fotodiodo. Cuando se producen cambios en el área de impacto, el espectro SPR es desplazado, por lo que resulta útil en la detección de la formación de una bicapa (Tawa & Morigaki, 2005). La técnica *SPR* ha sido utilizada para obtener información acerca del espesor de la bicapa principalmente, sin embargo, la energía entregada por el láser puede excitar no solo a las moléculas presentes en el objetivo, sino que también mejora las propiedades fluorescentes de algunos materiales. El aprovechamiento de la fluorescencia con la resonancia de plasmones desemboca en la técnica reportada como *resonancia de plasmones superficiales fluorescentes* o *SPFR*. Gracias a esta unión, es posible caracterizar la morfología de la bicapa y sus propiedades fisicoquímicas dependiendo de las mediciones de intensidad fluorescente detectada (Tawa & Morigaki, 2005). Por otro lado, otra mejora a la técnica *SPR* es la reportada por Parkkila et al., en donde gracias a

modelos y software sofisticado como el “*Fresnel – layer Analysys*” es posible determinar propiedades ópticas, índices de refracción, entre otras propiedades de la bicapa (Parkkila et al., 2018).

Entre las técnicas de microscopía, la más usada es la *microscopía de fuerza atómica*, la cual ya fue expuesta en apartados anteriores. En el campo de las bicapas, esta técnica provee información relevante puesto que es posible visualizar cómo es la interacción, formación y estabilidad de la bicapa (Lind & Cárdenas, 2016). En el caso de la formación a partir de vesículas, el microscopio puede detectar la morfología de las vesículas que son adsorbidas y a través de imágenes continuas, verificar su transformación por rompimiento hacia las bicapas, ya sea por su fusión con vesículas continuas o por coalescencia, es decir, que discos ya formados rompan vesículas adyacentes. Su aplicabilidad en esta área es fundamental para el estudio de las bicapas por la información morfológica que brinda, sin embargo, posee limitaciones a nivel instrumental dado que, para monitorear la formación de las bicapas es necesario que la celda usada en la detección sea operable en flujo continuo, es decir, la solución con lípidos debe ser inyectada y extraída continuamente con el fin de que exista la adsorción sobre el sustrato, lo cual dificulta la lectura de la muestra (R. Richter et al., 2003b). Por otro lado, otros parámetros deben ser minuciosamente definidos, en especial el modo y velocidad de lectura y la fuerza de interacción entre la punta y la muestra, puesto que se puede dar el caso en que la punta induzca al rompimiento de las vesículas en la detección (R. P. Richter & Brisson, 2005).

Por último, la técnica tanto más reportada como con más importancia en el estudio de las bicapas es la *microbalanza electrónica de cristal de cuarzo (EQCM)*. Esta técnica está basada principalmente en el funcionamiento de su sensor, un piezoeléctrico que oscila a una determinada

frecuencia base que es función de las propiedades del material tales como la densidad y de la geometría del mismo como el espesor. Esta oscilación se debe a que el sensor está en medio de dos electrodos los cuales lo excitan a través del paso de corriente eléctrica. Debido a esto, cuando algún material es depositado sobre la superficie del sensor, la frecuencia entregada varía y está correlacionada con la masa adsorbida sobre él (Kanazawa & Cho, 2009). Gracias a este comportamiento, *la microbalanza* permite la identificación en tiempo real de la formación de las bicapas sobre el sensor, es decir, a través del monitoreo en el tiempo de los cambios en la frecuencia de oscilación, se determinan los procesos de adsorción y rompimientos de vesículas y formación de bicapas. Por otro lado, la medición de la frecuencia no es lo único medido por el equipo, sino que también existe otro parámetro importante llamado disipación, asociado a la energía disipada y almacenada por el sistema sensor – material de estudio cuando la corriente eléctrica es apagada. Con esto, es posible determinar análogamente si el material adsorbido son vesículas o si son bicapas (Biolin Scientific, n.d.). En conclusión, a través de los cambios en frecuencia y en la disipación en el tiempo se determinan la adsorción de las vesículas, su interacción con la superficie del sensor, su rompimiento y su transformación hacia bicapas lipídicas estables.

Dado que la deposición de las vesículas fosfolipídicas se dan sobre la superficie del sensor y estos están hechos de materiales específicos, R. Richter & Brisson diseñaron una metodología para recubrir ingeniosamente los sensores con mica, un sustrato que posee características atractivas por su afinidad con los fosfolípidos. Este recubrimiento descrito en su trabajo se da bajo un minucioso cuidado con el fin de no alterar el funcionamiento del sensor (R. P. Richter & Brisson, 2004).

Figura C.3. 1.

Esquema resumen de las técnicas de caracterización SLB.



Nota. Autores de la revisión bibliográfica basados en (R. P. Richter & Brisson, 2004; R. P. Richter & Brisson, 2005; Tawa & Morigaki, 2005; Kanazawa & Cho, 2009; Nickel, 2008; Lind & Cárdenas, 2016; Parkkila et al., 2018).