



Universitat de Barcelona

Facultat d'Odontologia

Exosomas salivales

Trabajo de Final de Grado

Sheila Martín Roca

Universidad de Barcelona

Facultad de Odontología

4 de Julio del 2014

Curso 2013 - 2014

Índice

1. Resumen	2-4
2. Introducción	5-9
2.1 Contexto histórico.....	5
2.2 Características generales.....	6-9
3. Objetivos	10
4. Diseño	10
5. Materiales y métodos	11-12
6. Resultados	13-22
6.1 Exosomas.....	13-14
6.2 Microvesículas.....	14-15
6.3 Micro RNAs.....	15
6.4 Glándulas salivales.....	16-17
6.5. Obtención de muestras salivales.....	17-19
6.5.1 Aislamiento de los exosomas salivales.....	19-20
6.5.2 Caracterización y cuantificación exosomal.....	20-22
7. Discusión	23-30
7.1 Aplicaciones clínicas de los exosomas.....	23-27
7.2 Exosomas y visión de futuro.....	27-30
8. Conclusiones	31-32
9. Bibliografía	33-38

1. Resumen

Los exosomas salivales son vesículas delimitadas por membrana de entre 50 y 100 nm de diámetro. Éstas se forman a través de la membrana endosomal. Se trata de nanovesículas extracelulares liberadas por la mayoría, pero no todas, las células. Algunas de las células productoras de exosomas son: las células dendríticas, los macrófagos, los linfocitos, las células epiteliales glandulares y las células tumorales. Las encontramos en muchos fluidos tales como el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, el lavado broncoalveolar, el líquido sinovial, la ascitis, la leche materna y la saliva.

Estas vesículas extracelulares representan un importante modo de comunicación intercelular. Sirven de vehículos para la transferencia entre las células de membrana, de proteínas citosólicas, de lípidos y de RNA tanto codificante como no codificante. Los exosomas juegan un papel biológico fundamental en la regulación de la fisiología normal, así como de los procesos patológicos a través de las redes de regulación genética y / o a través de la programación epigenética.

Los exosomas son considerados como un nuevo mecanismo por el cual las células cancerosas y las células infectadas por virus pueden regular su microambiente. De este modo, la saliva ofrece una excelente alternativa para el descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de diferentes patologías, con ventajas como fácil recolección de la muestra y no invasividad. Más allá del diagnóstico, los exosomas también han surgido como un candidato potencial para modalidades de inmunoterapia y vacunación, así como un nuevo vector para la terapia génica.

1. Abstract

Salivary exosomes are vesicles with 50 to 100 nm of diameter bounded by membrane. These are formed through the endosomal membrane. These extracellular nanovesicles are released by some cells. Some of the exosome-producing cells are dendritic cells, macrophages, lymphocytes, glandular epithelial cells and tumor cells. We find them into many fluids such as plasma, urine, cerebrospinal fluid, amniotic fluid, bronchoalveolar lavage, synovial fluid, ascites, breast milk and saliva.

These extracellular vesicles represent an important way of intercellular communication. They act as vehicles for the transfer of cytosolic protein, lipid and RNA both coding and non-coding between the membrane cells. Exosomes play a fundamental role in regulating normal physiology and pathological processes through genetic regulatory networks and / or via epigenetic programming.

Exosomes are considered a new mechanism whereby cancer cells and virus-infected cells can regulate their microenvironment. Thus, saliva offers an excellent alternative for the discovery of biomarkers as a way of diagnosis and prognosis of various diseases, with advantages such as an easy way to collect sample and it's non-invasiveness property. Beyond diagnosis, exosomes have also emerged as a potential candidate of immunotherapy and vaccination modalities as well as a new vector for gene therapy.

1.1. Abreviaturas

COCE	Carcinoma de células escamosas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
miRNA	Micro RNA
MVE	Cuerpos multivesiculares
MV	Microvesículas
RNAm	RNA mensajero
SL	Submaxilar
SM	Sublingual
VE	Vesículas extracelulares

2. Introducción

2.1. Contexto histórico

Los exosomas son vesículas de membrana extracelulares que fueron descubiertas en 1983. Su biogénesis se produce por exocitosis de endosomas multivesiculares. Desde su descubrimiento, ha quedado claro que los exosomas participan en muchos aspectos de la fisiología, incluida la comunicación intercelular, y de la fisiopatología¹.

Las primeras publicaciones que hablan de exosomas las encontramos en la revista *The Journal of Cell Biology* por Harding y col.² y en *Cell* por Pan y Johnstone³ en 1983. En dichas publicaciones se describen unos reticulocitos receptores de transferrina asociados a pequeñas vesículas de unos 50 nm que se desprendien hacia el espacio extracelular¹.

El nombre "exosomas" para estas vesículas extracelulares fue acuñado algunos años más tarde por Rose Johnstone, aunque el término en realidad se había usado un par de años antes, cuando se hacía referencia a otros fragmentos de membrana aislados de fluidos biológicos¹.

Estos estudios iniciales han ido seguidos por un gran crecimiento en el estudio del campo de la biología exosomal. Como resultado se han constituido varias sociedades dedicadas a su estudio (*International Society for Extracellular Vesicles* y *The American Society for Exosomes and Microvesicles*) ya existe una revista especializada en el campo (*Journal of Extracellular Vesicles*), y periódicamente se organizan congresos internacionales. Además, hasta la fecha hay más de mil publicaciones en revistas indexadas sobre los exosomas¹.

2.2. Características generales

El espacio extracelular de los organismos pluricelulares contiene soluciones de metabolitos, iones, proteínas y polisacáridos.

Sin embargo, está claro que este entorno extracelular también contiene un gran número de vesículas de membrana para las que se sugiere el término " vesículas extracelulares" (VE). Las VE incluyen los exosomas, las microvesículas (MV), las micropartículas y los cuerpos apoptóticos⁴. En concreto nos centraremos y diferenciaremos los exosomas de las microvesículas (Figura 1). Dichas vesículas extracelulares se forman a través de vesículas de la membrana endosomal o plasmática respectivamente⁵.

Los exosomas y las microvesículas son nanovesículas extracelulares liberadas por la mayoría, pero no todas, las células⁷. Algunas de las células productoras son: las células dendríticas, los macrófagos, los linfocitos, las células epiteliales glandulares y las células tumorales⁸. Dichas VE se encuentran también en muchos fluidos tales como el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, el lavado broncoalveolar, el líquido sinovial, la ascitis, la leche materna y la saliva^{8,9}. Estas vesículas extracelulares representan un importante modo de comunicación intercelular^{5,9} a través de la transferencia de información genética⁷. Sirven de vehículos para la transferencia entre las células de membrana, de proteínas citosólicas, de lípidos y de RNA⁵ tanto codificante como no codificante⁷. También realizan la expulsión de componentes obsoletos de la membrana y se las ha relacionado con la presentación de antígenos¹⁰. Como resultado, los exosomas y las microvesículas juegan un papel biológico fundamental en la regulación de la fisiología normal, así como de los procesos patológicos a través de las redes de regulación genética y / o a través de la programación epigenética⁷.

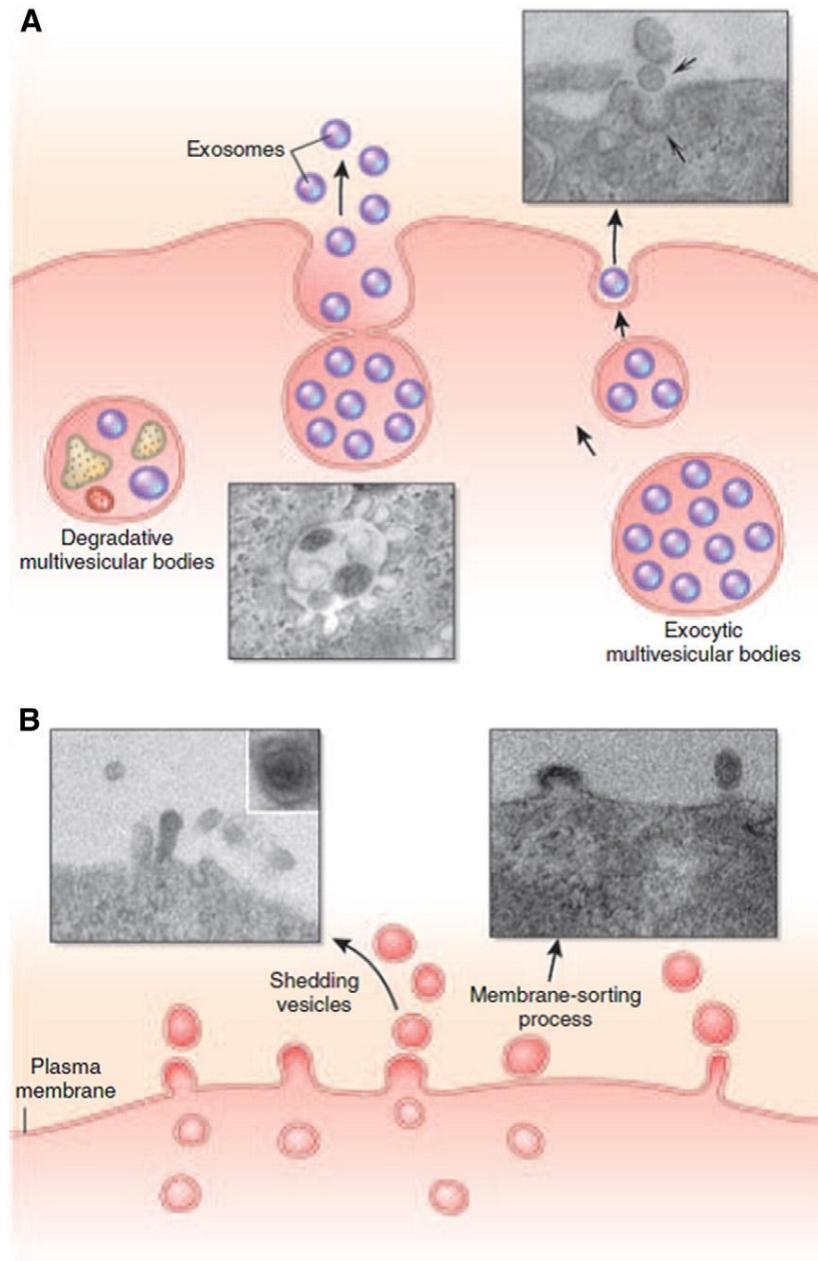


Figura 1. Liberación de los exosomas y de las microvesículas. (A) Producción de los exosomas, originarios de cuerpos multivesiculares. (B) Producción de las microvesículas, éstos contienen elementos de la membrana plasmática (B)⁶.

Los exosomas son un producto final de la vía de reciclaje endocítico. En primer lugar, se forman vesículas endocíticas a partir de la membrana plasmática y se fusionan para formar los endosomas tempranos. Estos endosomas maduran y se forman endosomas tardíos donde vesículas intraluminales brotan dentro del lumen. Estos cuerpos multivesiculares se fusionan directamente con la membrana plasmática y liberan los exosomas al espacio extracelular. En cuanto a las microvesículas, éstas se desprenden directamente desde la membrana plasmática^{5,7} (Figura 2).

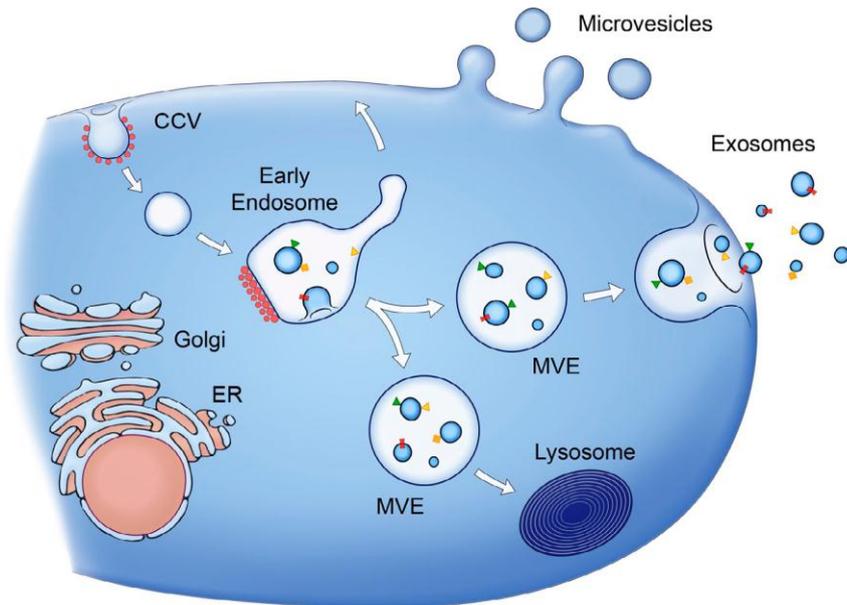


Figura 2. Liberación de MV y exosomas. Las MV brotan directamente de la membrana plasmática, mientras que los exosomas se forman por gemación en los endosomas tempranos formando las vesículas intraluminales. Cuando los endosomas se llenan de estas vesículas, se les llama endosomas o cuerpos multivesiculares (MVE). Los exosomas son liberados por la fusión de MVE con la membrana plasmática. Otros MVE se fusionan con los lisosomas⁵.

Estudiando los exosomas se demuestra que hay una gran variedad de marcadores comunes de superficie exosomal: tetraspaninas tales como CD9 y CD63 y proteínas asociadas a dominios ricos en lípidos, incluyendo flotilina-1, así como marcadores internos tales como Alix y Tsg101^{7,11}. Cada exosoma contiene también pequeños RNAs, así como otras proteínas citoplasmáticas y receptores específicos de las células que se pueden transferir a las células receptoras⁷ (Figura 3).

Sin embargo, esta capacidad natural de los exosomas y de las MV para transferir información a la vez podría facilitar la propagación de la enfermedad a través de la entrega de material genético y / o proteínas patogénicas. Por ejemplo, se ha observado que se aísla un número mayor de vesículas extracelulares en los pacientes con algunas patologías como el cáncer, y que a menudo algunas de estas vesículas contienen elevados niveles de micro RNAs (miRNAs) específicos, que pueden estar involucrados en la causa y la propagación de enfermedades⁷. Recientemente se han encontrado evidencias similares para las enfermedades neurodegenerativas siendo probable una propagación local de la neuropatología mediada exosomalmente¹². Por lo tanto, una hipótesis cada vez más extendida es que las vesículas extracelulares

juegan un papel crucial en la transferencia de información en ambos estados no patológicos y patológicos⁷.

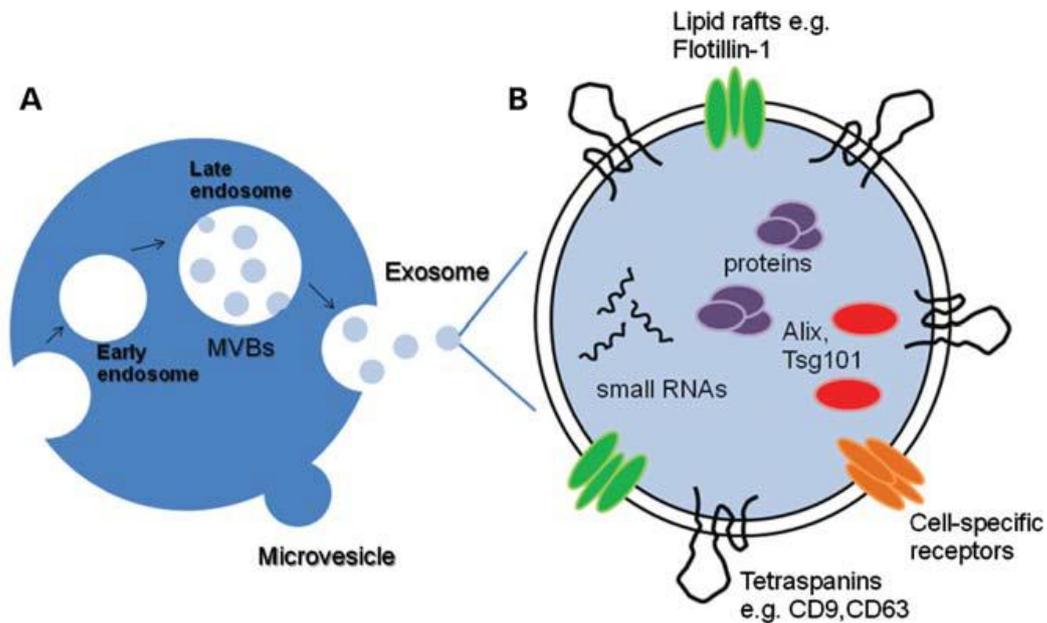


Figura 3. (A) Biogénesis de los exosomas y las microvesículas. (B) Un exosoma en aumento que muestra que hay una variedad de marcadores de superficie exosomal comunes⁷.

Aprovechando su papel natural en la transferencia de información genética, existe un gran interés en tratar de explotar el potencial de las vesículas extracelulares para aplicaciones terapéuticas⁷.

A pesar de las diferencias en la biogénesis y en el contenido molecular, la distinción entre exosomas y MV permanece sutil: no hay evidencia de una separación estricta en sus roles funcionales, y no hay propiedades establecidas o marcadores moleculares que permitan distinguir claramente estas dos clases de vesículas⁹.

3. Objetivos

Este estudio pretende ser una revisión científica sobre los exosomas salivales, con él queremos dar respuesta a los siguientes ítems:

- Descripción general de los exosomas.
- Obtención de los exosomas salivales.
- Métodos utilizados en el aislamiento, caracterización y cuantificación de los exosomas.
- Aplicaciones clínicas de los exosomas salivales.
- Visión de futuro y posibles aplicaciones de los exosomas salivales a largo plazo.

4. Diseño

El trabajo es una revisión narrativa.

5. Materiales y métodos

Para la obtención de literatura científica sobre los exosomas se realizó una primera búsqueda en noviembre de 2013 mediante el motor de búsqueda de PubMed que nos permitió acceder a los artículos de mayor interés en nuestro tema en la base de datos de Medline. La búsqueda pretendía darnos una idea general sobre qué eran los exosomas y poderlos diferenciar de otras vesículas extracelulares. Así, se introdujo inicialmente la palabra clave "exosome" con 1769 resultados, para acotar la búsqueda se limitaron los resultados a "review", con 344 resultados, y se añadió el término "microvesicle" con 65 resultados. De ésta última búsqueda primero seleccionamos los que estaban en texto completo y luego leímos los títulos y los resúmenes para confirmar su interés para realizar nuestra revisión.

Realizamos una segunda búsqueda en febrero de 2014 con el fin de concretar el tipo de exosomas, en nuestro caso, los salivales. Se utilizó PubMed y las palabras clave fueron "salivary AND exosome" encontramos 18 resultados. Procediendo con las mismas palabras clave pero con el motor de búsqueda ReCercador+ de la Universidad de Barcelona se encontraron 63 resultados procedentes de las colecciones siguientes: Scopus, MedLine, SciVerse ScienceDirect, Swetswise Online Content, Science Citation Index Expanded, PMC (PubMed Central), Hindawi Journals, Oxford Journals, BioMed Central, Directory of Open Access Journals, Journals.ASM.org (American Society of Microbiology), Wiley Online Library, SwePub (National Library of Sweden), SAGE Journals, DiVA - Academic Archive Online, BMJ Journals, Oxford Journals Open Access, HAL (CCSd), American Chemical Society. De estas dos búsquedas escogemos 18 resultados como los más adecuados.

En mayo del 2014 realizamos una nueva búsqueda con las palabras clave "salivary glands AND exosome" en PubMed con 8 resultados y en ReCercador+ con 38 y otra con las palabras clave "RNA AND exosome AND microvesicles" y nos da un total de 65 resultados en PubMed y 195 resultados en ReCercador+. Escogemos los de texto completo y mayor relevancia para nuestro estudio.

En abril de 2014 se realiza una última búsqueda con las palabras clave "exosome AND immunotherapy" con 485 resultados en ReCercador+ y 130 en PubMed con tal de

acotar más la búsqueda se cambian las palabras clave a: “exosomes AND immunotherapy AND cancer” con 391 resultados de ReCercador+ y 99 de PubMed. Se descartan los que no tienen la versión completa disponible y aquellos que se desvían del tema.

En todos los casos se escogen los textos más recientes y los que se consideran de mayor relevancia científica.

6. Resultados

6.1 Exosomas

Se trata de vesículas delimitadas por membrana de entre 50 y 100 nm de diámetro^{4,7}; su intervalo de tamaño se equipara aproximadamente al de los virus. Se liberan tanto de forma constitutiva como regulada mediante exocitosis de cuerpos multivesiculares. Los exosomas se han caracterizado principalmente en células del sistema inmunitario (células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos), en células epiteliales y en células tumorales⁴. Los mecanismos fundamentales por los que los exosomas podrían ejercer sus funciones biológicas en las células son: el contacto directo entre las moléculas de superficie de los exosomas y de las células, mediante la fusión de la membrana de las células y la de los exosomas y por endocitosis de los exosomas^{4,5} (Figura 4). Ejemplos de funciones clave de los exosomas incluyen la presentación de antígenos, la inmunoestimulación y la inmunosupresión⁴.

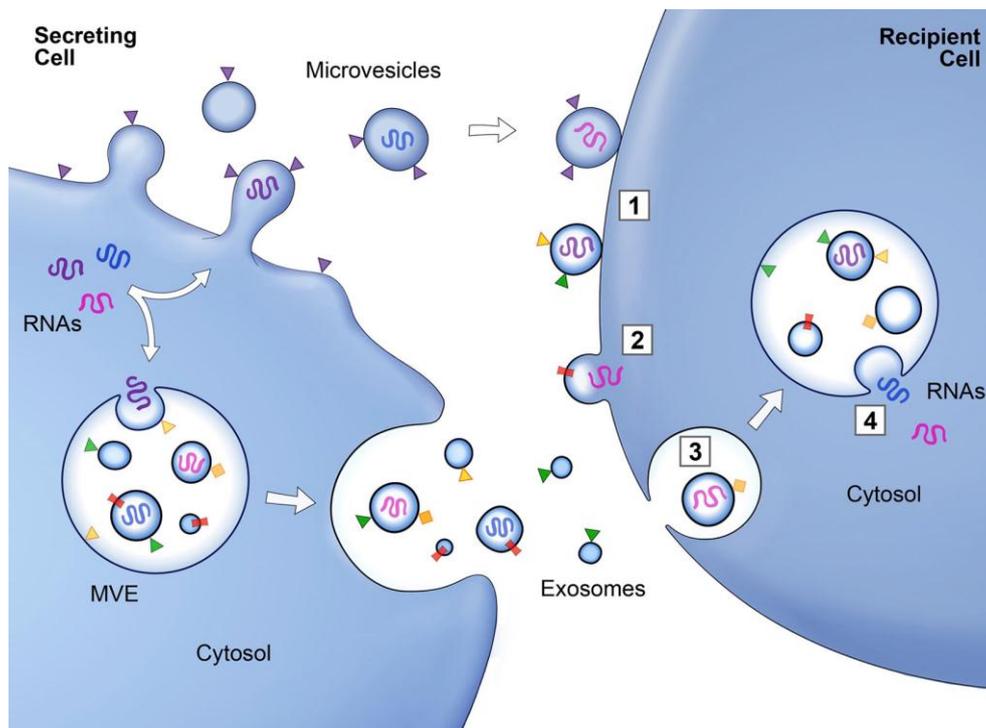


Figura 4. Mecanismos por los que los exosomas podrían ejercer sus funciones biológicas en las células⁵.

Diferentes estudios recientes han demostrado que los exosomas pueden transferir RNA mensajero (RNAm) y miRNA y que éste es funcional en ese nuevo entorno^{8,13,14,15,16,17,18}. La estructura de los exosomas permite proteger de manera óptima este contenido genético de las ribonucleasas⁸.

Los exosomas cuentan con fosfatidilserina en la capa externa de la membrana e incluyen los marcadores CD63, CD81, CD9, LAMP1 y TSG101^{4,7}.

Hasta la fecha, el mejor catálogo de proteínas, RNA y lípidos exosomales es la web ExoCarta (<http://www.exocarta.org>)^{9,11,19}. La base de datos ExoCarta contiene información exhaustiva de todas las moléculas identificadas en varios exosomas, especificando el organismo, el contenido, el material de la muestra y los métodos de identificación; la última versión disponible (4.1) publicada en mayo de 2012, contiene 13.333 proteínas, 2.375 RNAm, 764 miRNA y 194 entradas de lípidos, obtenidos a partir de 146 estudios exosomales⁹.

6.2 Microvesículas

Las MV fueron descritas por primera vez por Chargaff y West en 1946 como un factor precipitable del plasma, libre de plaquetas, con potencial de generar trombina. Las MV son estructuras delimitadas por membrana. El rango de diámetros oscila entre 100 y 400 nm, aunque se han descrito MV de hasta 1000nm. Su rango de tamaño se solapa al de las bacterias y al de los complejos inmunes insolubles. Se han localizado en el plasma sanguíneo. Se forman por la liberación regulada mediante gemación de la membrana plasmática. La tasa de liberación es generalmente baja (a excepción de los tumores que las liberan de forma constitutiva). Se han caracterizado principalmente como productos de plaquetas, de eritrocitos y de las células endoteliales. Ejemplos de funciones clave de las MV son su actividad procoagulante, que representan una forma de secreción de IL1b, la contribución a la patogénesis de la artritis reumatoide, la contribución al carácter invasivo de los tumores y la inducción de la transformación oncogénica celular así como la comunicación feto-materna⁴.

Cuentan con fosfatidilserina, sin embargo, algunas observaciones también sugieren la existencia de las MV sin externalización de fosfatidilserina. El aislamiento de rutina y

los métodos de análisis incluyen la centrifugación diferencial, la citometría de flujo y los ensayos basados en la captura⁴.

6.3 MicroRNAs

Los miRNAs son un grupo de pequeños RNAs, de 19-25 nucleótidos de longitud, que participan en la regulación del desarrollo, la diferenciación celular, la proliferación y la supervivencia^{20,21}. Ejercen sus efectos por dos mecanismos: la degradación del RNA mensajero y la inhibición de la traducción. Un único RNAm se traduce generalmente en una sola proteína, sin embargo, un solo miRNA es capaz de regular la traducción de una multitud de genes por el control que ejercen en regiones específicas del extremo 3'-UTR de sus transcritos de RNAm. Los cambios en los niveles de RNAm pueden ser controlados o anulados por la regulación post-transcripcional, por lo que los niveles de expresión del miRNA pueden proporcionar una mejor indicación del estado fisiológico de una célula que la propia expresión del RNAm^{20,21}.

Se ha demostrado que los miRNAs realizan funciones importantes en el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la respuesta al estrés, la respuesta inmune, y la secreción de glucosa. Parece ser que los miRNAs diferencian con más precisión entre los diferentes tipos de cáncer que los RNAm, lo que sugiere que los miRNAs se pueden usar para detectar el cáncer. Además, el cambio en el RNAm entre las células cancerosas y las células normales es relativamente pequeño, mientras que en el miRNAs es mucho mayor²².

Otra característica que hace de los miRNAs excelentes candidatos para los estudios de biomarcadores es su notable estabilidad y resistencia a la degradación, especialmente en comparación con el RNAm²⁰.

6.4 Glándulas salivales

La saliva humana es una compleja mezcla acuosa de proteínas y minerales. Contribuye a mantener la integridad de la cavidad oral a través de la lubricación, de acciones antibacterianas, antivirales y tamponadoras^{21,23,24}. Además, participa en la mineralización de los dientes²⁴ y facilita la masticación y la deglución de los alimentos^{21,23}.

La saliva está compuesta principalmente de agua (99 %), pero incluye una mezcla compleja de electrolitos (sodio, potasio, calcio, cloruro, magnesio, bicarbonato y fosfato), proteínas (enzimas, inmunoglobulinas y otros factores antimicrobianos, glicoproteínas, albúmina y otros polipéptidos y oligopéptidos) y, en cantidades más pequeñas, glucosa y productos nitrogenados (urea y amoníaco)²⁵.

Las proteínas presentes en la saliva se secretan principalmente de tres pares de glándulas salivales mayores: la parótida, la submaxilar (SM) y la sublingual (SL), que representan aproximadamente el 90 % de la secreción salival total. Las proteínas restantes resultan de las glándulas salivales menores, del fluido gingival crevicular y de la mucosa oral. La saliva también tiene proteínas plasmáticas. Hay diferentes maneras por las cuales las proteínas plasmáticas pueden llegar a la saliva. Las más comunes incluyen la difusión pasiva, la ultrafiltración (que se produce a través de las uniones estrechas entre las células) y como resultado de la salida de flujo del fluido gingival crevicular²⁵.

Las glándulas parótidas producen secreciones serosas, mientras que las glándulas SM y SL producen secreciones mixtas que son serosas y mucinosas. La combinación de estas secreciones constituye la saliva total, e incluye proteínas, microorganismos, restos celulares, el fluido crevicular gingival y los componentes del suero⁹.

Los exosomas son liberados a la saliva mediante la secreción ductal o por las células acinares. Esencialmente la implicación de las glándulas salivales en la secreción de vesículas exosomales se debe a la vía secretora constitutiva⁸ (Figura 5).

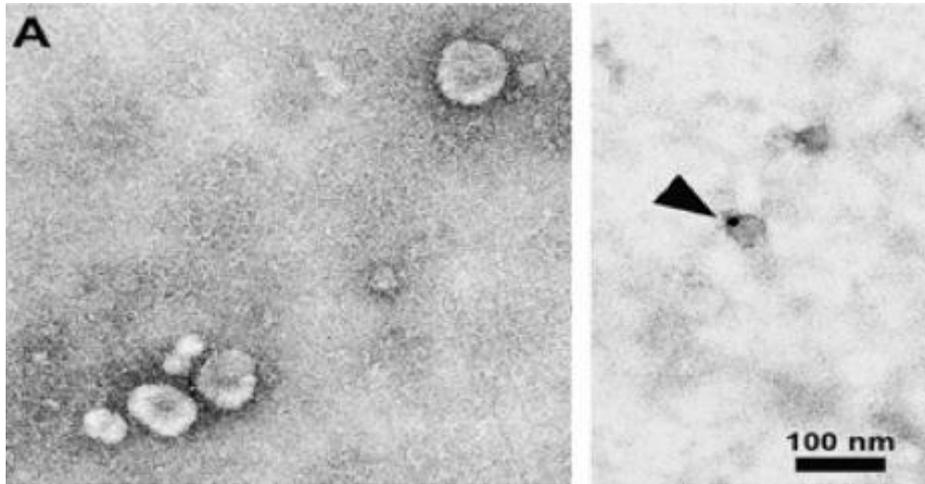


Figura 5. Microscopía electrónica de exosomas de la glándula parótida. La punta de flecha indica un exosoma marcado²⁴.

6.5. Obtención de muestras salivales

El aislamiento de exosomas salivales implica la obtención previa de muestras de saliva. La obtención de una muestra de saliva se realiza mediante un método no invasivo, relativamente simple y se puede efectuar de dos modos diferentes. El primer tipo de muestra se llama saliva total "no estimulada", y puede ser recogida por drenaje o por babear, escupir o mediante succión. El segundo tipo se llama saliva "estimulada" y el resultado es tres veces mayor en comparación con el volumen de la saliva no estimulada²⁶. Los métodos utilizados para recoger saliva estimulada incluyen el uso de un estimulante (por ejemplo, ácido cítrico), o por reflejo de respuesta masticatoria (por ejemplo, parafina o una base de goma)^{9,27}.

Es importante utilizar métodos estandarizados que permitan múltiples recolecciones con una mínima variabilidad y teniendo en cuenta las fluctuaciones circadianas. Los criterios de recogida de muestras, como la elección de saliva total frente a la glandular, o la no estimulada frente a la estimulada, son parámetros que influyen en la detección de biomarcadores proteómicos. Para los estudios de biomarcadores se prefiere la saliva total, ya que es más fácil de recoger y puede reflejar mejor el estado de las

condiciones sistémicas²⁸. De hecho, existe una coincidencia significativa entre las proteínas detectadas en la saliva y las detectadas en el suero (aproximadamente un tercio de las proteínas encontradas en la saliva también son comunes al suero)²⁹, debido a la proximidad física entre las glándulas salivales y las fuentes locales sistémicas de suero. La detección de moléculas secretadas en la saliva de los pacientes puede proporcionar nuevas oportunidades diagnósticas y se utilizaría una técnica no invasiva. Sin embargo, la saliva total se origina a partir de diferentes fuentes y su análisis es más complejo; la mayor parte de su contenido de proteína se sintetiza in situ por las glándulas salivales. La composición de las proteínas de la saliva total está también fuertemente influenciada por el microambiente oral y las condiciones temporales: la concentración de analitos, la variación de la composición por las fluctuaciones circadianas o la variación en función del método de recolección³⁰. Por lo tanto, esto limita el uso de la saliva total cuando se requieran múltiples colecciones de muestras para observar la evolución de la enfermedad. La saliva glandular en cambio, puede ser más informativa para la investigación de determinadas enfermedades glandulares⁹.

Hasta la fecha, la saliva no estimulada se ha utilizado en la mayoría de los estudios de diagnóstico. La principal ventaja de ésta es que confiere un reflejo más preciso del estado clínico sistémico, ya que está menos influenciada por la propia función de la glándula salival. Además, la saliva estimulada puede ser menos adecuada para aplicaciones de diagnóstico especialmente cuando el uso de un agente estimulante produce un cambio en la composición de la saliva y en el pH, además, al aumentar la producción de agua en la saliva se produce una dilución de las proteínas de interés^{9,29}.

Numerosas proteínas de la saliva humana y exosomales han sido identificadas y catalogadas con detalle, incluyendo acuaporinas, proteínas del citoesqueleto y proteínas de membrana, que también han sido encontradas en exosomas de otros orígenes celulares⁸.

Diferentes estudios han intentado clasificar los exosomas salivales. Coinciden en que existen al menos dos tipos diferentes de vesículas (exosomas I y II) que difieren en tamaño, densidad y contenido de proteínas^{9,23,21}. Sin embargo, ambas poblaciones

tendrían un solapamiento de proteínas exosomales tales como CD63, Alix, Tsg101, y Hsp70^{7,9,11,23,21}. Este resultado refleja la heterogeneidad de los exosomas salivales; la saliva puede contener vesículas procedentes de células epiteliales glandulares o de otros tipos de células presentes en las glándulas salivales^{9,23,21}.

6.5.1 Aislamiento de los exosomas salivales

Han sido optimizados diferentes protocolos para purificar las vesículas extracelulares. El procedimiento más común se basa en una serie de centrifugaciones diferenciales^{9,25} que primero eliminan los restos celulares y contaminantes, seguido de la separación de las vesículas de mayor densidad a través de etapas de ultracentrifugación⁹.

Este método de aislamiento está bien desarrollado y ha demostrado ser eficaz y puede procesar hasta 250 ml de muestra³¹. Los exosomas se sedimentan a partir del sobrenadante usando ultracentrifugación a 100.000 x g⁹.

Las muestras están muy contaminadas por vesículas de diferentes tamaños, vesículas apoptóticas, restos celulares y grandes agregados de proteínas. Por estas razones, los protocolos anteriores se combinan a menudo con etapas de filtración adicionales, separación utilizando gradientes de densidad, filtración por nanomembrana⁹, purificación por inmunofinidad^{19,31} y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)³¹.

Cuando el aislamiento de exosomas se hace a partir de fluidos corporales, donde es imposible distinguir los exosomas derivados de los diferentes tejidos, se puede utilizar la purificación por inmunofinidad³¹. Se ha visto que con dicha técnica se obtienen preparaciones de exosomas ultrapuras^{19,32}.

Hasta la fecha, no existe un método eficaz ideal y rentable para la purificación exosomal³² (Figura 6).

Con el fin de abordar algunas limitaciones técnicas, se han optimizado protocolos de purificación teniendo en cuenta el biofluido del que se trate⁹.

En este contexto, la orina es el biofluido más estudiado, ya que puede ser recogido de manera no invasiva y es relativamente fácil de procesar; de acuerdo a estas características los protocolos para el aislamiento de los exosomas salivales se pueden

adaptar fácilmente a partir de los protocolos ya establecidos para la orina. En este contexto la saliva total es un medio menos ideal para el aislamiento exosomal por su viscosidad y la contaminación celular en comparación con la saliva glandular⁹.

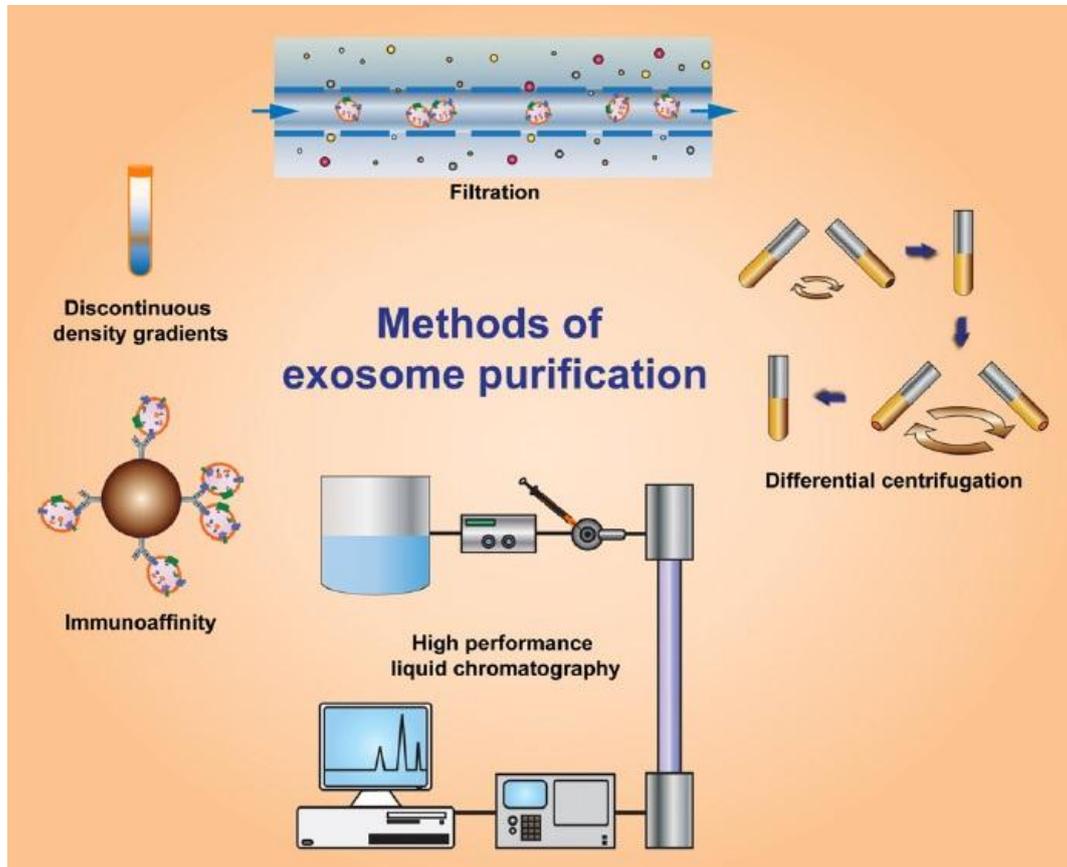


Figura 6. Métodos de purificación exosomal³².

6.5.2. Caracterización y cuantificación exosomal

Para caracterizar la población de vesículas después de su aislamiento, se puede utilizar una gran variedad de métodos de análisis, tales como, la microscopía electrónica de transmisión, el análisis por Western blot, la espectrometría de masas para cromatografía de líquidos^{9,19} y la citometría de flujo¹⁹. Recientemente, se ha descrito la caracterización estructural mecánica y bioquímica de los exosomas humanos salivales utilizando Microscopía de Fuerza Atómica⁹.

Debido al pequeño tamaño de los exosomas, la microscopía electrónica es la técnica más adecuada para la caracterización morfológica. El uso de microscopía electrónica

combinada con técnicas inmunológicas, posibilita investigar si los exosomas expresan ciertas proteínas en la membrana³¹ (Figura 7).

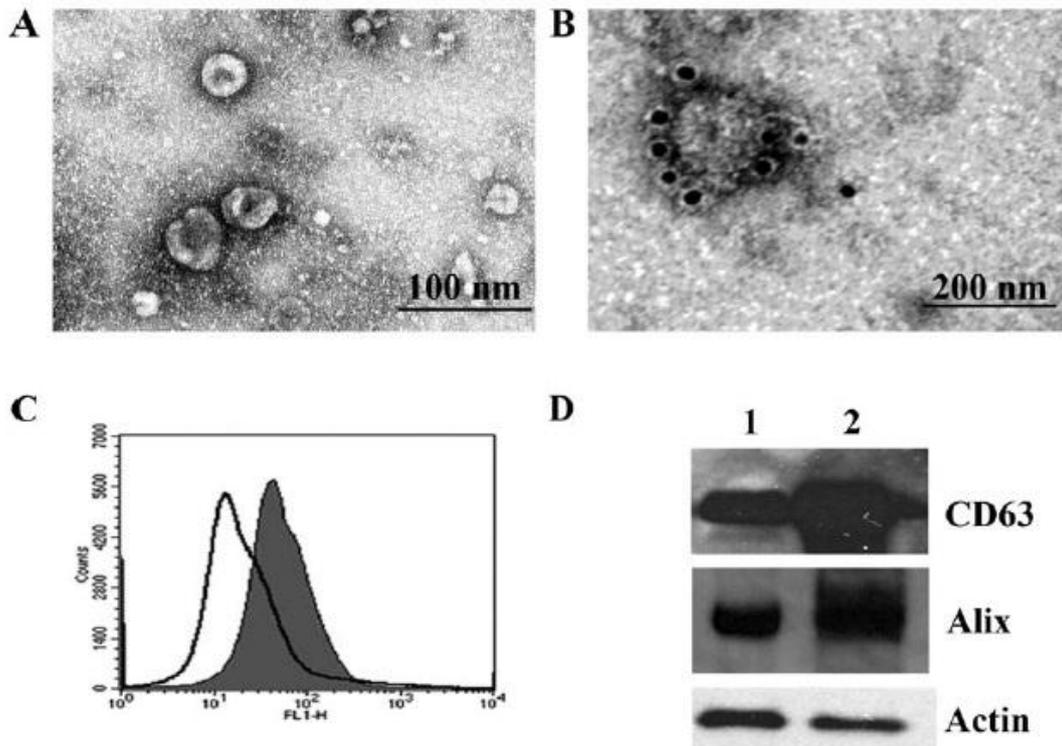


Figura 7. (A) Imagen de microscopía electrónica que muestra los exosomas salivales. En (B) se realizó un inmunomarcaje con un anticuerpo anti-CD63. (C) Citometría de flujo que muestra la expresión de CD63. (D) Western blot de exosomas salivales utilizando anticuerpos contra CD63 y Alix⁸.

Otro medio de visualización es la microscopía confocal, que implica el uso de marcadores fluorescentes (Figura 8). Aunque los exosomas no marcados son demasiado pequeños para ser visualizados con la microscopía confocal estándar, la fluorescencia en sus membranas se detecta fácilmente. Otra ventaja de esta técnica es la posibilidad de estudiar algunas funciones de los exosomas y su interacción con las células huésped³¹.

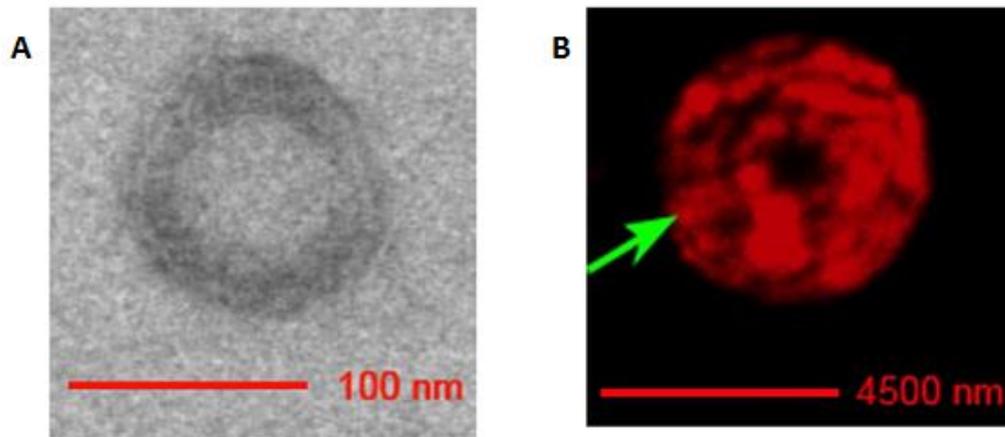


Figura 8. (A) Microscopía electrónica de un exosoma. (B) Imagen tomada a partir de microscopía confocal. Se trata de una esfera de 4.500 nm con anticuerpos dirigidos contra la proteína de membrana exosomal CD9. Esta esfera contiene múltiples exosomas. La marca verde indica un solo exosoma unido a la esfera³¹.

La cuantificación de los exosomas se estima en general mediante la determinación de la cantidad de proteína. La citometría de flujo también se usa para su cuantificación pero la medición de forma individual de los exosomas en un sistema de flujo es difícil debido a la resolución del láser³¹.

7. Discusión

A pesar de tratarse de una revisión narrativa, que puede quedar marcada por la subjetividad del realizador del estudio, cabe destacar en este caso su utilidad ya que no hay un número elevado de estudios sobre exosomas salivales y las conclusiones de los diferentes originales tienen un alto grado de coincidencia. Es un tema relativamente nuevo y del que se están descubriendo cosas de manera paulatina por ello no existen demasiadas controversias entre los diferentes autores.

7.1 Aplicaciones clínicas de los exosomas

Estudios recientes han demostrado que se pueden detectar fácilmente biomarcadores salivales discriminatorios en el desarrollo de enfermedades sistémicas, tales como el cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón y el cáncer de ovario^{33,34,35}. Sin embargo, la utilidad de los biomarcadores salivales para la detección de enfermedades sistémicas se ha visto debilitada debido a la ausencia de la lógica biológica y mecánica de por qué enfermedades distales a la cavidad oral conducirían al desarrollo de biomarcadores discriminatorios en la saliva³⁶.

Los exosomas son considerados como un nuevo mecanismo por el cual las células cancerosas y las células infectadas por virus pueden regular su microambiente. Además, los virus también pueden utilizar la vía exosomal para la difusión de infecciones, así como la evasión del sistema inmunitario^{9,37} (Figura 9).

La asociación de los exosomas con el cáncer nasofaríngeo se demostró por primera vez en los exosomas tumorales de la saliva, del suero y del plasma. Los exosomas relacionados con el cáncer nasofaríngeo son sospechosos de contribuir a la evasión del sistema inmunitario por parte de las células tumorales, la angiogénesis del tumor, así como la preparación del nicho metastásico⁹.

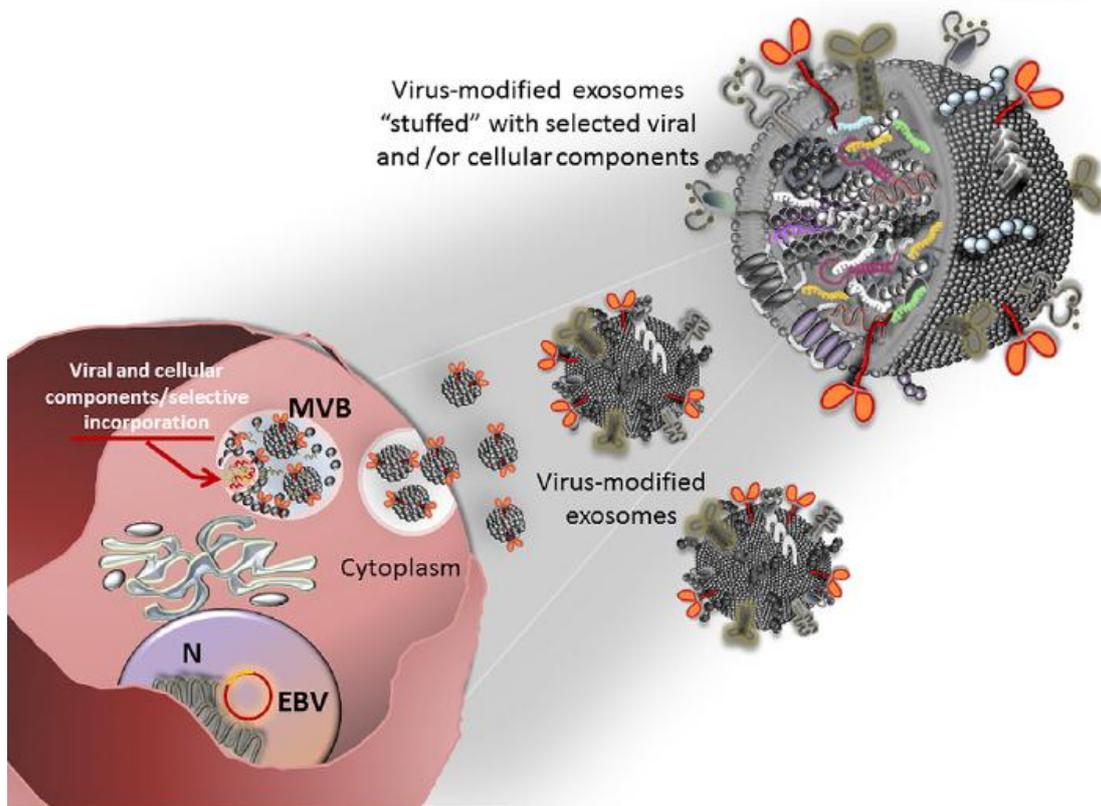


Figura 9. Formación y liberación de exosomas modificados por virus³⁷.

Se ha visto que las vesículas de la saliva derivadas de cánceres orales tienen variaciones en el tamaño, la densidad y la expresión de CD63 en comparación con los casos no cancerígenos⁹. Más específicamente, los exosomas derivados de pacientes con COCE (Carcinoma de células escamosas) son más grandes y van de 20 a 400 nm. Están presentes en agregados o aglomerados y son más prolongados en algunas regiones. Expresan niveles elevados del marcador de membrana CD63. Este efecto es más prominente en los casos con estadios avanzados de cáncer oral^{9,38}.

El COCE constituye aproximadamente el 90 % de los cánceres orales. La tasa media de supervivencia a los 5 años es de aproximadamente el 50%. Sorprendentemente, este número no ha cambiado en los últimos tres decenios. Por lo tanto, se necesita un método de detección temprana del COCE para aumentar la supervivencia del paciente²². Se ha observado en diferentes estudios que la composición salival es diferente en los pacientes con cáncer en comparación con los sanos. Dado que las diferencias en los niveles de expresión de proteínas pueden estar asociadas con la progresión tumoral y la metástasis, estas proteínas podrían ser potencialmente útiles

en el seguimiento de pacientes con riesgo de neoplasias orales. Se han propuesto diferentes moléculas salivales como potenciales biomarcadores de cáncer oral. Entre los más prometedores encontramos el CD44 soluble, ya que se han relacionado niveles elevados de éste con el COCE, a la vez que diferencia entre lesiones malignas de las benignas^{9,39,40,41}.

De este modo, la saliva ofrece una excelente alternativa para el descubrimiento de biomarcadores del cáncer oral, aunque a pesar de sus ventajas sobre el suero en términos de facilidad de recolección de la muestra y de no invasividad, sigue siendo un líquido complejo, y con abundantes proteínas que potencialmente podrían enmascarar la presencia de proteínas de baja abundancia que podrían ser los biomarcadores importantes. Por esta razón es tan importante la investigación de los exosomas salivales, ya que la subfracción de exosomas/ microvesículas reduce la complejidad de todo el fluido. El uso de la saliva también ofrece la oportunidad de trabajar en un fluido fácilmente recolectable que está en contacto directo tanto con lesiones premalignas como con neoplasias orales malignas, y por lo tanto probablemente se encuentre enriquecido en secreciones de biomarcadores tumorales. Por otra parte, las vesículas salivales generadas por las células tumorales son portadoras de oncogenes, tales como las moléculas de superficie CD44 y CD95L, que ya han sido encontradas en la saliva y verificadas como biomarcadores del cáncer de cabeza y cuello^{9,42,43,44}.

Un estudio de Palanisamy y col.⁸ indica que los exosomas derivados de la saliva humana modulan la expresión génica en los queratinocitos orales. Por ello la saliva se ha utilizado como un medio de diagnóstico para el COCE, para su detección se ha analizado la saliva, sus proteínas y sus ácidos nucleicos. Noh Jin Park y col.²² han demostrado recientemente que están presentes en la saliva miles de RNAm que pueden ser utilizados para la detección del cáncer oral. Los RNAm salivales parecen entrar en la cavidad oral a través de diversas fuentes, entre ellas de las tres principales glándulas salivales, del líquido crevicular gingival y de las células epiteliales descamadas orales. La mayoría de los RNAm de la saliva parecen estar presentes como formas parcialmente degradadas. Estos RNAm parcialmente degradados mantienen su estabilidad en la saliva a través de su asociación con macromoléculas no identificadas²².

Diferentes estudios demuestran también que tanto la saliva total como la saliva glandular contiene cantidades detectables de miRNAs²². Dos de estos miRNAs, MIR-125a y MIR-200a, se expresan diferencialmente en la saliva de los pacientes con COCE en comparación con la de los controles sanos. Estos hallazgos sugieren que la detección de miRNAs en la saliva puede ser utilizada como una herramienta no invasiva y rápida para el diagnóstico del cáncer oral²².

Como ya hemos comentado, varias líneas de evidencia implican a los exosomas en la presentación de antígenos. Se ha demostrado que los exosomas secretados a partir de células presentadoras de antígeno pueden estimular directamente las células T de una manera dependiente de antígeno y pueden inducir respuestas inmunogénicas o tolerogénicas. Por otra parte, los exosomas podrían contribuir indirectamente a la regulación de la respuesta inmune por mediación de la transferencia de antígenos a las células dendríticas. Por lo tanto, los exosomas pueden representar un mecanismo para la presentación de proteínas autoantigenicas intracelulares al sistema inmunitario¹⁰.

Estos hallazgos indican la probable participación de las vesículas exosomales en la regulación de las reacciones inmunológicas contra las proteínas intracelulares. I se podría relacionar con patologías sistémicas reumáticas, como el síndrome de Sjögren y el lupus eritematoso sistémico¹⁰.

Aunque la muestra de saliva total es relativamente fácil de obtener, tiene desventajas significativas como medio de aislamiento del RNAm. Toda la saliva contiene cientos de miles de células de origen diferente, así como contaminantes tales como bacterias comensales, que pueden alterar fácilmente los niveles de RNAm específicos sólo por la presencia diferencial de un tipo celular sobre otro, incluso entre diferentes muestras de saliva de un mismo donante. Por ejemplo, el estado periodontal de un donante puede alterar fácilmente el nivel relativo de expresión de los ácidos nucleicos, por contaminar la saliva total con numerosas células inflamatorias desde el fluido crevicular. Muchas de estas desventajas se reducen en gran medida por el uso de la saliva glandular²⁰.

Los exosomas aislados a partir de glándulas salivales individuales se derivan de las células de dentro de esa glándula específica y pueden reflejar el estado fisiológico de la glándula^{20,45}.

Los miRNAs exosomales salivales pueden ser valiosos no sólo como una herramienta de diagnóstico, sino que también pueden proporcionar una visión del papel que juegan los miRNAs en los procesos patofisiológicos subyacentes a diversas enfermedades de las glándulas salivales. Entre otros, puede ayudar a la comprensión de si los miRNAs específicos están implicados en anomalías de la producción o la regulación de la respuesta inflamatoria periférica de la glándula salival y si son característicos del síndrome de Sjögren. El análisis exosomal de miRNA también puede ser valioso en la comprensión de la patogénesis de tumores de las glándulas salivales^{20,46}.

Se necesitan más estudios para caracterizar mejor estas diferencias y para evaluar mejor el valor de los miRNAs exosomales salivales en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades de las glándulas salivales²⁰.

8.2. Exosomas y visión de futuro

Los exosomas salivales, al igual que otros tipos de exosomas, tienen claramente múltiples funciones. Así, regulan la comunicación entre células mediante la transferencia de información, participan en la regulación génica, y además están involucrados en la protección de los ácidos nucleicos frente a las nucleasas en la cavidad oral. La identificación de nuevos marcadores de exosomas salivales permitirá entender mejor la base molecular de las enfermedades orales y facilitará el diagnóstico y pronóstico de las mismas⁹.

Diferentes estudios nos abren una nueva perspectiva en la investigación sobre el uso de la transferencia exosomal de RNAm dirigida⁹.

Dado que el diagnóstico precoz de lesiones premalignas se asocia con una mejor supervivencia en pacientes con cáncer, el uso de biomarcadores salivales, puede ser por tanto, un método útil y prometedor en la detección de tumores en estadios tempranos. Debido a su fácil disponibilidad y facilidad de procesamiento, un enfoque

de diagnóstico basado en la saliva sería ventajoso en la consecución de una mejor comprensión de la base molecular de las enfermedades orales⁹.

Aunque los resultados iniciales son prometedores, se necesitan más investigaciones para evaluar los valores clínicos exactos y las funciones biológicas de los exosomas³¹.

Más allá del diagnóstico, los exosomas también han surgido como un candidato potencial para modalidades de inmunoterapia y vacunación, así como un nuevo vector para la terapia génica²⁰. Existe un creciente interés en el estudio de sistemas de administración de moléculas biológicas que sirven como medio de entrega de material genético, de drogas o de antígenos en el cuerpo; entre estas moléculas biológicas encontramos a los exosomas⁴⁷. Una de las finalidades de la administración de fármacos a nanoescala es mejorar los resultados terapéuticos mediante el aumento de su potencia en sitios específicos así como reducir la toxicidad sistémica⁴⁸. Están siendo utilizadas partículas a nanoescala, por ejemplo, partículas recombinantes de virus, para el desarrollo de vacunas contra el cáncer debido a su eficacia en la obtención de respuestas inmunes celulares y humorales. Se ha demostrado que las nanopartículas sintéticas podrían ser conjugadas a moléculas biológicas (por ejemplo, los exosomas) y podrían ser utilizadas como un sistema de suministro de una vacuna eficaz^{11,49,50}.

Hasta la fecha encontramos tres ensayos clínicos en Fase I en los que se utilizan los exosomas como medio para estimular respuestas inmunitarias contra tumores ya establecidos (los encontramos en China, Francia y los Estados Unidos)^{51,52,53} (Figura 10).

Los ensayos clínicos han establecido que los exosomas se pueden administrar de forma segura, aunque su potencia para provocar respuestas inmunes adecuadas para matar las células cancerosas deja mucho que desear. El número reducido de pacientes que han sido incluidos en los ensayos clínicos representa una limitación en la interpretación de los resultados. La mayor parte de la evidencia experimental está en el tratamiento de los tumores sólidos, y no se ha demostrado suficientemente que los tumores no sólidos (por ejemplo, enfermedades hematológicas) puedan ser tratadas con la tecnología exosomal. Además, la inmunoterapia exosomal se basa en gran medida en el sistema inmunitario, por ello sigue habiendo una necesidad de abordar el problema de los pacientes con cáncer que están inmunodeprimidos y / o

inmunosuprimidos, debido a los regímenes de quimioterapia y radioterapia y, por tanto, podrían no ser capaces de combatir a las células cancerosas solamente con su sistema inmunitario¹¹.

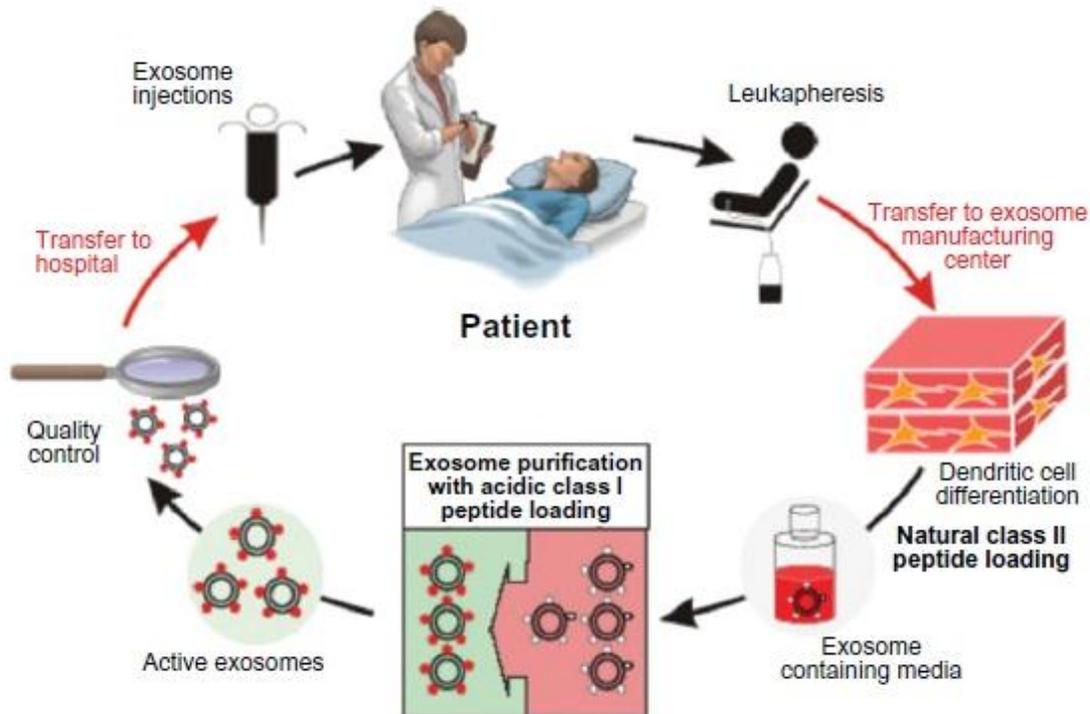


Figura 10. Fases clínicas de los exosomas en la inmunoterapia. El proceso de cómo los exosomas pueden ser recolectados, purificados, y utilizados en el tratamiento contra el cáncer¹¹.

El siguiente objetivo es aumentar la magnitud de la respuesta inmunitaria, esto podría lograrse mediante el recubrimiento artificial de los exosomas con antígenos tumorales para que sean más reconocibles por el sistema inmunológico⁵⁴.

A pesar de los modestos resultados de los ensayos clínicos en Fase I, el potencial para el avance y la aplicación de los exosomas como una vacuna a nanoescala contra el cáncer es muy real. Se necesitan ensayos clínicos multicéntricos más grandes y más investigación a fin de establecer la eficacia de los exosomas¹¹.

Aún con la gran cantidad de información ya conocida en relación a la biología exosomal queda mucho trabajo por hacer para garantizar un uso terapéutico seguro y eficaz de los exosomas. A medida que nuestra comprensión de la biología exosomal crece,

también lo hará la serie de principios para el diseño de los exosomas y conjugados exosomales utilizados en inmunoterapia⁵⁵.

Como se describe en esta revisión, los exosomas son importantes entidades moleculares implicadas en la comunicación intercelular, lo que contribuye a la fisiología y a la fisiopatología. Los exosomas también tienen un gran potencial como biomarcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico de enfermedades y también como una nueva modalidad terapéutica. El conjunto de evidencias científicas indica que los exosomas podrían ser utilizados como una vacuna a nanoescala contra el cáncer. Por ello más investigación en esta área no sólo valdría la pena sino que sería de suma importancia.

8. Conclusiones

- Los exosomas son vesículas de entre 50 y 100 nm de diámetro delimitadas por membrana, éstas son encargadas de regular la comunicación celular.
- La obtención de una muestra de saliva es un método no invasivo. Puede realizarse a partir de saliva no estimulada o estimulada y de total o glandular. Existe un alto grado de heterogeneidad entre los exosomas salivales.
- Para su aislamiento se utiliza centrifugación diferencial, filtración, gradientes de densidad, filtración por nanomembrana, purificación por inmunofinidad y cromatografía líquida de alta eficacia. Para la caracterización y cuantificación se utiliza microscopía electrónica de transmisión, Western blot, citometría de flujos, espectrometría de masas para cromatografía de líquidos, microscopía confocal y microscopía de Fuerza Atómica.
- Los exosomas derivados de pacientes con cáncer oral tienen variaciones de composición y morfología. Estos cambios se han asociado a progresión tumoral y metástasis. También se los relaciona en la regulación de reacciones autoinmunes y patologías como: enfermedad reumática sistémica, síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico.
- Los exosomas pueden ser potenciales biomarcadores salivales y una herramienta de detección de tumores en estadios tempranos. También son un candidato potencial para modalidades de inmunoterapia, vacunación y un nuevo vector para la terapia génica. Aunque los resultados iniciales son prometedores, se necesitan más investigaciones sobre sus aplicaciones clínicas y funciones biológicas.

8. Conclusions

- Salivary exosomes are vesicles with 50 to 100 nm of diameter bounded by membrane. These extracellular vesicles represent an important way of intercellular communication.
- Obtaining a sample of saliva is a noninvasive method. It can be made of stimulated or unstimulated and total or glandular saliva. There is a high degree of heterogeneity between salivary exosomes.
- For the exosomes isolation we can use differential centrifugation, filtration, density gradients, nanomembrane filtration, immunoaffinity purification and high performance liquid chromatography. For the characterization and quantification we use a transmission electron microscopy, Western blot, flow cytometry, mass spectrometry for liquid chromatography, confocal microscopy and atomic force microscopy.
- Exosomes derived from patients with oral cancer have variations in composition and morphology. These changes have been associated with tumor progression and metastasis. It is also related to the regulation of autoimmune reactions and diseases such as systemic rheumatic disease, Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus.
- Exosomes are potential salivary biomarkers and a tool to detect tumors at an early stage. They are also a potential candidate for immunotherapy modalities, vaccination and a new vector for gene therapy. Although initial results are promising, more research into clinical applications and biological functions is needed.

Agradecimientos

Gracias a Mireia Martín Satué por darme la idea del trabajo y por ayudarme y guiarme en todo su proceso.

9. Bibliografía

1. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):367-71.
2. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983 Aug;97(2):329-39.
3. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983 Jul;33(3):967-78.
4. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug;68(16):2667-88.
5. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373-83.
6. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(9):838-48.
7. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2012 Oct 15;21(R1):R125-34.
8. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One.* 2010 Jan 5;5(1):e8577.
9. Principe S, Hui AB, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics.* 2013 May;13(10-11):1608-23.

10. Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1517-21.
11. Tan A, De La Peña H, Seifalian AM. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine.* 2010 Nov 10;5:889-900.
12. Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol.* 2012 May 28;3:145.
13. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
14. Lau CS, Wong DT. Breast cancer exosome-like microvesicles and salivary gland cells interplay alters salivary gland cell-derived exosome-like microvesicles in vitro. *PLoS One.* 2012;7(3):e33037.
15. Müller G, Schneider M, Biemer-Daub G, Wied S. Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis. *Cell Signal.* 2011 Jul;23(7):1207-23.
16. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2440-8.
17. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006 May;20(5):847-56.
18. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1470-6.

19. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010 Sep 10;73(10):1907-20.
20. Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):34-8.
21. Ogawa Y, Taketomi Y, Murakami M, Tsujimoto M, Yanoshita R. Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(1):66-75.
22. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5473-7.
23. Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yamaguchi T, Toda T, Endo T, Tsubuki M, Yanoshita R. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):13-23.
24. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, Yates JR. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res*. 2009 Mar;8(3):1304-14.
25. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, Barros M. From the salivary proteome to the OralOme: comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol*. 2012 Jul;57(7):853-64.
26. Liu, J., Duan, Y., Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol*. 2012, 48, 569–577.
27. Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., De Palo, E. F., Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin. Chim. Acta* 2007, 383, 30–40.
28. Lee, J. M., Garon, E., Wong, D. T., Salivary diagnostics. *Orthod. Craniofac. Res*. 2009, 12, 206–211.

29. Yan, W., Apweiler, R., Balgley, B. M., Boontheung, P. et al., Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin. Appl.* 2009, 3, 116–134.
30. Henson, B. S., Wong, D. T., Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications. *Methods Mol. Biol.* 2010, 666, 21–30.
31. Duijvesz D, Luider T, Bangma CH, Jenster G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *Eur Urol.* 2011 May;59(5):823-31.
32. Lai RC, Yeo RW, Tan KH, Lim SK. Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol Adv.* 2013 Sep-Oct;31(5):543-51.
33. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, Chia D, Wong DT. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):949-57.
34. Zhang L, Xiao H, Karlan S, Zhou H, Gross J, Elashoff D, Akin D, Yan X, Chia D, Karlan B, Wong DT. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One.* 2010 Dec 31;5(12):e15573.
35. Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DT. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Feb;11(2):M111.012112.30.
36. Lau C, Kim Y, Chia D, Spielmann N, Eibl G, Elashoff D, Wei F, Lin YL, Moro A, Grogan T, Chiang S, Feinstein E, Schafer C, Farrell J, Wong DT. Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26888-97.
37. Koppers-Lalic D, Hogenboom MM, Middeldorp JM, Pegtel DM. Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery; a new approach in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Mar;65(3):348-56.
38. Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes. *Langmuir.* 2011 Dec 6;27(23):14394-400.

39. Franzmann EJ, Reategui EP, Carraway KL, Hamilton KL, Weed DT, Goodwin WJ. Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Mar;14(3):735-9.
40. Franzmann, E. J., Reategui, E. P., Pedroso, F., Pernas, F. G. et al., Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007, 16, 1348–1355.
41. Franzmann, E. J., Reategui, E. P., Pereira, L. H., Pedroso, F. et al., Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012, 34, 687–695.
42. Kim, J. W., Wieckowski, E., Taylor, D. D., Reichert, T. E. et al., Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 1010–1020.
43. Franzmann, E. J., Reategui, E. P., Carraway, K. L., Hamilton, K. L. et al., Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005, 14, 735–739.
44. Nakamura, H., Kawakami, A., Izumi, M., Nakashima, T. et al., Detection of the soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2005, 23, 915.
45. Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1517-21.
46. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Mar 15;15(6):1915-22.
47. Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther.* 2009 May;17(5):767-77.

48. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Nov;30(11):592-9.
49. Scheerlinck JP, Greenwood DL. Virus-sized vaccine delivery systems. *Drug Discov Today*. 2008 Oct;13(19-20):882-7.
50. Rieger J, Freichels H, Imberty A, Putaux JL, Delair T, Jérôme C, Auzély-Velty R. Polyester nanoparticles presenting mannose residues: toward the development of new vaccine delivery systems combining biodegradability and targeting properties. *Biomacromolecules*. 2009 Mar 9;10(3):651-7.
51. Dai S, Wei D, Wu Z, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther*. 2008;16(4):782–790.
52. Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med*. 2005; 3(1):10.
53. Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med*. 2005;3(1):9.
54. Xiu F, Cai Z, Yang Y, Wang X, Wang J, Cao X. Surface anchorage of superantigen SEA promotes induction of specific antitumor immune response by tumor-derived exosomes. *J Mol Med*. 2007;85(5): 511–521.
55. Sun D, Zhuang X, Zhang S, Deng ZB, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Mar;65(3):342-7.