



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**CONTRIBUCIÓN DE LOS EXOSOMAS AL DESARROLLO
DE TUMORES**

Autor: García Giménez, Jorge

Tutor: Dr Carlos Guillén Viejo

Convocatoria:Junio2017

RESUMEN

Los exosomas pertenecen a uno de los tres tipos de vesículas extracelulares (cuerpos apoptóticos, ectosomas y exosomas), aunque no están muy bien definidos y se cree que hay subpoblaciones. Su función normal es la de desechar moléculas tóxicas o moléculas excedentes, tanto expulsándolas fuera de la células como destruyéndolas en los lisosomas. En el cáncer, sin embargo, dado su aumento cualitativo y cuantitativo, son capaces de ejercer efectos en las células que los captan. Normalmente este efecto supone inmunosupresión, progresión tumoral y metástasis.

Tras comprobar la gran importancia del sistema inmune en el cáncer, se investigó el papel que los exosomas tenían en esa relación. Dicha investigación permite entender un poco mejor la relación del sistema inmune con el cáncer, así como descubrir nuevas dianas terapéutica y formas de diagnóstico.

La gran variabilidad de los exosomas, su capacidad para ser captados por diversas células o la fácil modificación de su contenido, los harían idóneos como coadyuvantes en la terapia contra el cáncer.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los exosomas son unas vesículas que se integran dentro de los cuerpos multivesiculares, produciéndose en casi todas las células. La liberación de los exosomas se produce por medio de la fusión de dichos cuerpos con la membrana plasmática, proceso en el que intervienen las Rab GTPasas. Su tamaño varía entre los 30-100nm [1], aunque hoy se acepta que puedan llegar hasta los 150nm. La aparición de técnicas físicas de caracterización más sensibles, lo han hecho posible. Estas técnicas son la cryo-EM (microscopía electrónica en condiciones criogénicas) o el rastreo de nanopartículas, llamado Nanosight. Las mencionadas técnicas se usan después de aislar los exosomas, permitiendo su visualización y caracterización física. La forma más fiable de aislar los exosomas sigue siendo la centrifugación escalada (primero se quitan los cuerpos más grandes), acabando en una ultracentrifugación a 100.000g en un medio con gradiente de densidad (medio de sacarosa, por ejemplo). Su forma es esférica, aunque el procedimiento usado para aislarlas normalmente, hace que adquieran forma de copa [2].

Los exosomas se diferencian del resto de vesículas extracelulares (cuerpos apoptóticos y ectosomas) por su tamaño, contenido, densidad y forma de liberación. Su función en

condiciones normales, es la de desechar moléculas excedentes o tóxicas del interior celular [1]. El contenido interno y de membrana de los exosomas es muy diverso, y varía entre tipos celulares y estados celulares. Tienen algunos marcadores característicos establecidos por consenso, aunque no existen unos perfectos y exclusivos, tales como: CD81, CD63, Hsp70, Alix, TSG101, Rab11B, MHCII y CHMP2A [1][2]. También tienen moléculas como mRNA, miRNA, ssDNA [2] y la maquinaria necesaria para producir los miRNA (complejo RISC, Dicer, Drosha...) [3]. Poseen moléculas que son más ubicuas del resto de vesículas extracelulares, como las tetraspaninas, flotilinas, anexinas, histonas, rafts lipídicos, proteínas ribosomales, fosfatidilserina [2]... En condiciones normales, el miRNA de los exosomas no causa ningún efecto en la célula que los endocita, porque suele degradarse en los lisosomas [4]. Sin embargo, en situaciones como el cáncer o el ateroma, la cantidad de exosomas aumenta, pudiendo escapar el contenido de los lisosomas y ejercer su efecto [5][4]. En condiciones tumorales su contenido cambia y pueden tener sintetinas, survivinas [2], antígenos tumorales, citoquinas... [5].

Los exosomas interactúan con otras células por medio de la endocitosis de los mismos, por unión a receptores o fusión de membrana. Pueden actuar de forma paracrina o endocrina [1]. Los exosomas pueden tener actividad antitumoral [6] o protumoral [7]. Su protumoralidad en cáncer se ha demostrado en diversas ocasiones, y tienen medios muy diversos para contribuir a ella. Es por ello, y porque los fabrican casi todos los tipos celulares, que son unos buenos candidatos para diagnóstico. Un ejemplo es el del cáncer ovárico, que se suele detectar en estadios avanzados. Sin embargo, con la detección de exosomas con fosfatidilserina se podría detectar la presencia de células tumorales en estadios iniciales [8]. Por otra parte, la detección de exosomas también puede servir para teracnóstica [9], seguimiento de tratamiento o factor pronóstico [10][11]. Un ejemplo de molécula para la teracnóstica sería la Hsp60 en cáncer colorrectal [9]. Hallar exosomas con la integrina alfa2beta1 podría ser indicativo de metástasis, o de la posibilidad de desarrollarla [16]. El problema de usar los exosomas para diagnóstico, es la dificultad para aislarlo y la cantidad que se consigue. Para ello se ha propuesto el uso de aptámeros específicos para cada tumor sujetos a nanotetraedros de DNA unidos a superficie de oro. Con ellos se aumenta mucho la sensibilidad y especificidad [12].

Los exosomas tumorales pueden desencadenar el desarrollo de metástasis [11], así como también los derivados del estroma. En lo referente al estroma pueden inducir metástasis de forma directa, por aumento de agresividad tumoral. Es el caso de los fibroblastos asociados

a tumor (CAF, que son protumorales) en cáncer de mama, cuyos exosomas aumentan la agresividad de las células tumorales por miRNAs [13]. Los CAF también se ha visto que pueden favorecer la progresión tumoral por la liberación de exosomas, que tienen nutrientes y la capacidad de generar una adaptación metabólica en tumor [14]. En el caso de la leucemia de linfocitos T del adulto, son los propios linfocitos infectados por el virus HTLV1, los que liberan exosomas que generan un fenotipo protumoral en las células madre mesenquimales de la médula [19]. La metástasis también se puede inducir indirectamente por el favorecimiento de la generación del nicho premetastásico (se basa en la modelación de la matriz extracelular, así como la expresión en el nicho de ciertas proteínas de adhesión. También se modifica la arquitectura vascular y se polarizan ciertas células inmunes, además de reclutar células de la médula ósea con capacidad inmunosupresora. La hipoxia y la inflamación son muy importantes para la formación del nicho premetastásico [15]). En el caso de los exosomas derivados de células ascíticas cancerígenas, estos generan la transición de células de mesotelio a CAF, induciendo así la metástasis de forma indirecta [17]. En el caso de los exosomas derivados de cáncer de páncreas, hacen que se exprese TGFbeta en el estroma del hígado haciendo que se exprese fibronectina, por lo que se reclutan macrófagos que favorecerán la metástasis [15].

Los exosomas no sólo son capaces de favorecer y promover la metástasis, hecho al que ayuda la remodelación vascular que permite a las células desprenderse del tumor y entrar en la circulación, sino que también son capaces de dirigir el sitio en el que se dé (organotropismo) [15][16]. Ello se debe a la expresión de integrinas en los exosomas que determinan su captación por células del estroma de determinados órganos; ITGalfa6 con ITGbeta1 e ITGbeta4 en pulmón, porque los captan fibroblastos y células epiteliales; ITGbeta5 e ITGalfaV promoverían en hígado, porque los captan células de Kupfer; y la ITGbeta3 indica organotropismo a cerebro. Esas mismas integrinas también pueden favorecer la formación del nicho premetastásico, como en el caso de ITGalfa6beta4, que puede promover la expresión de genes proinflamatorios y promigratorios en células del estroma, como son los fibroblastos en pulmón, a los cuales les hace expresar genes S100 [16] que favorecen la progresión tumoral. Por lo que las ITG y S100 podrían ser buenas candidatas como diana terapéutica.

Aunque no sólo están implicadas las integrinas en el organotropismo o la captación de exosomas. Un ejemplo es el caso del mieloma múltiple, en el cual el heparin sulfato de los exosomas también contribuye a la internalización [18].

El efecto protumoral de los exosomas (derivados de tumor o del estroma) puede ser directo: en el caso del glioblastoma se vio que los exosomas derivados de células tumorales transportaban TrkB, que aumenta la agresividad y proliferación de otras células [19]. Otro ejemplo es la transferencia de EGFR III por los exosomas derivados de glioblastoma. El EGFR III es una oncoproteína que favorece la transformación celular de células sanas [7]. Dos de los mecanismos por los que los exosomas pueden ser protumorales de forma indirecta es por medio de la alteración del sistema inmune [21] o por conferir resistencia a la quimioterapia [27].

Sin embargo, gran parte de la contribución a la progresión tumoral, o la metástasis, por parte de los exosomas se debe a su interacción con las células inmunes del estroma o del resto del cuerpo [5]: su capacidad para inhibir las células dendríticas (DC) [20], dar apoptosis de algunos linfocitos T (LT), generar LT reguladores (LTreg) [21], dar fenotipo protumoral en macrófagos [51], activar las células supresoras derivadas de linaje mielóide (MDSC) [22] y suprimir a las NK (Natural Killer) [65]. Aunque sus acciones dependen del tipo de tumor y del paciente.

Otro punto de gran interés es el posible uso de los exosomas contra el cáncer: tanto por su posibilidad de ser vehículos de fármacos [24] biocompatibles, biodisponibles oralmente, y atravesar la barrera hematoencefálica y la tumoral [23]. También tienen capacidades organotrópicas y pueden ser captados por células determinadas en función del origen de los exosomas [16]. Los exosomas pueden ser antitumorales *per se* o por derivar de células con diversos tratamientos que los hagan antitumorales [25][26].

OBJETIVOS

La importancia que ha cobrado la inmunología y el estroma en el cáncer, se debe tanto a su capacidad para revertirlo como para promoverlo. A esto se le suma el descubrimiento del papel inmunosupresor, metastásico y protumoral de los exosomas derivados de tumor, en condiciones normales. Por ello, y por la posibilidad de usarlos en terapéutica como fármacos *per se* (tras modificar o estimular diferentes células) o como portadores de principios activos, me dispongo a hacer una revisión de la implicación de los exosomas en la progresión, o regresión tumoral, a través de su interacción con el sistema inmune. Así como también revisar los posibles usos de los exosomas en la terapéutica y dar algunos ejemplos de su implicación a la hora de desarrollar resistencias.

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica en Pubmed y Google Académico usando palabras clave y frases como: "implications of exosomes in cancer", "tumor derived exosomes and immune system", "DCs and exosomes in cancer", "DC exosomes", "LT exosomes cancer", "macrophages exosomes cancer"...

También se realizó una búsqueda en la página de Annual Reviews con las palabras: "Exosomes and cancer" y "Tumor derived exosomes and immune system".

Tras ello se realizó una búsqueda cada mes (restringida a los nuevos meses que se cumplían) en Pubmed usando la frase: "Exosomes and cancer".

RESULTADOS

Células Dendríticas

Las DCs son esenciales a la hora de desarrollar una respuesta antitumoral, por presentación de antígenos (Ag), secreción de citoquinas y quimioquinas. Activan LB (linfocitos B), LT CD4+ y LT CD8+ [6]. Son capaces de endocitar exosomas de otras DCs por medio de LFA1/CD54 y lectina tipo C/CDR rico en manosa [28]. También son capaces de endocitar exosomas tumorales [29], entre otros. Las terapias con DCs fracasaron por su baja permanencia y su capacidad para ser inhibidas. Por el contrario, se ha visto que los exosomas derivados de DCs superaban esos inconvenientes. Un estudio apunta a que los exosomas de DCs, estimuladas *ex vivo* con células tumorales (introducen Ags, no péptidos), necesitan de los LB para una buena activación de los LTs. Se cree que los LB de la zona marginal transportan los exosomas derivados de DCs vía CD21 (porque los exosomas tienen moléculas de complemento adheridas) a las DCs foliculares, las cuales los captan y activan a LBs y LT CD4+. Aunque también se cree que los LB podrían activar a los LT CD4+ y éstos a los LT CD8+ [6]. En un modelo de ratón se vio que inclinaban el fenotipo de los LT a Th1 (antitumoral), que pueden generar cambio de isotipo en inmunoglobulinas de LB, diferenciar LB a células plasmáticas y generar LB de memoria. Por ello, se especula que los exosomas derivados de DC, cargados con Ag tumorales, pueden ser una mejor opción a la alumina como coadyuvantes, dado que la alumina puede inclinar el fenotipo de los LT hacia Th2 (protumoral) [34].

Se cree que los exosomas de DCs, cultivadas con células tumorales, también pueden activar a los LT CD8+, por sí mismos, dando una respuesta antitumoral. Para ello las DC

inmaduras (mejor inmaduras, porque son más capaces de captar Ag, procesarlo y presentarlo [26]) se deben cultivar con células tumorales (para aportar Ag tumoral) y estimular con IFN γ para incrementar la expresión de moléculas coestimuladoras, como B7 o CD54. Así, los exosomas activarían a los LT CD8 $^{+}$ por medio de la interacción TCR/pMHCII (pMHCII se refiere al complejo mayor de histocompatibilidad dos, cargado de péptido) y LFA1/CD54, además de coestimularse por medio de B7/CD28 [30]. Otra posibilidad, sería que las DCs maduras de entorno tumoral, captasen el pMHCII de los exosomas derivados de DCs inmaduras cultivadas con células tumorales y lo presentasen para activar a los LT CD8 $^{+}$ [31].

El problema es que en tumor suele haber DCs inmaduras, por el entorno inmunosuprimido que genera el tumor, lo cual se puede deber, en parte, a la eferocitosis o a los exosomas tumorales con fosfatidilserina [32]. Otro ejemplo de inmunosupresión es el de los exosomas derivados de células tumorales de cáncer de páncreas, los cuales transfieren miR-212-13p que inhibe RFXAP, el cual media la expresión de MHCII, entre otras [20]. También transfieren miR-203 que downregula el TLR-4, impidiendo la activación de las DCs por medio de él [33]. *In vitro* e *in vivo* (ratón), se vio que los exosomas derivados de tumor eran capaces de impedir la diferenciación de DCs en médula ósea, y las que conseguían diferenciarse se quedaban en estado de inmadurez [29].

Con respecto al problema de las DCs inmaduras en tumor un estudio apunta a que el uso de exosomas tumorales (proporcionan Ag tumoral a las DCs) unidos a alfa-galactosilceramida (agonista de TLR) podría ser una solución. Esto es así porque la alfa-galactosilceramida incrementa la expresión de MHC y activa a las células NKT, que son antitumorales [35]. En la terapia con exosomas de DCs, cultivadas con células tumorales, se vio que el mejor ligando de TLR para producir maduración de DC, en estroma tumoral, era el poly(I:C) (ligando de TLR-3 que emula al RNA viral). En el estudio concluyen que lo que mejor efectividad tiene, en un modelo murino, es tratar a las DC con células tumorales apoptóticas y poly(I:C), frente a lo mismo cambiando el poly(I:C) por CpG o LPS (ligandos alternativos de TLR). Dicho tratamiento aumentaba la presencia de LT CD4 $^{+}$, NK activados y LT CD8 $^{+}$ no exhaustos [36].

También se piensa que los exosomas de DCs pueden causar, *per se*, la apoptosis de células tumorales por la presencia de TRAIL, FasL y TNF α en membrana [25].

Linfocitos T

Un estudio realizado *in vitro*, demuestra que ningún LT es capaz de internalizar exosomas (LB y monocitos sí), por lo que cualquier efecto sobre ello debe de ser indirecto o por interacción con los receptores de membrana [37].

Se vio que los LT CD4+ activados eran capaces de generar exosomas y ser captados por las DCs vía LFA1/CD54 y TCR/MHC. En un modelo de ratón se vio que los exosomas de LT CD4+ activados producían la downregulación del MHC de las DCs, posiblemente por la transferencia de TCR. También eran capaces de mediar la apoptosis de DC por el FasL, en parte. Esto deriva en un ambiente de inmunosupresión hacia el tumor, dado que los LT CD8+ se activan, principalmente, vía DCs [38].

En el caso del carcinoma nasofaríngeo (asociado a infección por EBV) sus exosomas inhiben diferenciación, proliferación y secreción de citoquinas de los LT CD4+ y CD8+, seguramente vía LMP-1 [10]. También inducen su apoptosis por la galectina-9 de los exosomas vía Tim3 en los L Th1. La galectina-9 también media la diferenciación de LT en LTreg [21], a lo cual también contribuye, probablemente, LMP1 (proteína que producen las células infectadas por EBV) por fosforilación de STAT y ERK [10].

Un estudio *in vitro*, realizado con células de mesotelioma, apunta a que los exosomas derivados de ellas son capaces de inhibir la actividad de los LT estimulados con IL-2. Esto es así salvo en los LTreg, cuya proliferación y actividad se incrementa, siendo ellos contribuidores de la inmunosupresión y progresión tumoral [39]. Ello apunta a un posible mecanismo de resistencia a la terapia antitumoral con IL-2 [40], dejando de relieve la versátil capacidad de los exosomas tumorales para contribuir a la supervivencia del mismo.

Otra sorprendente acción de los exosomas derivados de tumor se vio en un estudio realizado *in vitro*, e *in vivo*, en un modelo de insulinoma. En él se comprobó que los exosomas derivados del insulinoma son proinflamatorios. También pueden llevar autoantígenos que activen LT autoreactivos contra células pancreáticas o gliales [41]. Lo cual podría desencadenar una diabetes tipo 1, entre otras patologías.

Linfocitos T reguladores

Los LTreg son un subtipo de LT (CD25+ y FoxP+, que es un factor de transcripción) que son inmusupresores y, por ende, protumorales por inhibición de la actividad antitumoral. Un estudio apunta a que los exosomas derivados de LTreg contribuyen a la inhibición de los

LT por medio de Let7d, que es un miRNA que downregula COX2. Los exosomas, cuya liberación es Rab27 dependiente (Foxp3 también podría estar implicado), también transportan miR-155 que promueve la diferenciación de LT CD4+ en LTreg [42]. Otro estudio *in vivo*, en un modelo de melanoma en ratón, comprobó que los exosomas derivados de LTreg CD8+ CD25+ FoxP+ contribuyen a la inhibición de la respuesta antitumoral de los LT CD8+ activados [43]. En humanos, se cree que los exosomas derivados de tumores de cabeza y cuello inducen la proliferación, diferenciación y activación de LTreg. Ello podría deberse a la IL-10 y TGFbeta de los exosomas [44]. En cáncer de pulmón se vio que sus exosomas tenían mucho EGFR. Este, al ser captado por las DCs, producía inmunotolerancia por la expresión de IDO (indolamina-2,3-dioxigenasa), la cual hace que se generen LTregs [45] y se dé inmunosupresión. En cáncer nasofaríngeo también se vio que sus exosomas inducían proliferación, diferenciación y activación de LTregs (LMP1 podría estar implicado). A diferencia del resto de LTs en ellos la galectina-9 no causa apoptosis por su baja expresión de Tim3. Además, los exosomas producen migración y quimioatracción por el CCL20 que contienen [46].

Otro mecanismo de inmusupresión se debe al CD39 y CD73, que son ectonucleasas (enzimas de membrana que degradan ATP a adenosina pasando por 5'AMP) presentes en los exosomas secretados por ciertos tumores. Se necesitan las dos enzimas para producir adenosina, la cual produce anergia en los LT, y además incrementa la proporción de LTreg. Los LTreg humanos son CD39+ y CD73 inducibles, pero en muy baja proporción. Así, los LT, LB y exosomas derivados de tumores, expresan el CD73 suficiente para complementar a los LTreg CD39+ [47], y así producir un ambiente inmunosupresivo en tumor [48].

Por todo ello el papel protumoral, e inmunosupresivo, de los exosomas se debe, en gran medida, a los LTregs.

Macrófagos

Los macrófagos son las células del sistema inmune más abundantes en estroma, y son capaces de promover progresión tumoral y metástasis. Hay estudios que vinculan una mayor densidad a un peor pronóstico. También pueden tener actividad antitumoral (en cáncer de páncreas una mayor densidad es un indicador positivo) [49]. Todo depende de su fenotipo y activación. Así el M1 sería antitumoral y el M2 protumoral, aunque hay moléculas de M1 que son protumorales (como TNFalfa, CCL2, IL-6) y no hay fenotipos absolutos [50]. De esta forma se podría llegar a hablar de fenotipo protumoral y antitumoral.

En cuanto a los exosomas derivados de tumor, suelen promover un fenotipo protumoral en los macrófagos [52]. Al respecto hay tanto ejemplo de estudios realizados *in vitro* como *in vivo*.

Un estudio realizado con células de cáncer colorrectal mostraba que los exosomas derivados de las células tumorales eran suficientes para generar macrófagos protumorales y activados (CD80, CD86, MCP-1, TNFalfa, catepsinaB (es protumoral, causa inflamación y remodelación de ECM)). Los exosomas derivados de las células tumorales transportaban muchas moléculas relacionadas con el citoesqueleto (vimentina, por ejemplo) produciendo la reorganización del mismo (se ve por F-actina) en los macrófagos, lo cual es uno de los puntos clave en la transformación de los mismos. El reconocimiento de los exosomas vía FcR ayudaba a la reorganización del citoesqueleto [51].

Los estudios realizados *in vivo*, que suelen ser más fiables en cuanto a extrapolación en humanos, también apuntan a que los exosomas tumorales promueven un fenotipo protumoral en los macrófagos. Un estudio *in vivo* (ratón) comprobó que los exosomas derivados de cáncer de mama desencadenaban la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos (activación de NF-KB vía TLR-2). Este tipo de citoquinas, como el IL-6 o el TNFalfa, promueven la progresión tumoral y la metástasis [54]. Otro estudio realizado con un modelo murino comprobó que los exosomas de las células de cáncer ovárico epitelial contenían miR-222-3p. Este miRNA es capaz de polarizar los macrófagos hacia un fenotipo M2 (inhibe SOCS3, por lo que se activa STAT3 y se transcriben los genes M2) con actividad protumoral (proliferación y migración de células tumorales). También produce angiogénesis y linfangiogénesis en el ambiente tumoral [55].

Los ligandos de los exosomas pueden servir para bloquear los receptores celulares por inhibición competitiva. Ello se deduce, entre otros, por un estudio *in vivo* realizado con células de adenocarcinoma HER2+. En él se comprobó que los exosomas también portaban el HER2 en membrana, siendo un posible mecanismo por el cual la terapia con trastuzumab puede fallar. Haciendo posible que los exosomas inhiban la citotoxicidad, o fagocitosis, dependiente de anticuerpo, además de bloquear la acción terapéutica de los anticuerpos [56].

Por otro lado, también se puede usar la capacidad de los macrófagos para acabar con el tumor. Esa hipótesis es la que explora un estudio que usa la proteína TWEAK (antimetastásica y tumoral). Los macrófagos tratados con TWEAK secretan exosomas cargados con miR-7. Estos exosomas, al ser captados por las células de cáncer epitelial ovárico, reducen la metástasis por inhibir la expresión de EGFR (se ha visto en ratón con células tumorales humanas) [57].

Células supresoras derivados de linaje mieloide (MDSC)

Las MDSC son células inmunosupresoras (inhiben LT CD8+), y secretan citoquinas proinflamatorias (TNFalfa, IL-6...), por lo que son protumorales [22]. Existen diversos fenotipos que pueden adquirir las MDSC, pero se cree que el que más promueven los exosomas derivados de tumor es el inmunosupresivo y proinflamatorio (CD11b+ LysG bajo LysC+ en ratón) [58].

La acción de los exosomas derivados de tumor sobre las MDSC difiere en función del tipo de tumor, el estado de las células que se use o incluso el tipo de estudio. De todas formas, siempre implica aumento de la actividad inmusupresiva y protumoral de las MDSC.

Un estudio realizado en ratón con células de cáncer de mama señala que los exosomas derivados de tumor son capaces de activar y aumentar proliferación de MDSC. También apuntan a que el efecto puede deberse, en parte, por el PGE2 y TGFbeta de los exosomas [59]. Sin embargo, otro estudio *in vivo* con tumores humanizados en ratón, y muestras de paciente, señalaba que los exosomas derivados de tumor eran capaces de activar las MDSC (independiente de PGE2), pero no aumentar su proliferación (los factores solubles sí que podían) [60].

Los estudios, con independencia a las líneas celulares y los modelos, ponen de relieve que las MDSC se activan por la activación de Myc88, el cual media la secreción de IL-6 entre otras, y hace que se active STAT3, dando inmunosupresión por inhibición de LTs (por diferentes mecanismos) [21][60][61][62]. Por otro lado, el estudio realizado en diversos modelos murinos y con muestras de pacientes, demuestra que la activación de TLR2 está implicada en la activación de la vía Myc88/IL-6/STAT3 (exosomas derivados de tumor con Hsp72 como agonista) [60]. Dato que también comprueba un estudio realizado con un modelo de cáncer renal en ratón, sólo que con exosomas derivados de tumor que tienen Hsp70 como agonista del TLR2 (este estudio dice que también se secreta VEGF con la activación de Myc88 y que al activarse STAT3 la inhibición de los LT se debe a la inducción de la iNOS y la Arg1 en las MDSC) [61]. En contraposición, un estudio realizado por Zhang et al, en diversos modelos murinos de cáncer, ponía de manifiesto que la activación de la vía Myc88/IL-6/STAT3 era independiente de los agonistas de TLR2 que puedan existir en exosomas (al activarse Myc88 también se secretaba TNFalfa y CCL2). La activación de las MDSC favorece la formación de metástasis, angiogénesis y progresión tumoral [22]. Apoyando ese estudio, otro realizado *in vivo*, en un modelo de mieloma múltiple en ratón,

también comprobaba la falta de necesidad de exosomas derivados de tumor que contengan Hsp70 para activar MDSC vía activación de STAT3 o STAT1 [58]. Zhang et al aportaban una hipótesis a la discrepancia en cuanto al papel de TLR2, apuntando a que la verdadera debería ser la que implica una activación de Myc88 independiente de TLR2.

El estudio realizado en mieloma múltiple también comprobaba que los exosomas derivados de células tumorales incrementaban la expresión de moléculas de adhesión de las MDSC, permitiendo así su acumulación en órganos linfáticos secundarios. Ello haría que se generasen nichos premetastásicos [58]. Hecho que también apoya otro estudio realizado *in vivo*, sólo que en ese caso el nicho se generaba en hígado y pulmón [22]. En melanoma se vio que los exosomas derivados de tumor "educaban" la médula ósea, produciendo la proliferación y diferenciación de células C-KIT+Tie2+. Las cuales mediaban angiogénesis y crecimiento tumoral, así como influían en la creación del nicho premetastásico. Todo ello se debía a la transferencia de la oncoproteína MET en los exosomas tumorales [11]. Por último, señalar otro estudio realizado en ratón, que comprobó que los ratones con cáncer de mama tratados con doxorubicina eran propensos a tener metástasis de pulmón. Esto se debía a que la doxorubicina hacía que las MDSC produjeran miR-126a (posible indicador del éxito del tratamiento con doxorubicina y posible diana terapéutica en caso negativo) y lo secretaran en exosomas. Este miR-126a produce la secreción de IL-13 (proinflamatoria y protumoral) por los Th2 de los pulmones, y activaba las células endoteliales dando angiogénesis. Ello contribuye a formar el nicho premetastásico en pulmón [62].

Para finalizar este apartado diré que el estudio que usaba muestras de pacientes, también propuso la posibilidad de usar fármacos inhibidores de bombas (amilorida, que es inhibidor de la bomba H⁺/Na⁺) para el tratamiento coadyuvante del cáncer, por ser capaces de inhibir la secreción de exosomas y, por ende, la activación de MDSC, parcialmente [60].

Células Natural Killer

La actividad de las NK tiene una gran trascendencia a la hora de eliminar los tumores. Gran parte de su actividad se debe a los receptores NKG2D y DNAM-1 (como en el caso de cáncer ovárico epitelial). Los ligandos de estos receptores (en el caso de DNAM-1 son PVR y nectina-2, que se expresan por estrés y condiciones adversas (células infectadas, sometidas a mucho estrés, tumorales...)). Las NK ejercen su efecto citotóxico mediado por estos receptores sin necesidad de coestimuladores o de MHC I (el cual es un inhibidor de la actividad de NKG2D, entre otros, por ello no "atacan" indiscriminadamente) [63]. Diversos

estudios demuestran que el receptor NKG2D se puede downregular por el contacto prolongado de ligandos de NKG2D (presentes en los exosomas, por ejemplo), como son los MICA/B o los ULBP1-3 [64].

Sin embargo, un estudio realizado con los exosomas derivados del suero de pacientes con leucemia mieloide aguda, comprueba que inhiben a las NK por la downregulación del NKG2D, vía TGFbeta de los exosomas [65]. Con respecto al IL-15, otro estudio realizado en humanos, y en ratón, afirma que el tratamiento de pacientes (con melanoma) con exosomas derivados de células dendríticas maduras (y tratadas con antígenos tumorales) que lleven ligandos de NKG2D y IL-15Ralfa (se liga a IL-15 y puede unirse al receptor de otra célula desencadenando una señal) puede revertir el cáncer. En los pacientes las células NK se reactivaban y expresaban más NKG2D (también los LT CD8+, aunque ellos necesitan coestimuladores para su función citotóxica). También se incrementa la secreción de IFNgama, si los exosomas se tratan con IL-15 [66].

De todos modos, a pesar de la downregulación de NKG2D por parte de los exosomas, las células NK tienen otras alternativas. Además de la posibilidad, por parte de los exosomas derivados de NKs, de ser antitumorales en ciertas circunstancias.

Terapéutica y Resistencias

Los exosomas son unos vehículos idóneos para la terapéutica. No sólo por su capacidad para albergar contenidos muy dispares (incluso pueden actuar como pequeñas ``fábricas`` de RNA, miRNA [3] y procesar proteínas [53]) y protegerlos, sino también por ser biodisponibles oralmente [67] y atravesar, tanto la barrera hematoencefálica como la tumoral. El problema es la poca rentabilidad de su extracción, por lo que se tenderá en el futuro a su fabricación artificial [23], aunque un estudio *in vivo* demostró la eficacia y seguridad de los exosomas derivados de leche bovina cargados con paclitaxel [67].

No sólo se puso de relieve la capacidad para transportar principios activos, sino también la de modificar su contenido tras la quimioterapia. Es el caso de un estudio realizado en cáncer de mama. Este sugiere que, tras el tratamiento neoadyuvante (paclitaxel o epirrubicina) los exosomas derivados de células endoteliales se enriquecen con miR-503 (en condiciones de estrés las células endoteliales lo producen: radiación, taxanes...). Esto afecta a las células tumorales inhibiendo proliferación e invasión [24].

Otra posible aplicación sería la de aumentar la seguridad de las terapias con linfocitos T-CAR. Estos linfocitos se extraen de los pacientes y se modifican genéticamente para que reconozcan un determinado antígeno (CAR es un receptor derivado de Ig que se diseña “a

medida”) dando citotoxicidad y liberando citoquinas (también se expanden *in vivo*). Estos linfocitos dan muchos efectos adversos que se eliminan si se usan los exosomas derivados de ellos [68]. En cuanto al uso de exosomas derivados de células del sistema inmune, un estudio en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (en estadio IIIb/IV) apunta a que los exosomas derivados de DCs, cultivadas con células tumorales y activadas con IFN γ , podrían ser utilidad.

El lado negativo de los exosomas es su capacidad para generar y/o propagar las resistencias. Un ejemplo de ello nos lo da un estudio realizado con CAF sacados de tumor pancreático. Al tratar el tumor con gentamicina, los CAF secretaban exosomas que mediaban la expresión de Snail en células tumorales (produce resistencia a gentamicina) [27].

CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento del papel de los exosomas en el cáncer como mensajeros y modificadores celulares, se ha puesto mucho interés en ellos. La capacidad de los exosomas derivados de tumor para promover la progresión tumoral y dar metástasis, ha contribuido a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en los exosomas, o en los mecanismos de generación y exocitosis de los mismos. También se ha buscado tratar el tumor para modificar el contenido de los exosomas derivados del mismo, y así dar un efecto antitumoral o al menos frenar la protumoralidad.

El sistema inmune contribuye enormemente a la progresión y regresión tumoral, siendo los exosomas derivados del tumor unos grandes modificadores de la respuesta tumoral. Con sus exosomas el tumor consigue progresar, con la ayuda del sistema inmune en condiciones normales. Por otro lado, el sistema inmune o el estroma, también pueden promover el crecimiento tumoral y generar inmunosupresión. Pueden llegar a promover la generación del nicho premetastásico. También han permitido conocer, un poco mejor, hechos importantes como el organotropismo en metástasis o las resistencias quimioterapéuticas.

De todas formas, también hay exosomas cuyo contenido promueve la regresión tumoral. Ellos derivan de un determinado tipo celular o de células estimuladas para que cambien su contenido exosomal y sean antitumorales. Así emergen como nuevas opciones a investigar para la terapéutica.

Otro gran atractivo de los exosomas es su capacidad para transportar moléculas (muy diversas y de baja biodisponibilidad por otros medios) y la capacidad artificial para modificar el contenido *in vitro*, así como el organotropismo (característica que podría permitir dirigir la

terapia hacia la alteración de los nichos premetastásicos directamente), en función de la célula que los genere. También su capacidad para ser captados y generados por la mayoría de tipos celulares. Por ello, y por sus capacidades intrínsecas (biodisponibilidad oral, capacidad para atravesar barreras biológicas...), han llamado la atención para ser vehículos de principios activos y moléculas biológicas. No sólo lo antedicho, sino también su capacidad para transcribir RNA y traducir proteínas, podría revolucionar la terapéutica, así como su uso para diagnóstico precoz, y aumentar la probabilidad de éxito de los tratamientos oncológicos.

Es por ello que podrían llegar a tener una importancia vital en diversas áreas de la medicina y la farmacia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stella Kourembanas. Exosomes: Vehicles of Intercellular Signaling, Biomarkers, and Vectors of Cell Therapy. *Annu. Rev. Physiol.* 2015. 77:7.1–7.15.
2. Marina Colombo, Graca Raposo, and Clotilde Théry. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2014. 30:255–89.
3. Sonia A. Melo, Hikaru Sugimoto, Joyce T. O’Connell, Noritoshi Kato, Alberto Villanueva, August Vidal et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2014 November 10; 26(5).
4. Mario Leonardo Squadrito, Caroline Baer, Frédéric Burdet, Claudio Maderna, Gregor D. Gilfillan, Robert Lyle et al. Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells. *Cell Reports* 8, 1432–1446, September 11, 2014.
5. Paola Filipazzi, Maja Bürdek, Antonello Villa, Licia Rivoltini, Veronica Huber. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Seminars in Cancer Biology* 22 (2012) 342–349.
6. Tanja I. Näslund, Ulf Gehrman, Khaleda R. Qazi, Mikael C. I. Karlsson, and Susanne Gabrielsson. Dendritic Cell-Derived Exosomes Need To Activate Both T and B Cells To Induce Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 2013, 190: 2712–2719.
7. Khalid Al-Nedawi, Brian Meehan, Johann Micallef, Vladimir Lhotak, Linda May, Abhijit Guha and Janusz Rak. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat cell bio* 20 April 2008.
8. Jayanthi Lea, Raghava Sharma, Fan Yang, Hong Zhu, E. Sally Ward and Alan J. Schroit. Detection of phosphatidylserine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: a proof of concept study. *Oncotarget*, January 22, 2017.
9. Claudia Campanella, Francesca Rappa, Carmelo Sciumé, Antonella Marino Gammazza, Rosario Barone, Fabio Bucchieri et al. Heat Shock Protein 60 Levels in Tissue and Circulating

Exosomes in Human Large Bowel Cancer Before and After Ablative Surgery. *Cancer*, September 15, 2015.

10. Shu-biao Ye, Ze-Lei Li, Dong-hua Luo, Bi-jun Huang, Yu-Suan Chen, Xiao-shi Zhang et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, June 19, 2014.

11. Héctor Peinado, Maša Alečković, Simon Lavotshkin, Irina Matei, Bruno Costa-Silva, Gema Moreno-Bueno et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, June 2012.

12. Sai Wang, Liqin Zhang, Shuo Wan, Sena Cansiz, Yuan Liu, Ren Cai et al. Aptasensor with Expanded Nucleotide Using DNA Nanotetrahedra for Electrochemical Detection of Cancerous Exosomes. *ACS Nano*, 13 Mar 2017.

13. Elvira Donnarumma, Danilo Fiore, Martina Nappa, Giuseppina Roscigno, Assunta Adamo, Margherita Iaboni et al. Cancer associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget*, January 19, 2017.

14. Hongyun Zhao, Lifeng Yang, Joelle Baddour, Abhinav Achreja, Vincent Bernard, Tyler Moss et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer. *eLife* 2016;5.

15. Heath A. Smith and Yibin Kang. Determinants of Organotropic Metastasis. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2017. 1:21.1–21.21.

16. Ayuko Hoshino, Bruno Costa-Silva, Tang-Long Shen, Goncalo Rodrigues, Ayako Hashimoto, Milica Tesic Mark et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015 November 19.

17. Mingtian Wei, Tinghan Yang, Xiangzheng Chen, Yangping Wu, Xiangbing Deng, Wanbin He et al. Malignant ascites-derived exosomes promote proliferation and induce carcinoma-associated fibroblasts transition in peritoneal mesothelial cells. *Oncotarget*, February 02, 2017.

18. Anurag Purushothaman, Shyam Kumar Bandari, Jian Liu, James A. Mobley, Elizabeth E. Brown, and Ralph D. Sanderson. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 291, NO. 4, pp. 1652–1663, January 22, 2016.

19. Sandra Pinet, Barbara Bessette, Nicolas Vedrenne, Aurélie Lacroix, Laurence Richard, Marie-Odile Jauberteau et al. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget* July 02, 2016.

20. Guoping Ding, Liangjing Zhou, Yingming Qian, Mingnian Fu, Jian Chen, Jionghuang Chen et al. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. August 14, 2015.

21. Jihène Klibi, Toshiro Niki, Alexander Riedel, Catherine Pioche-Durieu, Sylvie Souquere, Eric Rubinstein et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. BLOOD, 26 FEBRUARY 2009.

22. Yuelong Liu, Xiaoyu Xiang, Xiaoying Zhuang, Shuangyin Zhang, Cunren Liu, Ziqiang Cheng et al. Contribution of MyD88 to the Tumor Exosome -Mediated Induction of Myeloid Derived Suppressor Cells. The American Journal of Pathology, Vol. 176, No. 5, May 2010.

23. Dinh Ha, Ningning Yang, Venkatarreddy Nadithe. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. Acta Pharmaceutica Sinica B 2016;6(4):287–296.

24. Nicolas Bovy, Benoît Blomme, Pierre Frères, Stella Dederen, Olivier Nivelles, Michelle Lion. Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. Oncotarget, March 10, 2015.

25. Taoyong Chen, Jun Guo, Mingjin Yang, Xuhui Zhu, and Xuetao Cao. Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and Act as Efficient Tumor Vaccine. J Immunol 2011.

26. Andrea Sobo-Vujanovic, Stephan Munich, Nikola L. Vujanovic. Dendritic-cell exosomes cross-present Toll-like receptor-ligands and activate bystander dendritic cells. Cellular Immunology 289 (2014) 119–127.

27. Richards KE, Zeleniak AE, Fishel ML, Wu J, Littlepage LE, Hill R. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. Oncogene, 26 September 2016.

28. Siguo Hao, Ou Bai, Fang Li, Jinying Yuan, Suzanne Laferte² and Jim Xiang. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. Immunology, September 2006.

29. Shaohua Yu, Cunren Liu, Kaihong Su, Jianhua Wang, Yuelong Liu, Liming Zhang et al. Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. The Journal of Immunology, 2007, 178: 6867–6875.

30. Marek Kovar, Onur Boyman, Xuefei Shen, Inkyu Hwang, Rachel Kohler, and Jonathan Sprent. Direct stimulation of T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells. PNAS, August 1, 2006.

31. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. Nat Immunol. 2002 Dec.

32. RB Birge, S Boeltz, S Kumar, J Carlson, J Wanderley, D Calianese et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. Nat, 2006.

33. Min Zhou, Jionghuang Chen, Liangjing Zhou, Wenchao Chen, Guoping Ding, Liping Cao. Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203. *Cellular Immunology* 292 (2014) 65–69.

34. Khaleda Rahman Qazi, Ulf Gehrman, Emilie Domange Jordö, Mikael C. I. Karlsson, and Susanne Gabrielsson. Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B cell-dependent mechanism. *BLOOD*, 19 MARCH 2009.

35. Stefanie Hiltbrunner, Pia Larssen¹, Maria Eldh, Maria-Jose Martinez-Bravo, Arnika K. Wagner, Mikael C.I. Karlsson et al. Exosomal cancer immunotherapy is independent of MHC molecules on exosomes. *Oncotarget*, May 25, 2016.

36. Martina Damo, David S. Wilson, Eleonora Simeoni & Jeffrey A. Hubbell. TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma. *Sci Rep*. 2015 Dec 3.

37. Laurent Muller, Masato Mitsuhashi, Patricia Simms, William E. Gooding & Theresa L. Whiteside. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function related genes in human T cell subsets. *Sci Rep*. 2016 Feb 4.

38. Yufeng Xie, Haifeng Zhang, Wei Li, Yulin Deng, Manjunatha Ankathatti Munegowda, Rajni Chibbar. Dendritic Cells Recruit T Cell Exosomes via Exosomal LFA-1 Leading to Inhibition of CD8+ CTL Responses through Downregulation of Peptide/MHC Class I and Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 2010.

39. Aled Clayton, J. Paul Mitchell, Jacquelyn Court, Malcolm D. Mason, and Zsuzsanna Tabi. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res* 2007;67(15):7458–66.

40. Steven A. Rosenberg. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 5451–5458.

41. Huiming Sheng, Saleema Hassanali, Courtney Nugent, Li Wen, Emma Hamilton-Williams, Peter Dias, and Yang D. Dai. Insulinoma-released exosomes or microparticles are immunostimulatory and can activate autoreactive T cells spontaneously developed in non-obese diabetes mice. *J Immunol*. 2011 August 15.

42. Isobel S. Okoye, Stephanie M. Coomes, Victoria S. Pelly, Stephanie Czieso, Venizelos Papayannopoulos, Tanya Tolmachova et al. MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* 41, 89–103, July 17, 2014.

43. Yufeng Xie, Xueshu Zhang, Tuo Zhao, Wei Li, Jim Xiang. Natural CD8+25+ regulatory T cell-secreted exosomes capable of suppressing cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity against B16 melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438 (2013) 152–155.

44. Marta Szajnik, Malgorzata Czystowska, Mirosław J. Szczepanski, Magis Mandapathil², Theresa L. Whiteside. Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up- Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg). *PLoS ONE*, July 22, 2010.

45. Shao-hong Huang, Yun Li, Jian Zhang, Jian Rong, and Sheng Ye. Epidermal Growth Factor Receptor-Containing Exosomes Induce Tumor-Specific Regulatory T Cells. *Cancer Investigation*, 2013.
46. Dhafer Mrizak, Nathalie Martin, Clement Barjon, Anne-Sophie Jimenez-Pailhes, Rami Mustapha, Toshiro Niki et al. Effect of Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes on Human Regulatory T Cells. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 2015.
47. P. J. Schuler, Z. Saze, C.-S. Hong, L. Muller, D. G. Gillespie, D. Cheng et al. Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014.
48. François Ghiringhelli, Mélanie Bruchard, Fanny Chalmin, and Cédric Rébé1. Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunoescape. *Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume*, 2012.
49. Bin-Zhi Qian and Jeffrey W. Pollard. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* 141, April 2, 2010.
50. Alberto Mantovani, Silvano Sozzani, Massimo Locati, Paola Allavena and Antonio Sica. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes
51. Zhipeng Chen¹, Lijuan Yang, Yizhi Cui, Yanlong Zhou, Xingfeng Yin, Jiahui Guo et al. Cytoskeleton-centric protein transportation by exosomes transforms tumor-favorable macrophages. *Oncotarget*, September 1, 2016.
52. Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):2912-5.
53. Yinghui Zhu, Xianwei Chen, Qingfei Pan, Yang Wang, Siyuan Su, Cuicui Jiang et al. A Comprehensive Proteomics Analysis Reveals a Secretory Path- and Status-Dependent Signature of Exosomes Released from Tumor Associated Macrophages. *J. Proteome Res*, 27 Aug 2015.
54. Amy Chow, Weiyang Zhou, Liang Liu, Miranda Y. Fong, Jackson Champer, Desiree Van Haute et al. Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NF-κB. *Sci Rep.* 2014 Jul 18;4:5750.
55. Xiang Ying, Quanfeng Wu, Xiaoli Wu, Qinyi Zhu, Xinjing Wang, Lu Jiang et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget*, May 09, 2016.
56. Christina Battke, Romana Ruiss, Ulrich Welsch, Pauline Wimberger, Stephan Lang, Simon Jochum et al. Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60:639–648.

57. Yuan Hu, Dong Li, Anyue Wu, Xingdi Qiu, Wen Di, Lei Huang et al. TWEAK-stimulated macrophages inhibit metastasis of epithelial ovarian cancer via exosomal shuttling of microRNA. *Cancer Letters*, 2017.

58. Jinheng Wang, Kim De Veirman, Nathan De Beule, Ken Maes, Elke De Bruyne, Els Van Valckenborgh et al. The bone marrow microenvironment enhances multiple myeloma progression by exosome-mediated activation of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, November 02, 2015.

59. Xiaoyu Xiang, Anton Poliakov, Cunren Liu, Yuelong Liu, Zhong-bin Deng, Jianhua Wang et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor Exosomes. *Int J Cancer*. 2009 June 1.

60. Fanny Chalmin, Sylvain Ladoire, Grégoire Mignot, Julie Vincent, Mélanie Bruchard, Jean-Paul Remy-Martin et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*. 2010;120(2):457–471.

61. Jianjun Diao, Xue Yang, Xuedong Song, Shiyu Chen, Yunfeng He, Qingsong Wang et al. Exosomal Hsp70 mediates immunosuppressive activity of the myeloid-derived suppressor cells via phosphorylation of Stat3. *Med Oncol* (2015) 32:35.

62. Z Deng, Y Rong, Y Teng, X Zhuang, A Samykutty, J Mu et al. Exosomes miR-126a released from MDSC induced by DOX treatment promotes lung metastasis. *Oncogene* (2016).

63. Nadia Guerra, Ying Xim Tan, Nathalie T. Joncker, Augustine Choy, Fermin Gallardo, Na Xiong et al. NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* 28, 571–580, April 2008.

64. Lucia Mincheva-Nilsson, Vladimir Baranov. Cancer exosomes and NKG2D receptor–ligand interactions: Impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance. *Seminars in Cancer Biology*, 2014.

65. Mirosław J. Szczepanski, Marta Szajnik, Ann Welsh, Theresa L. Whiteside, and Michael Boyiadzis. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1. *Haematologica*. 2011 Sep.

66. Sophie Viaud, Magali Terme, Caroline Flament, Julien Taieb, Fabrice Andréé, Sophie Novault et al. Dendritic Cell-Derived Exosomes Promote Natural Killer Cell Activation and Proliferation: A Role for NKG2D Ligands and IL-15Ra. *PLoS ONE*, 2009.

67. Ashish K. Agrawal, Farrukh Aqil, Jeyaprakash Jeyabalan, Wendy A. Spencer, Joshua Beck, Beth W. Gachuki et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine*. 2017 Mar 11.

68. Xiang-Jun Tang, Xu-Yong Sun, Kuan-Ming Huang, Li Zhang¹, Zhuo-Shun Yang, Dan-Dan Zou et al. Therapeutic potential of CAR-T cell-derived exosomes: a cell-free modality for targeted cancer therapy. *Oncotarget*, October 19, 2015.