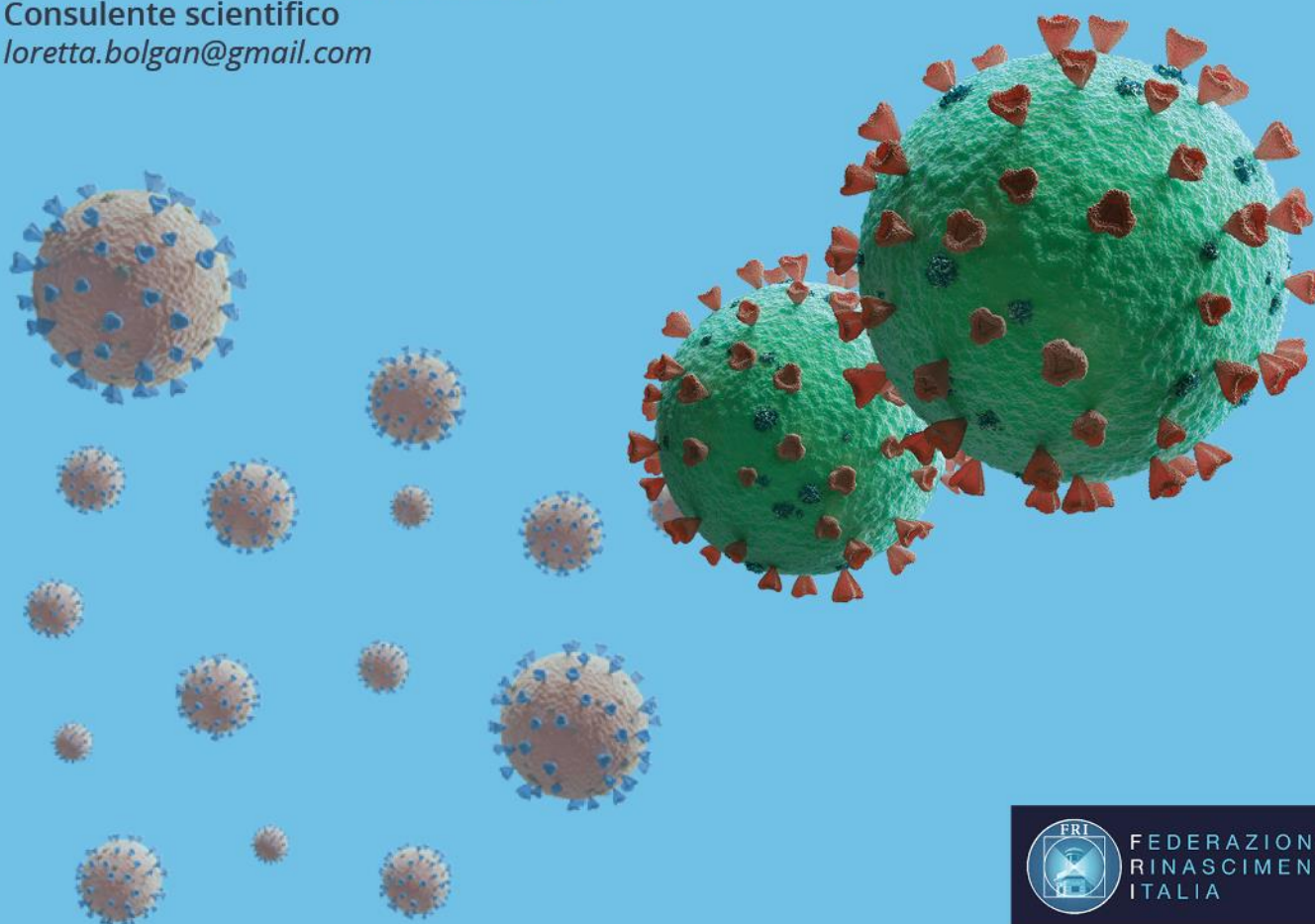


CAPITOLO 2 - DANNO MULTIORGANO COVID 19 - COMPLICAZIONI RESPIRATORIE PARTE TERZA - *Esosomi*

DR.SSA LORETTA BOLGAN

Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche
Dottorato in Scienze Farmaceutiche
Consulente scientifico
loretta.bolgan@gmail.com



COVID-19

CAPITOLO 2 - DANNO MULTIORGANO

COMPLICAZIONI RESPIRATORIE - PARTE TERZA - *Esosomi*

SOMMARIO

APPROFONDIMENTO

Funzione degli esosomi e delle vescicole extracellulari (EV)	3
Biogenesi degli esosomi	7
Biogenesi dei corpi apoptotici.....	11
Risposta immunitaria ed esosomi	13
Inflammasoma ed esosomi	23
La sinapsi immunologica e gli esosomi	26
ESOSOMI E ARDS	27
EV e interazione tra il microbiota e la risposta immunitaria polmonare dell'ospite	29
EV contenute nei fluidi broncoalveolari (BALF)	31
Effetti delle EV derivate dal tessuto polmonare	31
VIRUS E VESCICOLE EXTRACELLULARI	34
Le EV e i virus si sovrappongono nella biogenesi	38
Strategie di entrata delle particelle virali ed esosomi	41
Infezioni in gravidanza ed esosomi	56
DIFFERENZE E SIMILARITÀ TRA GLI ESOSOMI E LE EV E IL SARS-COV-2	60
Meccanismo di formazione degli esosomi nell'infezione da SARS-Cov-2.....	63
Identificazione del SARS-Cov e SARS-Cov-2 mediante la microscopia elettronica	69

APPROFONDIMENTO

Funzione degli esosomi e delle vescicole extracellulari (EV) ¹

¹ Groot Kormelink T, Mol S, de Jong EC, Wauben MHM.

The role of extracellular vesicles when innate meets adaptive.
Semin Immunopathol. 2018;40(5):439-452. doi:10.1007/s00281-018-0681-1
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6208666/>

Schorey JS, Harding CV.

Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story.
J Clin Invest. 2016;126(4):1181-1189. doi:10.1172/JCI81132
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811125/>

Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH.

Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.
Cell Biosci. 2019;9:19. Published 2019 Feb 15. doi:10.1186/s13578-019-0282-2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6377728/>

Park SJ, Kim JM, Kim J, et al.

Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(50):E11721-E11730. doi:10.1073/pnas.1811432115
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6294905/pdf/pnas.201811432.pdf>

Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G.

Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication.
Endocrine. 2013;44(1):11-19. doi:10.1007/s12020-012-9839-0
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726927/>

Słomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Żekanowska E, Kornek M. L

Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation?
Front Immunol. 2018;9:2723. doi:10.3389/fimmu.2018.02723
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6300519/>

Karasu E, Eisenhardt SU, Harant J, Huber-Lang M.

Extracellular Vesicles: Packages Sent with Complement.
Front Immunol. 2018;9:721. doi:10.3389/fimmu.2018.00721
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5904200/>

Šibíková M, Živný J, Janota J.

Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response.
Folia Biol (Praha). 2018;64(4):113-124.
<https://fb.cuni.cz/file/5876/fb2018a0015.pdf>

Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L.

Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication.
Kidney Int. 2010;78(9):838-848. doi:10.1038/ki.2010.278
[https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)54664-4/pdf](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)54664-4/pdf)

Lindenbergh MFS, Stoorvogel W.

Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells.
Annu Rev Immunol. 2018;36:435-459. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055700
<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-immunol-041015-055700>

Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL.

Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions.
EMBO Rep. 2015;16(1):24-43. doi:10.15252/embr.201439363
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4304727/>

Lanyu Z, Feilong H.

Emerging role of extracellular vesicles in lung injury and inflammation.
Biomed Pharmacother. 2019;113:108748. doi:10.1016/j.biopha.2019.108748
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221930160X?via%3Dihub>

Lee H, Abston E, Zhang D, Rai A, Jin Y.

Extracellular Vesicle: An Emerging Mediator of Intercellular Crosstalk in Lung Inflammation and Injury.
Front Immunol. 2018;9:924. Published 2018 Apr 30. doi:10.3389/fimmu.2018.00924
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946167/>

Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K.

La scoperta iniziale degli esosomi risale a metà degli anni '80 con l'individuazione di piccole vescicole che germogliavano dai reticolociti (globuli rossi immaturi) durante la loro maturazione per eliminare alcune proteine legate alla membrana plasmatica ².

Originariamente si pensava che questi esosomi funzionassero come "bidoni della spazzatura" della cellula e quindi ricevettero poca attenzione, ma ulteriori studi hanno indicato che queste piccole vescicole esocitate non erano specifiche dei reticolociti e sono rilasciate dalla maggior parte delle cellule di mammifero.³

Successivamente, è stato dimostrato che gli esosomi hanno effetti di regolazione immunitaria, e che gli esosomi derivati dalle cellule B sono in grado di stimolare le cellule T ⁴.

Ulteriori studi hanno evidenziato il ruolo degli esosomi nella cancerogenesi, nei processi immunomodulatori, nelle malattie neurodegenerative e nel trasferimento di agenti infettivi ⁵.

Extracellular Vesicles: New Players in Lung Immunity.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2018;58(5):560-565. doi:10.1165/rcmb.2017-0293TR
<https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1165/rcmb.2017-0293TR>

Kalluri R, LeBleu VS.

The biology, function, and biomedical applications of exosomes.
Science. 2020;367(6478):eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977
<https://science.sciencemag.org/content/367/6478/eaau6977.long>

Hessvik NP, Llorente A.

Current knowledge on exosome biogenesis and release.
Cell Mol Life Sci. 2018;75(2):193-208. doi:10.1007/s00018-017-2595-9
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5756260/>

Pegtel DM, Gould SJ.

Exosomes.
Annu Rev Biochem. 2019;88:487-514. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111902
<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>

Gulfaraz Khan, Waqar Ahmed and Pretty S. Philip (July 12th 2017).

Exosomes and Their Role in Viral Infections, Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases, Jin Wang, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.69397.
Available from: <https://www.intechopen.com/books/novel-implications-of-exosomes-in-diagnosis-and-treatment-of-cancer-and-infectious-diseases/exosomes-and-their-role-in-viral-infections>
<https://www.intechopen.com/books/novel-implications-of-exosomes-in-diagnosis-and-treatment-of-cancer-and-infectious-diseases/exosomes-and-their-role-in-viral-infections>

² Nicole A. Kruh-Garcia, Jeff S. Schorey and Karen M. Dobos (February 15th 2012).

Exosomes: New Tuberculosis Biomarkers – Prospects From the Bench to the Clinic, Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis, Pere-Joan Cardona, IntechOpen, DOI: 10.5772/30720.
Available from: <https://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-global-experiences-and-innovative-approaches-to-the-diagnosis/tuberculosis-biomarkers-prospects-from-the-bench-to-the-clinic>
<https://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-global-experiences-and-innovative-approaches-to-the-diagnosis/tuberculosis-biomarkers-prospects-from-the-bench-to-the-clinic>

³ Raposo G, Stoorvogel W.

Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.
J Cell Biol. 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3575529/>

⁴ Bhatnagar S, Schorey JS.

Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory.
J Biol Chem. 2007;282(35):25779-25789. doi:10.1074/jbc.M702277200
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636815/>

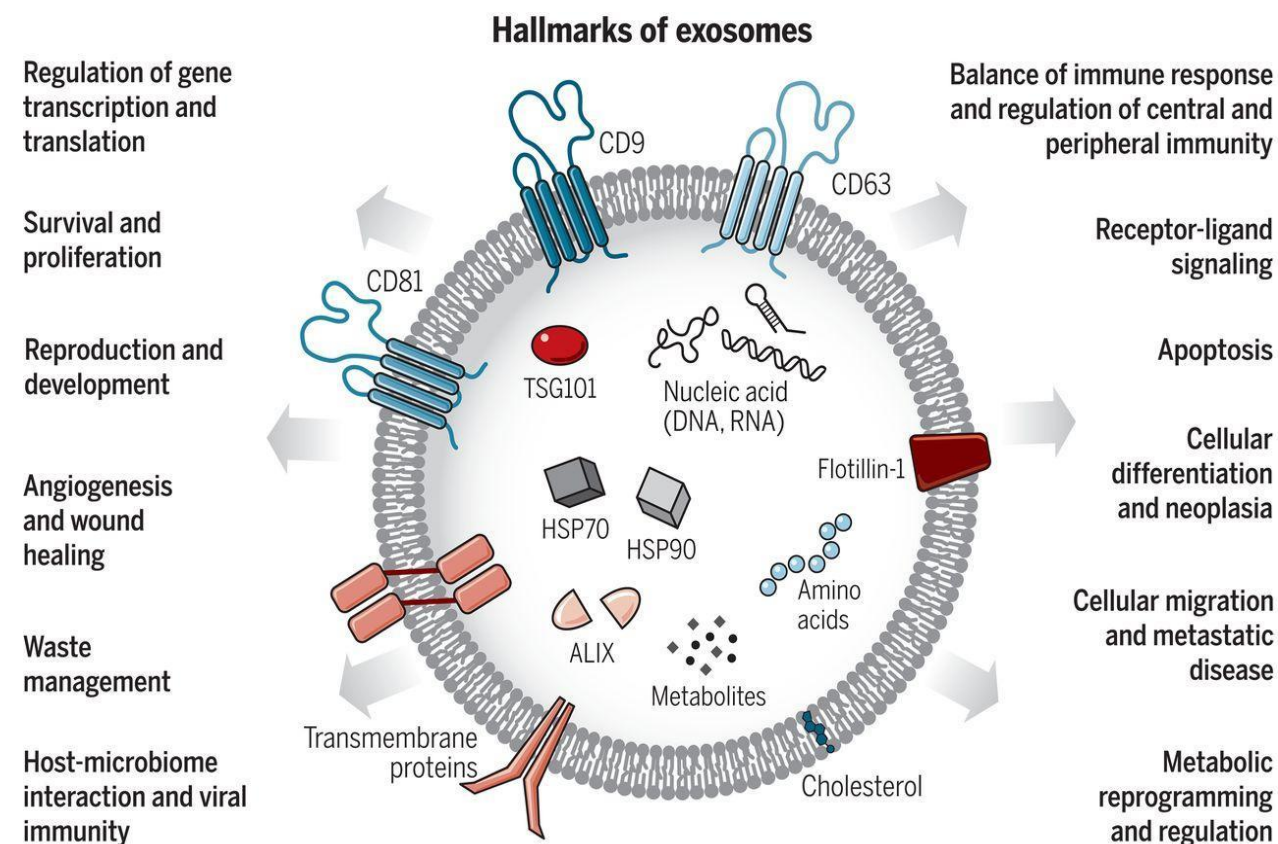
Kourembanas S.

Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy.
Annual Review of Physiology. 2015;77:13-27. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071641.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25293529/>

⁵ Kim C.-H., Hong M.-J., Park S.-D., et al.

Enhancement of anti-tumor immunity specific to murine glioma by vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells engineered to produce interleukin-12.

La svolta nella ricerca sugli esosomi è avvenuta nel 2007 con la scoperta che gli esosomi rilasciati dai mastociti contengono oltre 1200 mRNA che potrebbero essere trasferiti ad altre cellule ed essere tradotti in proteine⁶.



<https://science.sciencemag.org/content/367/6478/eaau6977.long>

Gli esosomi sono vescicole extracellulari generate da tutte le cellule e trasportano acidi nucleici, proteine, lipidi e metaboliti. Sono mediatori della comunicazione intercellulare a breve e lunga distanza nella salute e nella malattia e influenzano vari aspetti della biologia cellulare.

Cancer Immunology, Immunotherapy. 2006;55(11):1309–1319. doi: 10.1007/s00262-006-0134-x.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00262-006-0134-x>

Singh PP, Smith VL, Karakousis PC, Schorey JS.
Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo.
J Immunol. 2012;189(2):777–785. doi:10.4049/jimmunol.1103638
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3685416/>

Singh PP, LeMaire C, Tan JC, Zeng E, Schorey JS.
Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN- γ mediated activation of naïve macrophages.
PLoS One. 2011;6(4):e18564. Published 2011 Apr 14. doi:10.1371/journal.pone.0018564
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3077381/>

Kalluri R, LeBleu VS.
The biology, function, and biomedical applications of exosomes.
Science. 2020;367(6478):eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977
<https://science.sciencemag.org/content/367/6478/eaau6977.long>

⁶ Krek A., Grün D., Poy M. N., et al.
Combinatorial microRNA target predictions.
Nature Genetics. 2005;37(5):495–500. doi: 10.1038/ng1536.
<https://www.nature.com/articles/ng1536>

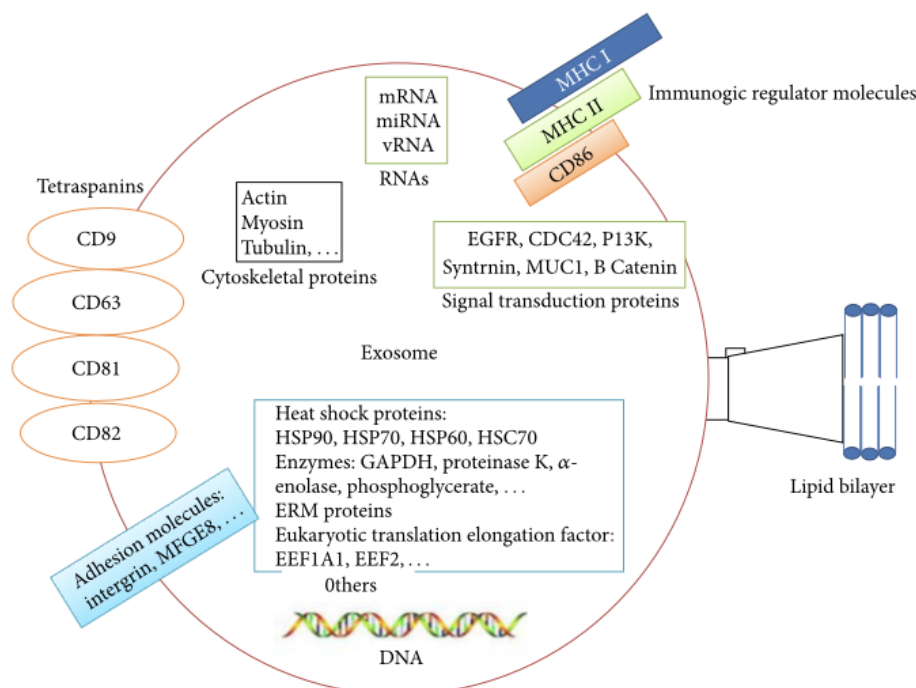
Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O.
Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.
Nature Cell Biology. 2007;9(6):654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
<https://www.nature.com/articles/ncb1596>

Secondo ExoCarta, (un database di proteine esosomali, RNA e lipidi ⁷) gli esosomi hanno una composizione complessa il cui contenuto molecolare dipende dalla loro cellula di origine.

Sono stati identificati in esosomi di diverse specie 4.563 proteine, 194 lipidi, 1.639 mRNA e 764 miRNA, con proteine di trasporto di membrana e proteine di fusione tra quelle rilevate più frequentemente.

Alcune proteine esosomali sono sempre presenti, come le tetraspanine, CD63, CD81, CD9 e la proteina da shock termico (Hsp70) comunemente usate come marcatori esosomali ⁸.

Gli esosomi sono ricchi di lipidi come colesterolo, fosfolipidi, fosfatidilserina e prostaglandine ma mancano di proteine nucleari, mitocondriali e ribosomiali. ⁹



<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/5628404/>

Struttura e contenuto degli esosomi: gli esosomi contengono una membrana a doppio strato fosfolipidica derivata dalla membrana plasmatica. I contenuti esosomali basati sul tipo di cellula di origine includono mRNA, miRNA e DNA e proteine come annessine, tetraspanine, molecole MHC, proteine citoscheletriche, enzimi e proteine di trasduzione del segnale

APPROFONDIMENTO

COMPARTIMENTI INTRACELLULARI

IL TRAFFICO VESICOLARE

Le proteine di membrana destinate alla degradazione vengono internalizzate nelle vescicole intraluminali. La trasformazione degli endosomi precoci in tardivi è accompagnata dalla perdita delle sporgenze tubulari. L'endosoma tardivo o corpo multivescicolare (MVB – Multivesicular Body) si muove lungo i microtubuli, verso l'interno della cellula.

⁷ Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al.

ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo.

J Mol Biol. 2016;428(4):688-692. doi:10.1016/j.jmb.2015.09.019

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4783248/>

⁸ Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA, Richard DJ, O'Byrne KJ.

Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer.

Front Oncol. 2014;4:127. Published 2014 May 27. doi:10.3389/fonc.2014.00127

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4034415/>

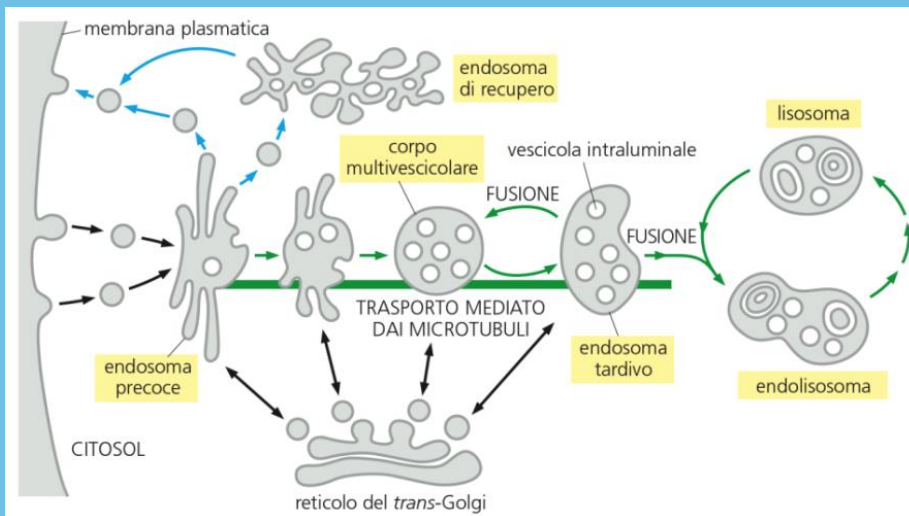
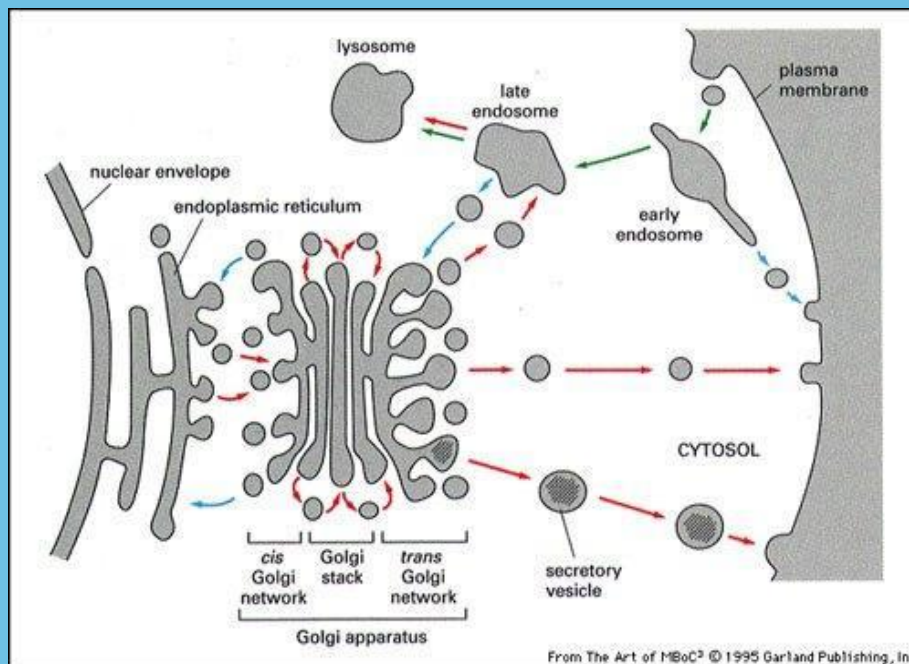
⁹ Alipoor SD, Mortaz E, Garssen J, Movassaghi M, Mirsaeidi M, Adcock IM.

Exosomes and Exosomal miRNA in Respiratory Diseases.

Mediators Inflamm. 2016;2016:5628404. doi:10.1155/2016/5628404

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055958/>

Gli endosomi tardivi maturi non veicolano più vescicole alla membrana e si fondono tra loro e coi lisosomi per degradare il loro contenuto. La maturazione degli endosomi è connessa per mezzo delle vescicole di trasporto al TGN (Trans Golgi Network), fornendo di continuo proteine lisosomiali di nuova sintesi.



Biogenesi degli esosomi

La biogenesi dell'esosoma inizia con l'endocitosi e la formazione di endosomi precoci.

L'endosoma precoce si sviluppa **nell'endosoma tardivo** dopo la maturazione, caratterizzata dalla formazione di **vescicole intraluminali (ILV)** all'interno del lume dell'endosoma.

Le ILV, di 30-100 nm di diametro, sono formate dalla gemmazione verso l'interno della membrana endosomiale, che ingloba in modo casuale porzioni del citosol e incorpora proteine transmembrana e periferiche nella membrana invaginata, portando alla formazione dei **corpi multivesiccolari (MVB)** ¹⁰.

10 Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P.
Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function.
Immunol Lett. 2006;107(2):102-108. doi:10.1016/j.imlet.2006.09.005

Sebbene l'endocitosi e il traffico dei recettori della membrana plasmatica negli MVB siano responsabili della loro degradazione in seguito alla fusione con i lisosomi ¹¹, il destino degli MVB può variare e non tutti gli MVB vengono degradati nei lisosomi, con un sottoinsieme che si fonde con la membrana plasmatica portando alla generazione di esosomi.

Il processo di biogenesi degli esosomi e di smistamento del carico non è ancora ben compreso e molti studi suggeriscono che i meccanismi di biogenesi degli esosomi possono essere cellula-specifici ¹².

Gli esosomi sono secreti principalmente da due diversi meccanismi: il **rilascio costitutivo** attraverso la rete Trans-Golgi e il **rilascio inducibile** ¹³

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17067686/>

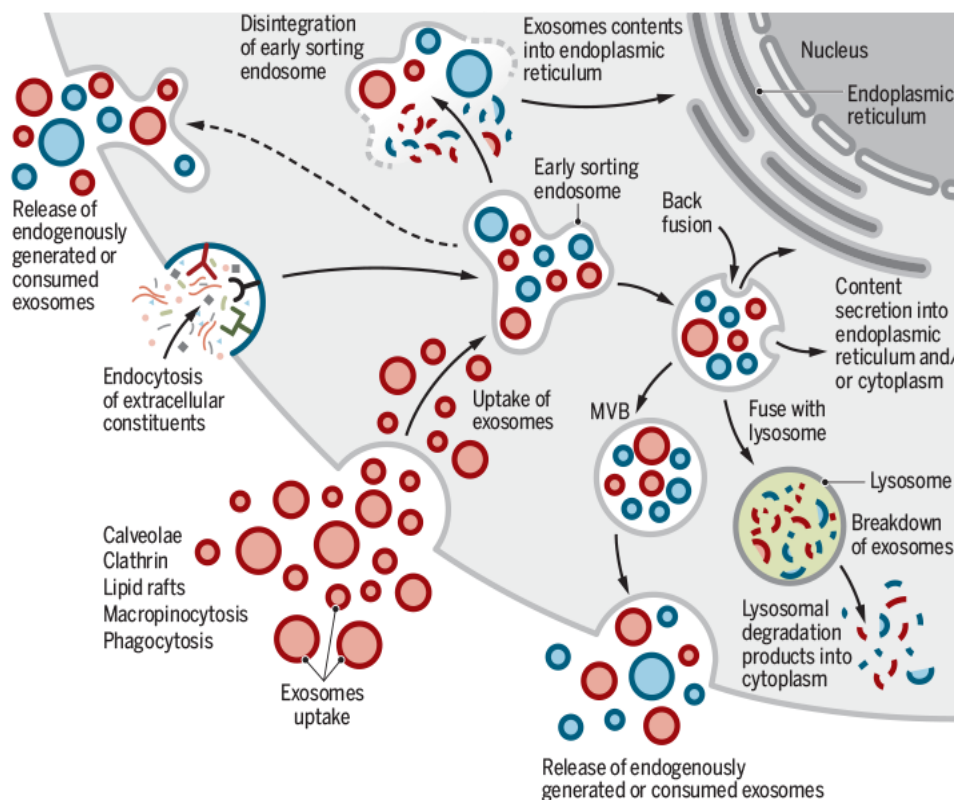
van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G.
Exosomes: a common pathway for a specialized function.
J Biochem. 2006;140(1):13-21. doi:10.1093/jb/mvj128
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16877764/>

¹¹ Woodman PG, Futter CE.
Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity.
Curr Opin Cell Biol. 2008;20(4):408-414. doi:10.1016/j.ceb.2008.04.001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2577128/>

¹² Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, et al.
The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes.
J Biol Chem. 2013;288(17):11649-11661. doi:10.1074/jbc.M112.445304
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636856/>

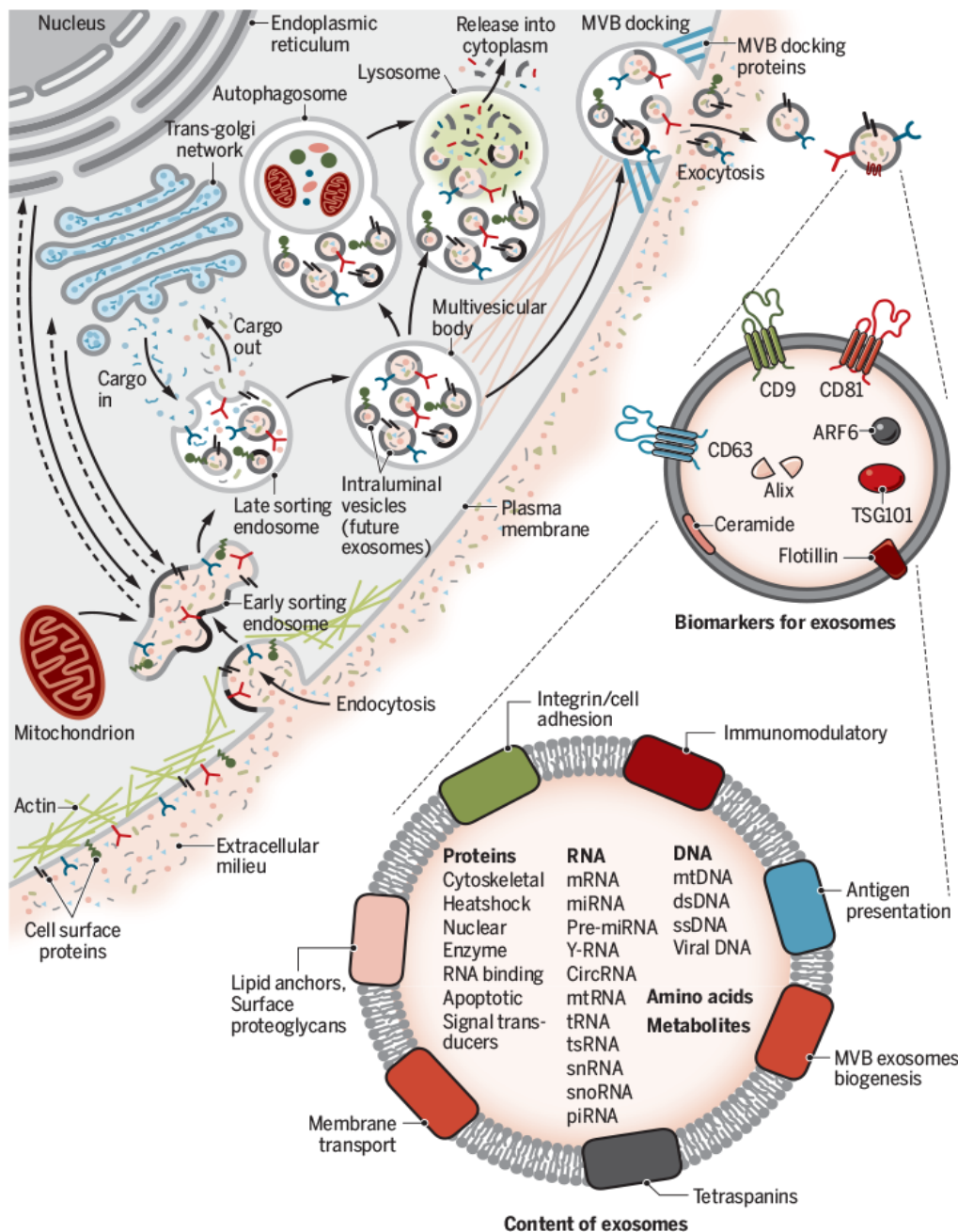
¹³ Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M.
Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors.
Biochem Pharmacol. 2011;81(10):1171-1182. doi:10.1016/j.bcp.2011.02.011
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371441/>

Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S.
Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals.
Biochim Biophys Acta. 2014;1841(1):108-120. doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.004
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140720/>



https://www.sciencemaginedigital.org/sciencemagazine/07_february_2020_Main/MobilePagedArticle.action?articleId=1559430#articleId1559430

Percorso cellulare degli esosomi internalizzati e degli esosomi prodotti per via endogena. Gli esosomi possono entrare direttamente nelle cellule mediante meccanismi diversi (rosso). Gli esosomi sono generati de novo dalle cellule attraverso il processo di endocitosi (blu). Gli esosomi vengono continuamente generati e assorbiti dalle cellule. È probabile che possano essere secreti come una miscela degli esosomi generati e consumati de novo (rosso e blu). Non è noto se il rilascio di esosomi generati o consumati per via endogena avvenga insieme o separatamente. Gli esosomi che vengono assorbiti possono essere degradati dai lisosomi. Gli esosomi che entrano nelle cellule possono entrare o fondersi con ESE (early-sorting endosomes) preesistenti e successivamente disintegrarsi e rilasciare il loro contenuto nel citoplasma. In alternativa, gli endosomi potrebbero fondersi di nuovo con la membrana plasmatica e rilasciare esosomi al di fuori delle cellule.



https://www.sciencemaginedigital.org/sciencemagazine/07_february_2020_Main/MobilePagedArticle.action?articleId=1559430#articleId1559430

Biogenesi e identificazione degli esosomi.

I costituenti fluidi ed extracellulari come proteine, lipidi, metaboliti, piccole molecole e ioni possono entrare nella cellula, insieme alle proteine della superficie cellulare, attraverso l'endocitosi e l'invaginazione della membrana plasmatica. La formazione di gemme della membrana plasmatica risultante nel lato luminale della cellula si presenta con un orientamento della membrana plasmatica dall'esterno all'interno. Questo processo di germogliazione porta alla formazione di ESE o possibile fusione del germoglio con ESE preformati dai costituenti del reticolo endoplasmatico (ER), rete trans-Golgi (TGN) e mitocondri. Gli ESE potrebbero anche fondersi con ER e TGN, forse spiegando come il carico endocitico li raggiunge.

Alcuni degli ESE possono quindi contenere membrane e componenti intracellulari che possono rappresentare origini diverse. Gli ESE danno origine a LSE. La seconda invaginazione nella LSE porta alla generazione di ILV e questo passaggio può portare a un'ulteriore modifica del carico dei futuri esosomi, con i costituenti citoplasmatici che entrano nell'ILV di nuova formazione. Come parte della formazione di ILV, le proteine (che erano originariamente sulla superficie cellulare) potevano essere distribuite distintamente tra le ILV. A seconda del volume di invaginazione, il processo potrebbe dare origine a ILV di diverse dimensioni con contenuto distinto. Le LSE danno origine a MVB con una raccolta definita di ILV (futuri esosomi). Gli MVB possono fondersi con gli autofagosomi e alla fine il contenuto può subire la degradazione nei lisosomi.

I prodotti di degradazione potrebbero essere riciclati dalle cellule. Gli MVB possono anche fondersi direttamente con i lisosomi per la degradazione. Gli MVB che non seguono questa traiettoria possono essere trasportati alla membrana plasmatica attraverso la rete citoscheletrica e dei microtubuli della cellula e ancorarsi sul lato luminale della membrana plasmatica con l'aiuto delle proteine MVB-docking. Segue l'esocitosi che provoca il rilascio degli esosomi con un orientamento del doppio strato lipidico simile a quello della membrana plasmatica. Diverse proteine sono implicate nella biogenesi dell'esosoma e includono Rab GTPases, proteine ESCRT, così come altre che sono anche usate come marcatori per esosomi (CD9, CD81, CD63, flotillina, TSG101, ceramide e Alix). Le proteine di superficie degli esosomi includono tetraspanine, integrine, proteine immunomodulatorie e altro ancora. Gli esosomi possono contenere diversi tipi di proteine della superficie cellulare, proteine intracellulari, RNA, DNA, amminoacidi e metaboliti.

Biogenesi dei corpi apoptotici

L'apoptosi è caratterizzata da una sequenza di passaggi che portano alla morte cellulare.

Le analisi al microscopio ottico e elettronico rappresentano un approccio efficace per valutare le caratteristiche morfologiche durante il processo apoptotico, ma solo se associate allo studio biochimico è possibile ottenere una comprensione completa della complessità del meccanismo.

Vie intrinseche o stimoli estrinseci sono in grado di portare all'attivazione della segnalazione apoptotica.

Dopo l'induzione, viene attivata una cascata proteolitica caspasi-dipendente.

Le **caspasi** sono proteasi specifiche dell'acido aspartico responsabili della degradazione dei componenti cellulari.

Le **caspasi-8 e -9** agiscono come iniziatori della via di segnalazione apoptotica, mentre le **caspasi-3, -6 e -7** agiscono come caspasi esecutori, che partecipano attivamente alla degradazione dei substrati cellulari.

L'attivazione della caspasi può seguire due principali vie apoptotiche, la via estrinseca o del recettore di morte e quella intrinseca o mitocondriale.

La cellula morente viene inghiottita da fagociti professionali o dalle cellule vicine.

Un'efficace rimozione delle cellule apoptotiche è guidata dall'interazione con i fagociti attraverso l'espressione di segnali "*mangiami*" e il rilascio di segnali "*trovami*", che facilitano l'attacco della cellula morente e la sua eventuale digestione nei fagolisosomi ¹⁴

L'apoptosi progredisce attraverso diversi stadi, di cui il primo consiste nella condensazione nucleare della cromatina, poi seguono la scissione nucleare e la frequente comparsa di micronuclei, quindi il *blebbing* (evaginazione) della membrana e, infine la scissione del contenuto cellulare in distinte vescicole racchiuse nella membrana, chiamate **corpi apoptotici o, più recentemente, apoptosomi**. ¹⁵

Il processo di disassemblaggio cellulare apoptotico e la rimozione del materiale apoptotico da parte dei fagociti sono molto rapidi, quindi la presenza di corpi apoptotici (ApoBD) è molto limitata in vivo. ¹⁶

¹⁴ Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4):239-257. doi:10.1038/bjc.1972.33
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2008650/>

¹⁵ Elmore S.

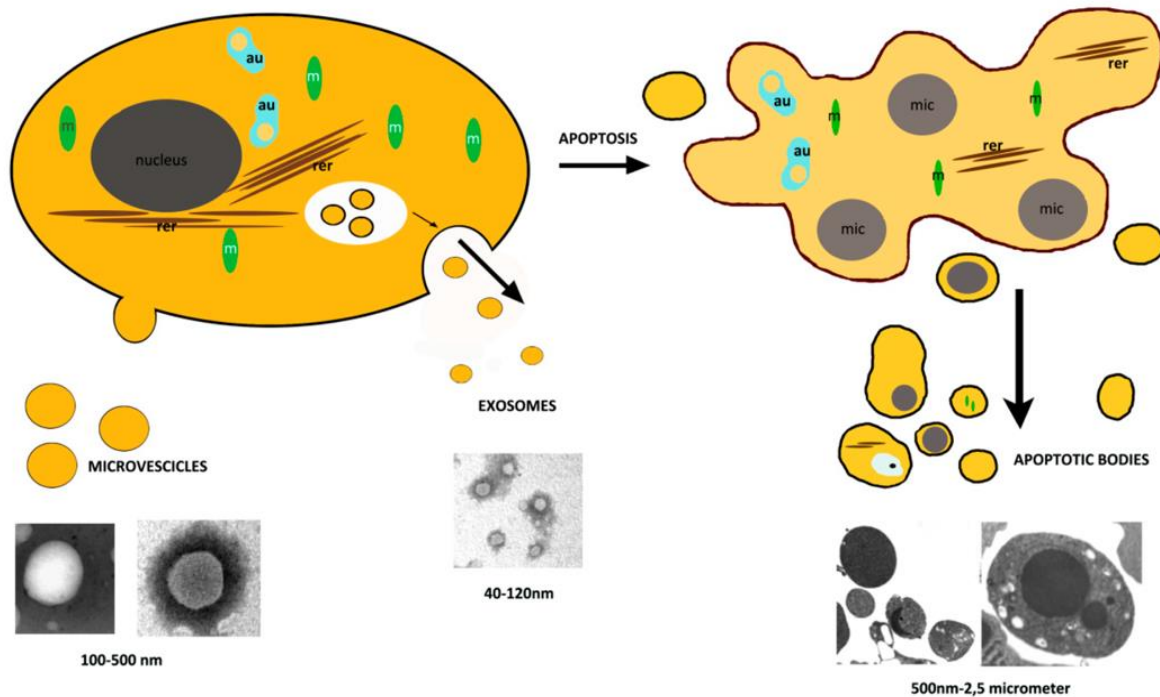
Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>

Povea-Cabello S, Oropesa-Ávila M, de la Cruz-Ojeda P, et al.

Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. Int J Mol Sci. 2017;18(11):2393. Published 2017 Nov 11. doi:10.3390/ijms18112393
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5713361/>

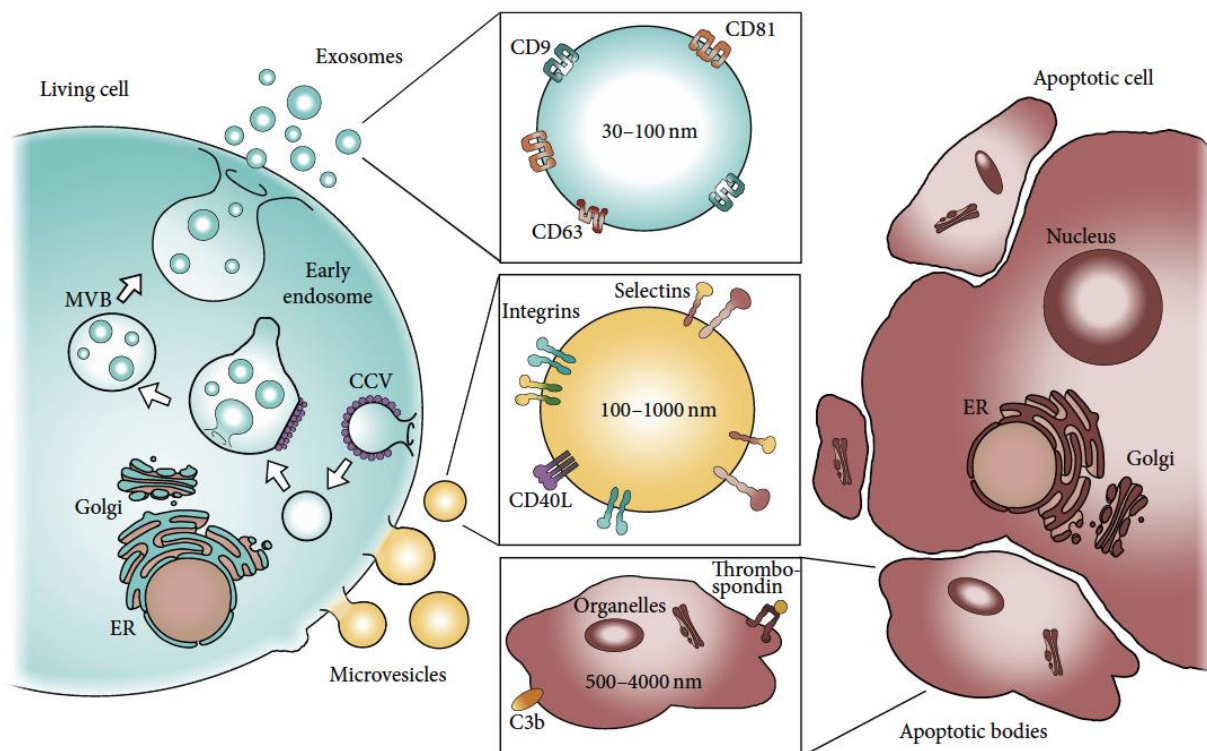
¹⁶ Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC.

Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. J Neurooncol. 2013;113(1):1-11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5533094/>



<https://www.mdpi.com/2079-7737/9/1/21/htm>¹⁷

Schema di formazione delle vescicole extracellulari. Questa figura mostra la biogenesi e il rilascio di microvescicole, esosomi e dei corpi apoptotici. La loro morfologia è stata osservata mediante microscopio elettronico a trasmissione (TEM) dopo la colorazione negativa. L'estrusione del corpo apoptotico appare nello schema e nelle sezioni di cellule apoptotiche convenzionalmente incorporate. m = mitocondri, rer = reticolo endoplasmatico ruvido, mic = micronuclei, Bar = 200 nm.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681819/>¹⁸

¹⁷ Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. Biology (Basel). 2020;9(1):21. Published 2020 Jan 20. doi:10.3390/biology9010021 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168913/>

¹⁸ Pugholm LH, Revenfeld AL, Søndergaard EK, Jørgensen MM. Antibody-Based Assays for Phenotyping of Extracellular Vesicles. Biomed Res Int. 2015;2015:524817. doi:10.1155/2015/524817

Risposta immunitaria ed esosomi ¹⁹

Una risposta immunitaria efficace richiede il coinvolgimento dei recettori dell'ospite da parte delle molecole di origine patogena e la stimolazione di un'adeguata risposta cellulare.

Pertanto, un fattore cruciale nella capacità dell'organismo di controllare un'infezione è l'accessibilità delle cellule immunitarie al materiale estraneo.

Gli esosomi possono svolgere un ruolo chiave nella diffusione di molecole derivate dall'agente patogeno e dall'ospite durante l'infezione ed è stato riscontrato che le vescicole extracellulari prodotte durante un'infezione possono essere di derivazione dai patogeni o dall'ospite.

Le prime includono le vescicole della membrana dei batteri gram-negativi e gram-positivi. Il contenuto e la funzione di queste vescicole generate dai batteri è stato recentemente oggetto di approfondite indagini ²⁰.

Sebbene queste vescicole svolgano probabilmente un ruolo importante nel corso di un'infezione batterica extracellulare, il loro ruolo nelle infezioni patogene intracellulari è meno chiaro, poiché non sono noti i meccanismi per il trasporto delle vescicole all'esterno della cellula ospite.

Anche i parassiti patogeni e funghi rilasciano vescicole extracellulari che possono modulare la risposta immunitaria. ²¹

Le vescicole derivate dall'ospite sono presenti durante le infezioni virali, batteriche, parassitarie e fungine. Queste vescicole hanno origini e composizione diverse e, in base alla loro biogenesi, sono divise in tre categorie principali:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681819/>

¹⁹ Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL.
Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions.
EMBO Rep. 2015;16(1):24-43. doi:10.15252/embr.201439363
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4304727/>

Lanyu Z, Feilong H.
Emerging role of extracellular vesicles in lung injury and inflammation.
Biomed Pharmacother. 2019;113:108748. doi:10.1016/j.biopha.2019.108748
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333221930160X?via%3Dihub>

Schorey JS, Harding CV.
Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story.
J Clin Invest. 2016;126(4):1181-1189. doi:10.1172/JCI81132
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811125/>

²⁰ Deatherage BL, Cookson BT.
Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life.
Infect Immun. 2012;80(6):1948-1957. doi:10.1128/IAI.06014-11
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3370574/>

Kulp A, Kuehn MJ.
Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles.
Annu Rev Microbiol. 2010;64:163-184. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073413
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3525469/>

Acevedo R, Fernández S, Zayas C, et al.
Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications.
Front Immunol. 2014;5:121. Published 2014 Mar 24. doi:10.3389/fimmu.2014.00121
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970029/>

²¹ Silverman JM, Reiner NE.
Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes.
Cell Microbiol. 2011;13(1):1-9. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x>

Oliveira DL, Rizzo J, Joffe LS, Godinho RM, Rodrigues ML.
Where do they come from and where do they go: candidates for regulating extracellular vesicle formation in fungi
Int J Mol Sci. 2013;14(5):9581-9603. Published 2013 May 2. doi:10.3390/ijms14059581
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676800/>

- corpi apoptotici,
- esosomi
- microvescicole.²²

Tutte e tre queste vescicole derivate dalle cellule sono racchiuse da un doppio strato lipidico, ma variano in dimensioni (da 30 a 2.000 nm di diametro), nonché in composizione.

A differenza delle microvescicole, che sono generate dal gemogliamento dalla membrana plasmatica²³, gli esosomi derivano dalla via endolisosomiale e hanno una composizione lipidica e proteica peculiare.

Gli esosomi sono stati i più studiati nel contesto dell'infezione. Una nota importante, tuttavia, è che la purezza della frazione esosomiale non è stata sempre analizzata in questi studi e, pertanto, la popolazione delle vescicole potrebbe essere composta sia da esosomi che da microvescicole, che si sovrappongono per dimensioni e densità.

Di recente, l'International Society for Extracellular Vesicles ha aggiornato le linee guida per le analisi delle EV per promuovere la standardizzazione dei protocolli EV²⁴.

*Le **microvescicole** più grandi (MV, 100 nm-1 µm) e i **corpi apoptotici** (ABs, 1-5 µm) si distinguono perchè germogliano direttamente dalla membrana plasmatica.*

Le MP (microparticelle) sono ora sostituite con il termine MV e per renderlo inequivocabile si usa la definizione "microvescicola (MV)" per le vescicole extracellulari di 100 nm-1 µm di diametro, e non il termine "microparticella (MP)".

*Gli **esosomi** invece si riferiscono a vescicole più piccole (50-100 nm), generate intracellularmente dal gemogliamento interno dai corpi multivescicolari (MVB) e rilasciate dalla cellula una volta che gli MVB si fondono con la membrana plasmatica.²⁵*

<https://www.endocrinology.org/endocrinologist/123-spring17/features/how-do-i-measure-extracellular-vesicles-in-my-samples/>

<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/228/2/R57.xml>

Tre tipi di vescicole extracellulari (EV). I corpi apoptotici (AB, 1-5 µm) sono formati dall'estroflessione (blebbing) della membrana delle cellule apoptotiche. Le microvescicole (MV, 100 nm-1 µm) sono formate dal gemogliamento verso l'esterno della membrana plasmatica. Gli esosomi (Exos,

²² Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM.

Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease.

J Endocrinol. 2016;228(2):R57-R71. doi:10.1530/JOE-15-0201

<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/228/2/R57.xml>

Šibíková M, Živný J, Janota J.

Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response.

Folia Biol (Praha). 2018;64(4):113-124.

<https://fb.cuni.cz/file/5876/fb2018a0015.pdf>

²³ D'Souza-Schorey C, Clancy JW.

Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers.

Genes Dev. 2012;26(12):1287-1299. doi:10.1101/gad.192351.112

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387656/>

²⁴ Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al.

Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.

J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1535750. Published 2018 Nov 23. doi:10.1080/20013078.2018.1535750

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6322352/>

²⁵ Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al.

Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes.

J Extracell Vesicles. 2013;2:10.3402/jev.v2i0.20677. Published 2013 Sep 12. doi:10.3402/jev.v2i0.20677

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823106/>

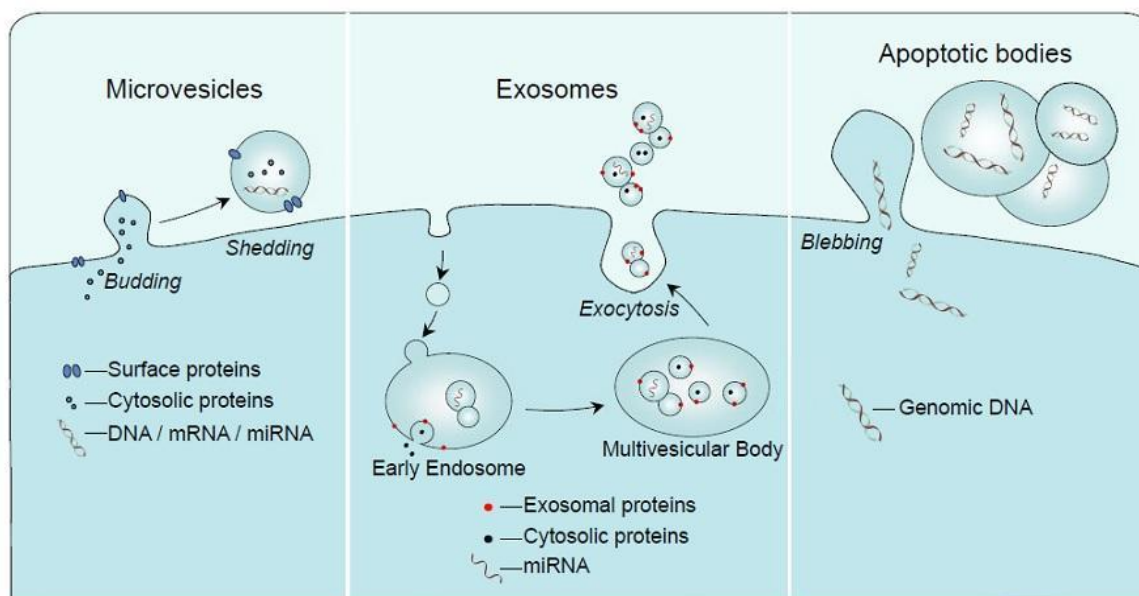
Huang-Doran I, Zhang CY, Vidal-Puig A.

Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease.

Trends Endocrinol Metab. 2017;28(1):3-18. doi:10.1016/j.tem.2016.10.003

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104327601630128X>

30–100 nm) sono contenuti in più corpi vescicolari (MVB), per germogliamento interno e inverso di una membrana endosomiale. Gli esosomi vengono rilasciati nello spazio extracellulare una volta che gli MVB sono fusi con la membrana plasmatica delle cellule.



Classification	Exosomes	Microvesicles	Apoptotic bodies
Size	30-100 nm	100-1000 nm	50-5000 nm
Mechanism of formation	Formation of multivesicular bodies by inward budding of endosomal membrane followed by fusion with cell plasma membrane	Outward protrusion (blebbing) of plasma membrane followed by detachment	Fragmentation of cells during the apoptotic process
Characteristics and composition	Rich in lipid rafts, cell endosome-specific proteins (e.g., LAMP1, CD63, TSG 101), cytoplasmic proteins, RNA, miRNA	Externalized phosphatidylserine (annexin V binding), rich in lipid rafts, cell surface-specific molecules, cytoplasmic proteins, RNA, miRNA, other ncRNA, occasionally DNA	Externalized phosphatidylserine (annexin V binding), organelles, DNA, cytoplasmic proteins, RNA, miRNA and other ncRNA
Functional properties	Selective cargo transfer (functional proteins, mRNA, miRNA), receptor interaction	Inflammation, coagulation, thrombosis, angiogenesis, tissue regeneration, tumour cell invasion, metastasis, mRNA, miRNA	Transfer of DNA fragments to the phagocytes, inhibition of inflammatory processes, cell survival

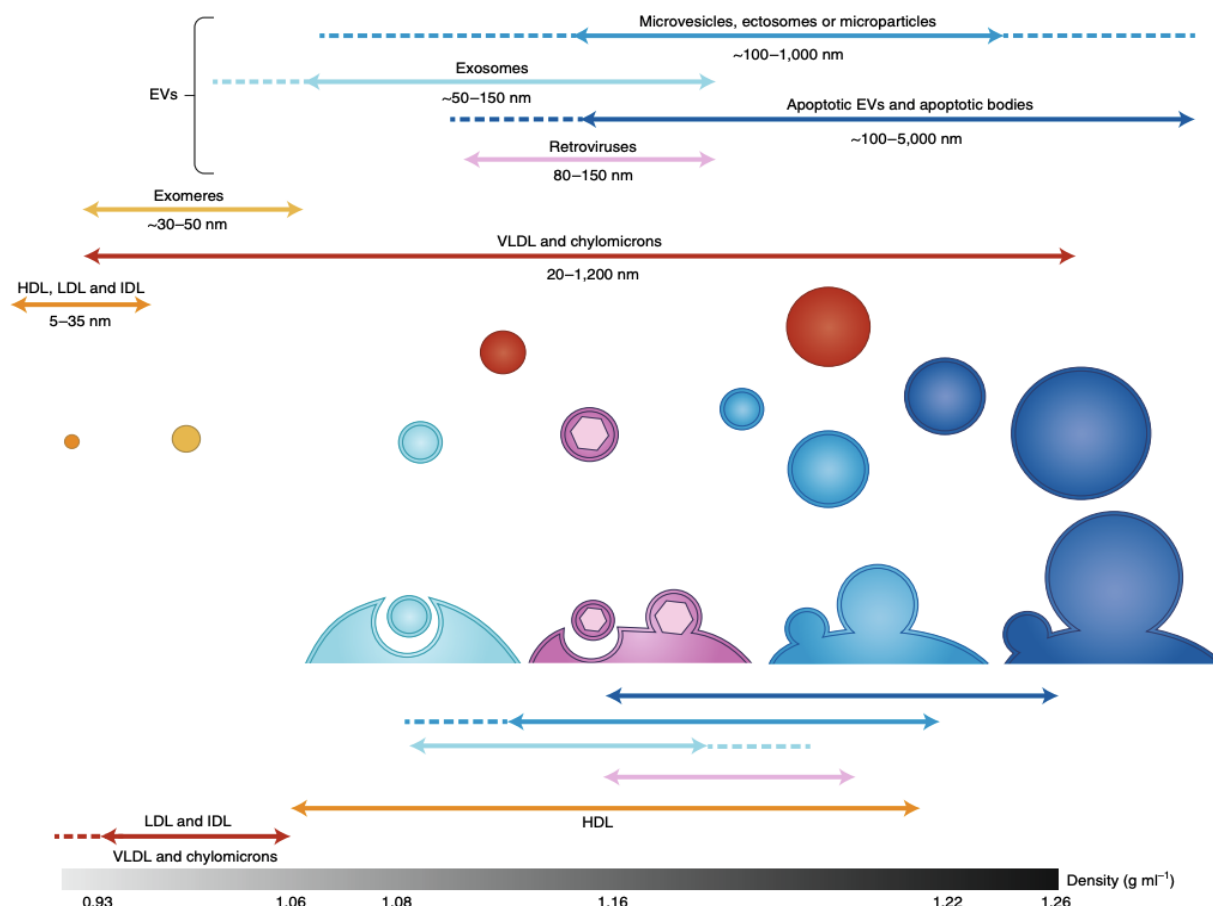
<https://fb.cuni.cz/file/5876/fb2018a0015.pdf>

Tipo di vescicola	Origine	Dimensione	Marcatore	Contenuto
Esosoma	Via endolisomiale; formazione intraluminale di corpi multivesicolari e fusione di questi ultimi con la membrana cellulare.	40-120 nm	Tetraspanine (come TSPAN29 and TSPAN30), componenti ESCRT, PDGFR, TSG101, flotillin, MFGE8	mRNA, miRNA, e altri RNA non codificanti; proteine citoplasmatiche e proteine di membrana inclusi i recettori e molecole dei complessi di maggiore istocompatibilità
Microvescicola	Superficie cellulare; estroflessione della membrana cellulare	50-1,000 nm	Integrine selectine, CD40 ligand	mRNA, miRNA, RNA non codificanti, proteine citoplasmatiche e proteine di membrana inclusi i recettori
Corpi Apoptotici	Superficie cellulare; estroflessione della membrana di una cellula apoptotica	500-2,000 nm	Vasta quantità di fosfatidilserina	Frazioni nucleari e organelli cellulari

https://ora.uniurb.it/retrieve/handle/11576/2629211/14864/phd_uniurb_257630.pdf

Caratteristiche fisiche dei diversi sottotipi di EV. Diversi sottotipi di EV sono raffigurati insieme ad altre particelle co-isolate. E' schematizzata l'origine subcellulare di queste EV (endosomiali o dalla membrana plasmatica) insieme a intervalli di dimensioni e densità. Indipendentemente dai meccanismi di secrezione, i diversi sottotipi di EV non possono essere completamente separati in base alle dimensioni o alla densità a causa delle caratteristiche fisiche sovrapposte. Ad esempio, questo si applica a piccole microvescicole, esosomi e virus con involucro. I detriti cellulari, come i corpi apoptotici o le piccole vescicole apoptotiche prodotte quando le cellule subiscono l'apoptosi²⁶, potrebbero non essere distinguibili dagli altri EV. Altre particelle secrete che possono essere co-isolate con EV includono esomeri e diversi tipi di lipoproteine. Dopo centrifugazione differenziale dei fluidi contenenti queste vescicole²⁷, le più grandi (ad esempio, > 300 nm) vengono recuperate a bassa velocità (circa 2.000 g) e un breve periodo (20-30 minuti) di centrifugazione, seguito dal recupero di dimensioni intermedie EV di 150–300 nm a circa 10–20.000 g per meno di 30 minuti. Le EV più piccole (<15 nm) vengono recuperate principalmente dopo ultracentrifugazione ad alta velocità, ma tali preparazioni possono includere le strutture non EV più piccole (esomeri²⁸ e lipoproteine ad alta densità (HDL)), soprattutto se la centrifugazione viene eseguita per un periodo esteso di tempo. Tuttavia, le lipoproteine possono essere separate dagli EV combinando metodi di isolamento²⁹ basati sulla dimensione e sulla densità. IDL, lipoproteine a densità intermedia; LDL, lipoproteine a bassa densità; VLDL, lipoproteine a bassissima densità.

https://www.nature.com/articles/s41556-018-0250-9?WT.feed_name=subjects_cell-biology



²⁶ Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, et al.

A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. Nat Commun. 2015;6:7439. Published 2015 Jun 15. doi:10.1038/ncomms8439
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4490561/>

²⁷ Kowal J, Arras G, Colombo M, et al.

Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(8):E968–E977. doi:10.1073/pnas.1521230113
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4776515/>

²⁸ Zhang H, Freitas D, Kim HS, et al.

Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. Nat Cell Biol. 2018;20(3):332–343. doi:10.1038/s41556-018-0040-4
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5931706/>

²⁹ Karimi N, Cvjetkovic A, Jang SC, et al.

Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. Cell Mol Life Sci. 2018;75(15):2873–2886. doi:10.1007/s00018-018-2773-4
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6021463/>

È importante sottolineare che **l'RNA presente negli esosomi è biologicamente attivo** e può modulare il profilo proteico e lo stato cellulare della cellula ricevente ³⁰.

Tuttavia, il contenuto esosomico di RNA è dettato dalla sua origine cellulare e dallo stato fisiologico della cellula ³¹, indicando che l'incorporazione dell'RNA nelle vescicole è un evento direzionato che porta all'incorporazione selettiva dell'RNA negli esosomi e in altri ExMV. ³²

Una volta internalizzati, gli esosomi possono fondersi con la membrana degli endosomi, determinando il trasferimento genetico orizzontale del loro contenuto nel citoplasma delle cellule bersaglio.

Le molecole bioattive contenute negli esosomi hanno dimostrato di avere un impatto sulle cellule bersaglio attraverso i seguenti meccanismi:

- (1) stimolazione diretta delle cellule bersaglio attraverso i ligandi presenti sulla superficie;
- (2) trasferimento dei recettori attivati alle cellule riceventi;
- (1) riprogrammazione epigenetica delle cellule riceventi attraverso il rilascio di proteine funzionali, lipidi e RNA ³³.

Di conseguenza, le cellule progenitrici possono comunicare con specifiche cellule bersaglio prossimali o distali attraverso l'amplificazione dell'esosoma.

Oltre all'RNA dell'ospite, esistono chiare prove dell'incorporazione degli RNA virali negli esosomi.

³⁰ Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ.

Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. Hum Mol Genet. 2012;21(R1):R125-R134. doi:10.1093/hmg/ddt317
<https://academic.oup.com/hmg/article/21/R1/R125/656800>

³¹ Eldh M, Ekström K, Valadi H, et al.

Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. PLoS One. 2010;5(12):e15353. Published 2010 Dec 17. doi:10.1371/journal.pone.0015353
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003701/>

³² Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, et al.

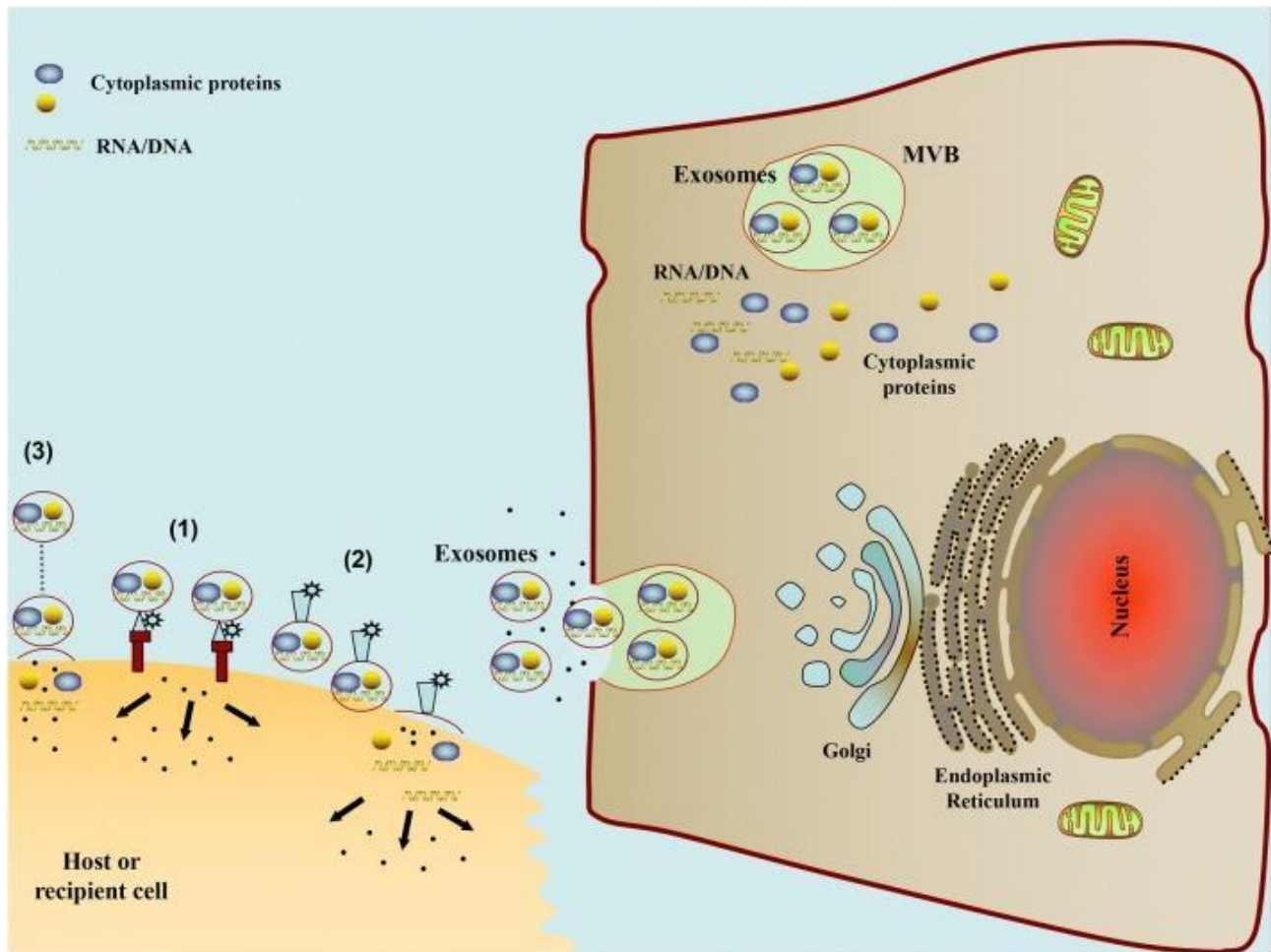
Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. Nat Commun. 2011;2:282. doi:10.1038/ncomms1285
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104548/>

Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al.

Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. Blood. 2012;119(3):756-766. doi:10.1182/blood-2011-02-338004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265200/>

³³ Khalyfa A, Gozal D.

Exosomal miRNAs as potential biomarkers of cardiovascular risk in children. J Transl Med. 2014;12:162. Published 2014 Jun 10. doi:10.1186/1479-5876-12-162
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4057926/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6377728/>

Diagramma schematico dei percorsi coinvolti nella comunicazione cellula-cellula mediata dall'esosoma.

(1) Gli esosomi comunicano con le cellule riceventi tramite ligandi presenti sulla superficie.

(2) Gli esosomi trasferiscono i recettori attivati alle cellule riceventi.

(3) Gli esosomi possono riprogrammare epigeneticamente le cellule riceventi tramite la veicolazione di proteine funzionali, lipidi e RNA

La bioattività degli esosomi proviene non solo dalle proteine e acidi nucleici inglobati, ma anche dai loro **componenti lipidici**.

Gli esosomi sono normalmente arricchiti in fosfatidilserina (PS), acido fosfatidico, colesterolo, sfingomieline (SM), acido arachidonico e altri acidi grassi, prostaglandine e leucotrieni, che sono responsabili della loro stabilità e rigidità strutturale.

Inoltre, gli esosomi hanno anche alcuni enzimi lipolitici funzionali, che possono produrre autonomamente unità di vari lipidi bioattivi. Questi lipidi bioattivi esosomali possono essere internalizzati nelle cellule riceventi e concentrati all'interno degli endosomi.³⁴

³⁴ Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH.

Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.

Cell Biosci. 2019;9:19. Published 2019 Feb 15. doi:10.1186/s13578-019-0282-2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6377728/table/Tab3/>

Lipid-related enzymes and bioactive lipids in exosomes

lipid category and description	Lipid related enzymes	Functional effects
LTA4, LTB4, LTC4	LTA4 hydrolase, LTC4 synthase	Triggering polymorphonuclear [131] leukocyte migration
PGE2, 15d-PGJ2	COX-1, COX-2	Immunosuppression, [44] PPAR γ ligand
PGE2	PGE synthase	Inflammation [4]
PA	PLD2, DGK	Increasing exosome production [132, 133]
AA, LPC	cPLA2, iPLA2	Accounting for the membrane curvature [44]
/	sPLA2 IIA, sPLA2 V	Prostaglandin biosynthesis [44]
Ceramides	nSMase2	Sorting cargo into MVBs [134]
Cholesterol	/	Regulating exosome secretion [135]
BMP	/	MVB formation [135] and subsequent ILV biogenesis [136]
PS	/	Being involved in exosome fate [13, 122]
SM	/	Triggering calcium influx [135]

LA4, LTB4, LTC4 Leukotriene; *COX-1, COX-2* cyclooxygenases; *PGE2, 15d-PGJ2* prostaglandins; *PLD2* phospholipase D2; *DGK* diglyceride kinase; *PA* phosphatidic acid; *PLA2* phospholipases A2; *cPLA2* calcium-dependent phospholipases A2; *iPLA2* calcium-independent phospholipases A2; *AA* arachidonic acid; *LPC* lysophosphatidylcholine; *sPLA2 IIA*; *V* secreted phospholipases A2 IIA and V; *nSMase2* neutral sphingomyelinase 2; *BMP* Bis(monoacylglycero)phosphate, also called LBPA; *PS* phosphatidylserine; *SM* sphingomyelin

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6377728/>

Una domanda fondamentale è se le funzioni degli ExMV che portano molecole derivate dai patogeni guidano la difesa dell'ospite e l'eliminazione del patogeno, o mediano la diffusione dei fattori di virulenza per promuovere la sopravvivenza e la malattia del patogeno. Ciò che si è visto è che in alcuni casi, possono verificarsi entrambi, contemporaneamente e in equilibrio.

Questa è una domanda complessa che dipende sia da fattori dell'ospite, del patogeno che da fattori ambientali. La risposta a questa domanda per vari agenti patogeni non è ancora disponibile, poiché mancano molti degli strumenti necessari per le indagini, ad esempio metodi robusti per inibire specificamente la produzione di esosomi o altri ExMV al fine di valutare il loro ruolo nelle risposte immunitarie e nel controllo delle infezioni.

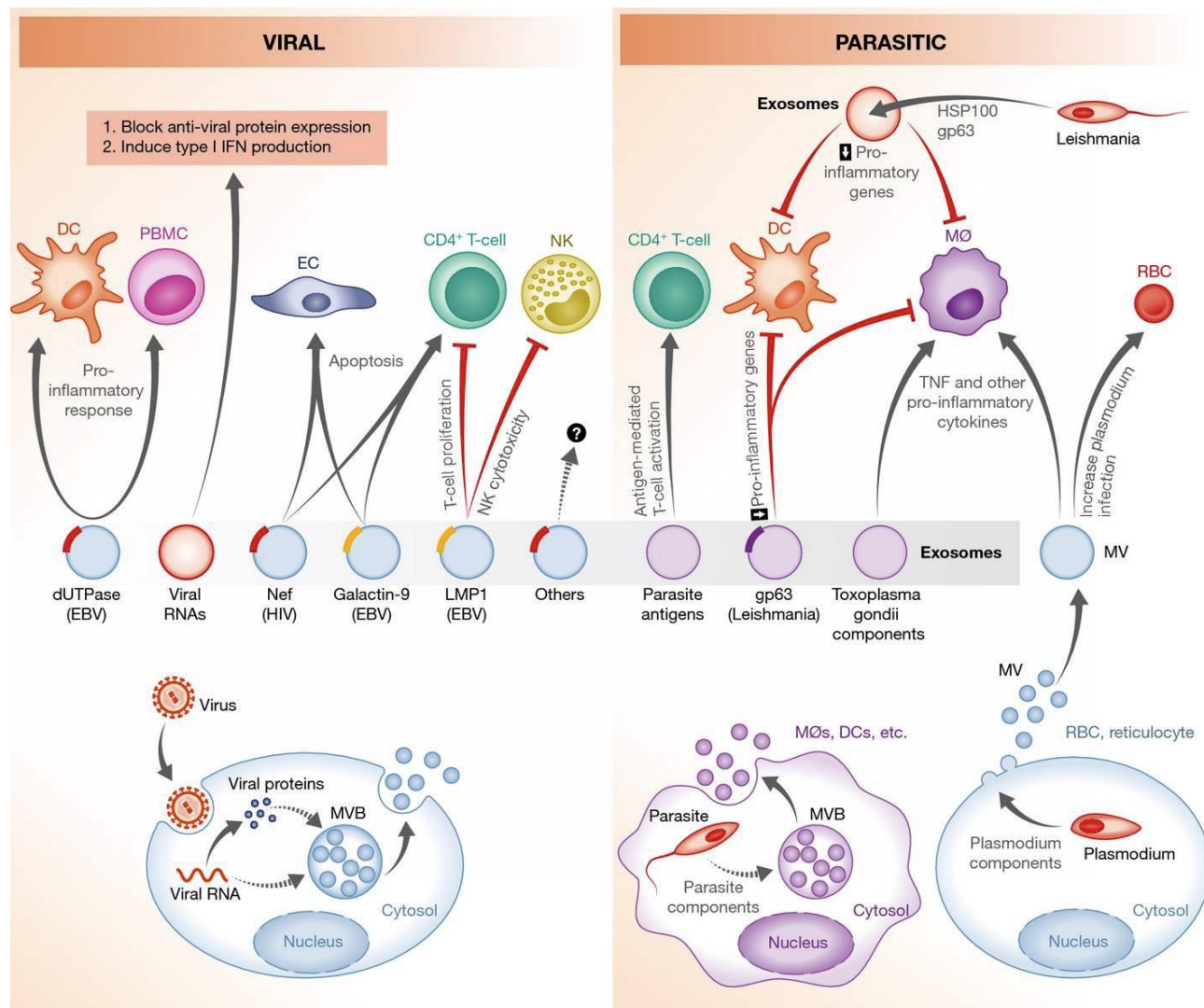
Tuttavia, studi condotti su vari modelli di infezione in vitro e in vivo hanno fornito alcune informazioni sulla funzione degli esosomi e di altri ExMV nella difesa dell'ospite e nell'evasione immunitaria.

Un'osservazione comune per molti studi di infezione in vivo è un'elevata concentrazione di ExMV nel sangue, che supporta una rilevanza funzionale per queste vescicole durante un'infezione, ³⁵ infatti gli esosomi e altri ExMV sono stati implicati nella patogenesi di diversi virus.

³⁵ Nantakomol D, Chimma P, Day NP, et al. Quantitation of cell-derived microparticles in plasma using flow rate-based calibration. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008;39(1):146-153. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18567455/>

Hu G, Gong AY, Roth AL, et al. Release of luminal exosomes contributes to TLR4-mediated epithelial antimicrobial defense. PLoS Pathog. 2013;9(4):e1003261. doi:10.1371/journal.ppat.1003261 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617097/>

Al momento del rilascio, queste vescicole vengono "catturate" dalle cellule e il trasferimento di proteine e/o RNA dell'ospite e virali potrebbe potenziare l'infezione virale e la replicazione nelle cellule riceventi o inibire la risposta immunitaria attraverso l'induzione dell'apoptosi o bloccando le risposte cellulari antivirali chiave.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4304727/>

Modulazione dell'immunità dell'ospite da parte degli esosomi durante un'infezione virale o parassitaria

Le cellule infettate da virus o parassiti, o gli stessi parassiti, rilasciano esosomi o microvescicole che possono stimolare l'attivazione dei linfociti T fornendo antigeni agli APC. Al contrario, gli esosomi contenenti molecole microbiche, come l'HIV Nef o la Leishmania GP63, possono bloccare l'attivazione dei linfociti T o indurre l'apoptosi delle cellule immunitarie effettrici. Le vescicole extracellulari rilasciate da cellule infettate da virus o parassiti possono modulare sia la risposta immunitaria innata che quella acquisita. In alcuni casi, questo è a vantaggio dell'agente patogeno, mentre in altri a vantaggio dell'ospite. Le linee tratteggiate indicano meccanismi sconosciuti. Vedere il glossario per le definizioni.

L'attuale comprensione delle funzioni delle EV comincia a colmare le lacune di conoscenza sulle comunicazioni cellula-cellula. Ad esempio, le EV possono parzialmente rispondere alle domande su come le citochine/chemochine raggiungono la concentrazione necessaria nel microambiente e raggiungano le loro cellule bersaglio.

È stato riscontrato che le citochine non sono trasmesse in forma libera, ma sembrano essere associate alle EV³⁶.

³⁶ Konadu KA, Chu J, Huang MB, et al. Association of Cytokines With Exosomes in the Plasma of HIV-1-Seropositive Individuals. J Infect Dis. 2015;211(11):1712-1716. doi:10.1093/infdis/jiu676

Citochine, chemochine, proteine e miRNA sono notevolmente arricchiti all'interno delle EV, suggerendo la funzione delle EV come veicolo per concentrare e trasportare queste molecole di segnalazione. Inoltre, gli RNA presenti nelle EV sono protetti dalla RNasiA, e quindi le EV possono costituire una fonte di miRNA a scopo terapeutico e per il rilevamento di biomarcatori di malattie ³⁷.

Veicolazione di farmaci tramite gli esosomi

La veicolazione di principi attivi a base di EV offre numerosi vantaggi rispetto ai tradizionali sistemi di somministrazione di farmaci: le EV mostrano una maggiore stabilità nel sangue che consente loro di percorrere lunghe distanze all'interno del corpo in condizioni fisiologiche e patologiche ³⁸.

- *Nel plasma sono stabili fino a 90 giorni in varie condizioni di conservazione ³⁹. Al contrario, le concentrazioni di picco del TNF-alfa libero si verificano circa 2 ore dopo la somministrazione, seguite da un rapido declino della concentrazione nel plasma (emivita di circa 18,2 minuti) ⁴⁰.*
- *Esprimono gli stessi marcatori di superficie delle loro cellule "madri". Questa funzionalità offre potenzialmente l'opportunità di fornire molecole contenenti EV in un modo specifico per il tipo di cellula.*
- *Trasportano marcatori specifici del tipo di cellula e possono fungere da agente diagnostico nella "biopsia liquida" * per evitare la diagnosi invasiva dei tessuti. ⁴¹*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4447830/>

³⁷ Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF.

Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood.

J Extracell Vesicles. 2014;3:10.3402/jev.v3.23743. Published 2014 Mar 26. doi:10.3402/jev.v3.23743

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3968297/>

³⁸ Jiang XC, Gao JQ.

Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery.

Int J Pharm. 2017;521(1-2):167-175. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.02.038

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731730128X?via%3Dihub>

Yousefpour P, Chilkoti A.

Co-opting biology to deliver drugs.

Biotechnol Bioeng. 2014;111(9):1699-1716. doi:10.1002/bit.25307

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251460/>

Terrasini N, Lionetti V.

Exosomes in Critical Illness.

Crit Care Med. 2017;45(6):1054-1060. doi:10.1097/CCM.0000000000002328

https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2017/06000/Exosomes_in_Critical_Illness.17.aspx

³⁹ Kalra H, Adda CG, Liem M, et al.

Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma.

Proteomics. 2013;13(22):3354-3364. doi:10.1002/pmic.201300282

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201300282>

⁴⁰ Fabbri LM, Rabe KF.

From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome?

Lancet. 2007;370(9589):797-799. doi:10.1016/S0140-6736(07)61383-X

<http://www.thelancet.com/retrieve/pii/S014067360761383X>

⁴¹ Lin J, Li J, Huang B, et al.

Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis.

ScientificWorldJournal. 2015;2015:657086. doi:10.1155/2015/657086

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322857/>

Properzi F, Logozzi M, Fais S.

Exosomes: the future of biomarkers in medicine.

Biomark Med. 2013;7(5):769-778. doi:10.2217/bmm.13.63

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322857/>

Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borràs FE.

Biofluid	Disease	Associated proteins
Plasma	Chronic hepatitis C	CD81
	Melanoma	CD63, caveolin-1, TYRP2, VLA-4, HSP70, HSP90, (phospho)Met
	Glioblastoma	Epidermal growth factor receptor VIII
	Prostate cancer	Survivin, PSA
	Plasma cell dyscrasias	c-src
	Ovarian cancer	TGFB1 and MAGE3/6
Serum	Glioblastoma	EGFRvIII
	Lung cancer	EGFR
	Pancreatic cancer	KRAS
Urine	Acute kidney injury	Fetuin-A, ATF 3
	Liver injury	CD26, CD81, S1c3A1, CD10
	Bartter syndrome type 1	NKCC2
	Bladder cancer	EGF, α subunit of Gs, Resistin, Retinoic acid-induced protein 3,
	Prostate cancer	PSA, PCA3
	ischemia reperfusion injury	Aquaporin-1, Transcription factor 3
	focal segmentary glomerulosclerosis	Wilms tumor 1, PODXL
	Nephrotic syndrome	Neprilysin, Aquaporin-2, Podocalyxin
Biofluid	Disease	Associated RNAs
Plasma	Ovarian cancer	miR-21, -141, -200a, -200b, -200c, -203, -205, -214
	Lung cancer	miR-17-3p, miR-21, miR-20b, miR-223, miR-301, let-7f, miR-151a-5p, miR-30a-3p, miR-200b-5p, miR-629, miR-100, miR-154-3p
	Prostate cancer	miR-16, miR-34b, miR-92a, miR-92b, miR-103, miR-107, miR-197, miR-328, miR-485-3p, miR-486-5p, miR-574-3p, miR-636, miR-640, miR-766 and miR-885-5p
	Esophageal squamous cell cancer (ESCC)	miR-21, miR-1246
	Breast cancer	miR-141 and miR195
	Cardiovascular disease	miR-1, miR-133a
	Alcoholic liver disease	miR-122 and miR-155
	Glioblastoma	RNU6-1, miR-320, and miR-574-3p
Serum	Colorectal cancer	let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, miR-23a
	Human esophageal cell carcinoma	miR-21
Urine	Renal fibrosis	miR-29c, CD2APmRNA

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946167/>

EV contenenti molecole che possono potenzialmente fungere da biomarcatori

Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases.
Front Immunol. 2015;6:6. Published 2015 Jan 30. doi:10.3389/fimmu.2015.00006
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311634/>

Zocco D, Ferruzzi P, Cappello F, Kuo WP, Fais S.
Extracellular vesicles as shuttles of tumor biomarkers and anti-tumor drugs.
Front Oncol. 2014;4:267. Published 2014 Oct 8. doi:10.3389/fonc.2014.00267
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4189328/>

* Definizioni: LA BIOPSIA LIQUIDA

Gli studi condotti fino ad oggi hanno dimostrato che gli agenti patogeni sono in grado di dirottare l'apparato biosintetico dell'esosoma dell'ospite come parte della loro strategia di sopravvivenza.

Virus come paramyxovirus, virus dell'epatite C (HCV), rhabdovirus, filovirus, herpesvirus e virus dell'epatite B (HBV) utilizzano i complessi di smistamento endosomiale necessari per il trasporto (ESCRT endosomal sorting complexes required for transport)⁴² per promuovere il loro rilascio.⁴³

Queste somiglianze e la presenza di proteine virali negli esosomi suggeriscono la condivisione di questo processo per la veicolazione delle proteine virali mediante gli esosomi.

Inflammasoma ed esosomi⁴⁴

C'è una forte evidenza che la secrezione delle EV sia correlata all'attività dell'inflammasoma,⁴⁵

⁴² Votteler J, Sundquist WI.

Virus budding and the ESCRT pathway.

Cell Host Microbe. 2013;14(3):232-241. doi:10.1016/j.chom.2013.08.012

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819203/>

⁴³ Meckes DG Jr.

Exosomal communication goes viral.

J Virol. 2015;89(10):5200-5203. doi:10.1128/JVI.02470-14

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442506/>

Ahmed I, Akram Z, Iqbal HMN, Munn AL.

The regulation of Endosomal Sorting Complex Required for Transport and accessory proteins in multivesicular body sorting and enveloped viral budding - An overview.

Int J Biol Macromol. 2019;127:1-11. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.015

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813018358380?via%3Dihub>

⁴⁴ Cypryk W, Nyman TA, Matikainen S.

From Inflammasome to Exosome-Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response?

Front Immunol. 2018;9:2188. Published 2018 Sep 25. doi:10.3389/fimmu.2018.02188

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02188/full>

⁴⁵ Nyman TA, Lorey MB, Cypryk W, Matikainen S.

Mass spectrometry-based proteomic exploration of the human immune system: focus on the inflammasome, global protein secretion, and T cells.

Expert Rev Proteomics (2017) 14:395-407. doi: 10.1080/14789450.2017.1319768

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28406322/>

Välimäki E, Miettinen JJ, Lietzén N, Matikainen S, Nyman TA.

Monosodium urate activates Src/Pyk2/PI3 kinase and cathepsin dependent unconventional protein secretion from human primary macrophages.

Mol Cell Proteomics (2013) 12:749-63. doi: 10.1074/mcp.M112.024661

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591666/>

Välimäki E, Cypryk W, Virkanen J, Nurmi K, Turunen PM, Eklund KK, et al.

Calpain activity is essential for ATP-driven unconventional vesicle-mediated protein secretion and inflammasome activation in human macrophages.

J Immunol. (2016) 197:3315-25. doi: 10.4049/jimmunol.1501840

<https://www.jimmunol.org/content/197/8/3315.long>

Cypryk W, Lorey M, Puustinen A, Nyman TA, Matikainen S.

Proteomic and bioinformatic characterization of extracellular vesicles released from human macrophages upon influenza A virus infection.

J Proteome Res. (2017) 16:217-27. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00596

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.6b00596>

Lorey MB, Rossi K, Eklund KK, Nyman TA, Matikainen S.

Global characterization of protein secretion from human macrophages following non-canonical caspase-4/5 inflammasome activation.

Mol Cell Proteomics (2017) 16(4 suppl. 1):S187-99. doi: 10.1074/mcp.M116.064840

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5393394/>

Singhto N, Kanlaya R, Nilnumkhum A, Thongboonkerd V.

Roles of macrophage exosomes in immune response to calcium oxalate monohydrate crystals.

Front Immunol. (2018) 9:316. doi: 10.3389/fimmu.2018.00316

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5835051/>

e che l'EV "indotto dall'inflammasoma" possa attivare risposte infiammatorie nelle cellule riceventi ⁴⁶.

Pertanto l'attivazione della secrezione di EV attraverso vari meccanismi è probabilmente il risultato dell'attività dell'inflammasoma nella segnalazione immunitaria determinata dall'evoluzione.

Nel loro articolo *"From Inflammasome to Exosome-Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response?"*, Cypryk et al suggeriscono un modello della secrezione di EV dipendente dall'inflammasoma come processo sequenziale, che serve al rilascio di citochine pro-infiammatorie e di numerose altre proteine.

Nella figura seguente è rappresentata la relazione tra attività dell'inflammasoma e secrezione delle EV:

*A. Il **segnale 1**, fornito da IL1R, TLR e altri PRR induce la trascrizione e l'espressione di NLRP3, nonché dei precursori delle citochine infiammatorie IL-1 β e IL-18 e all'induzione dell'espressione di centinaia di altre proteine.*

*B. Il **segnale 2** attiva l'inflammasoma che catalizza l'elaborazione della pro-IL-1 β e della gasdermina D. Il frammento N-terminale della gasdermina D si inserisce nella membrana cellulare e oligomerizza, formando un poro, che consente la secrezione diretta di piccole proteine, citochine e favorisce i flussi ionici attraverso la membrana.*

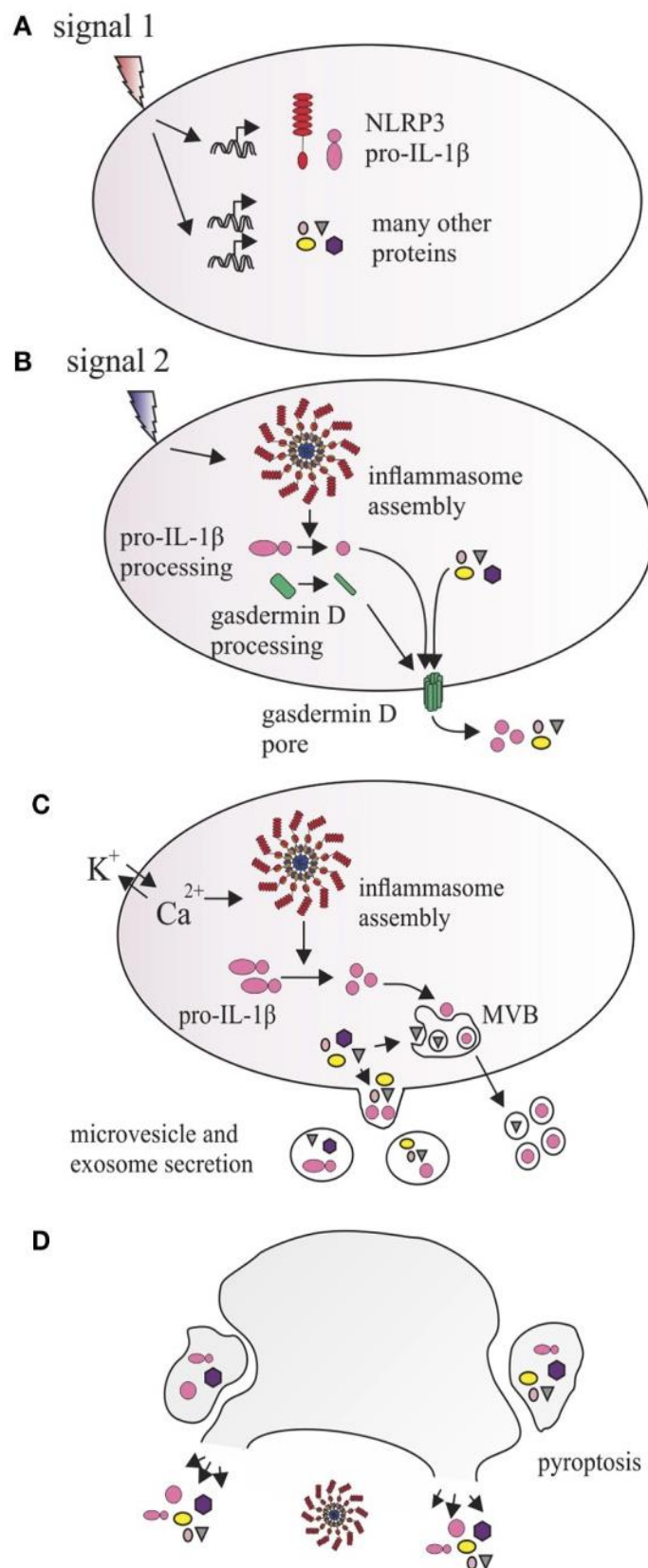
*Inoltre, le concentrazioni di calcio e potassio sono influenzate anche dai recettori di antiporto * di membrana (ad es. P2X7) o dalla fuoriuscita di lisosomi, amplificando l'attivazione dell'inflammasoma e causando l'attivazione di floppasi, flippasi e scramblasi, che catalizzano la traslocazione transmembrana di fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina.*

C. Ciò influisce sulla curvatura della membrana, provocando il germogliamento verso l'esterno, la formazione di microvescicole e l'incorporazione di proteine in prossimità della membrana (comprese pro-IL-1 β e IL-1 β maturo) nonché di proteine di membrana integrali nel loro lume. La rapida elaborazione di IL-1 β può comportare anche il reclutamento di IL-1 β maturo nelle vescicole intraluminali del corpo multivesicolare (MVB), un componente del percorso endosomiale, che trasferisce il suo contenuto direttamente alla membrana, rilasciando esosomi.

D. L'attività prolungata dell'inflammasoma porta a piroptosi che può causare il rilascio di componenti dell'inflammasoma, citochine e altre proteine tramite la lisi della membrana o strutture vescicolari più grandi risultanti dalla frammentazione cellulare.

Öhman T, Teirilä L, Lahesmaa-Korpinen AM, Cypryk W, Veckman V, Saijo S, et al.
Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages.
J Immunol. (2014) 192:5952–62. doi: 10.4049/jimmunol.1303213
<https://www.jimmunol.org/content/192/12/5952.long>

⁴⁶ Zhang Y, Liu F, Yuan Y, Jin C, Chang C, Zhu Y, et al.
Inflammasome-derived exosomes activate NF- κ B signaling in macrophages. J Proteome Res. (2017) 16:170–178. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00599
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.6b00599>

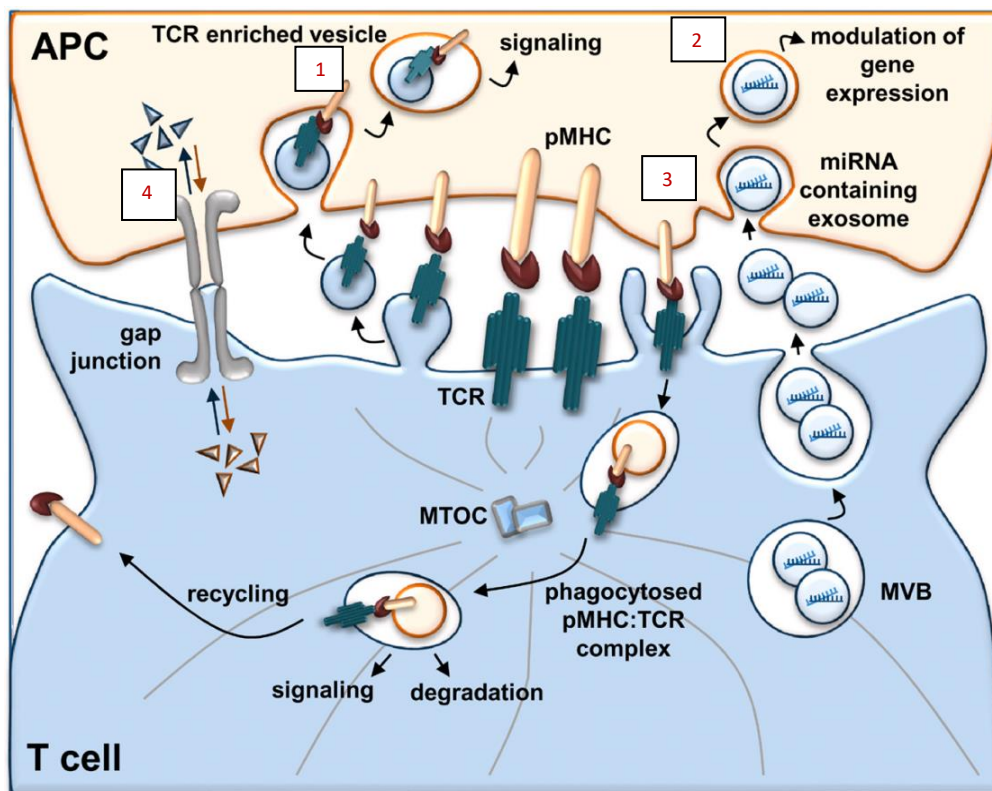


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6167409/>
Relazione proposta tra l'inflammasoma NLRP3 e la secrezione di proteine vescicolari

* Definizioni: TRASPORTO E PERMEABILITÀ DI MEMBRANA CELLULARE

La sinapsi immunologica e gli esosomi

Il termine "**sinapsi immunologica**" è stato originariamente coniato per evidenziare le somiglianze tra i contatti sinaptici tra i neuroni nel sistema nervoso centrale e le interazioni affini, dipendenti dall'antigene tra le cellule T e le cellule che presentano l'antigene ⁴⁷



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657015/>

⁴⁷ Yokosuka T., Saito T. (2010)

The Immunological Synapse, TCR Microclusters, and T Cell Activation. In: Saito T., Batista F.

(eds) Immunological Synapse. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 340. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03858-7_5

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-03858-7_5

Dustin ML.

he immunological synapse.

Cancer Immunol Res. 2014;2(11):1023-1033. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0161

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692051/>

Gutiérrez-Vázquez C, Villarroja-Beltri C, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F.

Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions.

Immunol Rev. 2013;251(1):125-142. doi:10.1111/imr.12013

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3740495/>

Davis DM, Dustin ML.

What is the importance of the immunological synapse?

Trends Immunol. 2004;25(6):323-327. doi:10.1016/j.it.2004.03.007

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15145322/>

Dustin ML.

What counts in the immunological synapse?

Mol Cell. 2014;54(2):255-262. doi:10.1016/j.molcel.2014.04.001

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005017/>

Finetti F, Cassioli C, Baldari CT.

Transcellular communication at the immunological synapse: a vesicular traffic-mediated mutual exchange.

F1000Res. 2017;6:1880. Published 2017 Oct 24. doi:10.12688/f1000research.11944.1

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657015/>

Comunicazione cellula-cellula alla sinapsi immunologica (IS).

miRNA, microRNA; MTOC, centro di organizzazione dei microtubuli; MVB, corpo multivesicolare.

L'IS funziona come un dispositivo per la comunicazione transcellulare sfruttando diversi meccanismi:

1. trasferimento polarizzato di vescicole arricchite con recettore dell'antigene delle cellule T (TCR) dalle cellule T alle cellule presentanti l'antigene (APC), che promuove la segnalazione precoce nella cellula ricevente;
2. rilascio di esosomi contenenti miRNA dalle cellule T che modulano l'espressione genica nelle APC;
3. trogocitosi * del complesso peptide-MHC:TCR (pMHC: TCR) durante l'internalizzazione del TCR, associata sia alla segnalazione sostenuta che all'espressione superficiale di pMHC nelle cellule T, in cui quest'ultima conferisce alle cellule T la capacità di presentare l'antigene ad altre cellule T;
4. assemblaggio della giunzione stretta tra cellule T e APC che consente lo scambio di molecole solubili all'IS.

** **trogocitosi**:⁴⁸ trasferimento di frammenti di membrana plasmatica da una cellula ad un'altra senza indurre la morte cellulare. Questo processo è mediato dalla segnalazione recettoriale in seguito al contatto cellula-cellula*

ESOSOMI E ARDS⁴⁹

La comunicazione cellula-cellula è essenziale per il funzionamento ottimale del polmone e quindi gli esosomi sono importanti nella biologia e nella funzione polmonare.

⁴⁸ Joly, E., Hudrisier, D.

What is trogocytosis and what is its purpose?

Nat Immunol 4, 815 (2003). <https://doi.org/10.1038/ni0903-815>

<https://www.nature.com/articles/ni0903-815>

⁴⁹ Kim TH, Hong SB, Lim CM, Koh Y, Jang EY, Huh JW.

The Role of Exosomes in Bronchoalveolar Lavage from Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome.

J Clin Med. 2019;8(8):1148. Published 2019 Aug 1. doi:10.3390/jcm8081148

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722638/>

Cabrera-Benítez NE, Valladares F, García-Hernández S, et al.

Altered Profile of Circulating Endothelial-Derived Microparticles in Ventilator-Induced Lung Injury [

published correction appears in Crit Care Med. 2016 Mar;44(3):e180]. Crit Care Med. 2015;43(12):e551-e559. doi:10.1097/CCM.0000000000001280

https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2015/12000/Altered_Profile_of_Circulating_Endothelial_Derived.37.aspx

Alipoor SD, Mortaz E, Garssen J, Movassaghi M, Mirsaeidi M, Adcock IM.

Exosomes and Exosomal miRNA in Respiratory Diseases.

Mediators Inflamm. 2016;2016:5628404. doi:10.1155/2016/5628404

<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/5628404/>

Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K.

Extracellular Vesicles: New Players in Lung Immunity.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2018;58(5):560-565. doi:10.1165/rcmb.2017-0293TR

<https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1165/rcmb.2017-0293TR>

Lanyu Z, Feilong H.

Emerging role of extracellular vesicles in lung injury and inflammation.

Biomed Pharmacother. 2019;113:108748. doi:10.1016/j.biopha.2019.108748

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753333221930160X>

Gli esosomi vengono rilasciati da un'ampia gamma di tipi di cellule presenti all'interno del polmone, comprese le cellule endoteliali, le cellule staminali, le cellule epiteliali, i macrofagi alveolari e le cellule tumorali, sebbene **le cellule epiteliali siano la principale fonte di esosomi derivati dal polmone.**⁵⁰

Gli esosomi rilasciati dalle cellule epiteliali delle vie aeree contengono mucine e acido sialico alfa-2,6 che hanno un effetto neutralizzante sull'infezione da virus influenzale umano⁵¹.

Le mucine influenzano le proprietà strutturali, la conformazione e la carica superficiale degli esosomi e contribuiscono così alla difesa mucociliare da parte del sistema immunitario innato del polmone.⁵²

Gli esosomi controllano la segnalazione infiammatoria all'interno delle vie aeree attraverso la comunicazione intercellulare⁵³ e possono agire come parte della risposta allo stress nelle vie aeree.

Nella sarcoidosi, gli esosomi provocano l'inizio e la progressione delle risposte infiammatorie migliorando l'induzione della produzione di IL-13, INF-gamma e CXCL-8 nel microambiente polmonare⁵⁴.

Inoltre, la secrezione degli esosomi e la loro composizione possono essere alterati a seguito dell'infezione. Ad esempio, è stato dimostrato che gli esosomi derivati dai macrofagi alveolari sono arricchiti per HSP-70 dopo l'infezione da Mycobacterium [66].⁵⁵

Le EV rilasciate dalle cellule delle vie aeree possono essere trovate nel liquido di lavaggio broncoalveolare e supportare l'infiammazione nei polmoni, ma possono anche riversarsi nella circolazione e trasportare un cocktail di molecole pro-infiammatorie alle cellule riceventi negli organi distanti.⁵⁶

⁵⁰ Y. Fujita, N. Kosaka, J. Araya, K. Kuwano, and T. Ochiya, Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis Trends in Molecular Medicine, vol. 21, no. 9, pp. 533–542, 2015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26231094/>

⁵¹ N. T. Eissa
The exosome in lung diseases: message in a bottle
Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 131, no. 3, pp. 904–905, 2013. [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(13\)00160-7/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(13)00160-7/fulltext)

⁵² M. C. Rose and J. A. Voynow
Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease
Physiological Reviews, vol. 86, no. 1, pp. 245–278, 2006. https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00010.2005?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org

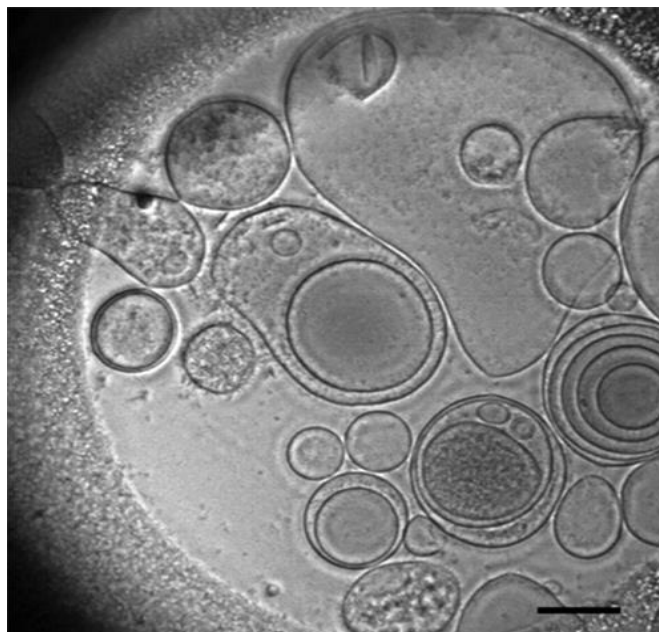
E. Bourdonnay, Z. Zasłona, L. R. K. Penke et al.
Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling
The Journal of Experimental Medicine, vol. 212, no. 5, pp. 729–742, 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4419346/>

⁵³ R. Sessa and A. Hata
Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases
Pulmonary Circulation, vol. 3, no. 2, pp. 315–328, 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3757825/>

⁵⁴ K. R. Qazi, P. T. Paredes, B. Dahlberg, J. Grunewald, A. Eklund, and S. Gabrielsson
Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis
Thorax, vol. 65, no. 11, pp. 1016–1024, 2010. <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v81/full/81081091.html>

⁵⁵ C. Cordazzo, S. Petrini, T. Neri et al.
Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca²⁺ mobilization
Inflammation Research, vol. 63, no. 7, pp. 539–547, 2014. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00011-014-0723-7>

⁵⁶ Wahlund CJE, Eklund A, Grunewald J, Gabrielsson S.
Pulmonary Extracellular Vesicles as Mediators of Local and Systemic Inflammation.
Front Cell Dev Biol. 2017;5:39. Published 2017 Apr 26. doi:10.3389/fcell.2017.00039
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28491866/>



<https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1165/rcmb.2017-0293TR>

Morfologia delle vescicole extracellulari purificate (EV) dal fluido BAL umano. Viene presentata un'immagine rappresentativa al microscopio elettronico a trasmissione di contrasto di fase. Si osservano EV di varie dimensioni e forme. Questi EV sono stati isolati utilizzando un metodo di ultracentrifugazione convenzionale. Barra della scala: 200 nm.

EV e interazione tra il microbiota e la risposta immunitaria polmonare dell'ospite

Come già visto, il microbiota è essenziale per lo sviluppo delle risposte immunitarie e dell'omeostasi delle vie aeree ⁵⁷.

La disbiosi e la colonizzazione dei patogeni sono state collegate ad alterazioni delle risposte immunitarie e allo sviluppo di malattie nei polmoni, ⁵⁸ ed è stato dimostrato che le EV derivate da agenti patogeni, compresi i batteri, trasferiscono il loro contenuto alle cellule ospiti e modulano l'immunità innata dell'ospite ⁵⁹.

⁵⁷ Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309:L1047–L1055. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4652146/>

⁵⁸ Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:55–63. <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.142.pdf>

⁵⁹ Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Rep* 2015;16:24–43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4304727/>

Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):375–387. doi:10.1038/nri3837 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25976515/>

Lee EY, Bang JY, Park GW, et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* [published correction appears in *Proteomics*. 2007 Oct;7(20):3821]. *Proteomics*. 2007;7(17):3143–3153. doi:10.1002/pmic.200700196 <http://www.zgddk.com/EN/abstract/abstract13896.shtml>

Park et al hanno riscontrato che l'ingresso di EV derivate da *Escherichia coli* nel flusso sanguigno induceva un'inflammatione sistemica che imitava la sepsi,⁶⁰ e che EV derivate da *Staphylococcus aureus* erano associate alla patogenesi dell'inflammatione polmonare neutrofila⁶¹.

Inoltre, le EV derivate da batteri gram-negativi inducono risposte delle cellule Th1 e Th17 e l'inflammatione neutrofila nei polmoni, che porta alla patogenesi delle malattie da inflammatione delle vie aeree come l'asma neutrofila e la BPCO⁶².

Questi dati suggeriscono che le EV derivate dal microbiota intestinale possono essere i messaggeri chiave della comunicazione tra il microbiota intestinale e le risposte immunitarie polmonari dell'ospite attraverso il trasferimento dei componenti contenuti nelle EV.

Kim et al hanno analizzato il microbiota polmonare dal tessuto polmonare della BPCO e le EV derivate dal tessuto polmonare della BPCO,⁶³ e hanno dimostrato che le EV di derivazione batterica possedevano caratteristiche distintive nei polmoni di non fumatori, fumatori sani e pazienti con BPCO.

Le EV prodotte dai batteri commensali possono giovare all'ospite promuovendo la tolleranza della mucosa e proteggendo dall'insorgenza di malattie polmonari⁶⁴.

Al contrario, le EV derivate dalla disbiosi del microbiota polmonare possono indurre risposte immunitarie polmonari attivate e patogenesi infiammatoria polmonare.⁶⁵

⁶⁰ Park KS, Choi KH, Kim YS, Hong BS, Kim OY, Kim JH, et al.
Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome.
PLoS One 2010;5:e11334.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2893157/>

⁶¹ Kim MR, Hong SW, Choi EB, et al.
Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both Th1 and Th17 cell responses.
Allergy. 2012;67(10):1271-1281. doi:10.1111/all.12001
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22913540/>

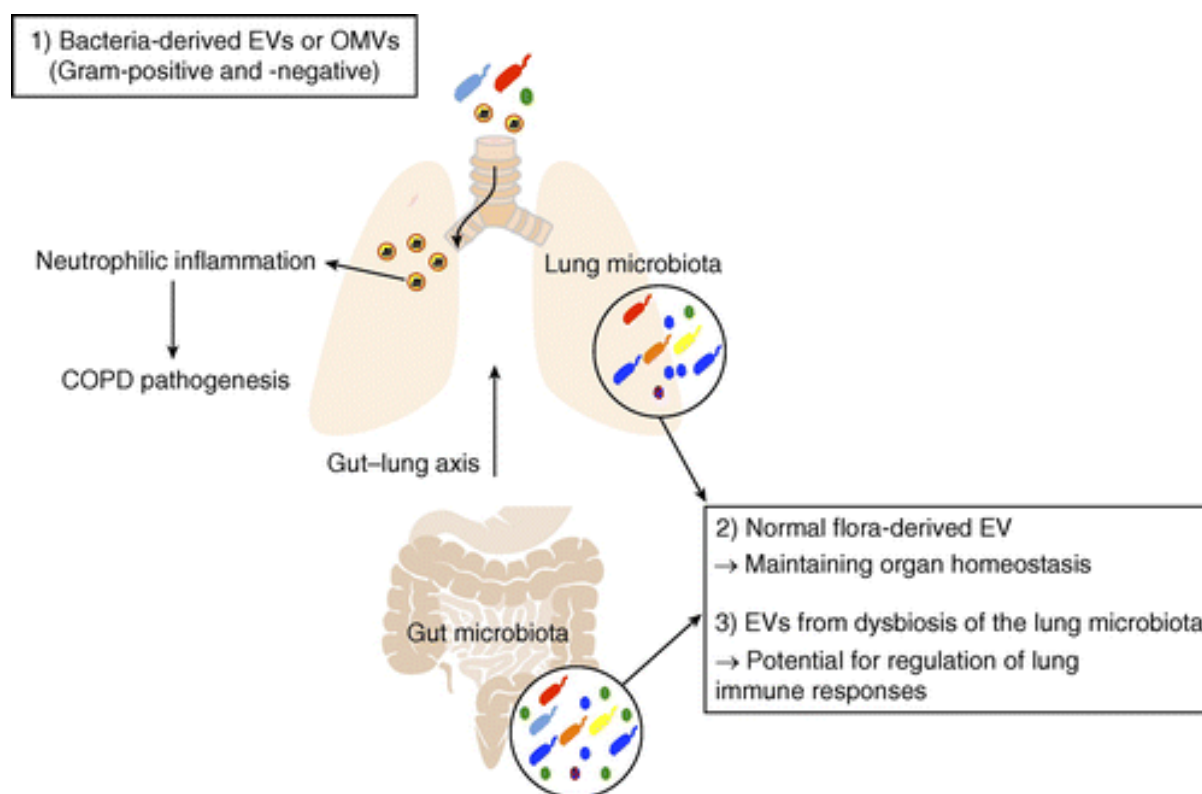
⁶² Kim YS, Choi EJ, Lee WH, et al.
Extracellular vesicles, especially derived from Gram-negative bacteria, in indoor dust induce neutrophilic pulmonary inflammation associated with both Th1 and Th17 cell responses.
Clin Exp Allergy. 2013;43(4):443-454. doi:10.1111/cea.12085
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23517040/>

Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS.
Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles.
Semin Cell Dev Biol 2015;40:97-104.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25704309/>

⁶³ Kim HJ, Kim YS, Kim KH, et al.
The microbiome of the lung and its extracellular vesicles in nonsmokers, healthy smokers and COPD patients.
Exp Mol Med. 2017;49(4):e316. Published 2017 Apr 14. doi:10.1038/emm.2017.7
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5420800/>

⁶⁴ Choi Y, Park H, Park HS, Kim YK.
Extracellular Vesicles, a Key Mediator to Link Environmental Microbiota to Airway Immunity.
Allergy Asthma Immunol Res. 2017;9(2):101-106. doi:10.4168/aaair.2017.9.2.101
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266118/>

⁶⁵ Kubo H.
Extracellular Vesicles in Lung Disease.
Chest. 2018;153(1):210-216. doi:10.1016/j.chest.2017.06.026
[https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(17\)31195-9/fulltext](https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(17)31195-9/fulltext)



me

EVs derivati dal microbiota e risposta immunitaria polmonare ospite. Si propone che l'interazione tra il microbiota e le risposte immunitarie polmonari dell'ospite mediate dalle EV abbia il potenziale per aumentare la comprensione delle risposte immunitarie polmonari fondamentali. **1)** EVs derivati da batteri o vescicole della membrana esterna (OMV) inducono infiammazione neutrofila e lo sviluppo di malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO). Inoltre, le EV prodotte dai microbi polmonari e intestinali possono attivare le risposte immunitarie polmonari. **2)** le EV prodotte dalla flora normale promuovono la tolleranza della mucosa e proteggono dall'insorgenza di malattie infiammatorie. **3)** Al contrario, le EV derivate dalla disbiosi del microbiota hanno il potenziale per attivare le risposte immunitarie polmonari

EV contenute nei fluidi broncoalveolari (BALF)

Vengono secrete nel fluido di lavaggio broncoalveolare grandi quantità di EV da diversi tipi di cellule dopo infezione o lesione polmonare.

Le EV BALF contribuiscono in modo significativo allo sviluppo dell'infiammazione polmonare in diversi modelli di ALI.

Dopo stimoli sterili, la fonte principale delle EV BALF era dalle cellule epiteliali di tipo I alveolare, mentre le EV erano principalmente derivate dai macrofagi alveolari in BALF indotto da stimoli infettivi.⁶⁶

Effetti delle EV derivate dal tessuto polmonare

Quasi tutti i tipi di cellule rilasciano EV che colpiscono cellule vicine o distanti ed esercitano anche azioni autocrine su sé stesse. Queste EV hanno effetti protettivi o dannosi distinti su altre cellule, che dipendono fortemente dalle cellule donatrici, dagli stimoli accettati delle cellule madri e dalla varietà e composizione delle EV.

Nei tessuti polmonari, le comunicazioni tra le cellule immunitarie e strutturali alveolari attraverso le EV contribuiscono alla risposta infiammatoria polmonare, alla rottura della barriera strutturale e alla modulazione del microambiente polmonare.

⁶⁶ Lee H, Zhang D, Laskin DL, Jin Y.

Functional Evidence of Pulmonary Extracellular Vesicles in Infectious and Noninfectious Lung Inflammation.

J Immunol. 2018;201(5):1500-1509. doi:10.4049/jimmunol.1800264

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6109965/>

EV derivate dalle cellule epiteliali

Le EV sono fondamentali per l'attivazione e la propagazione della trombosi attraverso l'esposizione di fosfolipidi caricati negativamente sulla loro superficie e il rilascio del fattore tissutale (TF, un iniziatore primario della coagulazione del sangue, che svolge anche un ruolo fondamentale nell'angiogenesi) nel sito della trombosi.⁶⁷

Jin-AhPark et al hanno dimostrato da studi in vitro e in vivo che **le cellule epiteliali bronchiali sottoposte a stress meccanico sono una fonte di TF secreto**.

La quantità di TF nel liquido di lavaggio broncoalveolare da pazienti con asma (una malattia caratterizzata in parte da angiogenesi sottoepiteliale) è stata trovata a concentrazioni medie che erano **5 volte maggiori** di quelle del controllo sano, e gli esosomi isolati dalle cellule epiteliali bronchiali normali umane e dal fluido di lavaggio broncoalveolare di soggetti asmatici contenevano TF.⁶⁸

In maniera analoga, **in seguito ad uno stimolo proinfiammatorio, le cellule epiteliali alveolari possono rilasciare molte EV contenenti fattore tissutale procoagulante (TF), che contribuiscono alla deposizione di fibrina nell'ARDS**.⁶⁹

EV derivate dai macrofagi alveolari

le microvescicole alveolari derivate dai macrofagi vengono rilasciate rapidamente nelle prime fasi del danno polmonare acuto e sono **potenti iniziatori dell'infiammazione**, mediata in particolare dal TNF (tumour necrosis factor).⁷⁰

⁶⁷ Falati S, Liu Q, Gross P, et al.

Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. J Exp Med. 2003;197(11):1585-1598. doi:10.1084/jem.20021868
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193915/>

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al.

Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood. 2000;95(3):930-935.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10648405/>

Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, et al.

Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. Thromb Haemost. 2003;89(3):486-492.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12624632/>

Rauch U, Nemerson Y.

Circulating tissue factor and thrombosis. Curr Opin Hematol. 2000;7(5):273-277. doi:10.1097/00062752-200009000-00003
https://journals.lww.com/co-hematology/Abstract/2000/09000/Circulating_tissue_factor_and_thrombosis.3.aspx

Thiagarajan P, Tait JF.

Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. J Biol Chem. 1991;266(36):24302-24307.
<https://www.jbc.org/content/266/36/24302.long>

⁶⁸ Park JA, Sharif AS, Tschumperlin DJ, et al.

Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. J Allergy Clin Immunol. 2012;130(6):1375-1383. doi:10.1016/j.jaci.2012.05.031
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3511625/>

⁶⁹ Bastarache JA, Fremont RD, Kropski JA, Bossert FR, Ware LB.

Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;297(6):L1035-L1041. doi:10.1152/ajplung.00214.2009
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793184/>

⁷⁰ Soni S, Wilson MR, O'Dea KP, et al.

Alveolar macrophage-derived microvesicles mediate acute lung injury. Thorax. 2016;71(11):1020-1029. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-208032
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099194/>

EV derivate da cellule endoteliali

Le EV derivate dalle cellule endoteliali promuovono lo **spostamento al fenotipo pro-infiammatorio delle cellule endoteliali** ⁷¹.

Inducono una **diminuzione della produzione di NO** sia in vivo che in vitro, e in vivo sono stati riscontrati edema polmonare, reclutamento di neutrofili e compromissione della barriera endoteliale-alveolare ⁷².

L'incubazione dei macrofagi con EV endoteliali indotte dal fumo di sigaretta (CS) causa una significativa **inibizione dell'efferocitosi dei macrofagi** ⁷³.

La ventilazione meccanica potrebbe causare lesioni e distruzione delle cellule endoteliali, anche senza un'infiammazione già esistente.

Rispetto alla ventilazione meccanica a basso volume corrente, **la ventilazione ad alto volume corrente aumenta il punteggio dell'edema polmonare e porta a un deterioramento dello scambio gassoso, associato a un evidente aumento del numero di EV delle cellule endoteliali circolanti** ⁷⁴.

Il ruolo diagnostico degli EV nel danno polmonare e nell'infiammazione

I componenti molecolari nelle EV sono correlati a determinate malattie, indicando che possono essere utilizzati anche per la diagnosi e predire la gravità della malattia ⁷⁵.

Le EV leucocitarie nel BALF e nel sangue (LeuMP) sono state identificate come biomarcatori di prognosi favorevole all'inizio dell'ARDS ⁷⁶.

⁷¹ Andrews AM, Rizzo V.

Microparticle-Induced Activation of the Vascular Endothelium Requires Caveolin-1/Caveolae. PLoS One. 2016;11(2):e0149272. Published 2016 Feb 18. doi:10.1371/journal.pone.0149272 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758735/>

⁷² Densmore JC, Signorino PR, Ou J, et al.

Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. Shock. 2006;26(5):464-471. doi:10.1097/01.shk.0000228791.10550.36 https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2006/11000/ENDOTHELIUM_DERIVED_MICROPARTICLES_INDUCE.6.aspx

⁷³ Serban KA, Rezanian S, Petrusca DN, et al.

Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. Sci Rep. 2016;6:31596. Published 2016 Aug 17. doi:10.1038/srep31596 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987682/>

⁷⁴ Cabrera-Benítez NE, Valladares F, García-Hernández S, et al.

Altered Profile of Circulating Endothelial-Derived Microparticles in Ventilator-Induced Lung Injury [published correction appears in Crit Care Med. 2016 Mar;44(3):e180]. Crit Care Med. 2015;43(12):e551-e559. doi:10.1097/CCM.0000000000001280 https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2015/12000/Altered_Profile_of_Circulating_Endothelial_Derived.37.aspx

⁷⁵ Properzi F, Logozzi M, Fais S.

Exosomes: the future of biomarkers in medicine. Biomark Med. 2013;7(5):769-778. doi:10.2217/bmm.13.63 <https://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/bmm.13.63>

Masaoutis C, Mihailidou C, Tsourouflis G, Theocharis S.

Exosomes in lung cancer diagnosis and treatment. From the translating research into future clinical practice. Biochimie. 2018;151:27-36. doi:10.1016/j.biochi.2018.05.014 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908418301457?via%3Dihub>

⁷⁶ Bastarache JA, Fremont RD, Kropski JA, Bossert FR, Ware LB.

Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;297(6):L1035-L1041. doi:10.1152/ajplung.00214.2009 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793184/>

Guervilly C, Lacroix R, Forel JM, et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. Crit Care. 2011;15(1):R31. doi:10.1186/cc9978 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3222067/>

EV derivate da altre cellule

La somministrazione intratracheale ed endovenosa di EV ematiche provenienti da ratti trattati con LPS a ratti normali era in grado di indurre l'ARDS con l'aumento significativo della mieloperossidasi (MPO), TNF- α , IL-1 β e IL-10 nel BALF e plasma.

Lo studio della morfologia polmonare ha dimostrato che le strutture alveolari erano distrutte con una grande quantità di **neutrofili infiltrati nei tessuti polmonari**.⁷⁷

Studi effettuati sulle unità stoccate di globuli rossi concentrati (pRBC) hanno dimostrato la presenza di EV in quantità crescente con l'aumentare del tempo di stoccaggio e l'associazione tra le EV e diversi processi avversi, tra cui malattie vascolari, danno polmonare, trombosi, immunomodulazione, refrattarietà piastrinica e priming dei neutrofili.

In vitro, i neutrofili umani co-incubati con RBC-MV hanno mostrato l'aumento delle espressioni di CD11b e della produzione di superossido, nonché una maggiore capacità fagocitica che può spiegare il **potenziamento della risposta infiammatoria osservata durante la trasfusione nei pazienti che ricevono pRBC più vecchi**.⁷⁸

VIRUS E VESICOLE EXTRACELLULARI⁷⁹

⁷⁷ Li H, Meng X, Liang X, Gao Y, Cai S.

Administration of microparticles from blood of the lipopolysaccharide-treated rats serves to induce pathologic changes of acute respiratory distress syndrome.

Exp Biol Med (Maywood). 2015;240(12):1735-1741. doi:10.1177/1535370215591830
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4935343/>

⁷⁸ Belizaire RM, Prakash PS, Richter JR, et al.

Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation.

J Am Coll Surg. 2012;214(4):648-657. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2011.12.032
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4034387/>

⁷⁹ Margolis L, Sadovsky Y.

The biology of extracellular vesicles: The known unknowns.

PLoS Biol. 2019;17(7):e3000363. doi:10.1371/journal.pbio.3000363
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6667152/>

Microvesicles and Viral Infection

David G. Meckes Jr., Nancy Raab-Traub

Journal of Virology Nov 2011, 85 (24) 12844-12854; DOI: 10.1128/JVI.05853-11
<https://jvi.asm.org/content/85/24/12844>

Ressel S, Rosca A, Gordon K, Buck AH.

Extracellular RNA in viral-host interactions: Thinking outside the cell.

Wiley Interdiscip Rev RNA. 2019;10(4):e1535. doi:10.1002/wrna.1535
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6617787/>

Gulfaraz Khan, Waqar Ahmed and Pretty S. Philip (July 12th 2017).

Exosomes and Their Role in Viral Infections, Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases, Jin Wang, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.69397.

Available from: <https://www.intechopen.com/books/novel-implications-of-exosomes-in-diagnosis-and-treatment-of-cancer-and-infectious-diseases/exosomes-and-their-role-in-viral-infections>

Assil S, Webster B, Dreux M.

Regulation of the Host Antiviral State by Intercellular Communications.

Viruses. 2015;7(8):4707-4733. doi:10.3390/v7082840
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576201/>

Anderson MR, Kashanchi F, Jacobson S.

Exosomes in Viral Disease.

Neurotherapeutics. 2016;13(3):535-546. doi:10.1007/s13311-016-0450-6
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4965413/>

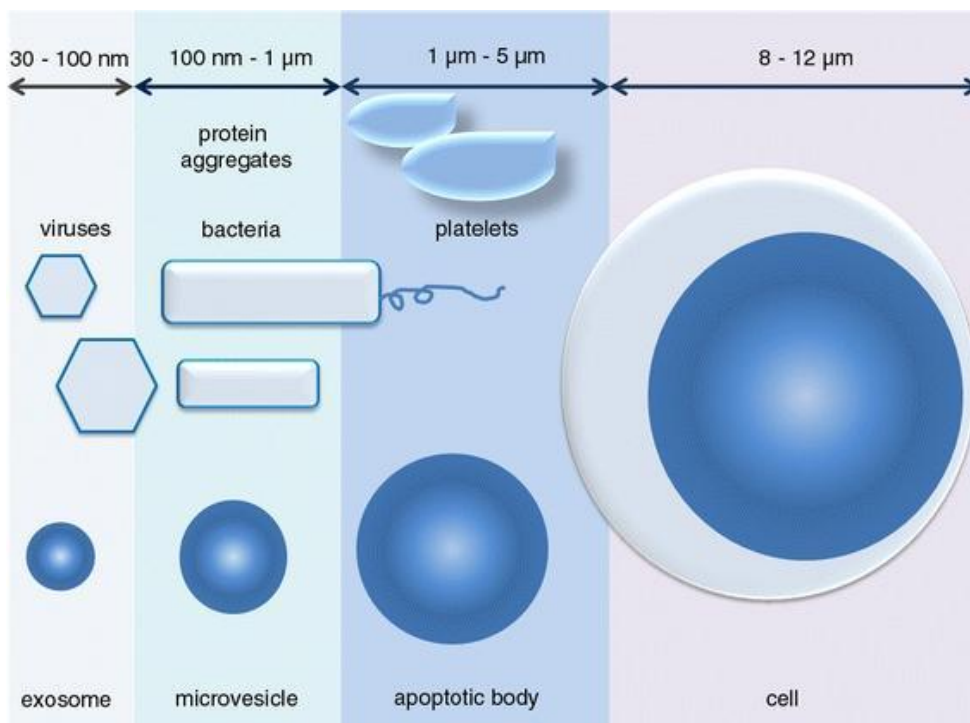
A differenza delle EV, la definizione di virus sviluppata dai virologi del XX secolo era abbastanza precisa: il virus era "un agente infettivo di piccole dimensioni che può moltiplicarsi solo nelle cellule viventi".⁸⁰

Le EV non rientrano in questa definizione, perché nonostante la loro somiglianza con i virus in molti aspetti, sono fondamentalmente diversi, in quanto **non si replicano**.

Tuttavia, la virologia contemporanea ha preso le distanze da questa definizione rigorosa di virus con l'introduzione dei termini di virus non infettivo e difettoso. Pertanto, **le EV generate da cellule infettate da retrovirus che trasportano proteine virali e persino frammenti di genomi virali rientrano essenzialmente nella definizione di virus non infettivi**.

Sulla base delle conoscenze attuali, ci sono molti aspetti in cui le EV assomigliano ai virus, in particolare ai retrovirus.

Innanzitutto, **sebbene alcune EV possano avere dimensioni fino a un micrometro, la maggior parte sono <300 nm, la dimensione di un tipico virus a RNA**.



Wurdinger T, Gatsen NN, Balaj L, Kaur B, Breakefield XO, Pegtel DM.
Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways.
Adv Virol. 2012;2012:767694. doi:10.1155/2012/767694
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410301/>

Alenquer M, Amorim MJ.
Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection.
Viruses. 2015;7(9):5066-5083. doi:10.3390/v7092862
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4584306/>

Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Oshiumi H.
Extracellular Vesicles Deliver Host and Virus RNA and Regulate Innate Immune Response.
Int J Mol Sci. 2017;18(3):666. doi:10.3390/ijms18030666
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372678/pdf/ijms-18-00666.pdf>

⁸⁰ Nolte-'t Hoen E, Cremer T, Gallo RC, Margolis LB.
Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives?
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(33):9155-9161. doi:10.1073/pnas.1605146113
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4995926/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142546/>⁸¹

Intervalli di dimensioni dei principali tipi di vescicole di membrana. Mentre gli esosomi condividono la distribuzione delle dimensioni con i virus, le microvescicole si sovrappongono in termini di dimensioni con i batteri e gli aggregati proteici (ad esempio i complessi immunitari). Sia i corpi apoptotici che le piastre rientrano nella gamma di dimensioni di 1–5 µm

Come i virus con involucro, le EV sono circondate da una membrana lipidica che contiene anche proteine della membrana cellulare.

Come molti virus, le EV:

- **si formano nel sistema endosomiale o sulla membrana plasmatica** attraverso percorsi di biogenesi definiti, ad esempio, coinvolgendo i complessi di smistamento endosomiale necessari per i meccanismi di trasporto (ESCRT)⁸².
- **possono legarsi alle membrane plasmatiche di altre cellule**, penetrarvi tramite fusione o endocitosi e innescare reazioni specifiche nelle cellule riceventi⁴³⁴.
- **trasportano materiale genetico** che può modificare le funzioni delle cellule riceventi⁸³.

Soprattutto nel caso dei retrovirus, le EV generate nelle cellule infettate contengono molecole selezionate di origine virale⁸⁴ e **possono essere simili a virus difettosi non infettivi** che hanno perso la loro capacità di replicarsi, così la differenza tra loro diventa meno definita.

In altri casi, **le EV forniscono un "involucro" ai virus senza involucro**, ad esempio l'epatite A, e questi virus incapsulati con EV possono infettare le cellule⁸⁵.

⁸¹ György B, Szabó TG, Pásztói M, et al.

Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.
Cell Mol Life Sci. 2011;68(16):2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142546/>

Monerah Al Soraj, Salma Bargal and Yunus A. Luqmani (September 14th 2016).

Extracellular Vesicles: A Mechanism to Reverse Metastatic Behaviour as a New Approach to Cancer Therapy, Tumor Metastasis, Ke Xu, IntechOpen, DOI: 10.5772/64391. Available from: <https://www.intechopen.com/books/tumor-metastasis/extracellular-vesicles-a-mechanism-to-reverse-metastatic-behaviour-as-a-new-approach-to-cancer-thera>
<https://www.intechopen.com/books/tumor-metastasis/extracellular-vesicles-a-mechanism-to-reverse-metastatic-behaviour-as-a-new-approach-to-cancer-thera>

⁸² Colombo M, Raposo G, Théry C.

Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.
Annu Rev Cell Dev Biol. 2014;30:255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25288114/>

⁸³ Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al.

Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.
J Extracell Vesicles. 2015;4:27066. Published 2015 May 14. doi:10.3402/jev.v4.27066
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433489/>

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;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486113/>

⁸⁴ Chahar HS, Bao X, Casola A.

Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses.
Viruses. 2015;7(6):3204-3225. Published 2015 Jun 19. doi:10.3390/v7062770
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4488737/>

⁸⁵ Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al.

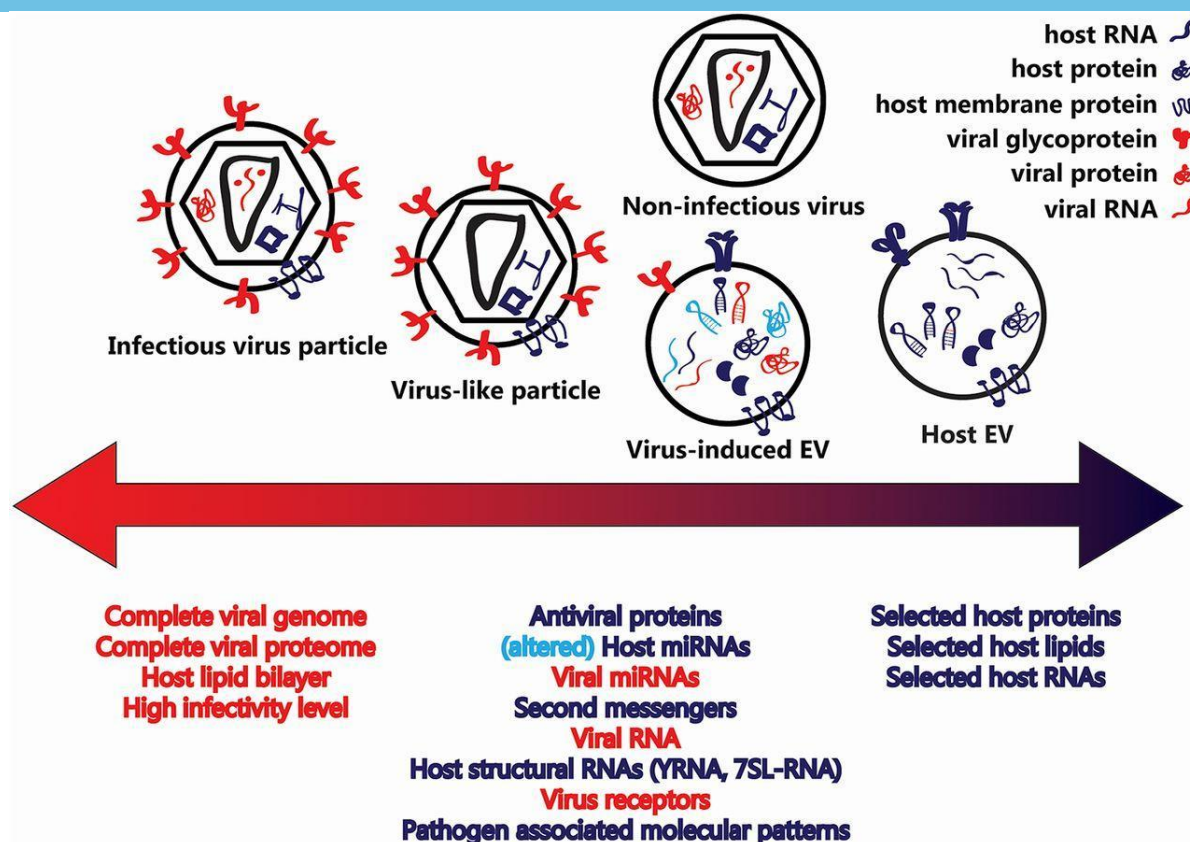
A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes.
Nature. 2013;496(7445):367-371. doi:10.1038/nature12029
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631468/>

Allo stesso modo, le EV rilasciate dalle cellule infettate dall'epatite C **possono trasportare genomi virali integri e funzionali che nelle cellule bersaglio generano nuove particelle virali infettive**⁸⁶.

Ne segue che nelle infezioni da retrovirus viene rilasciata una varietà di diverse vescicole, con ad un estremo le EV costituite interamente da componenti della cellula ospite e dall'altro virus capaci di replicazione. Tra questi estremi ci sono particelle non replicanti che possono essere considerate sia come virus difettosi che come EV contenenti varie quantità di molecole virus-specifiche.

Ovviamente, a differenza dei veri virus, le EV che contengono proteine virali e frammenti di genomi virali **non causano focolai ed epidemie**.

Tuttavia, le EV possono interagire direttamente con i retrovirus o modulare le cellule ospiti, influenzando così l'infezione.

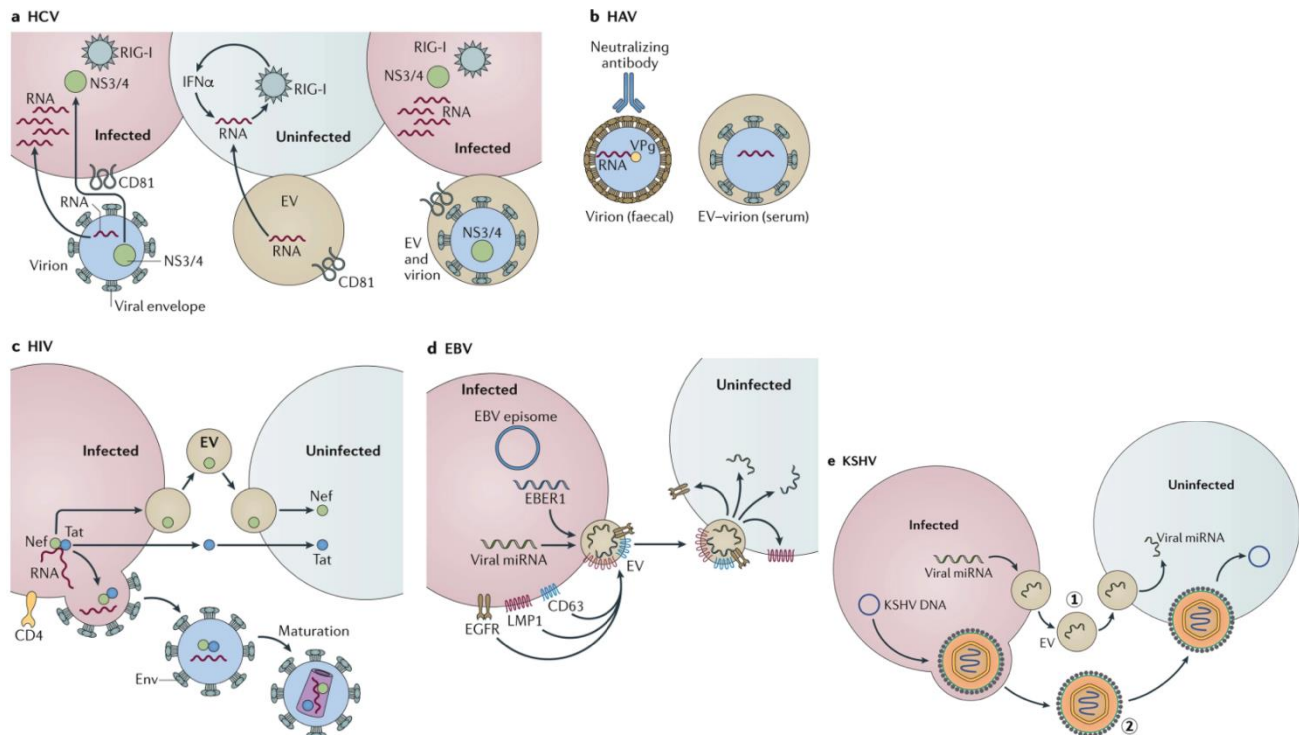


<https://www.pnas.org/content/113/33/9155>

Somiglianze strutturali tra EV e virioni. Le cellule infettate con (retro)virus a RNA con involucro rilasciano vescicole contenenti una varietà di fattori derivati dall'ospite e virali. Ad un estremo, ci sono EV costituite interamente da componenti della cellula ospite (blu), e all'altro estremo ci sono virus infettivi circondati da un doppio strato lipidico derivato dall'ospite e contenenti tutte le molecole specifiche del virus (rosso) necessarie per l'infettività. Nelle cellule infettate da virus, le EV incorporano frammenti del genoma virale e (glico)proteine virali. Inoltre, le infezioni virali modificano l'incorporazione delle proteine ospiti e degli RNA nelle EV (azzurro). Tali EV indotte da infezioni, i cosiddetti virus difettosi e particelle simili a virus, sono entità intermedie e il confine tra loro sembra non esistere.

⁸⁶ Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S, Szabo G.

Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. PLoS Pathog. 2014;10(10):e1004424. Published 2014 Oct 2. doi:10.1371/journal.ppat.1004424
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183590/>



<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.60>⁸⁷

Per ogni virus (virus dell'epatite C (HCV), virus dell'epatite A (HAV), HIV-1, virus Epstein-Barr (EBV) o herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV)), un trasferimento dipendente dal virione e una vescicola extracellulare (EV) vengono mostrate le fasi di trasferimento dipendenti. Solo nel caso di HCV (parte a) e HAV (parte b) sono stati identificati interi virioni all'interno degli EV. Per gli altri virus, negli EV sono stati rilevati singoli RNA o proteine. Durante l'infezione da HIV (parte c), Nef può essere incorporato negli EV e successivamente trasportato a cellule non infette. La proteina solubile dell'HIV Tat può essere trasportata a cellule non infette senza essere incorporata nelle EV. Nel caso dell'EBV (parte d), le proteine cellulari e virali e gli RNA cellulari e virali vengono trasportati dalle EV dalle cellule infette alle cellule non infette. Nel caso di KSHV (parte e), viene mostrato un modello temporale, in base al quale i microRNA virali (miRNA) vengono trasportati dalle EV prima dell'infezione (passaggio 1) e possono quindi innescare la cellula ricevente per l'infezione (passaggio 2). EBER1, RNA 1 codificato dal virus Epstein – Barr; EGFR, recettore del fattore di crescita epidermico; IFN α , interferone- α ; LMP1, proteina di membrana latente 1; NS3 / 4, proteina non strutturale 3/4; RIG-I, proteina gene-I inducibile dall'acido retinoico; VPg, proteina virale legata al genoma.

Le EV e i virus si sovrappongono nella biogenesi

Le prime discussioni sulle relazioni tra EV e virus^{440, 441} erano in gran parte basate sul fatto che sia le EV che i retrovirus utilizzano il meccanismo di vescicolazione cellulare, con sorprendenti somiglianze nella composizione dei lipidi (HDL e glicosfingolipidi) e nel contenuto proteico (tetraspanine, proteine GPI e proteine citoplasmatiche).

Inoltre, è stato ipotizzato che i retrovirus sfruttino percorsi preesistenti per il traffico di vescicole intracellulari (**The Trojan exosome hypothesis**)⁸⁸ e potrebbero essere considerati "esosomi modificati o mutati".

⁸⁷ Raab-Traub N, Dittmer DP.

Viral effects on the content and function of extracellular vesicles.
Nat Rev Microbiol. 2017;15(9):559-572. doi:10.1038/nrmicro.2017.60
<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.60>

⁸⁸ Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE.

The Trojan exosome hypothesis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(19):10592-10597. doi:10.1073/pnas.1831413100
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC196848/>

Badierah RA, Uversky VN, Redwan EM.

Dancing with Trojan horses: an interplay between the extracellular vesicles and viruses
[published online ahead of print, 2020 Apr 30]. J Biomol Struct Dyn. 2020;1-27. doi:10.1080/07391102.2020.1756409
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32351170/>

Altri ricercatori hanno contestato l'idea, perché a differenza dei retrovirus, c'erano poche prove di un ruolo attivo degli EV nella modifica funzionale delle cellule bersaglio attraverso il trasporto di proteine bioattive, lipidi e materiale genetico.⁸⁹

Successivamente, si è scoperto che **le EV contengono materiale genetico, principalmente sotto forma di piccoli RNA**.⁹⁰

Oltre al coinvolgimento di meccanismi molecolari per la selezione di proteine specifiche nelle EV⁹¹, numerosi studi indicano che il contenuto di RNA delle EV non riflette il contenuto di RNA della cellula che produce le EV.

Sebbene alcuni RNA possano diffondersi passivamente negli EV nel corso della loro biogenesi, si è visto che **la selezione attiva di RNA specifici dipende da definite proteine leganti l'RNA**.⁹² Inoltre, è stato riscontrato che miRNA e mRNA associati alle EV sono arricchiti in alcuni motivi di selezione⁹³.

Ulteriori scoperte scientifiche hanno dimostrato che **le proteine, i lipidi e il materiale genetico associati alle EV possono essere trasferiti funzionalmente alle cellule bersaglio**^{443, 94}, il che implica che EV e (retro)virus hanno

⁸⁹ Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M.
Endosomes, exosomes and Trojan viruses.
Trends Microbiol. 2004;12(7):310-316. doi:10.1016/j.tim.2004.05.004
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15223058/>

⁹⁰ 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;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486113/>

Nolte-t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, 't Hoen PA.
Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions.
Nucleic Acids Res. 2012;40(18):9272-9285. doi:10.1093/nar/gks658
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467056/>

Vojtech L, Woo S, Hughes S, et al.
Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions.
Nucleic Acids Res. 2014;42(11):7290-7304. doi:10.1093/nar/gku347
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066774/>

⁹¹ Raposo G, Stoorvogel W.
Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.
J Cell Biol. 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3575529/>

⁹² Villarroja-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al.
Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs.
Nat Commun. 2013;4:2980. doi:10.1038/ncomms3980
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3905700/>

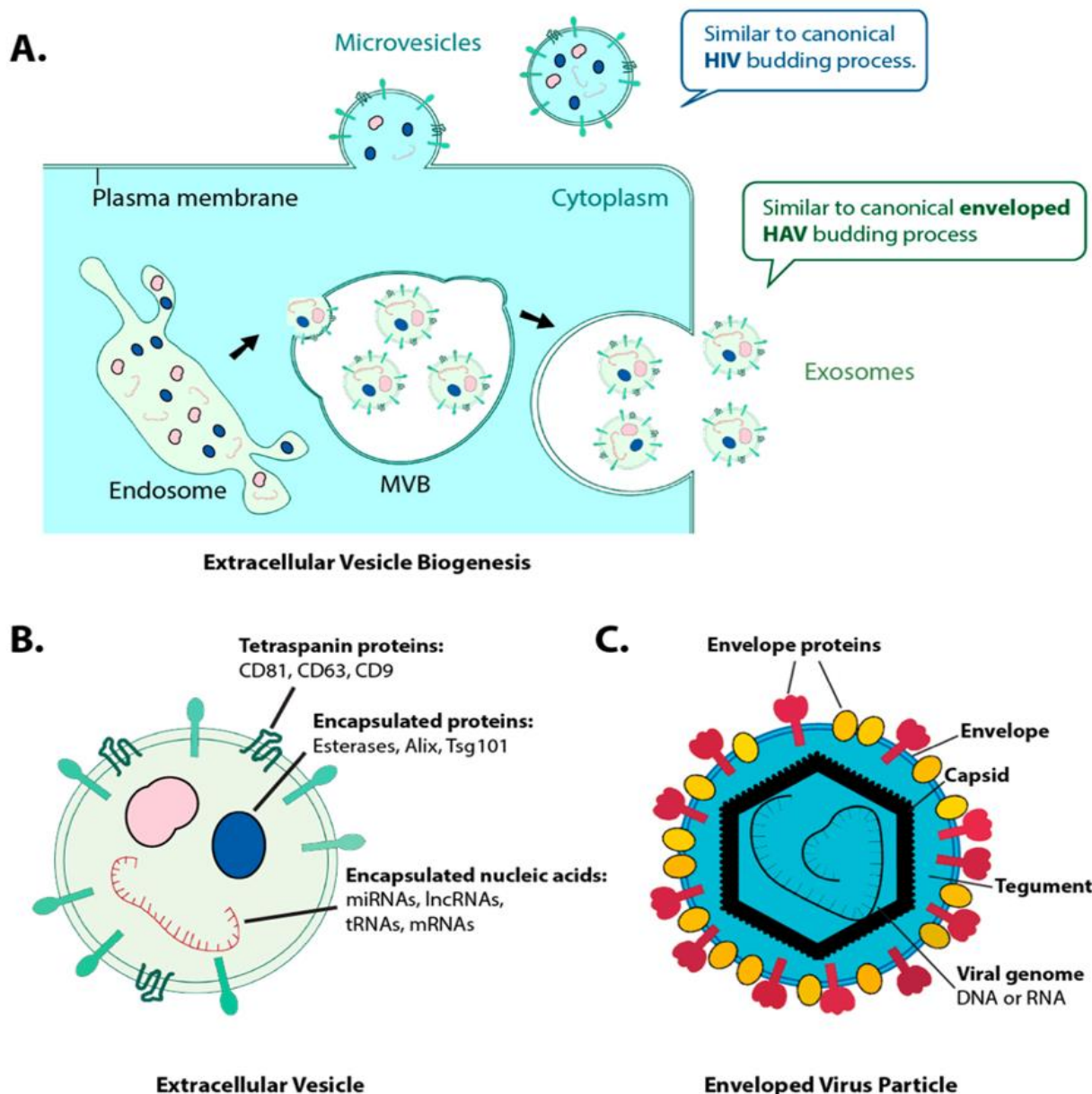
⁹³ Batagov AO, Kurochkin IV.
Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions.
Biol Direct. 2013;8:12. Published 2013 Jun 7. doi:10.1186/1745-6150-8-12
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732077/>

⁹⁴ Robbins PD, Morelli AE.
Regulation of immune responses by extracellular vesicles.
Nat Rev Immunol. 2014;14(3):195-208. doi:10.1038/nri3622
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4350779/>

Kowal J, Tkach M, Théry C.
Biogenesis and secretion of exosomes.
Curr Opin Cell Biol. 2014;29:116-125. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
<https://www.hal.inserm.fr/inserm-02452742/document>

Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G.
Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad.
Curr Opin Cell Biol. 2015;35:69-77. doi:10.1016/j.ceb.2015.04.013
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26001269/>

in comune non solo aspetti strutturali ma anche funzionali, a causa della somiglianza nella biogenesi di EV e virus.⁹⁵



<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/9/917/htm>⁹⁶

Le vescicole extracellulari (EV) e le particelle virali condividono un processo e una composizione di gemmazione vescicolare simili, comprese proteine, acidi nucleici e lipidi. **(A)** Microvescicole germogliano sulla membrana plasmatica, in modo simile al processo di germogliamento canonico dei virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Gli esosomi provengono dal germogliamento verso l'interno dell'endosoma tardivo nel corpo multivesicolare (MVB) e successivamente dal rilascio sulla membrana plasmatica, simile al processo di germogliamento del virus dell'epatite A con involucro canonico (HAV). **(B)** Le vescicole extracellulari possono trasportare fattori come tetraspanine, esterasi, Alix e Tsg101. Gli acidi nucleici racchiusi sono protetti dalle nucleasi. **(C)** Una particella virale è costituita da un involucro, capside, tegumento e genoma virale.

⁹⁵ Gill S, Catchpole R, Forterre P.

Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond.

FEMS Microbiol Rev. 2019;43(3):273-303. doi:10.1093/femsre/fuy042

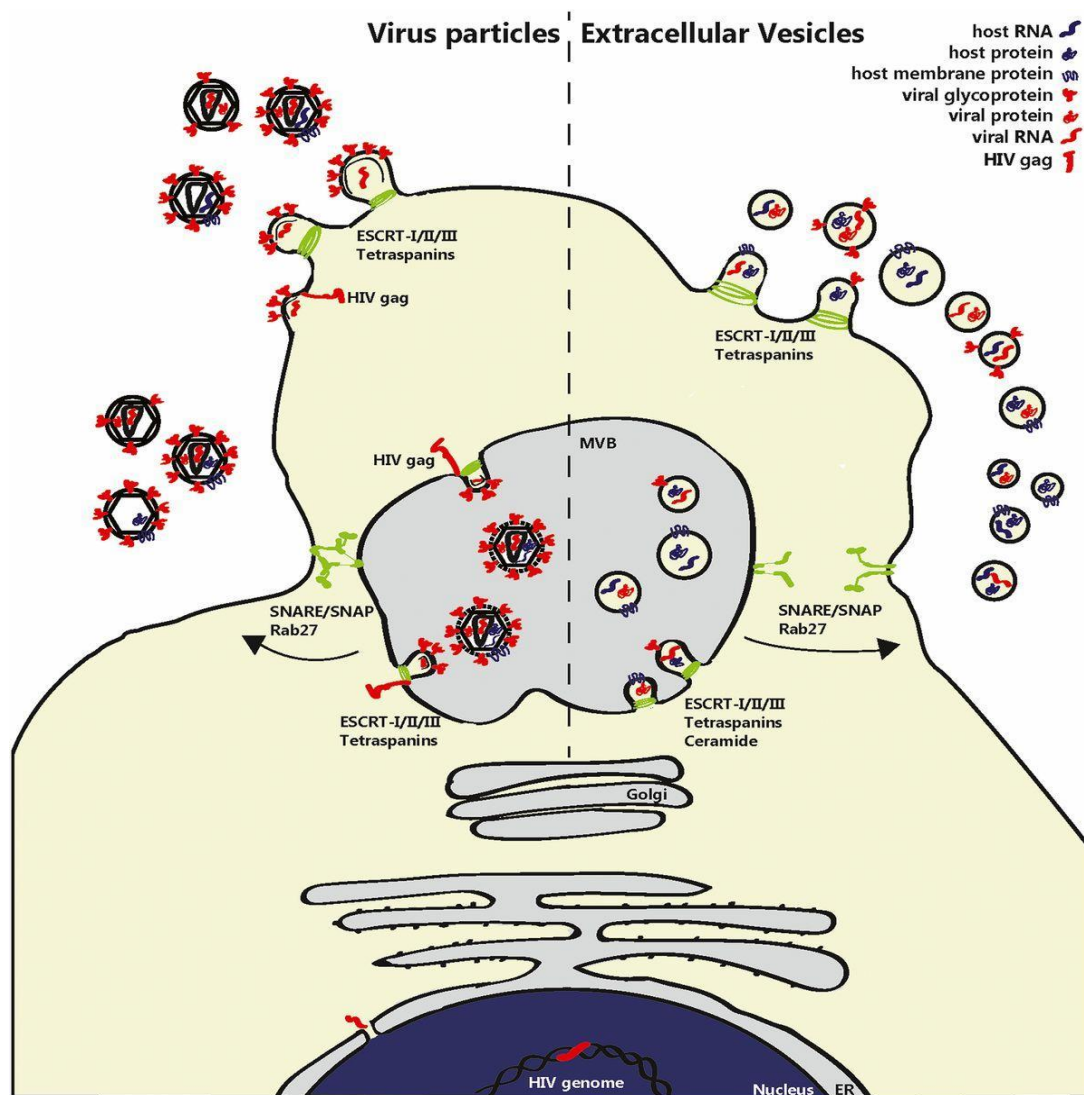
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6524685/>

⁹⁶ Zhou Y, McNamara RP, Dittmer DP.

Purification Methods and the Presence of RNA in Virus Particles and Extracellular Vesicles.

Viruses. 2020;12(9):E917. Published 2020 Aug 21. doi:10.3390/v12090917

<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/9/917/htm>



<https://www.pnas.org/content/113/33/9155>

Somiglianze tra la biogenesi delle EV e i virioni. Le EV e le particelle di retrovirus con involucro (ad esempio, l'HIV) vengono rilasciate simultaneamente dalle cellule infette e condividono i percorsi per la biogenesi sulla membrana plasmatica o sui corpi multivesiccolari (MVB). Ad esempio, le proteine del complesso ESCRT e le tetraspanine sono coinvolte sia nella formazione di virioni che di EV. L'RNA virale (rosso) entra nel citoplasma, dopodiché avviene l'assemblaggio del virione mediato da Gag nell'MVB o sulla membrana plasmatica. MVB può contenere sia virioni che EV e vengono rilasciati dalla cellula dopo la fusione dell'MVB con la membrana plasmatica attraverso l'azione delle proteine Rab, SNARE e SNAP. Si formano anche virus difettosi, ma non infettivi a causa della mancanza di componenti virali essenziali. Mentre specifiche proteine ospiti e RNA (blu), come CD63 e APOBEC3G, possono essere incorporati nei virioni, i componenti virali (rossi) sono anche incorporati nella pletora di tipi di EV rilasciati dalle cellule. Questi includono frammenti del genoma virale, miRNA virali e (glico)proteine virali, come Nef e Gag. Questo intreccio dei loro percorsi per la biogenesi offusca la distinzione tra virioni ed EV.

Strategie di entrata delle particelle virali ed esosomi

La **via endocitica** è la principale via di ingresso cellulare per grandi carichi e agenti patogeni.

Tra l'ampia varietà di strutture lipidiche specializzate all'interno degli endosomi, le vescicole intraluminali formate negli endosomi precoci e trasferite ai compartimenti endosomiali tardivi stanno emergendo come effettori critici dell'infezione virale e del riconoscimento immunitario.

Vari virus trasportano i loro genomi in queste vescicole intraluminali, che fungono da veicoli per trasportare il genoma alla periferia nucleare per la replicazione.

Quando secrete come esosomi, le vescicole intraluminali contenenti genomi virali possono infettare cellule permissive o attivare risposte immunitarie nelle cellule mieloidi.⁹⁷

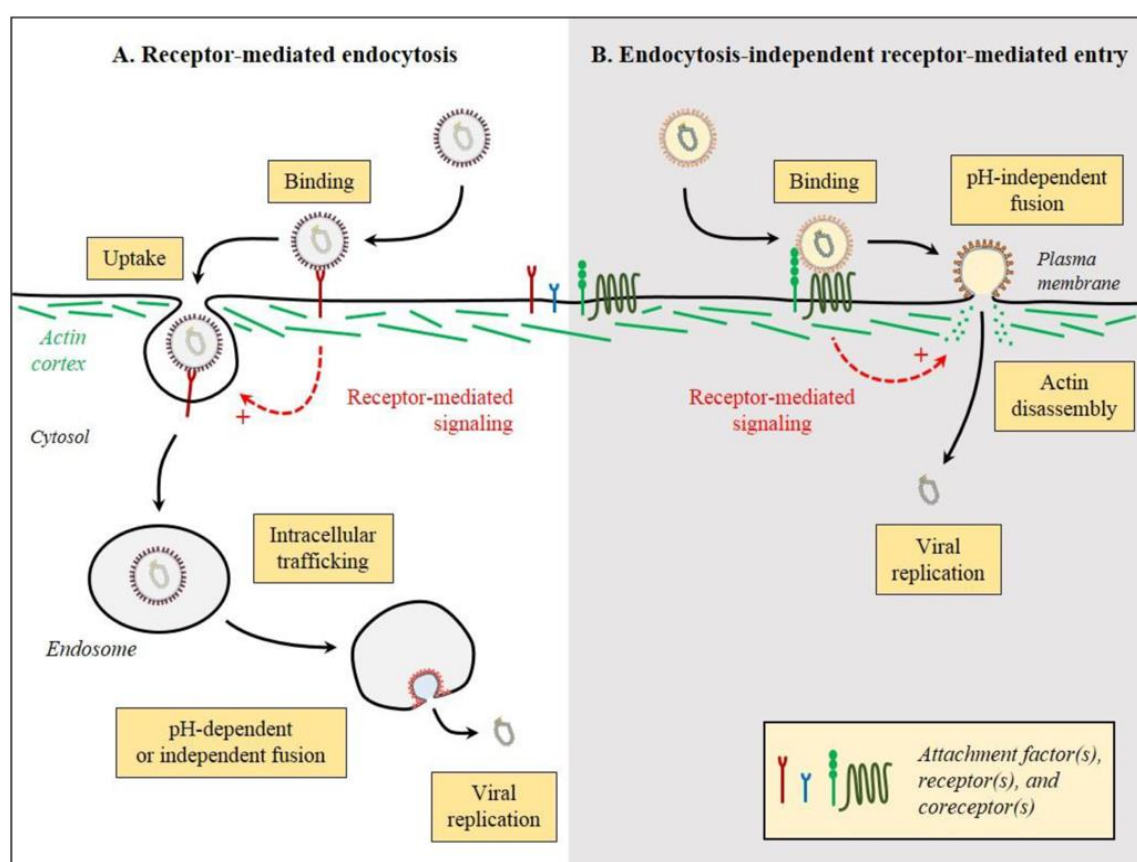
⁹⁷ Nour AM, Modis Y.

Ingresso del virus attraverso la via endocitica

Per poter infettare le cellule e replicarsi, i virus devono avere accesso all'ambiente intracellulare. Questo primissimo passaggio dipende strettamente dai recettori cellulari esposti in superficie a cui si legano le particelle virali.

I virus possono utilizzare essenzialmente due diverse strategie per entrare nell'ospite. La prima, nel classico modello di **endocitosi virale**, prevede che in seguito al legame a uno o più recettori cellulari, le particelle virali vengano fisicamente assorbite dall'apparato cellulare endocitico in un processo denominato **endocitosi mediata dal recettore**.

In una seconda strategia, il legame del virus ai recettori cellulari porta alla penetrazione diretta delle particelle virali dalla membrana plasmatica, bypassando il meccanismo endocitico. Questo processo è indicato come **ingresso mediato dal recettore indipendente dall'endocitosi**⁹⁸



<https://www.mdpi.com/1999-4915/7/6/2747/htm>

Strategie di ingresso dei virus. Per accedere al citoplasma delle cellule ospiti, i virus possono impiegare due strategie principali, ovvero **(A)** attraverso l'endocitosi e uscita dalle vescicole endosomiali in un processo denominato **endocitosi mediata dal recettore** o **(B)** mediante penetrazione diretta dalla membrana plasmatica, indicato come **ingresso mediato dal recettore indipendente dall'endocitosi**. Vengono mostrati i virus con involucro; tuttavia i virus senza involucro hanno sviluppato strategie simili. Queste sono solo generalizzazioni e ci sono eccezioni a queste regole. Le frecce nere rappresentano la sequenza di eventi e le frecce rosse tratteggiate la potenziale segnalazione indotta.

Endosomal vesicles as vehicles for viral genomes.
Trends Cell Biol. 2014;24(8):449-454. doi:10.1016/j.tcb.2014.03.006
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112135/>

⁹⁸ Boulant S, Stanifer M, Lozach PY.
Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding, signaling, and endocytosis.
Viruses. 2015;7(6):2794-2815. Published 2015 Jun 2. doi:10.3390/v7062747
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4488714/>

L'**endocitosi** è il meccanismo per l'internalizzazione di molecole di tutte le dimensioni, componenti della membrana plasmatica e nanoparticelle mediante invaginazione della membrana plasmatica e formazione di vescicole attraverso la fissione della membrana.

L'**endocitosi mediata dalla clatrina** è la via principale per il germogliamento delle vescicole dalla membrana plasmatica, ma anche diverse vie indipendenti dalla clatrina contribuiscono all'endocitosi, inclusa la **via dipendente dalla caveolina**.

Le vescicole endocitiche si fondono con gli endosomi precoci (EE) nel citoplasma periferico, principale stazione di smistamento nel percorso endocitico. Man mano che si accumulano i carichi extracellulari nelle vescicole endocitiche, alcune proteine e componenti della membrana vengono riciclati nel plasma, mentre altri vengono trasferiti all'apparato del Golgi, tuttavia, la maggior parte del carico viene trattenuta all'interno degli EE.

Le **vescicole intraluminali (ILV)** germogliano dalla membrana endosomiale, a partire dalle EE, anche se resta da chiarire il momento in cui iniziano a formarsi le ILV. Gli EE e le ILV vengono trasportati verso il nucleo attraverso i microtubuli (MT). Durante questo periodo, gli EE maturano in endosomi tardivi (LE).

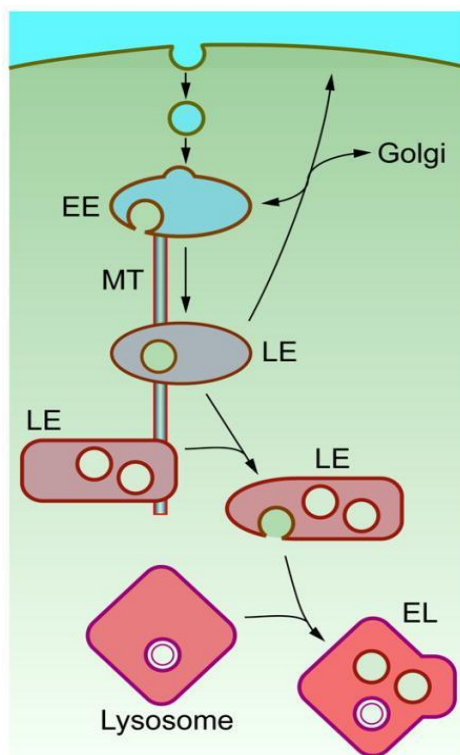
La maturazione degli LE comporta cambiamenti nella composizione lipidica e proteica e nel pH del lume.

Inoltre, le vescicole germogliano dalla membrana esterna (limitante) dell'endosoma in maturazione per formare le ILV. Man mano che la maturazione procede, le LE subiscono una fusione omotipica, crescono di dimensioni, acquisiscono più ILV e ricevono componenti di nuova sintesi dalla via secretoria.

Alcune ILV possono essere secrete sulla superficie cellulare attraverso la scissione di un frammento degli LE e la successiva fusione del frammento con la membrana plasmatica. La fusione di un LE con un lisosoma genera un organello ibrido transitorio, l'endolisosoma (EL), in cui avviene la degradazione attiva.

Gli endolisosomi maturano quindi in lisosomi, organelli di stoccaggio per idrolasi e componenti della membrana.

Le proteine della famiglia Rab delle GTPasi definiscono molti degli attributi funzionali degli endosomi regolando le attività biologiche delle proteine effettrici, che includono il meccanismo ESCRT responsabile del germogliamento e dello smistamento degli endosomi e degli ILV.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112135/>

I requisiti chimico-fisici della fusione della membrana che dirigono alcuni virus nelle ILV

Le membrane endosomiche precoci e tardive e l'ampia varietà di strutture contenute sono costituite da composizioni lipidiche distinte.⁹⁹

Gli endosomi precoci, come la membrana plasmatica da cui provengono, sono ricchi di colesterolo, fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositioli¹⁰⁰.

Le sottostrutture lipidiche che hanno origine dagli endosomi precoci, inclusi invaginazioni, tubuli e ILV, hanno inizialmente la stessa composizione lipidica (i lipidi possono successivamente essere sottoposti a smistamento).

Man mano che le membrane progrediscono lungo la via endocitica, il loro contenuto di colesterolo diminuisce. Il colesterolo è sostituito dalla ceramide negli endosomi tardivi e nei lisosomi, dove mantiene la fluidità della membrana.¹⁰¹

Il BMP (bis-monoacilglicerofosfato) lipidico anionico, resistente agli acidi (noto anche come acido lisobisfosfatidico o LBPA) è arricchito nelle membrane interne degli endosomi tardivi e dei lisosomi compresi gli ILV da essi derivati, ma non negli ILV trasportati dagli endosomi precoci.⁴⁵⁸

Quindi gli ILV derivati da endosomi precoci o tardivi formano pool distinti. Il BMP aumenta la fusogenicità delle membrane delle vescicole a pH <6 e induce la vescicolazione interna in liposomi * simili agli endosomi multivesicolari trovati in vivo.¹⁰²

⁹⁹ Falguières T, Luyet PP, Gruenberg J.

Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics.

Exp Cell Res. 2009;315(9):1567-1573. doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.006

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19133258/>

Huotari J, Helenius A.

Endosome maturation.

EMBO J. 2011;30(17):3481-3500. Published 2011 Aug 31. doi:10.1038/emboj.2011.286

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181477/>

McMahon HT, Boucrot E.

Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(8):517-533. Published 2011 Jul 22. doi:10.1038/nrm3151

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21779028/>

Gruenberg J, Stenmark H.

The biogenesis of multivesicular endosomes.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(4):317-323. doi:10.1038/nrm1360

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15071556/>

¹⁰⁰ Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J.

A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function.

Nature. 1998;392(6672):193-197. doi:10.1038/32440

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9515966/>

Möbius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, et al.

Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway.

Traffic. 2003;4(4):222-231. doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00072.x

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1034/j.1600-0854.2003.00072.x>

Leventis PA, Grinstein S.

The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes.

Annu Rev Biophys. 2010;39:407-427. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131234

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20192774/>

¹⁰¹ Kolter T, Sandhoff K.

Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids.

Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:81-103. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120013

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16212488/>

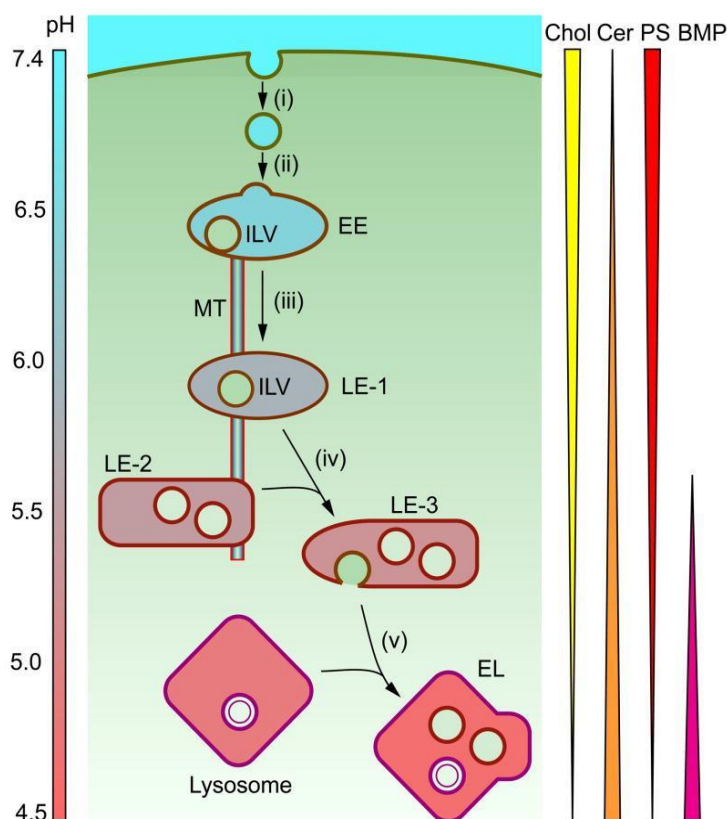
¹⁰² Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, et al.

Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization.

Gli autoanticorpi contro il BMP provocano malattie autoimmuni come la sindrome da antifosfolipidi e la sindrome di Niemann-Pick di tipo C.

Gli anticorpi anti-BMP causano una disfunzione nell'ordinamento e nel traffico degli endosomi tardivi,¹⁰³ suggerendo un ruolo critico per il BMP nella funzione e nella dinamica degli endosomi tardivi.

*** Liposomi:** sono vescicole di sintesi, cave o contenenti una soluzione acquosa, delimitate da uno strato singolo o doppio di fosfolipidi. Le dimensioni dei liposomi sono comprese tra i 50 nm e 2.5 micron



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112135/>

La composizione lipidica delle membrane limitanti e interne dei compartimenti nella via endocitica. (i) Le vescicole endocitiche intraluminali (ILV) germogliano verso l'interno dalla membrana plasmatica, (ii) si fondono con gli endosomi precoci (EE), che vengono trasportati lungo i microtubuli (MT), (iii), mentre maturano in endosomi tardivi (LE). (iv) Gli endosomi tardivi si fondono tra loro e (v) con i lisosomi per produrre endolisosomi (EL). Il colesterolo (Chol) diminuisce di concentrazione nella via endocitica, specialmente nelle membrane endosomiali limitanti, ed è sostituito dalla ceramide (Cer), presente anche nei microdomini della membrana plasmatica. La fosfatidilserina (PS) è presente principalmente nei lembi citoplasmatici del plasma e nelle membrane EE. Il bis (monoacilglicerico) fosfato (BMP) è specifico per le membrane interne dei compartimenti endosomiali tardivi. Le distinte composizioni lipidiche delle diverse membrane endosomiali dirigono il traffico intracellulare e l'ingresso del virus.

Science. 2004;303(5657):531-534. doi:10.1126/science.1092425
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14739459/>

Kobayashi T, Beuchat MH, Chevallier J, et al.
Separation and characterization of late endosomal membrane domains.
J Biol Chem. 2002;277(35):32157-32164. doi:10.1074/jbc.M202838200
<https://www.jbc.org/content/277/35/32157.long>

¹⁰³ Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, et al.
Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport.
Nat Cell Biol. 1999;1(2):113-118. doi:10.1038/10084
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10559883/>

Asherson RA, Khamashta MA, Gil A, et al.
Cerebrovascular disease and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus, lupus-like disease, and the primary antiphospholipid syndrome.
Am J Med. 1989;86(4):391-399. doi:10.1016/0002-9343(89)90335-5
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2494884/>

Prove recenti suggeriscono che queste mutevoli composizioni lipidiche negli endosomi, combinate con la soglia di fusione del pH, possono dirigere l'ingresso del virus in punti specifici lungo la via endocitica.

ILV: trasportatori di genomi virali alla periferia nucleare

Gli endosomi precoci, contenenti ILV, viaggiano lungo i microtubuli fino alla regione perinucleare, dove si fondono con le membrane endosomiali tardive, trasportando gli ILV nel lume endosomiale tardivo ¹⁰⁴.

I nucleocapsidi virali contenuti negli ILV endosomiali seguono lo stesso percorso. Le proteine ESCRT negli endosomi tardivi mediano la retro-fusione dell'ILV alla membrana limitante ¹⁰⁵, ma la localizzazione citosolica delle proteine ESCRT implica che il loro effetto sulla retro-fusione possa essere indiretto.

La retro-fusione consente il riciclaggio di vari componenti cellulari tra cui il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II), i recettori del mannosio-6-fosfato e le proteine tetraspanniche, tutti arricchiti in ILV.

Si ritiene che raggiungere la regione perinucleare sia vantaggioso per quei virus a DNA con involucro che devono replicare il loro genoma nel nucleo come gli herpesvirus ¹⁰⁶ e per i virus a RNA con involucro che assemblano i loro complessi di replicazione in organelli perinucleari come il reticolo endoplasmatico (ER) o compartimenti derivati dall'ER, come nel caso dei flavivirus ¹⁰⁷ e dell'HCV ¹⁰⁸.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112135/>

Vie di entrata e uscita dalle cellule di virus con involucro che coinvolgono vescicole endosomiali intraluminali (ILV). Gli ILV si formano negli endosomi precoci, che vengono poi trasportati lungo i microtubuli agli endosomi tardivi con i quali si fondono. Alcuni endosomi vengono riciclati sulla superficie cellulare, rilasciando qualsiasi ILV che contengono nell'ambiente extracellulare come "esosomi". Vari virus a RNA con involucro rilasciano i loro nucleocapsidi (gialli) negli ILV, i quali possono rilasciare i nucleocapsidi nel citoplasma perinucleare o trasmettere i nucleocapsidi a un'altra cellula tramite esocitosi. L'ingresso e l'uscita del virus ILV-dipendente dipende da diversi eventi di fissione e fusione della membrana: (i) gemmazione e fissione di una vescicola endocitica dalla membrana plasmatica seguita dalla fusione della vescicola con un endosoma precoce; (ii) fusione delle membrane ILV virali ed endosomiali; (iii) germogliamento e fissione di un ILV dalla membrana endosomiale precoce e (iv) successiva retro-fusione dell'ILV alla membrana endosomiale tardiva limitante; (v) fusione di un endosoma alla membrana plasmatica per secernere ILV come esosomi.

¹⁰⁴ Huotari J, Helenius A.

Endosome maturation.

EMBO J. 2011;30(17):3481-3500. Published 2011 Aug 31. doi:10.1038/emboj.2011.286

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181477/>

¹⁰⁵ Falguières T, Luyet PP, Gruenberg J.

Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics.

Exp Cell Res. 2009;315(9):1567-1573. doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.006

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19133258/>

Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, et al.

Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids.

Nat Cell Biol. 2005;7(7):653-664. doi:10.1038/ncb1269

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360589/>

¹⁰⁶ Krummenacher C, Carfi A, Eisenberg RJ, Cohen GH.

Entry of herpesviruses into cells: the enigma variations.

Adv Exp Med Biol. 2013;790:178-195. doi:10.1007/978-1-4614-7651-1_10

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112135/>

¹⁰⁷ Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM.

The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex.

J Virol. 2010;84(20):10438-10447. doi:10.1128/JVI.00986-10

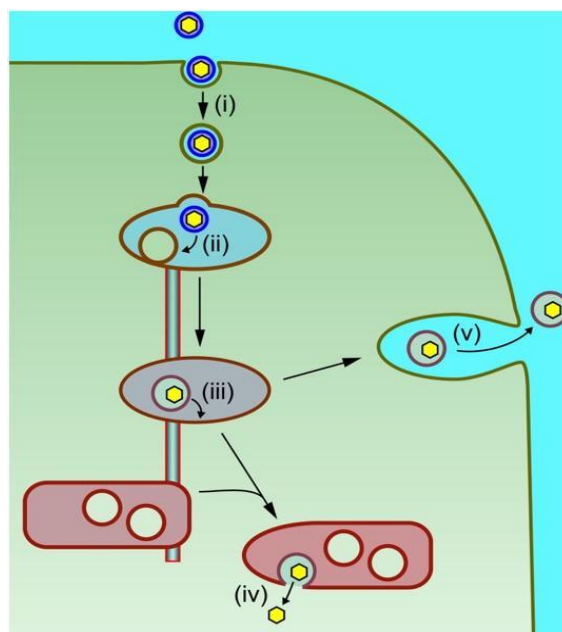
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950591/>

¹⁰⁸ Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, et al. T

Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication.

PLoS Pathog. 2012;8(12):e1003056. doi:10.1371/journal.ppat.1003056

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516559/>



ILV come esosomi: un'altra via per l'infezione

Oltre a servire come veicoli di trasporto verso la periferia nucleare, prove recenti suggeriscono che gli ILV forniscono un percorso per la trasmissione da cellula a cellula.

Quando gli endosomi tardivi maturano, si fondono principalmente con i compartimenti lisosomiali, tuttavia una frazione degli endosomi tardivi può essere indotta a fondersi con la membrana plasmatica rilasciando ILV endosomiali nell'ambiente extracellulare noti, come già visto, come esosomi.

Al rilascio nel flusso sanguigno, nel sistema linfatico o nella sinapsi neurale, gli esosomi possono essere endocitati da un'altra cellula. Se gli esosomi subiscono una retro-fusione con una membrana endosomiale tardiva, il loro carico può fornire importanti segnali alla cellula sullo stato delle cellule circostanti.¹⁰⁹

Sebbene gli esosomi di solito contengano citoplasma dalla cellula da cui hanno avuto origine, VSV e flavivirus possono rilasciare i loro genomi direttamente negli ILV endosomiali¹¹⁰.

Se tali ILV sono secreti come esosomi e quindi entrano nel percorso endocitico di una cellula diversa, il nucleocapside virale all'interno delle vescicole potrebbe, in linea di principio, essere rilasciato nel citoplasma di una cellula ricevente permissiva all'infezione fornendo così un **meccanismo per la trasmissione intercellulare dell'infezione virale**.

In effetti, proprio un tale meccanismo è stato recentemente segnalato per l'HCV. Gli esosomi isolati da cellule di epatoma umano infettato da HCV hanno dimostrato di contenere RNA virale a lunghezza intera, insieme a proteine del nucleo e dell'involucro¹¹¹, ed erano in grado di infettare cellule naïve.

¹⁰⁹ Simons M, Raposo G.

Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication.
Curr Opin Cell Biol. 2009;21(4):575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19442504/>

¹¹⁰ Nour AM, Li Y, Wolenski J, Modis Y.

Viral membrane fusion and nucleocapsid delivery into the cytoplasm are distinct events in some flaviviruses.
PLoS Pathog. 2013;9(9):e1003585. doi:10.1371/journal.ppat.1003585
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3764215/>

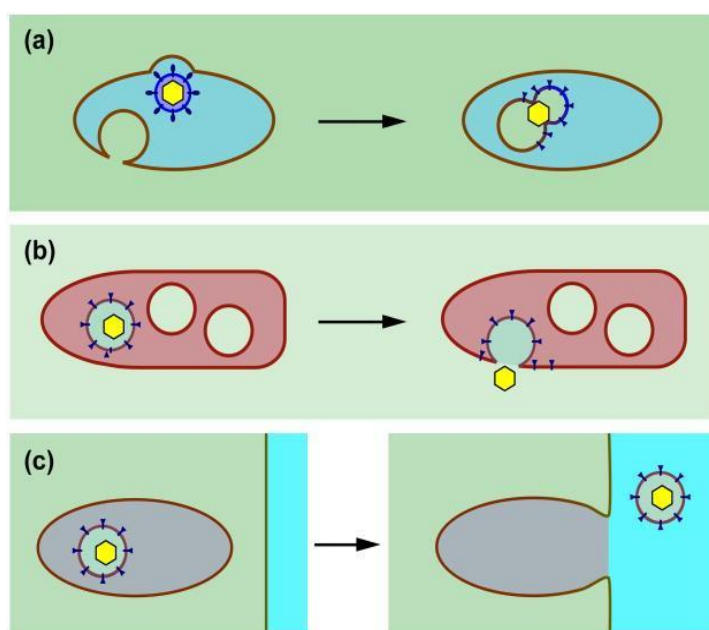
¹¹¹ Tamai K, Shiina M, Tanaka N, et al.

Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway.
Virology. 2012;422(2):377-385. doi:10.1016/j.virol.2011.11.009
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138215/>

In particolare, gli esosomi contenenti RNA dell'HCV erano parzialmente resistenti alla neutralizzazione degli anticorpi, suggerendo che l'HCV potrebbe utilizzare la trasmissione tramite esosomi come **meccanismo di evasione immunitaria**.¹¹²

In questo caso la componente ESCRT-0 Hrs è fondamentale per il rilascio del nucleocapside dell'HCV attraverso gli esosomi. La deplezione di Hrs non solo riduce la produzione di esosomi, ma inibisce anche la replicazione dell'HCV e la trasmissione da cellula a cellula, suggerendo che **gli esosomi sono una via principale per la trasmissione dell'HCV**.

E' possibile quindi affermare che la trasmissione da cellula a cellula di agenti microbici incapsulati in esosomi può essere un meccanismo generale e importante di patogenesi che si verifica in una certa misura con tutti i virus che rilasciano i loro nucleocapsidi negli ILV endosomiali.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112135/>

Eventi chiave nella fusione delle membrane nel trasporto di componenti virali da parte di vescicole endosomiali intraluminali (ILV). (a) Fusione di membrana Virus-ILV. Il nucleocapside virale (giallo) viene rilasciato all'interno dell'ILV. Le glicoproteine virali vengono rilasciate nella membrana ILV, con gli ectodomini glicosilati rivolti verso il lume dell'endosoma. Questo evento di fusione è catalizzato da un cambiamento conformazionale nella proteina dell'involucro virale (blu scuro). (b) Retro-fusione di ILVs della membrana endosomica tardiva limitante. L'evento di fusione trasporta il contenuto di ILV e il nucleocapside virale nel citoplasma. Fosfolipidi specifici ed effettori cellulari sono necessari per la retro-fusione. (c) Fusione esocitica dell'endosoma alla membrana plasmatica. Qualsiasi ILV all'interno del compartimento endosomiale viene rilasciato nell'ambiente extracellulare dopo la fusione. Gli esosomi rilasciati in questo modo possono infettare cellule adiacenti o distanti oppure possono essere trasmessi a una cellula dendritica o a un linfocita T tramite una sinapsi immunologica.

Di seguito si riportano altre due figure che dettagliano ulteriormente il meccanismo di formazione delle vescicole extracellulari che incorporano RNA (anche virale) e il loro ingresso nelle cellule circostanti ¹¹³

¹¹² Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, et al.

Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(32):13109-13113. doi:10.1073/pnas.1221899110

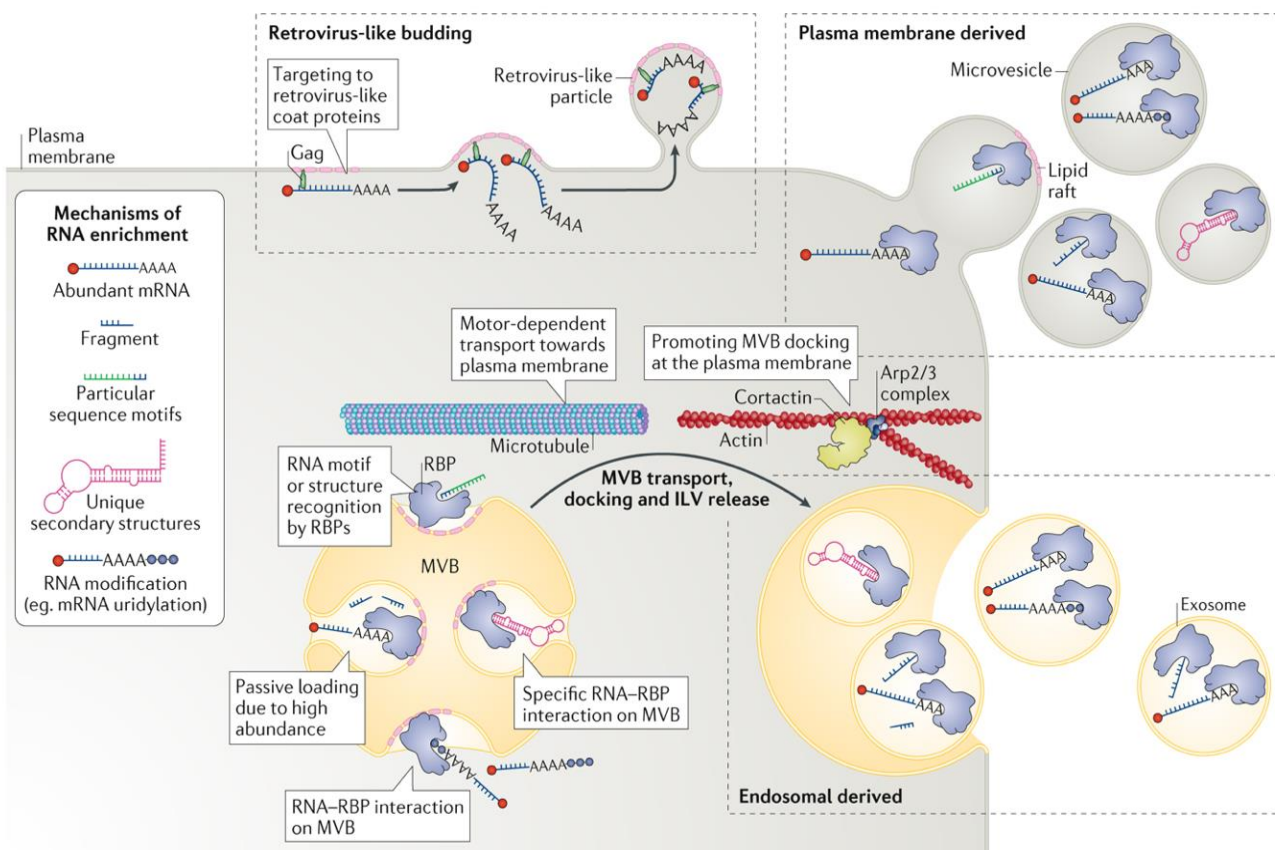
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3740869/>

¹¹³ O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO.

RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications

[published online ahead of print, 2020 May 26]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;1-22. doi:10.1038/s41580-020-0251-y

<https://www.nature.com/articles/s41580-020-0251-y.pdf>



<https://www.nature.com/articles/s41580-020-0251-y.pdf>

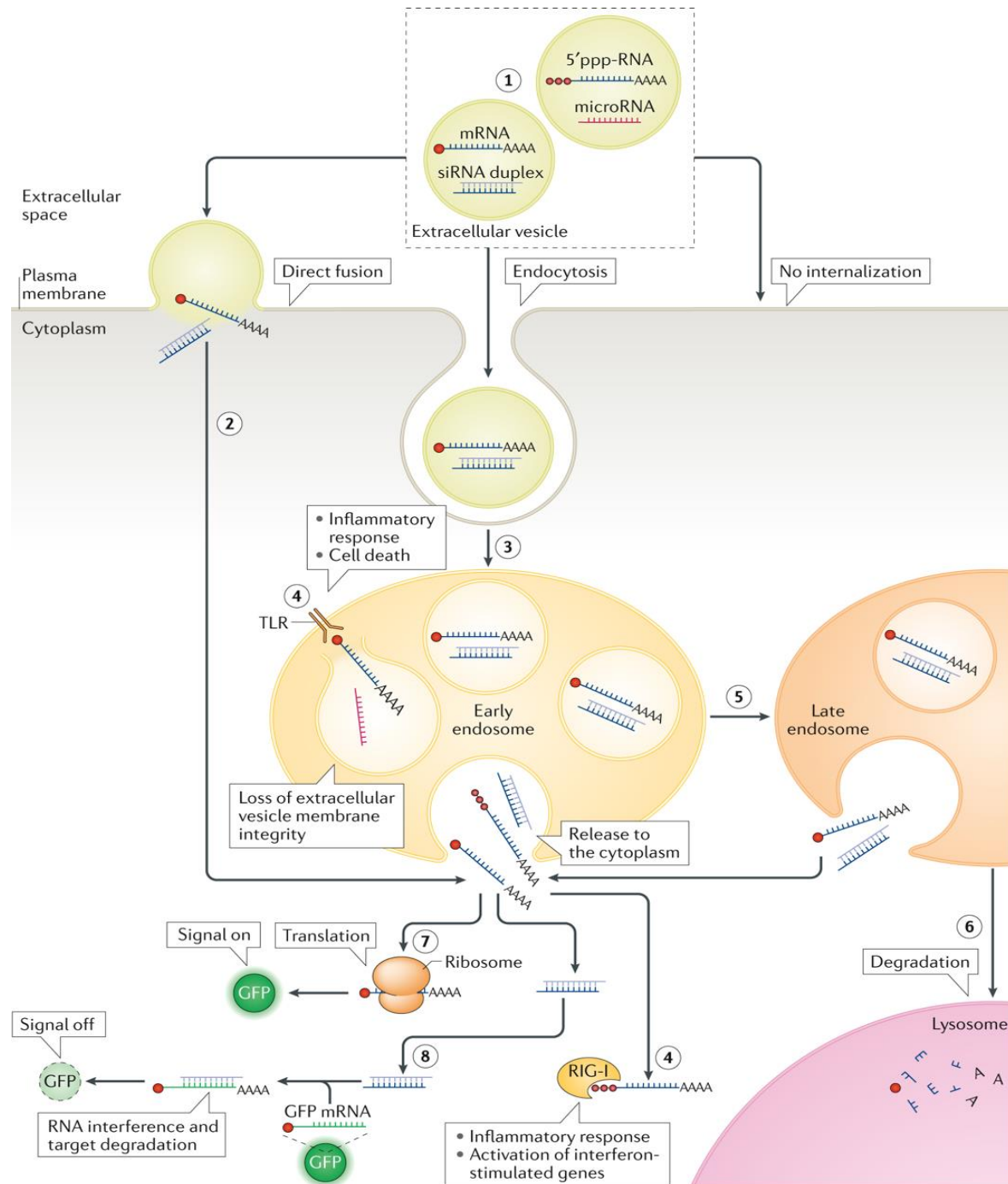
Incorporazione dell'RNA in vescicole extracellulari e loro rilascio nello spazio extracellulare.

Una varietà di diverse specie di RNA può essere incorporata in vescicole extracellulari. Sono state proposte numerose modalità per l'incorporazione di RNA (specifici) nelle vescicole extracellulari. In primo luogo, gli RNA possono essere ancorati alla membrana plasmatica e rilasciati come microvescicole. Possono anche essere ancorati al compartimento endosomiale e incorporati nelle vescicole intraluminali (ILV) del corpo multivesicolare (MVB), che quindi possono essere ancorati alla membrana plasmatica, dove si fonde per rilasciare ILV come esosomi. Entrambe queste modalità di biogenesi condividono molti fattori, e quindi il tipo di vescicola e l'origine della vescicola sono in genere difficili da accertare e controllare. I microdomini di membrana (lipid rafts) sono stati fortemente associati al rilascio di vescicole extracellulari. Inoltre, i componenti citoscheletrici sono implicati nella biogenesi delle vescicole extracellulari, in particolare per gli esosomi, che vengono trasportati tramite microtubuli, e il loro aggancio alla membrana plasmatica è supportato da filamenti di actina ramificata generati da Arp2 / 3 stabilizzati dall'attività di raggruppamento di actina della cortactina. Il rimodellamento dell'actina corticale è anche un evento importante nella formazione della membrana durante il rilascio di microvescicole (non mostrato). Il caricamento dell'RNA nelle vescicole extracellulari può avvenire attraverso molteplici vie: passivamente a causa dell'abbondanza di RNA nel citosol; mediante riconoscimento tramite una serie di proteine leganti l'RNA (RBP), come Argonaute, annessina A2, MVP, ribonucleoproteine nucleari eterogenee A2 / B1 (HNRNPA2B1), YBX1, SYNRIP e proteina del lupus La, che legano una particolare sequenza motivi nell'RNA o che riconoscono strutture uniche di RNA secondario; e attraverso modifiche specifiche, come l'uridilazione. L'incorporazione dell'RNA in vescicole extracellulari può anche essere promossa dal suo riconoscimento da parte di proteine del rivestimento retrovirale come Gag (e le loro copie silenti presenti nei genomi animali), che ancorano efficacemente gli RNA alla membrana plasmatica (o alla membrana del MVB; non mostrato), con conseguente rilascio di particelle simili a virus.

<https://www.nature.com/articles/s41580-020-0251-y.pdf>

Interazione dell'RNA incorporato nella vescicola extracellulare con le cellule riceventi e la sua veicolazione funzionale.

Dopo aver incontrato la cellula ricevente, la vescicola extracellulare è tipicamente legata alla sua superficie tramite i recettori della superficie cellulare (sebbene le vescicole extracellulari possano anche essere incorporate dall'ambiente in un processo noto come macropinocitosi; non mostrato). Dopo aver stabilito un'interazione con la superficie cellulare, la vescicola può rimanere legata sulla superficie o può essere internalizzata (1). Un possibile mezzo di internalizzazione è la fusione diretta con la membrana plasmatica (2), ma il meccanismo più comune di internalizzazione coinvolge l'endocitosi, per cui le vescicole extracellulari vengono portate fino agli endosomi (3). Nell'endosoma, il contenuto di RNA potrebbe essere rilasciato nello spazio lumenale (se l'integrità della membrana della vescicola extracellulare è perturbata) o potrebbe essere rilasciato nel citoplasma (da notare, la frequenza di questi eventi è bassa e la fuoriuscita endosomica del carico delle vescicole extracellulari è attualmente un importante collo di bottiglia nella consegna del carico di RNA funzionale da parte delle vescicole extracellulari). In entrambi i casi gli RNA possono essere riconosciuti da recettori di riconoscimento del pattern, come i recettori Toll-like (TLR) e i recettori RIG-I o NOD-like che risiedono rispettivamente nell'endosoma e nel citoplasma, aumentando la segnalazione della risposta immunitaria innata (4). Gli endosomi precoci si trasformeranno gradualmente in endosomi tardivi con progressiva acidificazione interna e possibile rilascio di RNA (stimolato dalla diminuzione del pH) (5). Più avanti lungo la via endocitica, gli endosomi matureranno in lisosomi, in cui il carico che non è stato rilasciato nel citoplasma sarà degradato (6). Il carico di RNA che raggiunge il citoplasma può suscitare il suo effetto funzionale. Ad esempio, l'mRNA può essere tradotto in una proteina funzionale, come la proteina fluorescente verde (GFP), e la fluorescenza risultante può agire come un reporter del rilascio funzionale del carico di vescicole extracellulari (7). Quando un piccolo carico di RNA interferente (siRNA) viene rilasciato nel citoplasma, può inibire la traduzione di trascritti specifici, come quelli che codificano per proteine fluorescenti. In questo caso, la scomparsa della fluorescenza riporterà il rilascio funzionale del carico di vescicole extracellulari (8). Le vescicole extracellulari possono essere tracciate lungo questo percorso con l'uso di diversi reagenti o strategie di etichettatura (Tabella 3). 5'ppp-RNA, 5'-RNA trifosforilato



I dati pubblicati indicano che le EV condividono con i virus un'importante funzione che ha svolto un ruolo critico nell'evoluzione, vale a dire il trasporto di materiale bioattivo da una cellula all'altra ¹¹⁴.

¹¹⁴ Meckes DG Jr, Raab-Traub N.
Microvesicles and viral infection.
J Virol. 2011;85(24):12844-12854. doi:10.1128/JVI.05853-11
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3233125/>

Meckes DG Jr.
Exosomal communication goes viral.
J Virol. 2015;89(10):5200-5203. doi:10.1128/JVI.02470-14
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442506/>

Ridder K, Keller S, Dams M, et al.

Combinazioni specifiche di lipidi e proteine, in particolare le **tetraspanine**¹¹⁵, nella membrana delle EV possono mediare il targeting specifico delle vescicole verso le cellule riceventi e possono determinare la capacità delle vescicole di fondersi con le membrane cellulari.

Queste molecole, così come il materiale genetico e le proteine racchiuse nelle EV (ad esempio, fattori di trascrizione e citochine), costituiscono segnali molecolari che possono influenzare la funzione delle cellule riceventi.

È esattamente questa caratteristica dell'essere unità di trasporto multicomponente, che le EV condividono con i virus con involucro.

In alcuni casi, le EV possono anche fornire materiale genetico alle cellule bersaglio. Dopo la scoperta iniziale che gli EV trasportano mRNA codificanti per proteine e piccoli RNA non codificanti coinvolti nella regolazione dell'espressione genica [microRNA (miRNA)]¹¹⁶.

Diversi gruppi hanno dimostrato alterazioni nell'espressione genica delle cellule bersaglio dovute al trasferimento di tali RNA tramite EV.¹¹⁷

Oltre agli miRNA, le EV contengono anche una grande varietà di altri piccoli RNA non codificanti, come frammenti di regioni codificanti di proteine e sequenze ripetute, che potrebbero agire anche come RNA regolatori influenzando l'espressione genica.¹¹⁸

Sebbene la maggior parte del materiale genetico racchiuso nei virioni codifichi per proteine virali essenziali per la replicazione del virus, **virus ed EV si uniscono nella loro capacità di trasferire RNA che possono attivare i recettori di riconoscimento dei patogeni (PRR) nelle cellule bersaglio**. Infatti, frammenti del genoma virale, così come piccoli RNA virali, come quelli codificati da EBV e alcuni miRNA delle cellule ospiti, attivano i PRR delle cellule bersaglio.

Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation [published correction appears in PLoS Biol. 2018 Mar 12;16(3):e1002623]. PLoS Biol. 2014;12(6):e1001874. Published 2014 Jun 3. doi:10.1371/journal.pbio.1001874
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4043485/>

Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, et al.
In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior.
Cell. 2015;161(5):1046-1057. doi:10.1016/j.cell.2015.04.042
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448148/>

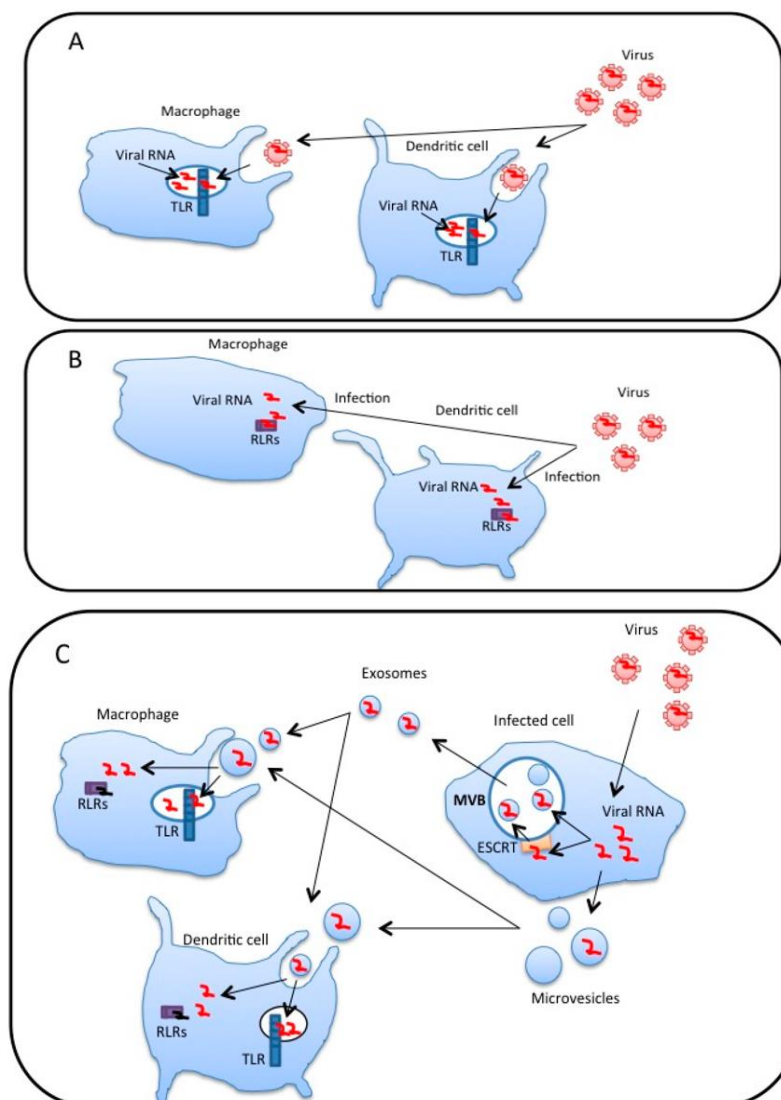
¹¹⁵ Andreu Z, Yáñez-Mó M.
Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function.
Front Immunol. 2014;5:442. Published 2014 Sep 16. doi:10.3389/fimmu.2014.00442
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4165315/>

¹¹⁶ 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;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486113/>

¹¹⁷ Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al.
Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.
J Extracell Vesicles. 2015;4:27066. Published 2015 May 14. doi:10.3402/jev.v4.27066
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433489/>

¹¹⁸ Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, 't Hoen PA.
Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions.
Nucleic Acids Res. 2012;40(18):9272-9285. doi:10.1093/nar/gks658
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467056/>

Sebbene l'attivazione del sistema PRR si traduca in risposte complesse, in alcuni casi può indurre un aumento dello stato di attivazione delle cellule bersaglio ¹¹⁹.



<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/666/htm> ¹²⁰

Riconoscimento dell'RNA virale da parte dei recettori dei pattern di riconoscimento. (A) Le cellule dendritiche e i macrofagi internalizzano le particelle virali attraverso la fagocitosi. Gli RNA virali sono internalizzati negli endosomi, in cui i recettori Toll-like (TLR) riconoscono l'RNA virale e attivano il segnale per indurre risposte immunitarie innate; (B) Alcuni tipi di virus infettano le cellule dendritiche e macrofagi. L'RNA virale viene rilasciato nel citoplasma. I sensori citoplasmatici dell'RNA virale, i recettori RIG-I-like (RLR), rilevano l'RNA virale nel citoplasma e attivano le risposte immunitarie innate; (C) Nelle cellule infettate da virus, gli RNA virali vengono ordinati in esosomi e microvesicole tramite i complessi di smistamento endosomiali

¹¹⁹ Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY.

microRNAs are ligands of Toll-like receptors.

RNA. 2013;19(6):737-739. doi:10.1261/rna.036319.112

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683908/>

Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, et al.

Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity.

Cell Host Microbe. 2012;12(4):558-570. doi:10.1016/j.chom.2012.08.010

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3479672/>

Baglio SR, van Eijndhoven MA, Koppers-Lalic D, et al.

Sensing of latent EBV infection through exosomal transfer of 5'pppRNA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(5):E587-E596. doi:10.1073/pnas.1518130113

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4747727/>

¹²⁰ Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Oshiumi H.

Extracellular Vesicles Deliver Host and Virus RNA and Regulate Innate Immune Response.

Int J Mol Sci. 2017;18(3):666. Published 2017 Mar 20. doi:10.3390/ijms18030666

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372678/>

necessari per il trasporto (ESCRT) o fattori sconosciuti. Le cellule dendritiche e i macrofagi internalizzano le vescicole extracellulari (EV) contenenti RNA virali, che vengono rilasciati negli endosomi e sono riconosciuti dai TLR, determinando risposte immunitarie innate. Gli RNA virali rilasciati nel citoplasma sono riconosciuti dagli RLR.

La maggior parte degli effetti descritti mediati dalle EV sulla funzione di altre cellule sono limitati ai sistemi in vitro o si verificano all'interno dello stesso organismo.

Mentre i virus si trasferiscono tra organismi e da cellula a cellula all'interno di un organismo, il trasferimento funzionale di EV da un individuo all'altro, a differenza delle EV derivate dal latte materno o seminale, non è stato dimostrato.¹²¹

Poiché le EV sono prodotte praticamente da tutte le cellule, probabilmente ogni preparazione virale è in realtà una miscela di virioni ed EV.

Per studiare le rispettive funzioni, è necessario separare EV e virioni. Questo è molto difficile con alcuni virus, come i retrovirus, perché sia le EV che i retrovirus sono di dimensioni (le EV vanno da 50 a 100 nm, i virioni ~ 100 nm) e densità comparabili (EV: 1,13-1,18 g / L; la maggior parte dei retrovirus: 1,16-1,18 g / L).

Pertanto, i gradienti di densità, che sono spesso usati per separare le EV dagli aggregati proteici contaminanti sulla base delle differenze nelle densità di galleggiamento¹²², non sono sempre affidabili per la separazione delle EV dalle particelle virali.

Ostacoli tecnici simili sono stati riscontrati anche nelle prime fasi della ricerca sui retrovirus, quando c'erano disaccordi e controversie di lunga durata riguardo alle particelle oncovirali che causano il cancro e la loro dipendenza da virus helper competenti per la propagazione.¹²³

In quei primi giorni, i microscopisti elettronici hanno osservato che i virus ultracentrifugati co-precipitavano con altre particelle racchiuse in una membrana delle dimensioni di 100 nm.

A meno che non sia definito in modo più specifico, è attualmente **virtualmente impossibile separare e identificare specificamente EV che trasportano proteine virali**, proteine ospiti ed elementi genomici virali da particelle virali con involucro che trasportano le stesse molecole.

Tuttavia, i metodi ad alto rendimento per analizzare le singole particelle nanometriche possono facilitare la discriminazione di diverse particelle nel continuum EV-virus in futuro.

Ad esempio, i recenti sviluppi nelle tecniche basate sulla citometria a flusso hanno aperto la possibilità di quantificare e caratterizzare particelle di dimensioni di 50–200 nm.

¹²¹ Vojtech L, Woo S, Hughes S, et al.

Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. Nucleic Acids Res. 2014;42(11):7290-7304. doi:10.1093/nar/gku347
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066774/>

Irmak MK, Oztas Y, Oztas E.

Integration of maternal genome into the neonate genome through breast milk mRNA transcripts and reverse transcriptase. Theor Biol Med Model. 2012;9:20. Published 2012 Jun 7. doi:10.1186/1742-4682-9-20
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3413567/>

¹²² Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al.

B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. J Exp Med. 1996;183(3):1161-1172. doi:10.1084/jem.183.3.1161
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192324/>

¹²³ Maeda N, Fan H, Yoshikai Y.

Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. Rev Med Virol. 2008;18(6):387-405. doi:10.1002/rmv.592
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.592>

In vivo, le EV possono interagire con i virus e tra loro, sia direttamente che tramite la modulazione delle risposte dell'ospite, partecipando così a una "Guerra e Pace" tra virus e ospite.¹²⁴

Alcuni virus inducono le cellule infettate a rilasciare **EV modificate che facilitano l'infezione** aumentando il pool di cellule bersaglio suscettibili (p. es., aumentando il numero di cellule attivate) o la loro suscettibilità alle infezioni virali o fungendo da esche che assorbono gli anticorpi antivirali, compromettendo così immunità antivirale.

Al contrario, **le EV che trasportano proteine virali possono anche essere utili per l'ospite**, ad esempio, fornendo alle cellule dendritiche antigeni virali per facilitare l'inizio delle risposte immunitarie adattative.

Ipoteticamente, la capacità delle EV di regolare la durata della vita delle cellule permissive e di modificare le risposte immunitarie antivirali può dare ulteriore flessibilità all'ospite nel rispondere all'infezione virale. Pertanto, le EV formate durante l'infezione virale possono svolgere un ruolo pro o anti-virale.

Al momento non è noto se le diverse funzioni attribuite alle EV indotte dal virus possano in parte essere spiegate dalle differenze nella purezza delle popolazioni EV usate in vari studi.

Manca quindi ancora una comprensione generale dei parametri che determinano l'effetto netto degli EV sulle infezioni virali.¹²⁵

¹²⁴ Lisco A, Vanpouille C, Margolis L.

War and peace between microbes: HIV-1 interactions with coinfecting viruses.
Cell Host Microbe. 2009;6(5):403-408. doi:10.1016/j.chom.2009.10.010
<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1931-3128%2809%2900354-0>

Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Kaufman TM, Stapleton JT.

Conserved Motifs within Hepatitis C Virus Envelope (E2) RNA and Protein Independently Inhibit T Cell Activation.
PLoS Pathog. 2015;11(9):e1005183. Published 2015 Sep 30. doi:10.1371/journal.ppat.1005183
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4589396/>

¹²⁵ Margolis L, Sadovsky Y.

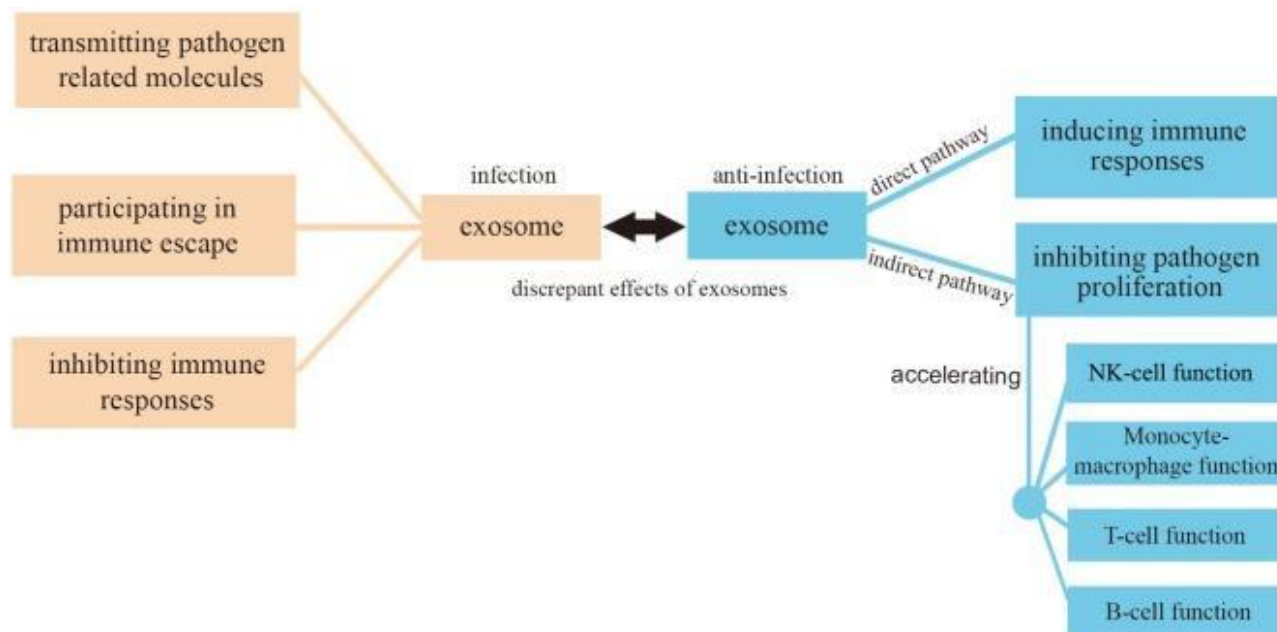
The biology of extracellular vesicles: The known unknowns.
PLoS Biol. 2019;17(7):e3000363. Published 2019 Jul 18. doi:10.1371/journal.pbio.3000363
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3000363>

Zhang W, Jiang X, Bao J, Wang Y, Liu H, Tang L.

Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions.
Front Immunol. 2018;9:90. Published 2018 Feb 12. doi:10.3389/fimmu.2018.00090
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816030/pdf/fimmu-09-00090.pdf>

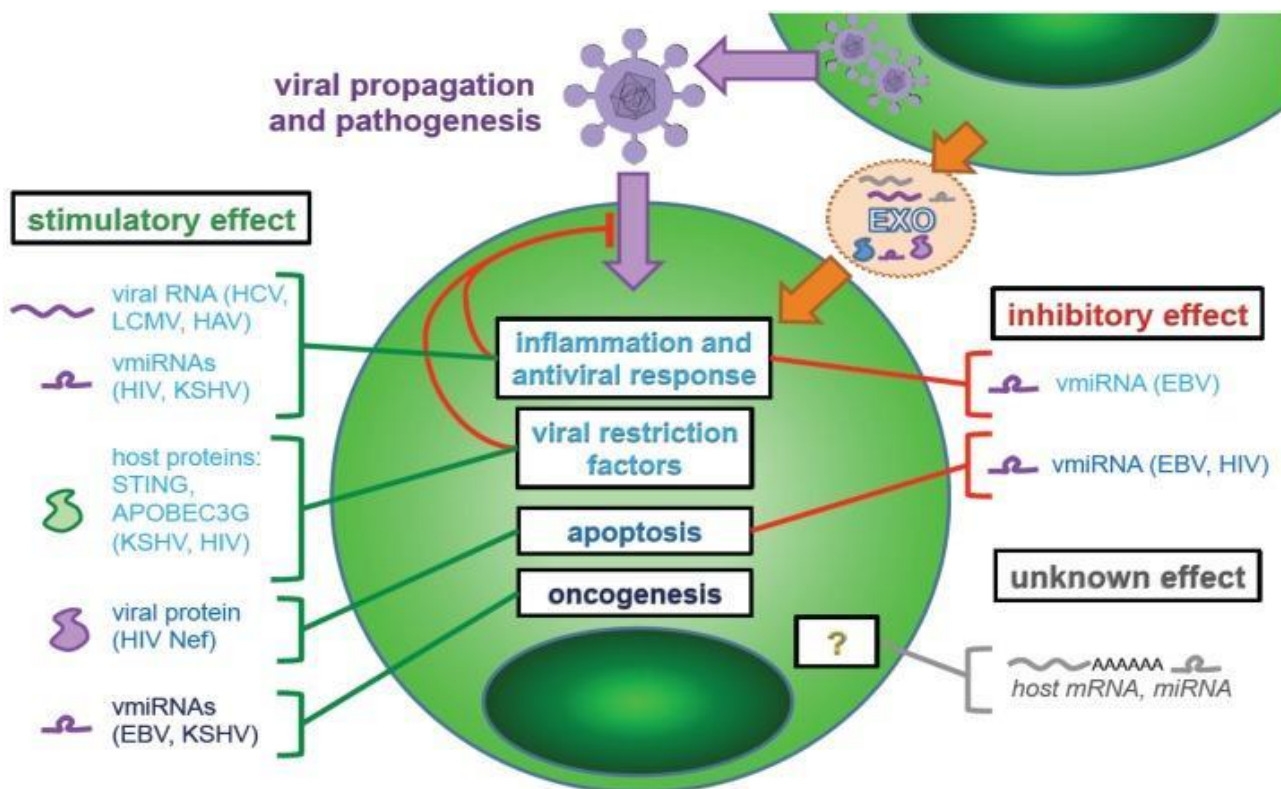
Assil S, Webster B, Dreux M.

Regulation of the Host Antiviral State by Intercellular Communications.
Viruses. 2015;7(8):4707-4733. Published 2015 Aug 19. doi:10.3390/v7082840
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576201/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816030/pdf/fimmu-09-00090.pdf>

Esosomi nell'infezione e anti-infezione. Gli esosomi partecipano sia ai processi di infezione che a quelli anti-infezione che vanno dall'infezione da patogeni alla regolazione delle risposte immunitarie.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576201/>

Trasferimento mediato da esosomi di componenti virali e dell'ospite da cellule infette a cellule vicine. Dopo l'infezione, il contenuto degli esosomi prodotti dalle cellule infette cambia considerevolmente, per quanto riguarda le proteine dell'ospite, gli RNA e l'incorporazione di micro RNA derivati dall'ospite (miRNA) o dal genoma virale (RNA virale, vmiRNA). Le specie derivate dall'ospite e dal virus presenti negli esosomi vengono trasferite alle cellule vicine, dove possono attivare o inibire una serie di diverse vie di segnalazione dell'ospite. Queste comunicazioni mediate da esosomi hanno un ampio effetto sulla funzionalità delle cellule nelle vicinanze delle cellule infette, compresi i tipi di cellule che sono refrattari all'infezione virale produttiva. Lo schema mostra una selezione di diverse specie trasferite da esosomi noti per influenzare il decorso dell'infezione virale e/o la patogenesi mirate alle vie infiammatorie, antivirali (tramite fattori di restrizione virali), apoptotici e oncogeni. Cambiamenti significativi si verificano nel contenuto di mRNA e miRNA derivati dall'ospite che sono incapsulati in esosomi in seguito a infezioni virali, tuttavia, ad oggi, l'effetto di queste diverse specie di RNA sulle cellule vicine durante un'infezione virale non è completamente compreso.

Infezioni in gravidanza ed esosomi

Il sistema immunitario di una donna in gravidanza, lungi dall'essere in uno stato di riposo, subisce diversi cambiamenti durante l'intero periodo di gestazione.

Negli anni gli studi nel campo della biologia riproduttiva si sono accostati alle molteplici interazioni all'interfaccia materno-fetale, che possono sfociare in gravidanze normali o patologiche.¹²⁶

Considerata inizialmente come una minaccia per una gravidanza di successo, l'infiammazione è attualmente riconosciuta come un passaggio essenziale per l'istituzione e il mantenimento della gravidanza, sebbene tale risposta immunitaria debba essere finemente regolata.

L'infiammazione esacerbata può causare l'aborto e altre complicazioni della gravidanza, ma l'assenza di infiammazione preclude un impianto efficace a causa di un rimodellamento inadeguato dei tessuti.

Durante la gravidanza si verifica un passaggio a un ambiente meno infiammatorio, consentendo lo sviluppo fetale. Infine, entro la fine del terzo trimestre, in prossimità del parto, si verifica una serie di alterazioni fisiologiche e un ambiente pro-infiammatorio è nuovamente predominante.

Inoltre, quando ha luogo l'impianto, gli antigeni paterni vengono espressi e il sistema immunitario materno incontra due sfide: evitare l'attivazione immunitaria e il rigetto del feto in via di sviluppo e contemporaneamente indurre l'attivazione immunitaria per evitare l'infezione da patogeni.

La tolleranza fetale è un processo complesso che si manifesta durante tutto il periodo di gestazione e comporta la modulazione delle risposte immunitarie locali verso un profilo antinfiammatorio.

È interessante notare che la placenta è un vigoroso produttore di esosomi e vescicole extracellulari che sono state descritte come attori chiave nella regolazione delle risposte immunitarie materne.

Il sinciziotrofoblasto ha importanti meccanismi fisici e molecolari che impediscono ai microbi di bypassare la placenta e raggiungere il feto, e queste caratteristiche vanno dai microvilli densi e ramificati sulla superficie apicale ai recettori solubili trasportati dagli esosomi.¹²⁷

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cei.13304>

Carichi di vescicole extracellulari rilasciate dall'embrione preimpianto e dai trofoblasti con effetti riportati sulle cellule immunitarie materne locali. PIBF = fattore di blocco indotto dal progesterone; ALB = albumina; ULBP1-5 = proteine leganti UL-16 1-5; PLAP = fosfatasi alcalina placentare; PD-L1 = ligando di morte programmato 1; MIC-A/B = proteina correlata alla classe I del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC); PAI-1 = inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1; hCG = gonadotropina corionica umana; CRH = ormone di rilascio della corticotropina; HPL = lattogeno placentare umano; FN1 = fibronectina-1.

¹²⁶ Kaminski VL, Ellwanger JH, Chies JAB.

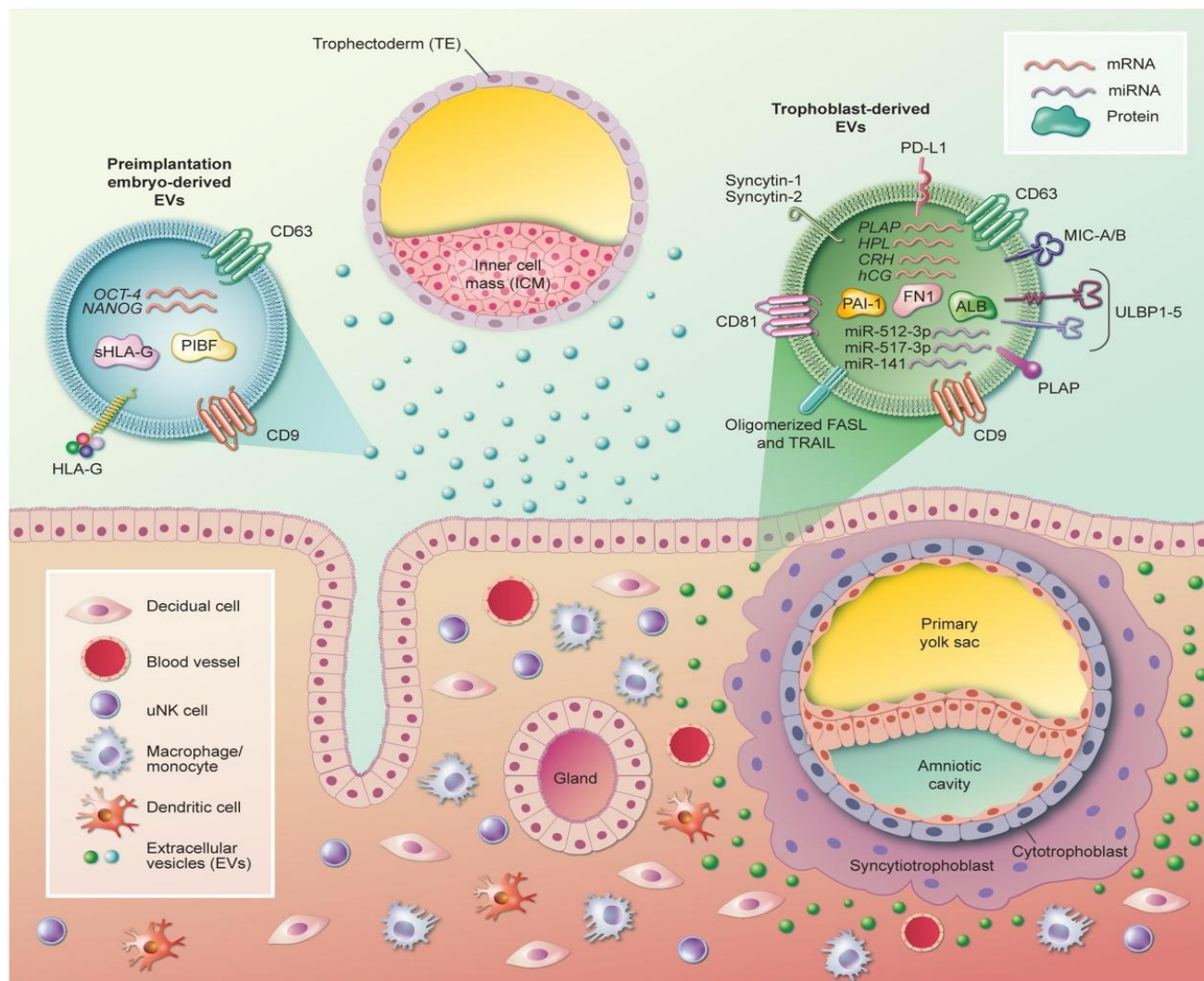
Extracellular vesicles in host-pathogen interactions and immune regulation - exosomes as emerging actors in the immunological theater of pregnancy. *Heliyon*. 2019;5(8):e02355. Published 2019 Aug 31. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02355
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6771614/>

¹²⁷ Giacomini E, Allea E, Fornelli G, et al.

Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface.

Clin Exp Immunol. 2019;198(1):15-23. doi:10.1111/cei.13304

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cei.13304>



Vale la pena ricordare che **la placenta umana è unica tra i tessuti normali per avere i più alti livelli di espressione di retrovirus endogeni umani (HERV).**

I retrovirus endogeni sono fossili evolutivi ereditati in modo mendeliano e sono derivati da retrovirus che anticamente hanno infettato le cellule della linea germinale. Un gene HERV envelope (env) appartenente alla famiglia HERV-W codifica una proteina espressa nel sinciziotrofoblasto denominata come sincitina.

La sincitina-1 ha dimostrato di essere coinvolta nella fusione delle cellule del trofoblasto umano ed è un fattore chiave nella regolazione della sincizializzazione durante la formazione della placenta.

La presenza di sincitina-1 negli esosomi placentari fornisce un meccanismo con cui la sincitina-1 raggiunge e interagisce con le cellule bersaglio del sistema immunitario materno e rappresenta un nuovo meccanismo di immunosoppressione endogena mediata retrovirale che può essere rilevante per la tolleranza immunitaria materna.¹²⁸

¹²⁸ Tolosa JM, Schjenken JE, Clifton VL, et al.

The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes.

Placenta. 2012;33(11):933-941. doi:10.1016/j.placenta.2012.08.004

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22999499/>

Recenti studi hanno rivelato l'importanza degli esosomi per una gravidanza di successo, come partner del sistema immunitario all'interfaccia materno-fetale.¹²⁹

Il traffico di molecole, cellule e agenti patogeni tra madre e feto durante la gravidanza è attualmente visto come un fenomeno naturale. In questo contesto, **gli esosomi possono essere importanti mediatori delle infezioni transplacentali.**

Inoltre, **l'immunosoppressione indotta dagli esosomi seminali¹³⁰ può aiutare a spiegare la persistenza dei numerosi virus presenti nello sperma.**

¹²⁹ Lucia Mincheva-Nilsson

Placental exosome-mediated immune protection of the fetus: feeling groovy in a cloud of exosomes, Expert Review of Obstetrics & Gynecology, (2010) 5:5, 619-634, DOI: 10.1586/eog.10.43
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eog.10.43?scroll=top&needAccess=true>

Menon R, Mesiano S, Taylor RN.
Programmed Fetal Membrane Senescence and Exosome-Mediated Signaling: A Mechanism Associated with Timing of Human Parturition. Front Endocrinol (Lausanne). 2017;8:196. doi:10.3389/fendo.2017.00196
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562683/>

Adam S, Elfeky O, Kinhal V, et al.
Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles - Implications for complications of pregnancies. Placenta. 2017;54:83-88. doi:10.1016/j.placenta.2016.12.001
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27939894/>

Salomon C, Nuzhat Z, Dixon CL, Menon R.
Placental Exosomes During Gestation: Liquid Biopsies Carrying Signals for the Regulation of Human Parturition. Curr Pharm Des. 2018;24(9):974-982. doi:10.2174/1381612824666180125164429
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29376493/>

Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, et al.
Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. J Immunol. 2009;183(1):340-351. doi:10.4049/jimmunol.0803477
<https://www.jimmunol.org/content/183/1/340.long>

Stenqvist AC, Nagaeva O, Baranov V, Mincheva-Nilsson L.
Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. J Immunol. 2013;191(11):5515-5523. doi:10.4049/jimmunol.1301885
<https://www.jimmunol.org/content/191/11/5515.long>

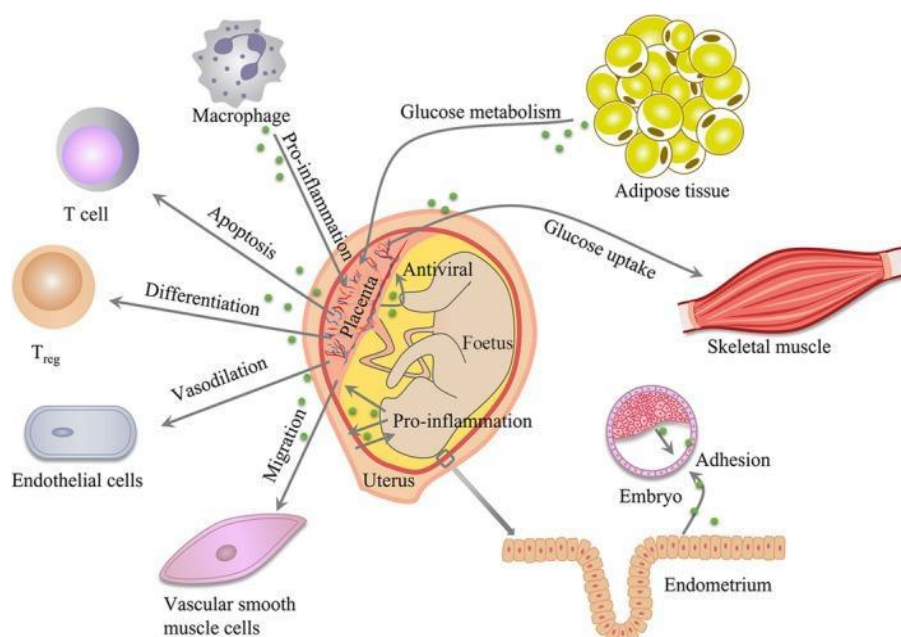
Nair S, Salomon C.
Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy. Semin Immunopathol. 2018;40(5):425-437. doi:10.1007/s00281-018-0680-2
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616307/>

Holder B, Jones T, Sancho Shimizu V, et al.
Macrophage Exosomes Induce Placental Inflammatory Cytokines: A Novel Mode of Maternal-Placental Messaging. Traffic. 2016;17(2):168-178. doi:10.1111/tra.12352
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4738478/>

Zhang J, Li H, Fan B, Xu W, Zhang X.
Extracellular vesicles in normal pregnancy and pregnancy-related diseases. J Cell Mol Med. 2020;24(8):4377-4388. doi:10.1111/jcmm.15144
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7176865/>

Salomon C, Rice GE.
Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;145:163-179. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.12.006
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110750/>

¹³⁰ Vojtech L, Woo S, Hughes S, et al.
Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. Nucleic Acids Res. 2014;42(11):7290-7304. doi:10.1093/nar/gku347
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066774/>

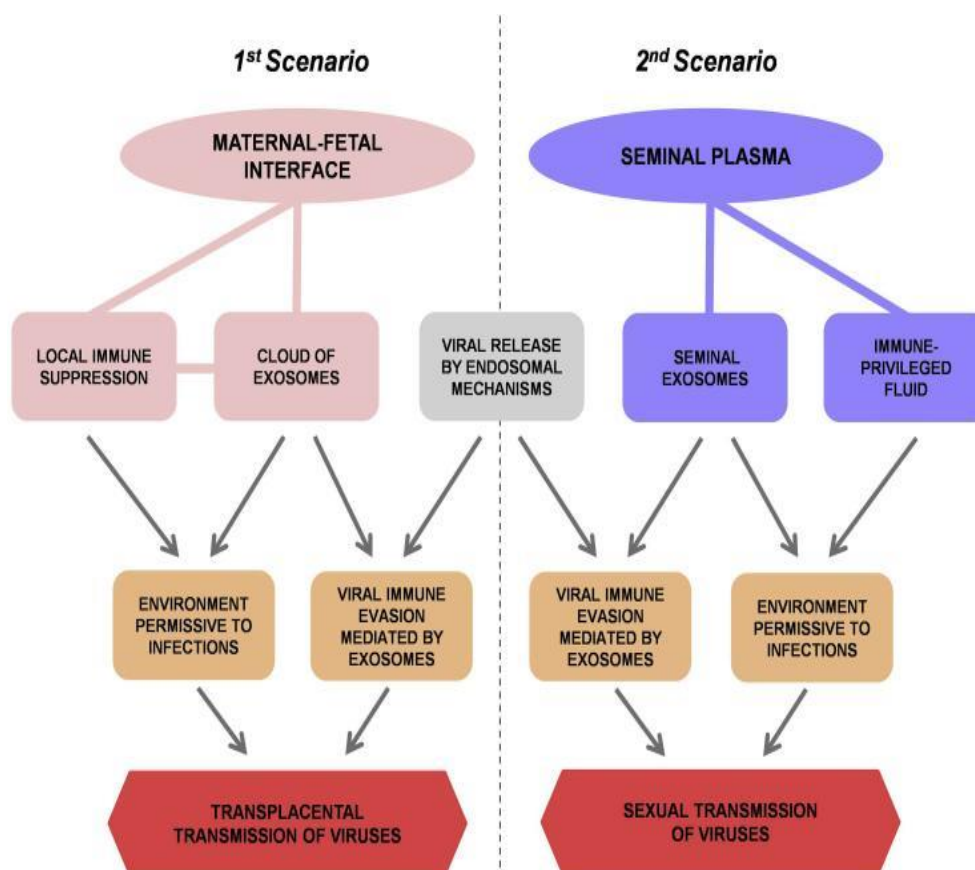


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7176865/>

Effetti delle EV nella gravidanza normale. Le EV mediano le comunicazioni materno-fetale nella gravidanza normale. Le EV contribuiscono all'impianto dell'embrione promuovendo l'adesione dei trofoblasti. La placenta può interagire con le cellule immunitarie tramite le EV per bilanciare l'attivazione e la soppressione immunitaria durante la gestazione. Le EV possono attivare le cellule endoteliali (EC) e le cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) per promuovere l'angiogenesi. Le EV possono accelerare il metabolismo del glucosio nella placenta e nei muscoli scheletrici. Inoltre, i segnali di infiammazione della maturazione nelle EV possono preparare l'utero per il parto

Madison MN, Roller RJ, Okeoma CM.
Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity.
Retrovirology. 2014;11:102. Published 2014 Nov 19. doi:10.1186/s12977-014-0102-z
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245725/>

Yang C, Guo WB, Zhang WS, et al.
Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma.
Andrology. 2017;5(5):1007-1015. doi:10.1111/andr.12412
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5639412/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6771614/>¹³¹

Potenziati ruoli degli esosomi nelle infezioni virali transplacentare (1 ° scenario) e sessualmente trasmissibili (2 ° scenario)

DIFFERENZE E SIMILARITÀ TRA GLI ESOSOMI E LE EV E IL SARS-COV-2

La presenza di esosomi nei tessuti di pazienti colpiti dall'infezione da SARS-Cov-2 ha portato numerosi ricercatori ad approfondire il loro ruolo nella patogenesi del COVID-19.

La similitudine tra esosomi e SARS-Cov-2, ha aperto un dibattito sulla reale esistenza del SARS-Cov-2 quale agente infettivo. Si riportano di seguito degli interessanti approfondimenti sul tema:

Dott. Fabio Franchi

[Pandemia di COVID-19: analisi critica](#)

Dr Andrew Kaufman

[COVID 19 Scientific analysis](#)

Ken Witwer+Jan Lötvall – the extracellular vesicle angle

[Is COVID-19 virus an Exosome?](#)

Dr. Pierre Arsène

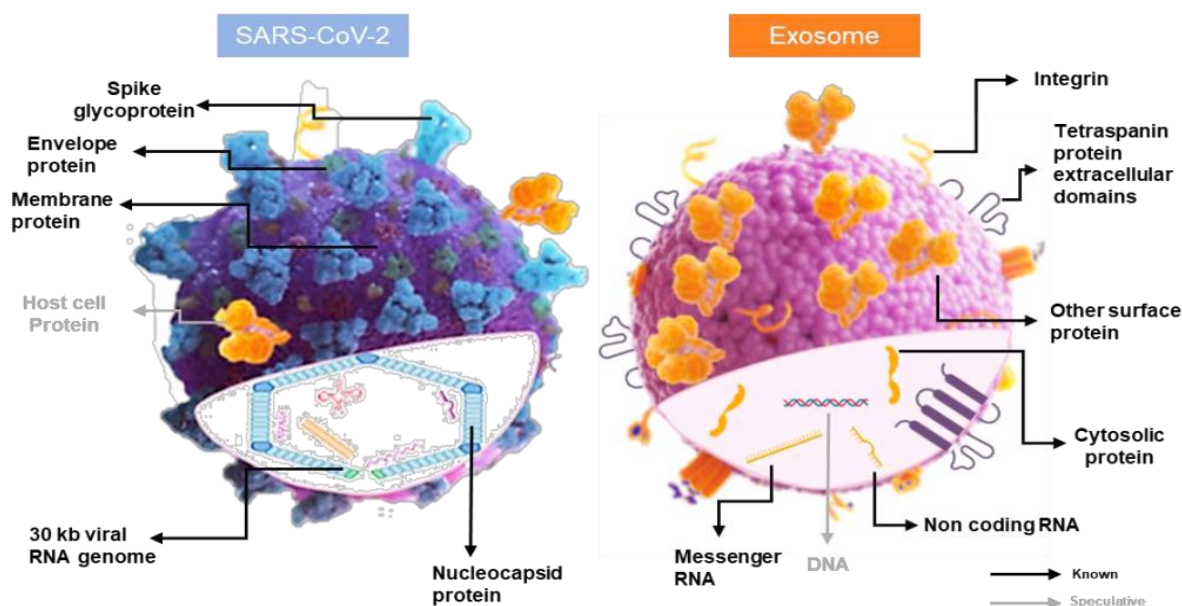
[Lessons for SARS-CoV-2 study \(COVID-19 disease\) from its exosome relatives](#)

¹³¹ Kaminski VL, Ellwanger JH, Chies JAB.

Extracellular vesicles in host-pathogen interactions and immune regulation - exosomes as emerging actors in the immunological theater of pregnancy.

Heliyon. 2019;5(8):e02355. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02355

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6771614/pdf/main.pdf>



Key similarities		
80-120 nm	Diameter	50-150 nm
1.16–1.18 g/L	Density	1.13–1.18 g/L
Lipid bilayer envelope	Structure	Lipid bilayer envelope
Protein, RNA, others	Cargo type	Protein, RNA, others
Releasing cell	Cargo origin	Releasing cell
Endocytic pathway, others	Cell entry mechanism	Endocytic pathway, others
Key differences		
Replication & survival	Function	Message delivery
Endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment (ERGIC)	Intracellular biogenesis	Multivesicular body (MVB)
Host cell budding	Cell exit mechanism	MVB-Plasma Membrane (PM) fusion or surface shedding

Lessons for SARS-CoV-2 study (COVID-19 disease) from its exosome relatives

Dalla revisione della letteratura è dimostrabile che il SARS-Cov-2 e i suoi antigeni si possono trovare all'interno degli esosomi.

Gli autori dello studio recente (pre-print) “Detection of Viral RNA Fragments in Human iPSC-Cardiomyocytes following Treatment with Extracellular Vesicles from SARS-CoV-2 Coding-Sequence-Overexpressing Lung Epithelial Cells” hanno riscontrato che gli esosomi contenenti SARS-CoV-2 RNA rappresentano una via di

ingresso indiretta nei cardiomiociti con conseguente potenziale disfunzione cardiaca senza la necessità di infezione virale diretta.¹³²

Muthukumar Gunasekaran et al. hanno riscontrato che **le infezioni da coronavirus aumentavano gli esosomi circolanti contenenti auto-antigeni associati ai polmoni, nonché antigeni virali e proteasoma 20S**¹³³. Questo fatto supporta l'ipotesi che **le cellule infettate dal virus COVID-19 producano esosomi contenenti particelle virali**.

Come già dettagliato nei paragrafi precedenti, **la differenza sostanziale tra gli esosomi e le particelle virali con involucro o veicolate da esosomi è la capacità di replicazione**.

Nel caso del virus SARS-Cov-2 è stata dimostrata mediante sequenziamento la capacità di replicazione in coltura cellulare di campioni clinici ed è stata studiata la sua cinetica di replicazione¹³⁴.

Un'altra importante caratteristica del virus SARS-Cov-2 che lo differenzia dagli esosomi non replicanti è la formazione di quasiespecie, cioè di popolazioni di mutanti che evolvono nel tempo per replicazione nell'organismo¹³⁵.

¹³² Kwon Y, Nukala SB, Srivastava S, et al.

Detection of Viral RNA Fragments in Human iPSC-Cardiomyocytes following Treatment with Extracellular Vesicles from SARS-CoV-2 Coding-Sequence-Overexpressing Lung Epithelial Cells.
Preprint. bioRxiv. 2020;2020.05.14.093583. Published 2020 Jul 1. doi:10.1101/2020.05.14.093583
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7337395/>

¹³³ Gunasekaran M, Bansal S, Ravichandran R, et al.

Respiratory viral infection in lung transplantation induces exosomes that trigger chronic rejection.
J Heart Lung Transplant. 2020;39(4):379-388. doi:10.1016/j.healun.2019.12.009
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102671/>

¹³⁴ Nyayanit DA, Sarkale P, Baradkar S, et al.

Transcriptome & viral growth analysis of SARS-CoV-2-infected Vero CCL-81 cells
[published online ahead of print, 2020 Jul 30]. Indian J Med Res. 2020;10.4103/ijmr.IJMR_2257_20. doi:10.4103/ijmr.IJMR_2257_20
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773420/>

Banerjee A, Nasir JA, Budyłowski P, et al.

Isolation, Sequence, Infectivity, and Replication Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.
Emerg Infect Dis. 2020;26(9):2054-2063. doi:10.3201/eid2609.201495
https://www.researchgate.net/publication/340603961_Isolation_sequence_infectivity_and_replication_kinetics_of_SARS-CoV-2

Liu Z, Zheng H, Lin H, et al.

Identification of Common Deletions in the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.
J Virol. 2020;94(17):e00790-20. Published 2020 Aug 17. doi:10.1128/JVI.00790-20
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431800/pdf/JVI.00790-20.pdf>

Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, et al.

SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology
[published online ahead of print, 2020 Jun 22]. J Gen Virol. 2020;10.1099/jgv.0.001453. doi:10.1099/jgv.0.001453
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001453/sidebyside>

Milewska A, Kula-Pacurar A, Wadas J, et al.

Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Human Respiratory Epithelium.
J Virol. 2020;94(15):e00957-20. Published 2020 Jul 16. doi:10.1128/JVI.00957-20
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375387/>

¹³⁵ Jary A, Leducq V, Malet I, et al.

Evolution of viral quasispecies during SARS-CoV-2 infection
[published online ahead of print, 2020 Jul 24]. Clin Microbiol Infect. 2020;S1198-743X(20)30440-7. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.032
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378485/>

Capobianchi MR, Rueca M, Messina F, et al.

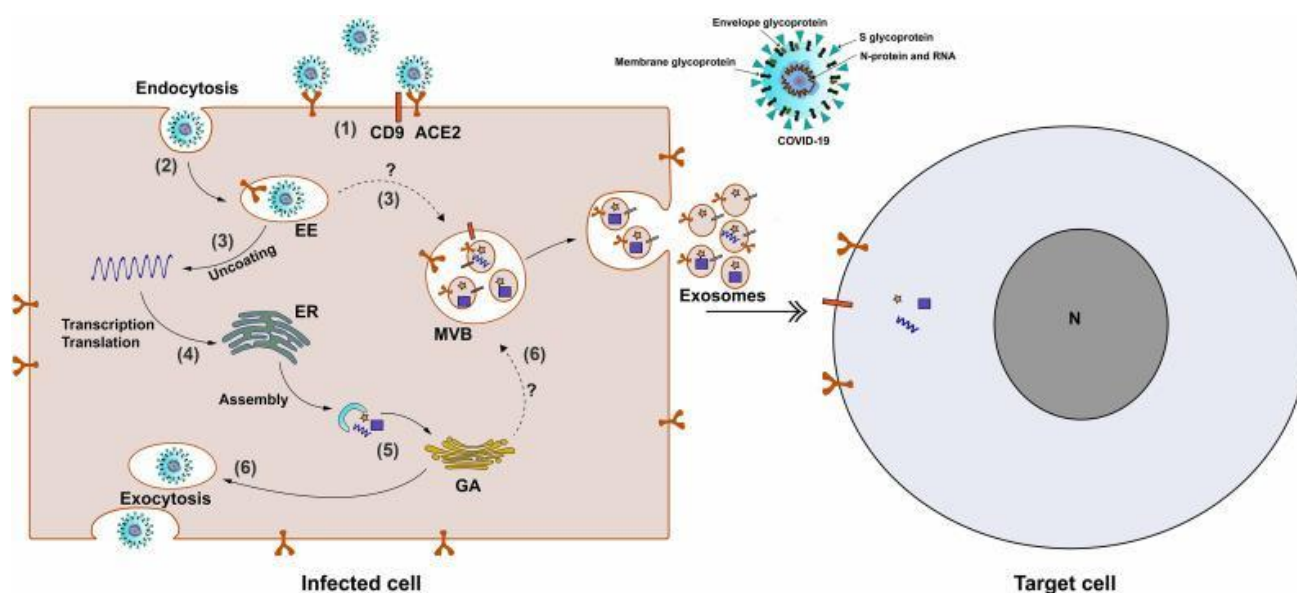
Molecular characterization of SARS-CoV-2 from the first case of COVID-19 in Italy.
Clin Microbiol Infect. 2020;26(7):954-956. doi:10.1016/j.cmi.2020.03.025
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7118617/>

Esistono prove che **gli esosomi trasferiscono ACE2** alle cellule riceventi ¹³⁶, con una funzione di supporto per l'internalizzazione e l'infezione del SARS-Cov-2.

Poiché gli ACE2 sono selezionati negli esosomi, il SARS-Cov-2 può entrare nelle cellule attraverso la via di internalizzazione, e di conseguenza i suoi componenti come gli miRNA e le proteine possono essere impacchettati in esosomi come per altri virus discussi in precedenza.

Meccanismo di formazione degli esosomi nell'infezione da SARS-Cov-2

Di seguito è proposto un meccanismo del ciclo vitale del SARS-Cov-2 nelle cellule polmonari ¹³⁷



Il ciclo vitale del virus (COVID-19) nelle cellule polmonari umane. Il COVID-19 entra nelle cellule quando la proteina S si lega al recettore ACE2 (1). Dopo l'aggancio, la conformazione della proteina S viene modificata, il che facilita l'ingresso del virus nella via endosomiale (2). Quindi, il virus COVID-19 rilascia RNA nella cellula o/e i componenti del virus COVID-19 possono essere diretti negli MVB/esosomi (3). L'RNA del virus viene tradotto in repliche virali poliproteine pp1a e 1ab, che vengono poi scisse in componenti virali dalle proteinasi virali. Le proteine virali e l'RNA vengono successivamente assemblati in virioni nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi (4 e 5) e quindi rilasciati fuori dalla cellula tramite esosomi (6). All'ingresso, il virus COVID-19 può essere diretto nella via esosomiale e i suoi componenti vengono selezionati negli esosomi per la secrezione e la diffusione (passaggi 3 e 6). Le vescicole extracellulari (esosomi e microvescicole) possono contribuire a diffondere questo virus in quanto trasferiscono recettori come la tetraspanina CD9 e ACE2, che rendono le cellule riceventi suscettibili all'aggancio del virus. ACE2, enzima di conversione dell'angiotensina 2; EE, endosoma precoce; ER, reticolo endoplasmatico; GA, apparato di Golgi; MVB, corpo multivesicolare; N, nucleo
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293471/>

Diversi gruppi di ricerca hanno riscontrato che la replicazione dei coronavirus è strettamente collegata alla formazione di vescicole intracellulari e il complesso replicativo si lega alla membrana intracellulare, portando alla formazione di strutture vescicolari. ¹³⁸

¹³⁶ Wang J, Chen S, Bihl J.

Exosome-Mediated Transfer of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) from Endothelial Progenitor Cells Promotes Survival and Function of Endothelial Cell.

Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:4213541. Published 2020 Jan 18. doi:10.1155/2020/4213541
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995312/>

¹³⁷ Hassanpour M, Rezaie J, Nouri M, Panahi Y.

The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection [published online ahead of print, 2020 Jun 13]. Infect Genet Evol. 2020;85:104422. doi:10.1016/j.meegid.2020.104422
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293471/>

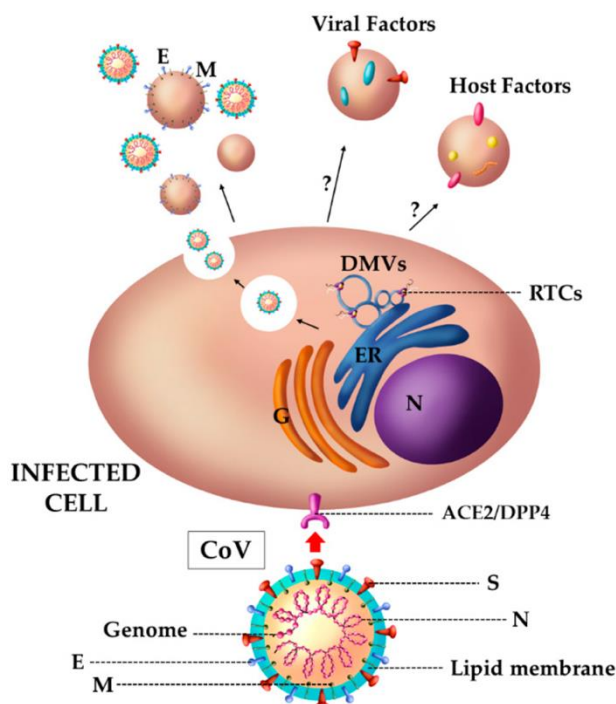
¹³⁸ Giannessi F, Aiello A, Franchi F, Percario ZA, Affabris E.

The Role of Extracellular Vesicles as Allies of HIV, HCV and SARS Viruses. Viruses. 2020;12(5):E571. Published 2020 May 22. doi:10.3390/v12050571
<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/5/571/htm>

Sono state identificate due diverse strutture vescicolari:

-la prima corrisponde a sferule a membrana singola che si formano in organelli membranosi, come ER, perossisomi o endosomi ¹³⁹;

-le seconde sono vescicole a doppia membrana (DMV) con un diametro di circa 200-300 nm, che sono spesso associate ad altre strutture, come i tubuli o le membrane ER, formando così una rete vescicolare nel citosol.¹⁴⁰



<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/5/571/htm>

Rappresentazione schematica delle EV rilasciate da cellule infettate da coronavirus (CoV). I CoVs dirottano il meccanismo cellulare per favorirne la replicazione. Le proteine CoVs promuovono la formazione nel citosol di vescicole a doppia membrana (DMV) associate ai complessi di replicazione e trascrizione (RTC) in cui si verifica la replicazione virale. Dopo la produzione di proteine strutturali e non strutturali, il germogliamento può avvenire

¹³⁹ den Boon JA, Ahlquist P.

Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories.

Annu Rev Microbiol. 2010;64:241-256. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134012

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20825348/>

¹⁴⁰ Knoops K, Kikkert M, Worm SH, et al.

SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum.

PLoS Biol. 2008;6(9):e226. doi:10.1371/journal.pbio.0060226

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2535663/>

Ulasli M, Verheije MH, de Haan CA, Reggiori F.

Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus.

Cell Microbiol. 2010;12(6):844-861. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01437.x

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159092/>

Maier HJ, Hawes PC, Cottam EM, et al.

Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes.

mBio. 2013;4(5):e00801-e813. Published 2013 Oct 22. doi:10.1128/mBio.00801-13

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812713/>

Hagemeijer MC, Rottier PJ, de Haan CA.

Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures.

Viruses. 2012;4(11):3245-3269. Published 2012 Nov 21. doi:10.3390/v4113245

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509692/>

Qian Z, Travanty EA, Oko L, et al.

Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;48(6):742-748. doi:10.1165/rcmb.2012-0339OC

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727876/>

dalle membrane di Golgi e ER. Successivamente, le particelle virali vengono rilasciate nello spazio extracellulare sfruttando la rete vescicolare. Oltre alle particelle virali, i CoVs inducono il rilascio di vescicole che trasportano le proteine dell'involucro virale (E) e della membrana (M). Ad oggi, non ci sono prove chiare di vescicole rilasciate da cellule infettate da CoV che trasportano altri fattori virali o dell'ospite. Nucleo (N); reticolo endoplasmatico (ER); Complesso di Golgi (G).

L'apparato replicativo di SARS-CoV-2 è analogo a quello del SARS-Cov ed è costituito da un massimo di sedici proteine non strutturali (da Nsp1 a Nsp16), di cui Nsp3, Nsp4 e Nsp6 sono impegnate nell'induzione di DMV.¹⁴¹ Mutazioni nella Nsp4 sono state collegate alla formazione di DMV aberranti con evidenti difetti nell'accoppiamento della membrana.

Questo può spiegare l'aspetto delle vescicole a membrana singola e delle vescicole a doppia membrana contenenti diverse vescicole a membrana singola racchiuse all'interno di una membrana esterna e contenenti il SARS-CoV nelle cellule Vero E6 9¹⁴².

Mutazioni in Nsp6 di diversi coronavirus causano invece la formazione di vescicole a membrana singola.¹⁴³

Queste osservazioni indicano che il riarrangiamento della membrana (reindirizzamento e riorganizzazione le membrane delle cellule ospiti per l'uso come parte del meccanismo di replicazione e trascrizione del genoma virale) rappresenta una strategia utilizzata da tutti i virus noti a RNA a singolo filamento con polarità positiva.

Diversi casi riportati in letteratura hanno indicato la presenza di DMV contenenti il virus in biopsie, autopsie ed endoscopie e campioni post mortem analizzati mediante microscopia elettronica (EM).

Dall'analisi istologica EM le particelle virali compatibili con il coronavirus (SARS-CoV) sono state rilevate in tutti i campioni esaminati di tessuto dell'intestino tenue ottenuti dall'autopsia, nonché nei campioni biotipici ileali e del colon terminali ottenuti con la colonscopia, che sono stati isolati, coltivati in vitro, propagati e confermati mediante RT-PCR.

Le particelle virali erano confinate alle cellule epiteliali, principalmente negli enterociti della superficie apicale e raramente nelle cellule epiteliali ghiandolari. A livello intracellulare, le particelle virali erano contenute all'interno di vescicole citoplasmatiche dilatate coerenti con il reticolo endoplasmatico dilatato.

Le vescicole contenenti le particelle virali sono state spesso viste verso il citoplasma apicale. Sono stati rilevati grappoli di coronavirus anche sui microvilli superficiali, il che può suggerire la partenza del virus dalla superficie luminale degli enterociti.

Non c'era evidenza di atrofia dei villi nonostante l'adesione virale e la colonizzazione¹⁴⁴.

¹⁴¹ Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. mBio. 2013;4(4):e00524-13. Published 2013 Aug 13. doi:10.1128/mBio.00524-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747587/>

¹⁴² Goldsmith CS, Tatti KM, Ksiazek TG, et al.

Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. Emerg Infect Dis. 2004;10(2):320-326. doi:10.3201/eid1002.030913
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322934/>

¹⁴³ Al-Mulla HM, Turrell L, Smith NM, et al.

Competitive fitness in coronaviruses is not correlated with size or number of double-membrane vesicles under reduced-temperature growth conditions. mBio. 2014;5(2):e01107-e1113. Published 2014 Apr 1. doi:10.1128/mBio.01107-13
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3977362/>

¹⁴⁴ Leung WK, To KF, Chan PK, et al.

Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. Gastroenterology. 2003;125(4):1011-1017. doi:10.1016/s0016-5085(03)01215-0
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126982/>

Particelle virali libere, particelle virali e/o particelle virali all'interno delle vescicole a singola o doppia membrana, più particelle virali con diametro di virioni variabile all'interno di un singolo DMV sono state costantemente riscontrate in campioni derivati da pazienti infetti da SARS-CoV,¹⁴⁵ MERS-CoV¹⁴⁶ e SARS-CoV-2¹⁴⁷ (si veda il paragrafo dedicato alla microscopia elettronica per una discussione più approfondita sulle immagini).

La presenza degli esosomi nei vari tessuti, in particolare quello intestinale potrebbe spiegare il rilascio prolungato di particelle virali oltre la risoluzione dei sintomi clinici, attraverso il meccanismo di evasione immunitaria del *cavallo di troia* già citato, e l'eventuale riacutizzazione della malattia in pazienti guariti.¹⁴⁸

Infatti, è stato riferito che in alcuni di questi pazienti, la diffusione prolungata dell'RNA di SARS-CoV-2 si è verificata con una durata mediana di 53 giorni e un massimo di 83 giorni.¹⁴⁹

¹⁴⁵ Goldsmith CS, Miller SE.

Modern uses of electron microscopy for detection of viruses.
Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):552-563. doi:10.1128/CMR.00027-09
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2772359/>

Qin F, Jinming C, Xiaojun H, et al.

The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells.
J Med Virol. 2004;73(3):332-337. doi:10.1002/jmv.20095
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166737/>

Shieh WJ, Hsiao CH, Paddock CD, et al.

Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan.
Hum Pathol. 2005;36(3):303-309. doi:10.1016/j.humpath.2004.11.006
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112064/>

¹⁴⁶ Alsaad KO, Hajeer AH, Al Balwi M, et al.

Histopathology of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection - clinicopathological and ultrastructural study.
Histopathology. 2018;72(3):516-524. doi:10.1111/his.13379
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165512/>

¹⁴⁷ Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, et al.

Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction
[published online ahead of print, 2020 May 4]. Histopathology. 2020;10.1111/his.14134. doi:10.1111/his.14134
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364264/>

Martines RB, Ritter JM, Matkovic E, et al.

Pathology and Pathogenesis of SARS-CoV-2 Associated with Fatal Coronavirus Disease, United States.
Emerg Infect Dis. 2020;26(9):2005-2015. doi:10.3201/eid2609.202095
https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/9/20-2095_article

Zhu N, Zhang D, Wang W, et al.

A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.
N Engl J Med. 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978945/>

¹⁴⁸ Irashdy F, Aljaddawi AA, Redwan EM, Uversky VN.

On the potential role of exosomes in the COVID-19 reinfection/reactivation opportunity
[published online ahead of print, 2020 Jul 9]. J Biomol Struct Dyn. 2020;1-12. doi:10.1080/07391102.2020.1790426
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7441802/>

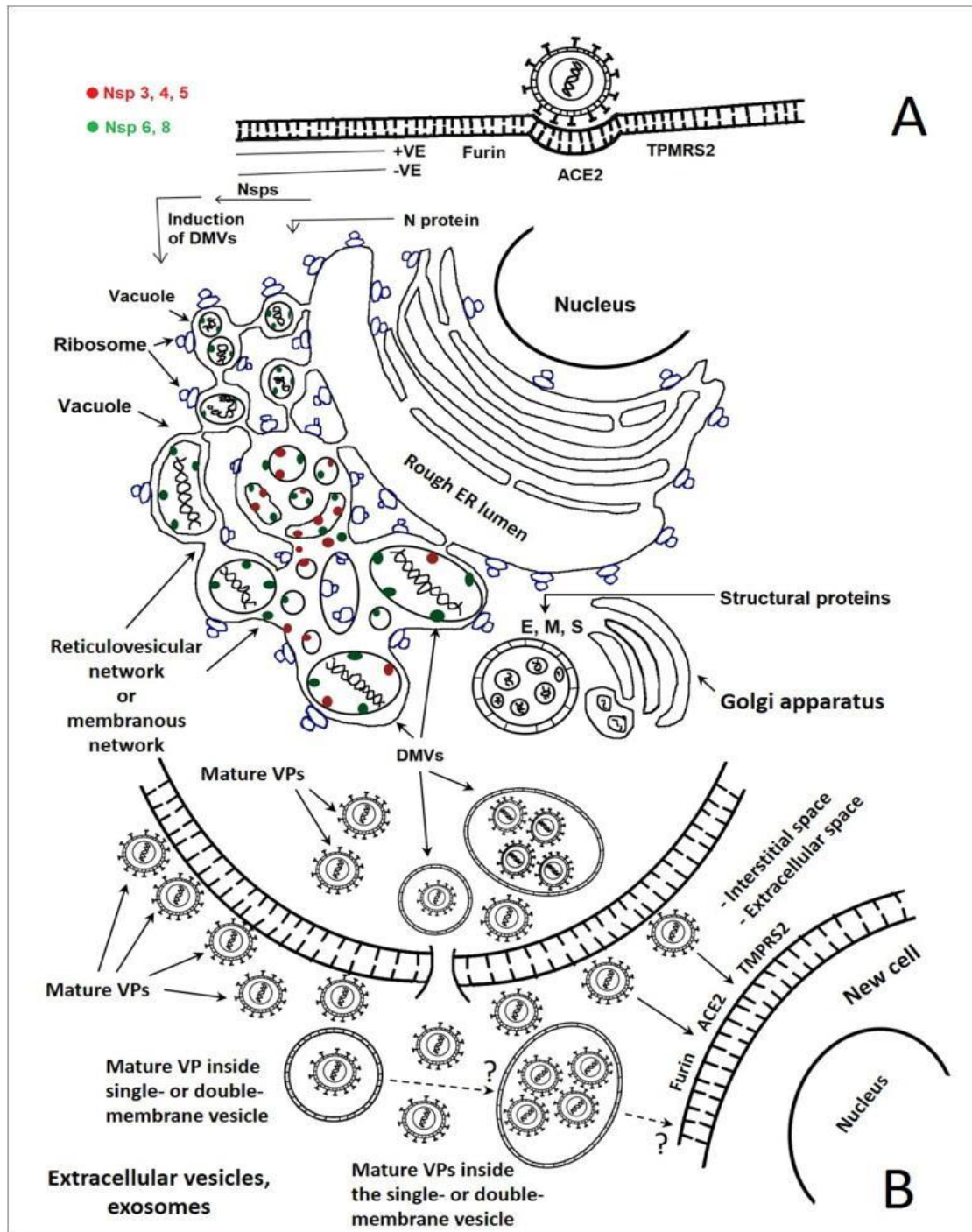
Ye G., Pan Z., Pan Y., Deng Q., Chen L., Li J., Li Y., & Wang X.

Clinical characteristics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 reactivation.
Journal of Infection, (2020). (5), e14–e17. 10.1016/j.jinf.2020.03.001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102560/>

¹⁴⁹ Li N, Wang X, Lv T.

Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: Not a rare phenomenon
[published online ahead of print, 2020 Apr 29]. J Med Virol. 2020;10.1002/jmv.25952. doi:10.1002/jmv.25952
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7267144/>

Oltre a questo trasporto prolungato di SARS-CoV-2, alcuni pazienti che erano guariti dal COVID-19 hanno dimostrato la recidiva di SARS-CoV-2.¹⁵⁰



¹⁵⁰ Xiao AT, Tong YX, Zhang S.

False negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence [published online ahead of print, 2020 Apr 9]. *J Med Virol.* 2020;10.1002/jmv.25855. doi:10.1002/jmv.25855
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7262304/pdf/JMV-9999-na.pdf>

Ye G., Pan Z., Pan Y., Deng Q., Chen L., Li J., Li Y., & Wang X.
Clinical characteristics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 reactivation.
Journal of Infection, (2020). (5), e14–e17. 10.1016/j.jinf.2020.03.001
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102560/>

Yuan J, Kou S, Liang Y, Zeng J, Pan Y, Liu L.
PCR Assays Turned Positive in 25 Discharged COVID-19 Patients
[published online ahead of print, 2020 Apr 8]. *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa398. doi:10.1093/cid/ciaa398
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7184423/>

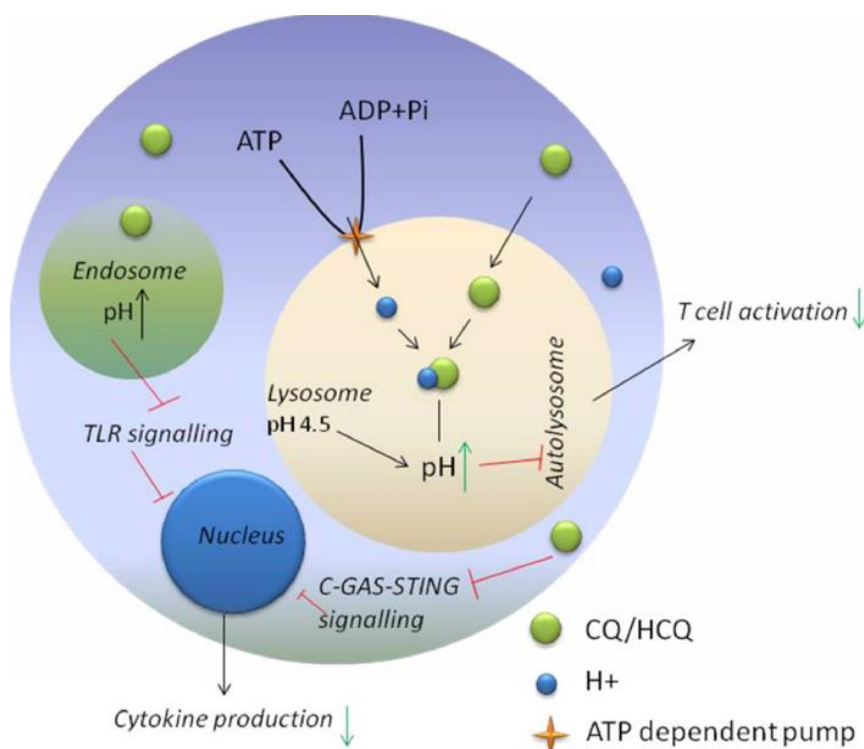
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7441802/>

Ciclo vitale putativo di SARS-CoV e SARS-CoV-2 nella cellula ospite umana (in vivo) e/o nella cellula Vero E6 (in vitro). Le vescicole a doppia membrana indotte dal virus nel citoplasma delle cellule infette rappresentano piattaforme per la replicazione, l'assemblaggio, il traffico, l'estruzione e la diffusione dei coronavirus delle particelle virali mature (libere e/o all'interno delle vescicole). La cellula infettata dal virus ha dimostrato la formazione di una rete reticolo-vescicolare di membrane modificate, che includeva vescicole a doppia membrana singola/multipla, che rappresentano il sito in cui il virus si replica. Tutti sono contigui al reticolo endoplasmatico ruvido. L'RNA+ virale viene rilasciato nel citoplasma e principalmente tradotto in poliproteine virali che codificano per le Nsps, che stimolano/inducono i DMV a procedere e completare il ciclo di vita del virus in associazione con il Golgi per produrre le particelle virali nelle vescicole, che eventualmente si fondono con la membrana plasmatica. Il DMV può contenere la particella virale matura o immatura o l'apparato virale non assemblato. Gli Nsp 3-8 sono presenti sul CM, mentre alcuni Nsp8 possono essere rilevati all'interno dei DMV. L'analisi istologica e ultrastrutturale dell'aspetto dei campioni dei pazienti infetti da SARS-CoV-2 ha dimostrato la presenza di particelle virali mature, nonché di particelle virali immature o apparati virali non assemblati all'interno dei DMV. Le particelle virali mature e immature di SARS-CoV-2 si diffondono/disseminano nelle nuove cellule vicine come documentato, mentre l'introduzione delle particelle del virus SARS-CoV-2 nelle cellule attraverso le vescicole extracellulari (esosomi) deve ancora essere documentato.

Va ricordato che il test in RT-PCR non consente di distinguere tra virus infettivi e acidi nucleici non infettivi dello stesso virus, motivo per cui è necessario lo studio mediante la propagazione in coltura dei campioni dei pazienti per stabilire se la persona è in grado di trasmettere il virus.

*E' interessante notare che la **clorochina** nella sua forma non protonata può facilmente diffondersi attraverso le membrane cellulari alle vescicole acide nel citoplasma [lisosomi, endosomi tardivi, vescicole della rete trans-Golgi (TGN)] e rimane intrappolata nelle vescicole dopo essere stato protonata. La clorochina protonata non è in grado di diffondersi dal lisosoma o dagli endosomi, essendo trattenuta nei compartimenti cellulari con idrolasi. Poiché la clorochina e i suoi analoghi sono basi deboli diprotiche e la loro forma non protonata può entrare selettivamente nei lisosomi e diventare protonata in modo inversamente proporzionale al pH, sono anche noti come agenti lisosomotropici.*

Il farmaco quindi altera l'ambiente acido nel lisosoma e, di conseguenza, la cellula non può procedere con l'endocitosi, il rilascio di esosomi o la fusione fagolisosomiale¹⁵¹



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7243790/>

Diagramma schematico del ruolo della clorochina (CQ) e dell'idrossiclorochina (HCQ) nello spazio intracellulare. I farmaci aumentano il pH degli endosomi e dei lisosomi. Di conseguenza, l'attivazione dei linfociti T e di altre citochine viene repressa.

¹⁵¹ Tripathy S, Dassarma B, Roy S, Chabalala H, Matsabisa MG.

A review on possible modes of action of chloroquine/hydroxychloroquine: repurposing against SAR-CoV-2 (COVID-19) pandemic.

Int J Antimicrob Agents. 2020;56(2):106028. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106028

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/32450198/>

Identificazione del SARS-Cov e SARS-Cov-2 mediante la microscopia elettronica

Lo studio in microscopia elettronica del SARS-Cov-2 richiede una particolare cautela per la presenza delle vescicole extracellulari rilasciate da tutte le cellule presenti nei tessuti infettati e/o infiammati.

Nel caso del tessuto polmonare come già discusso la criticità è notevole, proprio per le molteplici funzioni sia pro che antivirali degli esosomi e per la presenza di vescicole extracellulari che potrebbero contenere il virus infettivo, o componenti virali delle stesse dimensioni del virus con involucro che danno origine a strutture simili a coronavirus.

Riguardo la difficoltà di discernere per mezzo della microscopia tra virus SARS-Cov-2 ed esosomi si rimanda alla letteratura tecnica pubblicata in merito.¹⁵²

¹⁵² Goldsmith CS, Miller SE.

Caution in Identifying Coronaviruses by Electron Microscopy
[published online ahead of print, 2020 Jul 10]. J Am Soc Nephrol. 2020;ASN.2020050755. doi:10.1681/ASN.2020050755
<https://jasn.asnjournals.org/content/early/2020/07/14/ASN.2020050755>

Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al.
Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19.
Lancet. 2020;395(10234):1417-1418. doi:10.1016/S0140-6736(20)30937-5
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7172722/>

Goldsmith CS, Miller SE, Martines RB, Bullock HA, Zaki SR.
Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task.
Lancet. 2020;395(10238):e99. doi:10.1016/S0140-6736(20)31188-0
[https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(20\)31188-0.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(20)31188-0.pdf)

Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al.
Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task - Authors' reply.
Lancet. 2020;395(10238):e100. doi:10.1016/S0140-6736(20)31185-5
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7237177/>

Miller SE, Brealey JK.
Visualization of putative coronavirus in kidney.
Kidney Int. 2020;98(1):231-232. doi:10.1016/j.kint.2020.05.004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206426/>

Miller SE, Brealey JK.
Visualization of putative coronavirus in kidney.
Kidney Int. 2020;98(1):231-232. doi:10.1016/j.kint.2020.05.004
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206426/>

Calomeni E, Satoskar A, Ayoub I, Brodsky S, Rovin BH, Nadasdy T.
Multivesicular bodies mimicking SARS-CoV-2 in patients without COVID-19.
Kidney Int. 2020;98(1):233-234. doi:10.1016/j.kint.2020.05.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206432/>

Su H, Yang M, Wan C, et al.
Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China.
Kidney Int. 2020;98(1):219-227. doi:10.1016/j.kint.2020.04.003
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194105/>

Oshiro LS, Schieble JH, Lennette EH.
Electron microscopic studies of coronavirus.
J Gen Virol. 1971;12(2):161-168. doi:10.1099/0022-1317-12-2-161
<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/12/2/JV0120020161.pdf?expires=1598814490&id=id&accname=guest&checksum=20E0AA1B64433FE3FA51C922B99F2974>

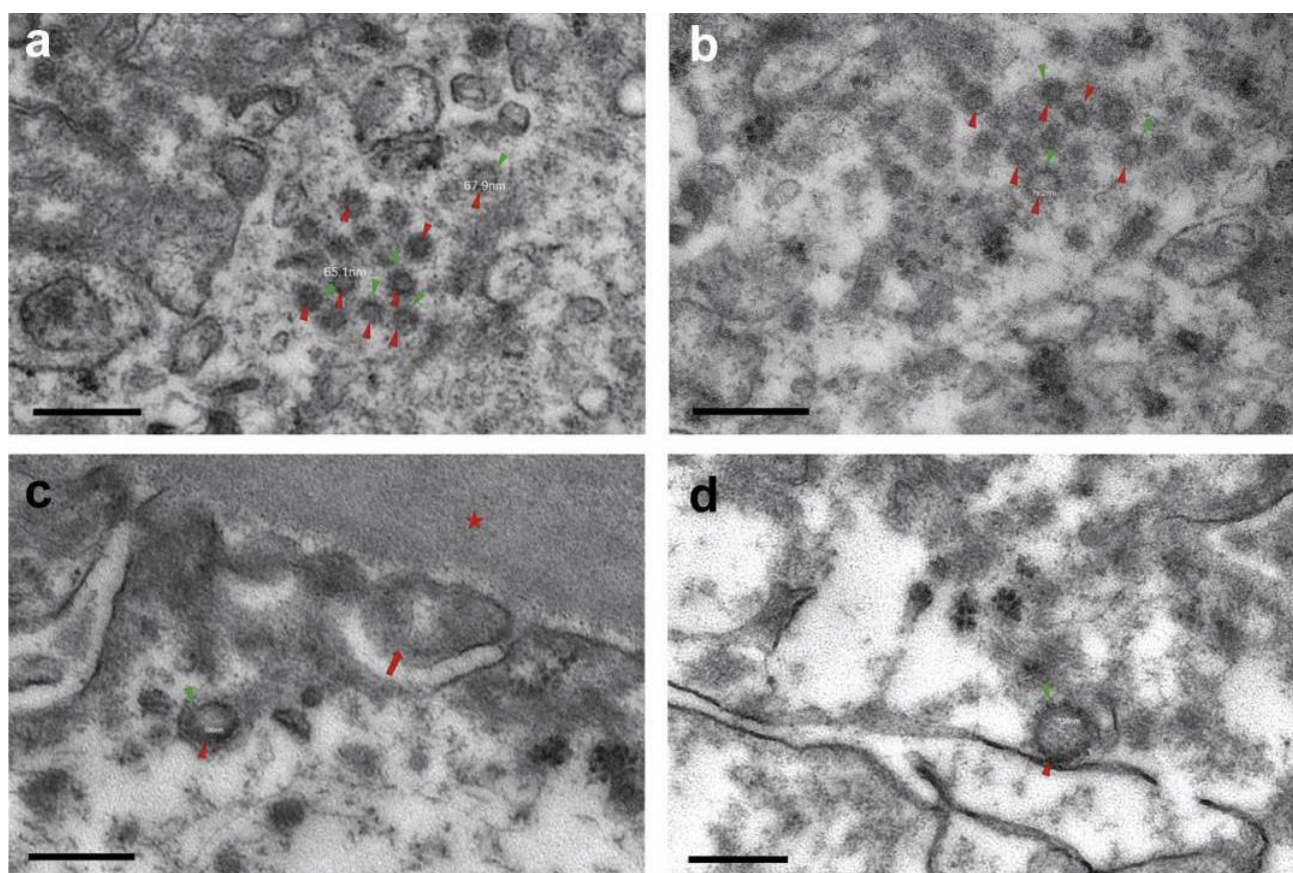
Knoops K, Kikkert M, Worm SH, et al.
SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum.
PLoS Biol. 2008;6(9):e226. doi:10.1371/journal.pbio.0060226
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2535663/>

Goldsmith CS, Tatti KM, Ksiazek TG, et al.
Ultrastructural characterization of SARS coronavirus.
Emerg Infect Dis. 2004;10(2):320-326. doi:10.3201/eid1002.030913
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322934/>

Gli esperti sono concordi nel sostenere che la microscopia elettronica (EM) a trasmissione di sezioni di tessuto non è un metodo specifico nè sensibile per la rilevazione di particelle virali; ci sono numerose strutture rilevabili dall'EM che assomigliano a virus (le cosiddette particelle simili-virali), come anche le inclusioni tubuloreticolari endoteliali (chiamate particelle simili a myxovirus) e pertanto, consigliano cautela quando si identifica un virus mediante EM in sezioni di tessuto.

Anche l'immunoistochimica può provocare una colorazione aspecifica, in particolare nei tubuli renali, portando a risultati falsi positivi.

A titolo di esempio si riportano le immagini che sono state messe in discussione per la presenza di particelle virali:



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7156952/>

Su et al. mostrano presunte particelle virali nel citoplasma dell'epitelio tubulare renale e dei podociti.

Queste strutture non sono particelle virali, ma piuttosto vescicole rivestite di clatrina, normali organelli cellulari coinvolti nel trasporto intracellulare.

Gli oggetti nelle loro Figure 2a e b (~60 nm) sono leggermente più piccoli dei coronavirus (da ~80 a 140+ nm), ma ancora più importante, i loro "picchi" (peplomeri) sono in contatto con il citosol, come quelli sulla clatrina -vescicole rivestite; la particella più grande nella Figura 2d ha anche punte che toccano il citosol e non ha punti densi all'interno delle particelle corrispondenti al nucleocapside avvolto, tagliate in sezione trasversale.

I coronavirus, d'altra parte, hanno le loro proiezioni rivolte verso lo spazio extracellulare tra le cellule o lo spazio all'interno dei vacuoli all'interno delle cellule.

Questo fenomeno è dovuto al fatto che i coronavirus ricevono il loro rivestimento esterno sbocciando dentro o sul cellulare membrane, formando così vacuoli intracellulari con le proiezioni virali a contatto con il contenuto vacuolare, non il citosol. Durante l'assemblaggio,

Farkash EA, Wilson AM, Jentzen JM.

Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2.

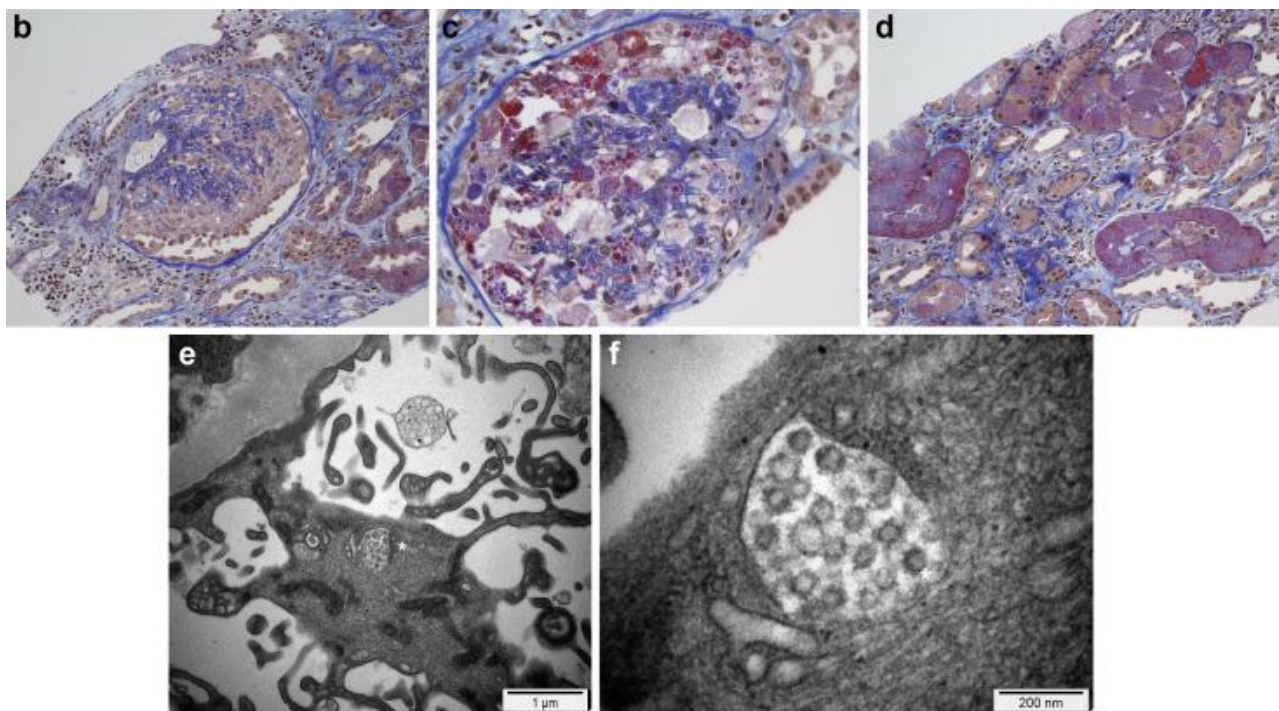
J Am Soc Nephrol. 2020;31(8):1683-1687. doi:10.1681/ASN.2020040432

<https://jasn.asnjournals.org/content/31/8/1683.long>

le proteine strutturali virali vengono incorporate nel complesso reticolo endoplasmatico-Golgi della cellula infetta e l'RNA virale, assemblato con un'altra proteina, germoglia in queste membrane, formando una sacca legata alla membrana contenente virioni maturi; le spike si trovano all'esterno del virione, ma all'interno del vacuolo e non a diretto contatto con il citosol.

Questi virioni escono dalla cellula per esocitosi quando la membrana del vacuolo si fonde con la membrana plasmatica e apre il suo contenuto verso l'esterno; quindi, i virioni completi con peplomeri sono visti all'interno della cellula all'interno della vescicola (sequestrata dal citosol) e all'esterno delle cellule, spesso ancora attaccate alla membrana vacuolare aperta che si è fusa con la membrana plasmatica.

Le particelle mostrate nelle micrografie elettroniche nell'articolo di Su et al. hanno le loro spike a contatto con il fluido citoplasmatico, come le vescicole endocitotiche, cioè le vescicole rivestite di clatrina. La presenza di proteine di rivestimento può causare un'area densa di elettroni attorno a queste vescicole, dando l'aspetto di una "corona" virale. Su et al. ha trovato nucleoproteina SARS-CoV nei tubuli renali mediante immunisto chimica, ma la presenza di una proteina virale non significa necessariamente la presenza di particelle virali complete.¹⁵³



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7156952/>

Le particelle in Kissling et al. non sono coronavirus.

Mentre si trovano all'interno di un vacuolo, hanno spike e hanno approssimativamente le dimensioni corrette, ma non hanno l'aspetto uniforme delle particelle virali con un rivestimento esterno della membrana e spike all'interno che indicano il nucleocapside.

Queste microvescicole sono fluttuanti e si trovano all'interno di una struttura chiamata corpo multivesicolare. L'articolo di Kissling et al. è preoccupante, poiché la microscopia elettronica è l'unica presunta prova presentata a sostegno dell'ipotesi che i coronavirus siano effettivamente presenti in questo tessuto renale; tutti gli altri test per il coronavirus nel rene sono risultati negativi.

Queste micrografie non supportano l'affermazione che le particelle siano effettivamente virus.¹⁵⁴

¹⁵³ Miller SE, Brealey JK.

Visualization of putative coronavirus in kidney.

Kidney Int. 2020;98(1):231-232. doi:10.1016/j.kint.2020.05.004

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206426/>

Calomeni E, Satoskar A, Ayoub I, Brodsky S, Rovin BH, Nadasdy T.

Multivesicular bodies mimicking SARS-CoV-2 in patients without COVID-19.

Kidney Int. 2020;98(1):233-234. doi:10.1016/j.kint.2020.05.003

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206432/>

Su H, Yang M, Wan C, et al.

Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China.

Kidney Int. 2020;98(1):219-227. doi:10.1016/j.kint.2020.04.003

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194105/>

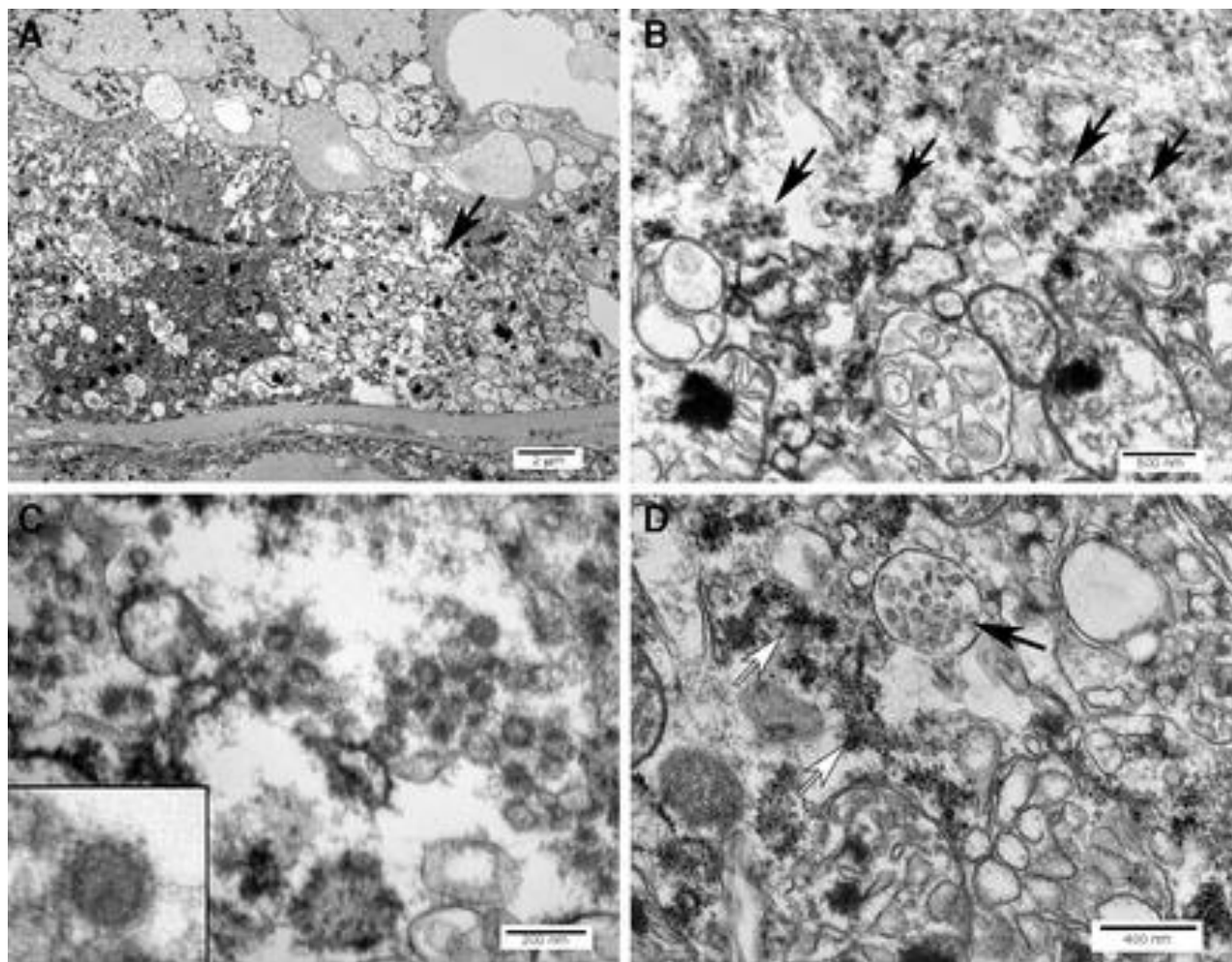
¹⁵⁴ Miller SE, Brealey JK.

Visualization of putative coronavirus in kidney.

Kidney Int. 2020;98(1):231-232. doi:10.1016/j.kint.2020.05.004

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206426/>

Miller SE, Brealey JK.



<https://jasn.asnjournals.org/content/31/8/1683.long>

Nell'articolo di Farkash et al., le immagini al microscopio elettronico nella loro Figura 3, A-C non mostrano coronavirus. Piuttosto, le strutture descritte come virus sono vescicole rivestite di clatrina (CCV), normali organelli subcellulari coinvolti nel trasporto intracellulare.

La Figura 3A è un ingrandimento basso di una cellula morente con citoplasma disorganizzato aspecifico con una freccia che punta a un'aggregazione di CCV. I pannelli B e C nella loro Figura 3 mostrano gruppi di CCV e il riquadro per la Figura 3C mostra un ingrandimento maggiore.

Nessuna di queste strutture sferiche contiene sezioni trasversali attraverso il nucleocapside delle particelle virali. Inoltre, questi CCV sono visti liberi nel citoplasma, mentre le particelle di coronavirus si trovano racchiuse all'interno di un vacuolo in modo che le spike siano rivolte verso l'interno del contenuto vacuolare, non il citoplasma. La Figura 3D contiene un corpo multivesicolare (MVB), che hanno paragonato a vescicole a doppia membrana, il complesso di replicazione dei coronavirus.

La struttura mostrata nel manoscritto di Farkash et al. non ha le due membrane strettamente opposte viste nelle vescicole a doppia membrana e non ha l'aspetto di ciò che è mostrato nel riferimento che citano.

Inoltre, si possono trovare MVB nei tessuti renali osservati storicamente.⁶ Inoltre, gli MVB sono formati da invaginazioni di endosomi e sono intermedi nel traffico di lisosomi.¹⁵⁵

Inoltre, Farkash et al. documentano le loro scoperte facendo riferimento a un articolo di Su et al. che pretende di aver identificato il coronavirus nel rene. Allo stesso modo, quell'articolo mostra solo strutture cellulari normali che, per il virologo non microscopista elettronico, possono assomigliare al coronavirus.

Visualization of putative coronavirus in kidney.

Kidney Int. 2020;98(1):231-232. doi:10.1016/j.kint.2020.05.004

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206426/>

¹⁵⁵ Goldsmith CS, Miller SE.

Caution in Identifying Coronaviruses by Electron Microscopy

[published online ahead of print, 2020 Jul 10]. J Am Soc Nephrol. 2020;ASN.2020050755. doi:10.1681/ASN.2020050755

<https://jasn.asnjournals.org/content/early/2020/07/14/ASN.2020050755>

Farkash EA, Wilson AM, Jentzen JM.

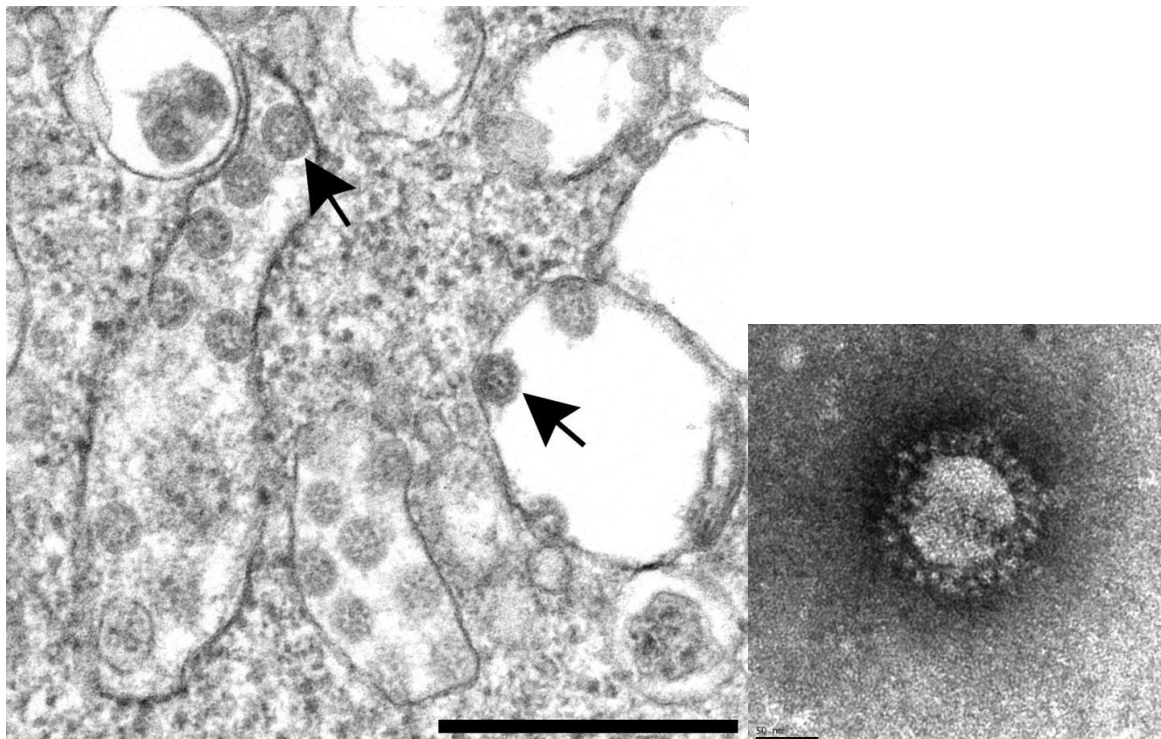
Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2.

J Am Soc Nephrol. 2020;31(8):1683-1687. doi:10.1681/ASN.2020040432

<https://jasn.asnjournals.org/content/31/8/1683.long>

E' necessario quindi procedere con la conferma con indagini molecolari più approfondite che permettano di identificare e quantificare il virus in seguito alla propagazione in coltura (sequenziamento NGS, genetica inversa) ¹⁵⁶

Le immagini seguenti sono prese come riferimento per l'identificazione in EM del SARS-Cov-2 e SARS-Cov provenienti da campioni di pazienti infetti



<https://jasn.asnjournals.org/content/early/2020/07/14/ASN.2020050755>

isolato di SARS-COV-2, propagato in coltura cellulare che mostra numerose particelle virali sferiche (freccie) che si trovano nelle cisterne del reticolo endoplasmatico ruvido / area complessa di Golgi della cellula. Notare i punti neri all'interno delle particelle, che sono sezioni trasversali attraverso il nucleocapside virale. Barra della scala: 400 nm.

¹⁵⁶ Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, et al.

SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology

[published online ahead of print, 2020 Jun 22]. J Gen Virol. 2020;10.1099/jgv.0.001453. doi:10.1099/jgv.0.001453

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001453#tab2>

Chu H, Chan JF, Yuen TT, et al.

Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study.

Lancet Microbe. 2020;1(1):e14-e23. doi:10.1016/S2666-5247(20)30004-5

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7173822/>

Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, et al.

SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract.

Cell. 2020;182(2):429-446.e14. doi:10.1016/j.cell.2020.05.042

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250779/>

Sims AC, Burkett SE, Yount B, Pickles RJ.

SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium.

Virus Res. 2008;133(1):33-44. doi:10.1016/j.virusres.2007.03.013

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2384224/>

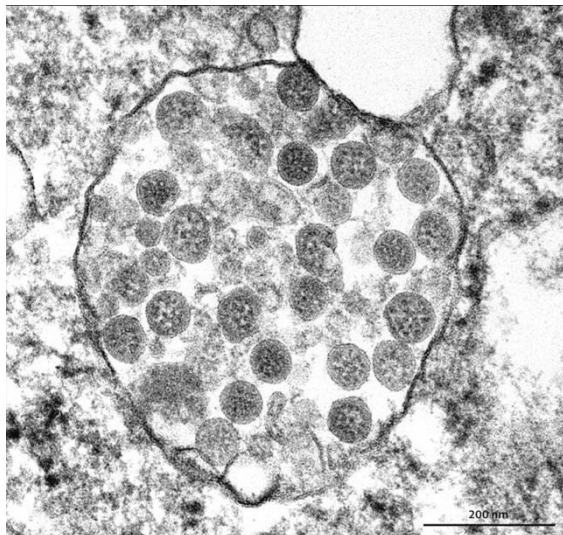


Fig. 1

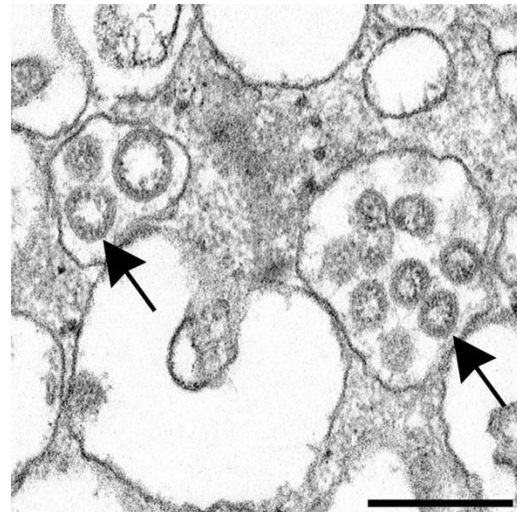


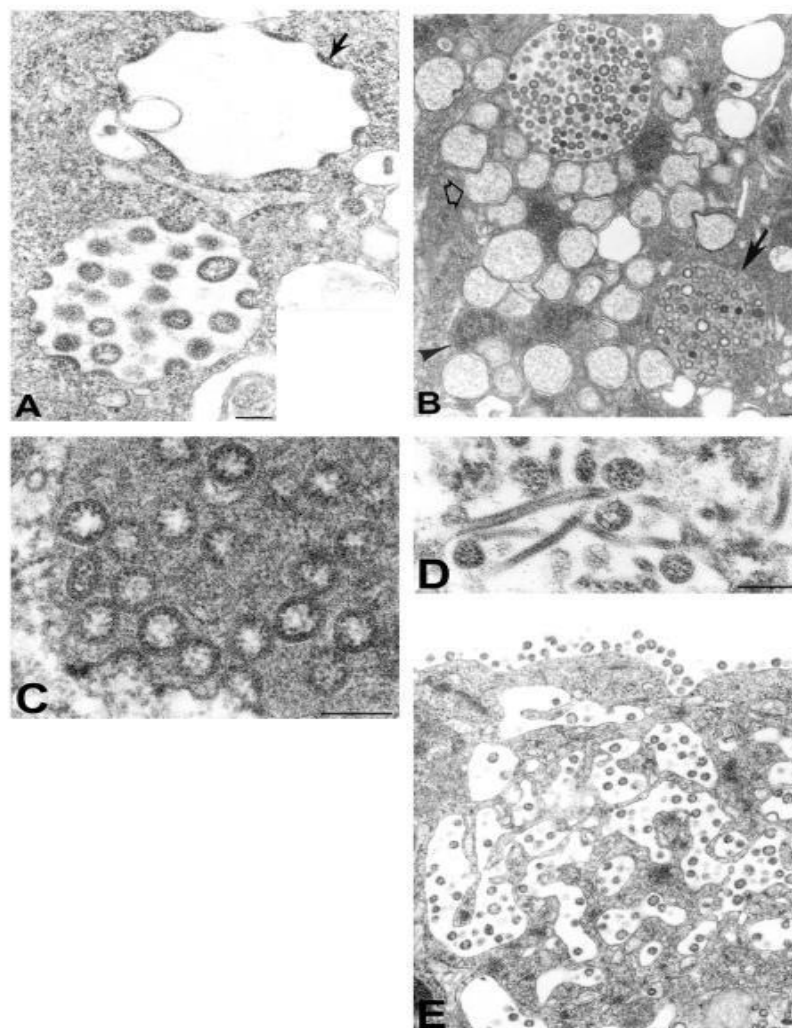
Fig. 2

Fig. 1 [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(20\)31188-0.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(20)31188-0.pdf)

Isolato virale coltivato in coltura cellulare Le particelle sferiche di coronavirus con sezioni trasversali attraverso il nucleocapside, viste come punti neri, sono raggruppate all'interno di una membrana che le separa dal citoplasma

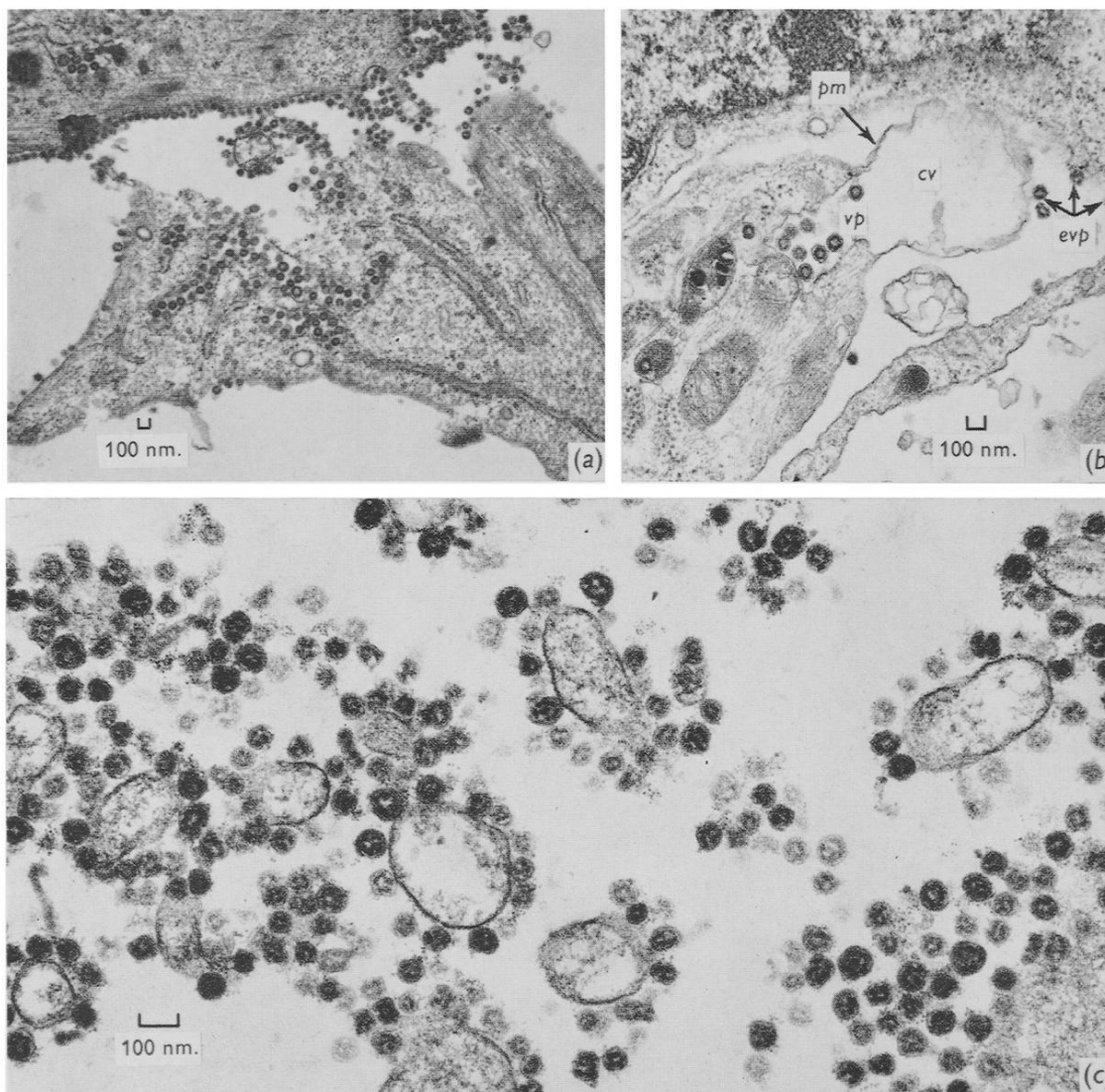
Fig. 2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7206426/>

Immagine al microscopio elettronico di un isolato del SARS-Cov-2 visto qui all'interno dei vacuoli (frecce). Notare il denso rivestimento della membrana attorno alle particelle virali. Questa micrografia è di particelle virali in una coltura cellulare inoculata con fluidi nasofaringei e orofaringei di pazienti infetti. Bar = 200 nm. Immagine fornita da Cynthia S. Goldsmith, Centers for Disease Control and Prevention.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322934/>

Assemblaggio di particelle di coronavirus associate alla sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) in cellule Vero E6 infette. A) Apposizione di nucleocapsidi (freccia) lungo le membrane del compartimento di germogliamento quando le particelle si sviluppano e germogliano. I nucleocapsidi misuravano 6 nm di diametro ed erano per lo più visti in sezione trasversale. Alcuni virioni avevano un centro elettron-lucente, con il nucleocapside giustapposto all'involucro, mentre altri erano relativamente scuri quando il nucleocapside era presente in tutta la particella. Il pretrattamento con acido tannico ha migliorato la visibilità delle proiezioni virali a forma di clava (riquadro), che avevano una lunghezza media di 14 nm. **B)** Cellula infetta da SARS-CoV con vescicole contenenti virus, vescicole a doppia membrana (freccia aperta) e inclusioni nucleocapside (punta di freccia). Notare la vescicola con materiale granulare intervallato dai virioni (freccia). **C)** Ingrandimento maggiore di una vescicola contenente virus con materiale granulare scuro. **D)** Strutture tubolari in una vescicola contenente virus. **E)** Virioni nelle vescicole, che sembravano migrare e fondersi con la membrana plasmatica. Si vede il caratteristico rivestimento di particelle lungo la superficie cellulare. Barre: A, inserto; B – D, 100 nm; E, 1 µm.



<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/12/2/JV0120020161.pdf?expires=1598816101&id=id&acname=guest&checksum=08D88475A1900C44BA2E5BE06CE1D12A>

(a) Uno stadio avanzato del processo litico che mostra particelle virali che lasciano le cisterne del reticolo endoplasmatico attraverso una grande rottura nella membrana della superficie cellulare. **(b)** Una possibile via alternativa di uscita del virus è illustrata da una bolla sulla membrana plasmatica (pm) adiacente a una cisterna del reticolo endoplasmatico risultante in una vescicola citoplasmatica (cv) contenente particelle virali (vp). Vengono mostrate anche particelle di virus extracellulari (evp). **(c)** Controllo normale del siero per gli esperimenti di marcatura di anticorpi marcati con ferritina indiretta. Notare alcuni granuli di ferritina di fondo.

DR.SSA LORETTA BOLGAN

Dottore in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche
Dottorato in Scienze Farmaceutiche
Consulente scientifico
loretta.bolgan@gmail.com
Dolo (VE)

Loretta Bolgan