



LOS EXOSOMAS COMO HERRAMIENTA EN BIOPSIA LÍQUIDA

Los exosomas son un conjunto de vesículas extracelulares que, liberados en los biofluidos corporales, transportan componentes (proteínas, ADN, ARN, lípidos, etc.) de la célula de la que provienen. Se trata de una prometedora herramienta en biopsia líquida para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diferentes patologías.



LORENA ALONSO ALCONADA,
Researcher en Nexotech.

La biopsia líquida (LB) representa una alternativa a las biopsias de tejido y ofrece la oportunidad de detectar y seguir la evolución del cáncer a través del análisis de un fluido biológico, como por ejemplo la sangre, la saliva, la orina o el líquido cefalorraquídeo. Las ventajas que ofrece son un análisis rápido, más sencillo y mínimamente invasivo de la muestra, que además puede llevarse a cabo de manera repetida, proporcionando información a tiempo real de la evolución de la enfermedad.

Desde que la FDA (Food and Drug Administration) aprobase el método CellSearch™ de enumeración de células tumorales circulantes (CTC) en la sangre, para predecir el pronóstico de pacientes con cáncer colorrectal, de mama, y de próstata, el número de aplicaciones de la LB ha aumentado rápidamente. Al análisis de estas CTC se han sumado otros elementos que derivan del tumor como el ADN tumoral circulante (ctDNA), el ARN circulante libre de células (mRNA, miRNA), las plaquetas "educadas por el tumor" o las vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares (*extracellular vesicles*, EVs) son unas partículas de tamaño nanométrico que son secretadas por todos los tipos celulares. Transportan diferentes componentes de la célula de la que provienen, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos protegidos de las enzimas del exterior a través de una doble bicapa lipídica. Las EVs median procesos de comunicación célula-célula, tanto fisiológicos como patológicos. Actualmente se han descrito diferentes subtipos de EVs, como exosomas, microvesículas, ectosomas, oncosomas y cuerpos apoptóticos, que se diferencian por su tamaño, contenido, biogénesis y su función.

Los exosomas son un tipo clave de EVs, con un tamaño de entre 30-160 nm, cuya biogénesis implica a la membrana plasmática endosomal y posteriores interacciones

con otras vesículas y orgánulos intracelulares que generan el contenido final de los exosomas. Están enriquecidos en una serie de proteínas que se emplean para su caracterización, como las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), las proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90) o las proteínas implicadas en la liberación de los exosomas (Alix, TSG101). Sin embargo, la población de exosomas presentes en un biofluido es heterogénea, presentando diferentes perfiles de expresión de estos marcadores y reflejando así un origen celular y una función diferentes. Los exosomas ejercen su función a través de la interacción con la célula receptora, mediante la fusión directa de sus membranas, la interacción ligando-receptor o mediante endocitosis.

Ventajas sobre otras fuentes de biopsia líquida

La investigación en el campo de las EVs, y en concreto de los exosomas, se está viendo impulsada por el potencial diagnóstico y terapéutico de estas estructuras, con aplicaciones no sólo en el campo de la salud humana, como el área de la oncología, las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, los trastornos del embarazo o el trasplante de órganos, entre otras, sino también en el campo de la veterinaria.

Los exosomas muestran ventajas significativas sobre otras fuentes de LB. En primer lugar, se ha descrito su presencia en la mayoría de fluidos biológicos, incluyendo la sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, leche materna, semen, fluido amniótico y ascitis. Se trata de estructuras muy estables, debido a la bicapa lipídica, que conserva en su interior el material protegido y que permite su almacenamiento a -80°C por largos periodos de tiempo. Además,

son secretados por células vivas y en mayores cantidades que, por ejemplo, las CTC. Asimismo, se ha descrito que el ADN contenido en los exosomas (exoDNA) presenta mayor sensibilidad y especificidad en la detección de alteraciones que el ctDNA, incluso se ha descrito que muestran superioridad a los biomarcadores convencionales basados en suero, como el antígeno carcinoembrionario, en cuanto a precisión diagnóstica. Sin embargo, una de las principales ventajas reside en la estabilidad conferida al ARN que portan en su interior. Por todo ello, los exosomas presentan un gran potencial como herramientas para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la evolución de los pacientes. Sin embargo, su traslación a la práctica clínica está limitada por la falta de un método de aislamiento estandarizado, que sea sencillo, eficiente y reproducible.

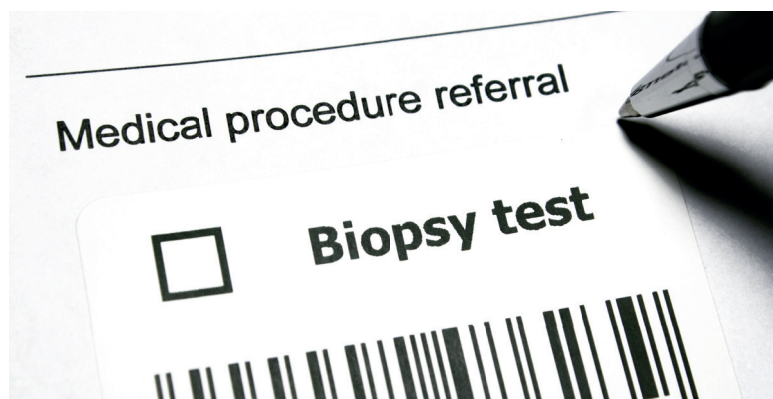
Actualmente las principales aplicaciones de los exosomas son como biomarcadores, sistemas de administración de fármacos, terapias y las vacunas contra el cáncer. Si realizamos una búsqueda en la base de datos de ensayos clínicos *Clinicaltrials.gov*, más del 50% de los mismos se centran en aplicaciones relacionadas con la búsqueda de biomarcadores exosomales.

Métodos de aislamiento de exosomas

Actualmente se emplean diferentes métodos de aislamiento de exosomas que presentan ventajas y limitaciones, considerándose la **ultracentrifugación diferencial (UC)** el método de referencia. Esta técnica se basa en la separación secuencial de partículas por sedimentación en función de su tamaño y densidad. Se trata de un método relativamente sencillo y económico, pero presenta la desventaja de que requiere grandes volúmenes iniciales de muestra y los exosomas recuperados suelen presentar contaminación por proteínas co-precipitadas. Además, la ultracentrifugadora es un equipamiento costoso y con grandes dimensiones que no está disponible en todas las instalaciones. Por ello, recientemente, esta técnica de aislamiento está dejando paso a otras tecnologías que consumen menos tiempo y son más accesibles.

El aislamiento por **inmunoafinidad** se basa en la presencia de proteínas de superficie o antígenos en la membrana de los exosomas. Se emplean anticuerpos que pueden estar unidos a diferentes soportes como placas de cultivo, beads magnéticas, sistemas de microfluidica, etc. Esta tecnología permite aislar exosomas a partir de pequeñas cantidades de muestra, pero tiene la limitación, añadida al coste, de aislar subpoblaciones de exosomas específicas, en función del anticuerpo empleado, lo que también lleva asociado un bajo rendimiento.

El aislamiento mediante **ultrafiltración (UF)** se basa en el uso de membranas semipermeables con rangos de poros específicos que descartan primero las partículas más



grandes y los exosomas se recuperan en un eluido. En este caso, el rendimiento es inferior al de la UC, los filtros pueden obstruirse y también se ha descrito la presencia de proteínas contaminantes.

La **cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)** está superando a otras técnicas de aislamiento de EVs por los tiempos de procesamiento necesarios. Sin embargo, el rendimiento de exosomas extraídos es bajo, por lo que se requiere un gran volumen de partida. Aísla las diferentes vesículas ya que se ralentizan al entrar en los poros del gel, y permite recoger las diferentes fracciones en los eluidos. Esta técnica puede preservar la estructura de las EVs mejor que la UC y la UF, sin embargo, no puede separarlas eficazmente de lipoproteínas o agregados proteicos de tamaño similar.

El empleo de los exosomas como herramienta de diagnóstico y seguimiento en clínica y en veterinaria presenta un futuro muy prometedor. En base a las ventajas de la LB en general y de las EVs, en particular, actualmente existen diferentes kits comerciales de aien Nexotech hemos desarrollado un kit comercial de purificación de EVs llamado ExoGAG. ExoGAG es un método rápido, tan sólo requiere 20 minutos, y sencillo, siendo necesaria una centrifugadora de laboratorio convencional, para aislar exosomas a partir de un pequeño volumen de muestra. La ventaja de esta tecnología es que el tipo y las características de la matriz no condicionan el rendimiento a la hora de aislar exosomas, pudiendo emplearse en muestras de plasma, suero y orina, pero también leche, saliva o medio de cultivo. Así mismo, una vez aislados los exosomas en formato pellet, el rendimiento y la calidad de los mismos permite llevar a multitud de aplicaciones posteriores para caracterizar su contenido, tanto a nivel proteico (ELISA, WesternBlott, citometría) como genético (qPCR, ddPCR, NGS). Se trata de una tecnología robusta y eficiente en el aislamiento de EVs, con un rendimiento óptimo para la aplicación clínica y veterinaria.