

APORTE ESTUDIANTIL**Exosomas: características y métodos de extracción****Oscar Mauricio Rodríguez Bohórquez**

Estudiante de Medicina, miembro del grupo de Inmunología y medicina traslacional (I&MT) - Facultad de Medicina- Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, Colombia.

omrodriguez@unal.edu.co

EXOSOMAS: CARACTERÍSTICAS Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**RESUMEN**

Las vesículas son estructuras compuestas por una bicapa lipídica que las separa del medio formando compartimentos anucleados. Se derivan de una membrana celular o un organelo intracelular. Son elementos importantes en numerosos procesos celulares internos y externos (1). Su rol en la comunicación celular es motivo de ardua investigación pues son potenciales biomarcadores y estrategias terapéuticas. El objetivo de este escrito es comentar brevemente la nomenclatura actual, hitos históricos, características y principales métodos de extracción de los exosomas con el fin de divulgar su complejidad estructural y la manera en la que se estudian en un laboratorio.

Palabras clave: Membrana celular; bicapa; exosoma; ectosoma; endosoma; cuerpo apoptótico

SUMMARY

Vesicles are structures composed of a lipid bilayer that separates them from the medium forming anucleated compartments. They are derived from a cell membrane or an intracellular organelle. They are important elements in numerous internal and external cellular processes (1). Their role in cellular communication is the subject of arduous research as they are potential biomarkers and therapeutic strategies. The aim of this paper is to briefly comment on the current nomenclature, historical milestones, characteristics and main methods of extraction of exosomes in order to disclose their structural complexity and the way in which they are studied in a laboratory.

Keywords: Cell membrane; bilayer; exosome; ectosoma; endosome; apoptotic body

CARACTERÍSTICAS DE LOS EXOSOMAS

Las vesículas son estructuras compuestas por una bicapa lipídica que las separa del medio formando compartimentos anucleados (Figura No. 1a). Se derivan de una membrana celular o un organelo intracelular. Son elementos importantes en numerosos procesos celulares internos y externos (1). Su rol en la comunicación

celular es motivo de ardua investigación pues son potenciales biomarcadores y estrategias terapéuticas; especialmente las vesículas extracelulares denominadas exosomas han venido recibiendo mayor atención en la última década. Por todo esto han sido denominadas “organelos extracelulares” (2).

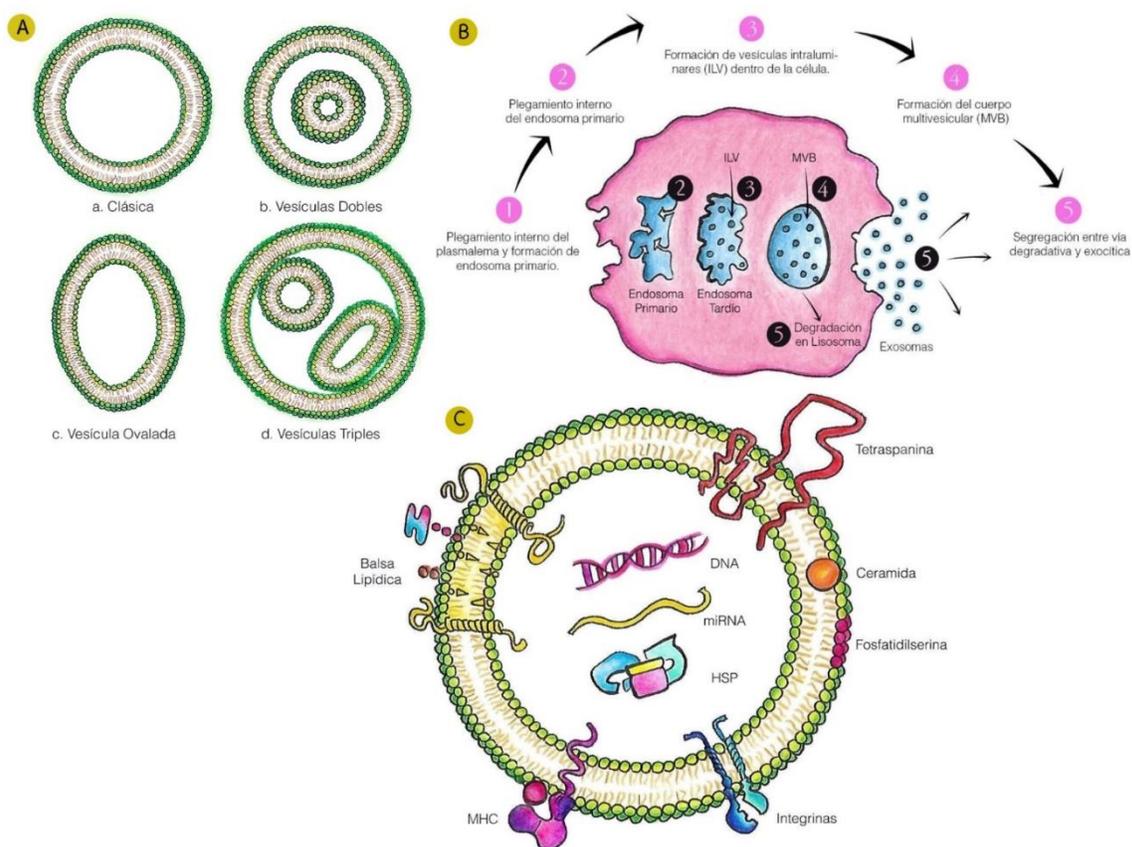


Figura No. 1. A. Formas de vesículas extracelulares B. Vía molecular de formación de exosomas C. Ejemplo de exosoma. (Elaboración propia)

La nomenclatura de estas vesículas ha sido motivo de confusión, pues inicialmente se llamaban según el tipo celular que las creaba y del tipo de fluido del cual solían extraerse, así, solían llamarse prostosomas si provenían del líquido seminal, cardiosomas si las producía los cardiomiocitos, dexosomas si por su parte eran extraídas de células dendríticas y así sucesivamente. Posteriormente se clasificaron en los tres tipos que hoy son mayormente aceptados (3).

Existen tres tipos de vesículas extracelulares. i) Exosomas, ii) Ectosomas y iii) Cuerpos apoptóticos. Su diferencia principal radica en su mecanismo de biogénesis y la composición de su membrana lipídica. Los exosomas son microvesículas de 30 a 150 nm de diámetro y son secretadas al exterior por una variedad de células como lo son las de origen tumoral, epitelial, hematopoyético e incluso por plaquetas. Estos se originan mediante la formación de endosomas primarios que al plegarse formando vesículas crean una estructura de transición llamada cuerpo multivesicular (MVB, por sus siglas en inglés) dentro de un endosoma tardío. Los MVB pueden tomar dos caminos, el de la degradación lisosomal o el de la exocitosis de la célula, si toman esta última vía se producirán los exosomas (Figura 1b). Por su parte, los ectosomas y cuerpos apoptóticos se derivan directamente de la membrana

plasmática y no a través de la formación de endosomas (3).

La historia de la investigación con exosomas tuvo 3 momentos determinantes. En un primer momento los grupos de Harding y Johnstone acuñan el término exosomas al describir su proceso de biogénesis a través de un modelo experimental con reticulocitos en 1983 (4,5). Después, en 1996, el grupo de Raposo demostró el papel inmunomodulador de los exosomas al aislar lo que ella llamó vesículas presentadoras de antígeno (6). Finalmente, en 2006 y 2007, los grupos de Ratajczak y Lötvall evidenciaron la función reguladora de los exosomas al encontrar mRNA y miRNA dentro de ellos (7,8).

Estas vesículas comparten varias características constitutivas de su “membrana madre”, es decir, la membrana plasmática de la célula de la cual se derivan (Figura No. 1c). Contienen elementos reguladores de la expresión genética y el comportamiento celular. Proteínas, lípidos y carbohidratos influyen en su destino (9). Algunas de estas proteínas son necesarias para su biogénesis desde que se forman los MVB hasta su vía exocítica. Entre las proteínas constitutivas se encuentran anexinas, integrinas, proteínas de choque térmico, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y tetraspaninas, unas proteínas de cuatro dominios

transmembrana como CD9, CD63, CD81 y CD82 son las más abundantes en los exosomas y están involucradas en procesos de señalización, adhesión celular y movilidad. Los lípidos de un exosoma son bastante similares a los de la membrana celular, así como ellas, estos contienen colesterol, esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y en una cantidad importante tienen ceramida, la cual está involucrada en el transporte de los dominios asociados a exosomas dentro del endosoma. Sin embargo, los lípidos de un exosoma pierden la asimetría lipídica establecida en

sus membranas madre, es decir que lípidos como la fosfatidilserina que son marcadores de señalización importantes de apoptosis en una célula al trasladarse de la cara interna a la externa en el caso de los exosomas, no cumplen esta función por lo que este lípido en particular, solo se encuentra en la membrana externa. Por otro lado la composición de carbohidratos está en mayor medida determinada por la glicosilación de proteínas, pues esta impacta directamente el transporte de las vesículas. Se destacan una composición alta en manosa, polilactosamina, ácido siálico y N-glicosilaciones en diversas proteínas (9).

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Para realizar la extracción de microvesículas del plasma sanguíneo y otros fluidos se pueden utilizar una variedad de técnicas, la utilización de una de ellas y no de otra, dependerá de las características de la muestra y de las herramientas de que se disponga pues no existe aún un consenso que establezca cuál es el mejor protocolo de aislamiento (1). También es posible que una técnica se realice después de otra, con el fin de obtener una muestra más pura. Algunas de las técnicas más utilizadas son la ultracentrifugación diferencial, la centrifugación por gradiente de densidad, la cromatografía por exclusión de tamaño y la captura por inmunoafinidad (9) (Figura No. 2).

La ultracentrifugación diferencial forma precipitados al aumentar la fuerza

centrífuga, estos son secuencialmente separados para una centrifugación subsecuente hasta obtener las partículas deseadas. En este caso, la elección del rotor a utilizar para realizar la centrifugación depende del tipo de experimento, pues las configuraciones para lograr un resultado similar son distintas según el rotor y deben ser acomodadas para obtener resultados óptimos (10) (Figura No. 2 A). La centrifugación por gradiente de densidad afecta la viscosidad de la solución (Figura No. 2 B) y puede ser de dos tipos: (i) Centrifugación zonal en la que el tamaño y la masa de las partículas son los determinantes de su separación y el tiempo las afecta; (ii) Centrifugación isopícnica, en la que la equivalencia de densidad de las partículas y el medio constituyen el principio de su separación,

en este caso el tiempo no es un factor relevante.

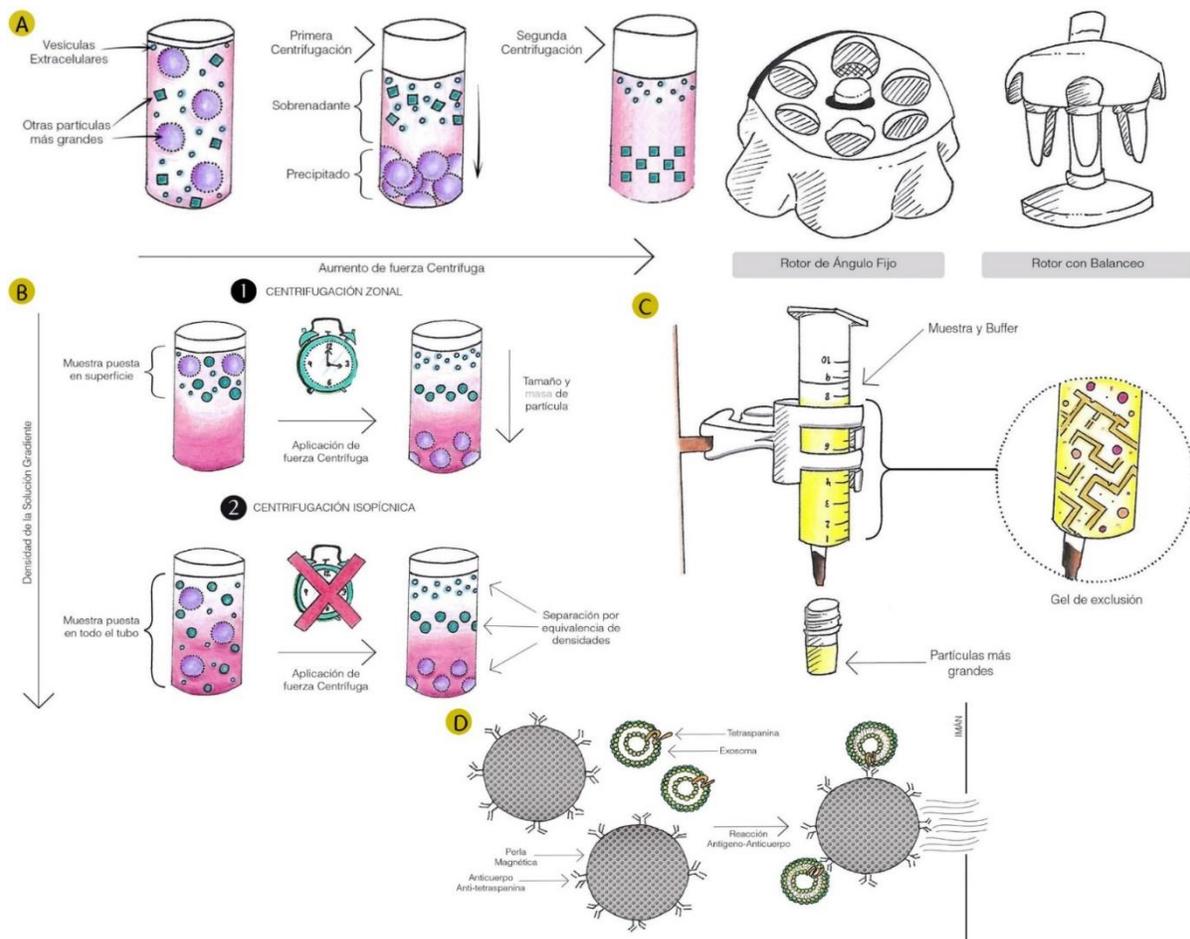


Figura No. 2. Métodos de aislamiento de vesículas extracelulares: A. Ultracentrifugación diferencial B. Centrifugación por gradiente de densidad C. Cromatografía por exclusión de tamaño y D. Captura por inmunoafinidad. (Elaboración propia)

La cromatografía por exclusión de tamaño se realiza con un gel poroso, en cuyos poros las partículas pueden o no entrar según su tamaño, aumentando o disminuyendo el área que deben atravesar para salir de la solución (Figura No. 2 C).

La captura por inmunoafinidad se basa en la interacción antígeno - anticuerpo, las perlas magnéticas son un método de inmunoprecipitación, están compuestas por nanopartículas magnéticas que son atraídas por un imán y tienen anticuerpos

anclados que reconocen tetraspaninas (Figura No. 2 D).

AGRADECIMIENTOS

De manera especial a Maria de los Ángeles Mendoza Carvajal, estudiante de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por la ayuda en el diseño y diagramación de las figuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Jose Alcaraz M, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Journal of Extracellular Vesicles 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.
2. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010 Sep;73(10):1907–20.
3. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr 17;19(4):213–28.
4. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983 Aug;97(2):329–39.
5. Pan BT, Johnstone RM, Singer SJ, Newman R, Kemshead J, Greaves M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul;33(3):967–78.
6. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding C V, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):1161–72.
7. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May 2;20(5):847–56.

8. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun 7;9(6):654–9.
 9. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019 Jul 15;8(7):727.
 10. Cvjetkovic A, Lotvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014 Jan 25;3(1):23111.
-