

Exosomas derivados de biopsia líquida y su potencial aplicación en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer.

Liquid biopsy derived exosomes and their potential application in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer.

Resumen:

Los exosomas son micro vesículas extracelulares secretadas por las células que han cobrado gran importancia por su potencial aplicación en la clínica para la identificación de nuevos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer, o para determinar su potencial aplicación terapéutica. Dado que estas vesículas se encuentran de forma natural en fluidos corporales tales como sangre, orina o saliva, es posible aislarlas a partir de una biopsia líquida para analizar su contenido, dilucidar su interacción con diferentes poblaciones celulares (crosstalk) y determinar su efecto durante el desarrollo de una patología particular. En esta revisión abordamos los últimos hallazgos relacionados con el diseño y la aplicación de terapias que emplean vesículas extracelulares, particularmente exosomas, para el tratamiento del cáncer o como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la enfermedad.

Abstract

Exosomes are extracellular micro-vesicles secreted by all cell types that have become of high-priority due to their potential clinical application for identification of new biomarkers for diagnosis, prognosis, and monitoring of neuro degenerative diseases and cancer and also, to determine their potential therapeutic application. Since these vesicles are found naturally in body fluids such as blood, urine, or saliva, it is possible to isolate them from a liquid biopsy to analyze their content, elucidate their interaction with different cell populations (crosstalk), and determine its effect during the development of particular pathologies. In this review we address the latest findings related to the design and application of extracellular vesicle-based therapies, particularly exosomes, for the treatment of cancer or as biomarkers for diagnosis, prognosis, or monitoring of diseases.

Palabras clave: Cáncer, biopsia líquida, exosomas, biomarcadores y terapia del cáncer.

Keywords: Cancer, liquid biopsy, exosomes, biomarkers and cancer therapy.

Introducción:

Los exosomas son vesículas intraluminales liberadas por las células nucleadas al espacio extracelular tras la fusión del cuerpo multi vesicular (MVB), con la membrana plasmática. Su tamaño varía entre 30 y 150 nanómetros de diámetro (1) y una vez en el espacio extracelular, los exosomas se distribuyen por todo el organismo y pueden aislarse a partir de una biopsia líquida (2) que constituye una estrategia de muestreo importante por su potencial diagnóstico para el cáncer, que surge como una alternativa a la biopsia tisular, que es la prueba de oro para su diagnóstico.

La toma de una biopsia tisular además de ser invasiva es incómoda para el paciente, puede generar efectos adversos y no permite evaluar la heterogeneidad tumoral ni su dispersión a otros tejidos del cuerpo. Los exosomas contenidos en las biopsias líquidas se consideran un material valioso para identificar biomarcadores de diferentes patologías, particularmente en cáncer (tabla1), porque se ha demostrado que las células tumorales producen una mayor cantidad de exosomas en comparación con las células sanas y que hay grandes diferencias en la composición y función de los exosomas dependiendo de la estirpe celular de la cual provienen o del estado fisiológico del individuo (3). Por lo anterior, en este artículo se revisará la composición de los diferentes fluidos corporales que pueden ser útiles como biopsia líquida para la obtención de exosomas, y sus posibles aplicaciones en la clínica para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer o para la administración de terapias antitumorales.

La búsqueda de literatura se realizó en las siguientes bases de datos: PubMed-NCBI, Elsevier, ExoCarta, Clinical Trials Database y Science direct, y se filtró empleando las palabras clave: Cancer, liquid biopsy, exosomes, biomarkers and cancer therapy. Se revisaron 50 artículos relacionados con el tema, publicados durante los últimos 10 años. Adicionalmente se revisaron otros 9 seleccionados de las referencias contenidas en estos artículos con el fin de aclarar algunos temas. En total se revisaron 59 referencias

Biopsia Líquida:

El término biopsia líquida se refiere al análisis de biomarcadores presentes en sangre u otro fluido biológico como orina, plasma, saliva, suero, líquido amniótico, leche materna, semen, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo (Fig. 1) (4–6). Numerosos estudios han determinado su utilidad clínica para el diagnóstico temprano del cáncer, la administración de terapias dirigidas y el monitoreo no invasivo y en tiempo real para obtener información relacionada con la evolución de la neoplasia. La biopsia líquida, combinada con la citología, la inmunquímica y la secuenciación de próxima generación, es un enfoque útil para proporcionar información diagnóstica y terapéutica en ciertos casos raros de cáncer que son difíciles de diagnosticar, como el caso de una metástasis a la falange del índice derecho, como manifestación inicial de un adenocarcinoma de pulmón, en una mujer de 69 años, que fue reportado por Clery y colaboradores (7).

La sangre periférica es, hasta el momento, la biopsia líquida más utilizada para analizar diversos componentes tumorales. Durante el desarrollo tumoral las células adquieren ocho capacidades biológicas que incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la adquisición de inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y metástasis, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmune. Adicionalmente, el reclutamiento de células, aparentemente normales, que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos al crear el "microambiente tumoral" agregan otro nivel de

complejidad a la biología tumoral (8). El reconocimiento de estos conceptos permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para tratar el cáncer humano.

De las capacidades adquiridas por las células tumorales, la activación de la invasión y metástasis constituyen el principal mecanismo utilizado por el tumor para desprenderse del sitio primario e ir a colonizar lugares distantes por vía sanguínea. Diferentes componentes tumorales (células tumorales circulantes (CTCs), micro vesículas, apoptosomas, exosomas, ácidos nucleicos (DNAs tumorales circulantes (ctDNAs), DNA extracelular de 134–144 pb (cfDNA), y microRNAs (miRNAs)) (Fig 2) circulan en la sangre y tienen utilidad como biomarcadores y/o dianas moleculares (9). La detección de células tumorales circulantes podría aplicarse al diagnóstico temprano del cáncer, puesto que numerosos estudios han demostrado que las metástasis pueden ocurrir en estadios tempranos del desarrollo tumoral, demostrando la utilidad de la sangre como biopsia líquida para el diagnóstico oportuno del cáncer (10).

Joosse y Pantel en 2015 monitorearon en tiempo real los cambios en las células y los productos celulares liberados por los tumores en la sangre y encontraron que aunque las plaquetas educadas por el tumor pueden proporcionar información específica sobre la ubicación y composición molecular del tumor primario y pueden contener fragmentos de RNA tumoral que favorecen el crecimiento y la diseminación tumoral éstas no son muy utilizadas para estudios de detección de RNAs tumorales porque el RNA de plaquetas se puede alterar por factores como la inflamación (11) y adicionalmente, hay más RNA tumoral en los exosomas que en las plaquetas (12).

Aunque la sangre ha sido la biopsia líquida más estudiada para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades, en la actualidad el análisis de otros fluidos ha cobrado gran interés para el diagnóstico de enfermedades complejas como el cáncer. La saliva está siendo objeto de muchos estudios para la identificación de biomarcadores porque comprende las secreciones, suministradas por la sangre, en las glándulas salivales mayores y menores. De ella se pueden aislar DNA, RNA, proteínas y todos los metabolitos presentes en la sangre además de los presentes en el microbioma. Por otro lado, la recolección de las muestras de saliva y su procesamiento es simple, y una ventaja que tiene la saliva sobre la sangre es que no se coagula (13).

El exosoma salival posee mucha información clínicamente relevante. Una vez que los exosomas derivados de cáncer entran en la circulación, alcanzan las glándulas salivales por endocitosis o por fusión de membrana y son arrojados en la saliva, donde pueden ser recolectados como una muestra con gran potencial para la búsqueda de biomarcadores tumorales (5,14). Kazuya et al demostraron que los exosomas salivales tienen un menor tamaño y mayor densidad que los aislados a partir de sobrenadante de una línea celular de adenocarcinoma de colon humano, por lo que se sugiere que los exosomas de saliva pueden proporcionar más información que otros componentes tumorales presentes en la saliva con potencial para su uso en el diagnóstico temprano del cáncer (15). Los exosomas aislados de saliva contienen varios tipos de RNA, como pseudogenes y grandes repertorios de RNA pequeños que pueden mediar la comunicación intercelular al transferirlos a las

células diana como reguladores de la expresión génica (16). Se han descrito otros tipos de biomarcadores RNA útiles para el diagnóstico de tipos específicos de cáncer como el oral, esofágico, gástrico (17) pulmonar, pancreático, de mama o de ovario (5).

Por otra parte, al igual que como ocurre con la saliva, la obtención de una muestra de orina no es invasiva y tiene gran potencial para la detección temprana, seguimiento de recurrencia, metástasis y eficacia terapéutica en cáncer no urológico. Aunque en comparación con la biopsia líquida a base de sangre, el análisis de la orina en este contexto todavía se encuentra en etapas tempranas, estudios recientes han demostrado el valor de la orina como biopsia líquida y se espera un mayor desarrollo de este tipo de muestra como alternativa a la biopsia basada en sangre. (18). En un estudio donde se analizó el contenido de miRNAs en exosomas provenientes de la orina en búsqueda de biomarcadores para la detección temprana del cáncer de endometrio, se concluyó que los exosomas aislados de orina poseen una firma de miRNA que los hace únicos. Además, se aíslan con éxito, por lo que son una fuente potencial de biomarcadores tumorales (19). Sin embargo, Elsharkawi y colaboradores encontraron un incremento significativo en la cantidad de exosomas presentes en suero y orina de pacientes con cáncer de vejiga en comparación con los controles sanos. Este incremento fue progresivo durante el curso de la enfermedad y se asoció con la invasión tumoral (20).

Otras biopsias líquidas con potencial para la identificación de biomarcadores tumorales son el fluido seminal debido a que su alta concentración de cfDNA, es mayor que la obtenida a partir de otros fluidos como la sangre o la orina de pacientes con cáncer de próstata, y a la facilidad con que se puede aislar el DNA a partir de este tipo de muestra, lo que sugiere que el fluido seminal puede ser la muestra ideal para el diagnóstico temprano del cáncer de próstata (21) y el líquido cefalorraquídeo (LCR), un fluido biológico incoloro producido en el cerebro por células especializadas que está en contacto directo con el sistema nervioso central (SNC) que tiene un uso potencial como biopsia líquida porque al igual que la muestra de sangre, contiene material biológico circulante útil para perfilar biomarcadores tales como ácidos nucleicos libres de células (cfDNA y miRNA), proteínas, vesículas extracelulares y células tumorales circulantes de pacientes con tumores cerebrales como el glioblastoma o con tumores que han hecho metástasis al cerebro (22).

Huang y colaboradores detectaron una mutación en el gen de la histona 3 (H3) en LCR de niños con tumores cerebrales, incluido el glioma difuso, que se asocia con una rápida evolución y propagación de la enfermedad. Dada la sensibilidad y especificidad del LCR se ha propuesto como biopsia líquida para complementar el diagnóstico de glioma en la biopsia tisular. A futuro el LCR podría proponerse incluso como alternativa a la biopsia de tejido, dado su valor para la estadificación de la enfermedad, para orientar el tratamiento con terapias dirigidas o para realizar el monitoreo de la respuesta al tratamiento (23), entre otras aplicaciones. Cabe anotar que la toma de la muestra de LCR, es un procedimiento que se realiza en pacientes con leucemias y con otros tumores cerebrales incluyendo el glioblastoma

(24), y se realiza mediante punción lumbar, un procedimiento invasivo e incómodo para el paciente que puede generar efectos adversos en algunos casos (25).

Lo anteriormente expuesto resalta la potencial utilidad clínica de la biopsia líquida para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, como prueba de tamizaje o como base para desarrollar terapias alternativas utilizando los exosomas como vehículos moleculares para la entrega de fármacos (26).

Biogénesis de los exosomas:

La biogénesis de los exosomas está mediada por la vía endosoma-lisosoma, que es un sistema de endomembranas presente en las células eucariotas. Se originan a partir de una invaginación de la membrana plasmática que da origen a un endosoma temprano, el cual madura para formar cuerpos multivesiculares (MVBs) cargados de vesículas intraluminales (ILVs), que son secretadas como exosomas al espacio extracelular por fusión del MVB con la membrana plasmática

Los exosomas, a diferencia de otros tipos de micro vesículas como los cuerpos apoptóticos (derivados de células que están muriendo por apoptosis) o los ectosomas (originados por la evaginación de la membrana plasmática), son vesículas intraluminales (ILV) liberadas por las células nucleadas al espacio extracelular tras la fusión del cuerpo multivesicular (MVB), con la membrana plasmática (fig. 3). A pesar de que estos tres tipos de vesículas tienen aproximadamente el mismo tamaño (30–150 nm de diámetro) y contienen una porción de citoplasma en su interior, son diferentes entre sí y desempeñan funciones no relacionadas que deben ser bien entendidas para definir las metodologías adecuadas para el desarrollo de sus posibles aplicaciones clínicas (27). Los exosomas están conformados por una serie de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes del citoplasma de la célula de la cual provienen, englobados en una bicapa lipídica. En condiciones fisiológicas, están presentes en todos los tejidos del cuerpo (28).

En general, sus componentes moleculares son los que constituyen una célula: ácidos nucleicos como RNAs (microRNA, RNAm, circRNAs etc), DNA y proteínas (29). Se ha descrito que expresan proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), integrinas, tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82), proteínas del antígeno de los leucocitos humanos (HLA-II), moléculas de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), ALIX, CD9, y TSG-101. Varias de estas proteínas son utilizadas como marcadores para su identificación o aislamiento (30). En condiciones fisiológicas, la capacidad que tienen los exosomas para fusionarse con las membranas celulares hace que desempeñen un papel fundamental en la comunicación intercelular y les permite atravesar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere uso potencial como vehículo para la administración de fármacos en lugares de difícil acceso como el cerebro (31).

Tauro y colaboradores en 2012 demostraron que los exosomas derivados de células tumorales contienen parte del genoma, transcriptoma y secretoma del tumor por lo que pueden transportar oncoproteínas, proteínas supresoras de tumores,

reguladores de la transcripción, y diferentes especies de RNAs (32) y DNAs, que pueden proporcionar información referente al origen de las células tumorales (33). En general favorecen el desarrollo y crecimiento tumoral, por su capacidad de fundirse con las membranas celulares para reprogramar las células hacia un fenotipo particular que puede ser angiogénico, de resistencia a la terapia o de evasión de la respuesta inmune antitumoral entre otros. (34)

Aislamiento y purificación de exosomas:

Uno de los prerequisites para la aplicación clínica de los exosomas es la estandarización de un proceso de aislamiento que sea escalable, reproducible y robusto para obtener un buen rendimiento de exosomas de alta pureza (35) Dado que éstos son secretados por casi todos los tipos celulares, su producción a gran escala para uso terapéutico constituye un desafío. El proceso para obtenerlos implica la expansión de la línea celular donante para recolectar grandes cantidades de medio de cultivo y realizar el adecuado aislamiento de estas estructuras membranosas mediante la aplicación de diferentes técnicas que dependen de la muestra, su aplicación y los recursos tecnológicos disponibles. Por otra parte, el aislamiento de exosomas adecuados para aplicaciones posteriores implica el uso de técnicas costosas que requieren equipos sofisticados y especializados (36).

A la fecha, las técnicas más utilizadas para la separación de exosomas son la centrifugación diferencial, la ultra centrifugación seguida de precipitación isoeléctrica, y la purificación por inmovinoafinidad. La centrifugación diferencial (37) fundamentada en la remoción de diferentes impurezas mediante ciclos de centrifugación iniciando a baja velocidad (elimina células), seguido por ultra centrifugación (precipita exosomas) y terminando con una nueva ultra centrifugación, esta vez con PBS (lavado y remoción de proteínas). Esta técnica permite separar, por tamaño y densidad los exosomas de otras vesículas, pues en general las micro vesículas precipitan a 20.000g y los cuerpos apoptóticos a 16.000g (38) mientras que los exosomas precipitan de los 100.000g a los 120.000g, lo que permite diseñar protocolos específicos para la población de vesículas que se desee estudiar. Sin embargo, la diferencia de tamaño y densidad de las micro vesículas es tan pequeña, que se dificulta el establecimiento de los ciclos y velocidades de centrifugación óptimos para separar de manera efectiva las micro vesículas de los cuerpos apoptóticos. Por otra parte, a menudo los exosomas así obtenidos no sirven para llevar a cabo estudios funcionales posteriores.(39)

La ultra centrifugación seguida por precipitación isoeléctrica (IP) es una técnica, rápida y efectiva para obtener exosomas de mejor calidad que los aislados por centrifugación diferencial y que ha demostrado ser efectiva para obtener exosomas a partir de leche porque permite eliminar las caseínas (40). La ultrafiltración, es más rápida que la centrifugación diferencial y no requiere de equipo especial (41), sin embargo, su mayor desventaja es que tanto los fluidos corporales como los medios de cultivo celulares poseen una gran variedad de nanopartículas con el mismo tamaño de los exosomas, lo que dificulta su adecuada separación. Adicionalmente, implica el uso de reactivos costosos libres de partículas (42).

La purificación por inmunofinidad podría ser la técnica de elección para el aislamiento de exosomas a partir de muestras heterogéneas como plasma, suero y orina, porque utiliza anticuerpos inmovilizados que reconocen proteínas como CD63, CD81, CD82, CD9, Alix, anexina, EpCAM y Rab5 que pueden ser utilizados de manera individual o en combinación, para separar los exosomas. Los anticuerpos pueden unirse de manera covalente a soportes tales como las perlas magnéticas y matrices de cromatografía. Sin embargo, esta metodología debe ser validada para determinar si es útil para la separación específica de los exosomas. Es importante considerar el tipo de exosomas que se quieren aislar, para elegir el anticuerpo más adecuado, ya que se ha demostrado que, aunque el uso de anti-CD63 es útil para aislar exosomas, esta proteína no es específica de las vesículas extracelulares tumorales y algunos cánceres secretan vesículas con baja expresión de CD63. Otros marcadores de exosomas son Rab GTPasa, anexinas, SNARE, Alix y flotillin7 Tsg101, tetraspaninas, CD63 y CD81(43).

Recientes avances tecnológicos han permitido el desarrollo de una plataforma basada en microfluidos para aislar exosomas circulantes directamente del suero sanguíneo. Estas plataformas permiten la captura y cuantificación simultáneas de exosomas en un solo dispositivo novedoso, simple y de bajo costo, que permite obtener una mejor tasa de recuperación y requiere un menor tiempo de procesamiento que el necesario para la ultra centrifugación. El dispositivo de microfluidos es fabricado en polidimetilsiloxano (PDMS) y funciona mediante el uso de anticuerpos contra CD63 que se encuentra comúnmente sobre expresado en exosomas, sin embargo, como se mencionó anteriormente, muchos tumores producen exosomas con baja expresión de DC63, por lo cual esta técnica no sería muy adecuada para aislar exosomas provenientes de tumor a menos que se utilice un anticuerpo diferente para utilizar en el dispositivo. Dado que se ha demostrado que la fosfatidilserina (PS), se expresa en la superficie externa de las vesículas extracelulares derivadas de células tumorales, se diseñó otro dispositivo microfluídico para el aislamiento de exosomas derivados de tumor a partir de una muestra de plasma con el que se logró una eficiencia de captura del 90% para exosomas de células tumorales en comparación con el 38% para los exosomas de células normales. Adicionalmente, se aísla un 35% más de exosomas derivados de la línea celular de cáncer de pulmón A549 que con el dispositivo conjugado con anti-CD63, facilitando el aislamiento de un tipo específico de exosomas (44).

Otra técnica muy eficaz para purificar y aislar exosomas intactos es la separación magnética, que es más eficaz que las metodologías convencionales utilizadas para la separación de exosomas, porque con este método, las vesículas extracelulares son capturadas por iones y proteínas de unión a fosfatidilserina y posteriormente se extraen con un reactivo quelante. Con esta metodología se obtienen exosomas que pueden utilizarse en futuras aplicaciones (45).

Carga del medicamento (Endógeno y Exógeno)

Los exosomas tumorales tienen la capacidad de reclutar y activar células inmunes que generan un microambiente inmunosupresor, jugando un papel importante en la patogénesis y progresión del cáncer y en el desarrollo de resistencia a múltiples

fármacos antitumorales (46). Los macrófagos asociados al tumor pueden favorecer el desarrollo de un microambiente tumoral inmunosupresor con diversos fenotipos dentro de la misma masa tumoral: zonas con alta proliferación celular, o angiogénesis e invasión, dependiendo del perfil de secreción de proteasas, citoquinas y factores de crecimiento de las células inmunes reclutadas por el tumor (47).

Sin embargo, a pesar del papel de los exosomas en la progresión del cáncer (48) y teniendo en cuenta su participación en la comunicación intercelular mediante la entrega de moléculas producidas por el tumor durante su desarrollo, se han adelantado estudios para determinar su potencial aplicación clínica por su capacidad de proporcionar información relacionada con el estado y evolución del tumor, apoyando el diagnóstico temprano, permitiendo realizar un seguimiento de la respuesta a los tratamientos e incluso a futuro, facilitando el transporte de fármacos a sitios específicos. Existe suficiente evidencia sobre la capacidad de los exosomas para actuar como vehículos en la administración de terapias dirigidas que incluyen el transporte de proteínas, ácidos nucleicos o medicamentos contra el cáncer (49). La tabla 1 presenta algunos de los estudios clínicos que están en curso con el uso de exosomas como alternativa terapéutica en distintos tipos de cáncer

La potencial aplicación teranóstica (terapéutica + diagnóstica) de los exosomas para el manejo clínico de las enfermedades se debe a su asombrosa capacidad para transportar y entregar carga celular del donante (biomoléculas) a las células diana (fig. 4). Pueden unirse a ellas mediante proteínas de adhesión celular y ligandos como las tetraspaninas o la integrina CD11b/CD18, para entregar su carga a las células diana (50,51). Por otra parte, tienen un tropismo celular específico, dependiendo de sus características y origen, por lo que podrían dirigirse a tejidos y órganos enfermos(52). Además, expresan en su membrana proteínas específicas del tipo celular del que derivan, lo que les confiere la propiedad de selectividad autodirigida (53). Adicionalmente, la membrana lipídica del exosoma protege al fármaco de su degradación en el medio extracelular (54), o de su destrucción por parte de los fagocitos mononucleares de sangre periférica que actúan como un manto invisible para el transporte de nanopartículas sintéticas fácilmente degradables en circulación y que pueden ser tóxicas para el organismo (55).

A la fecha se han descrito dos metodologías útiles para cargar moléculas en exosomas: i) Incorporación endógena, induciendo la sobreexpresión del ácido nucleico o proteína en las células donantes para generar exosomas precargados enriquecidos con el componente de interés terapéutico y ii), incorporación exógena del fármaco, mediante la carga directa de los exosomas con ácidos nucleicos y pequeñas moléculas utilizando métodos como la transfección química, la electroporación y la sonicación e incubación, de acuerdo al componente terapéutico que se espera cargar en los exosomas. Sin embargo, un aspecto muy importante que debe tenerse en cuenta es que en general, las células de mamíferos liberan pequeñas cantidades de exosomas y que su purificación es difícil, por lo cual se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la producción en gran escala de estas micro vesículas. Zhu et al, proponen una estrategia mediante la extrusión de células NK a través de filtros con tamaños de poros progresivamente

más pequeños para obtener miméticos de exosomas (NK-EM) cuya morfología similar a exosomas se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión, seguimiento de nanopartículas y Western blot. Por otra parte, su efecto antitumoral se evaluó mediante ensayos de citotoxicidad In vitro contra líneas celulares tumorales como glioblastoma, mama, tiroides e hígado, utilizando imágenes de bioluminiscencia y el Kit para conteo celular, Cell Counting Kit – 8 (CCK-8) (31).

Aplicaciones de los exosomas.

Las aplicaciones de los exosomas no se limitan a su uso como fuente de biomarcadores para diferentes enfermedades ya que está demostrado su enorme potencial en la clínica no sólo para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la enfermedad, sino que pueden ser eficientes para la terapia del cáncer por las características antes mencionadas. El hecho de que los exosomas puedan ser cargados de manera endógena o exógena les confiere una gran versatilidad para su uso terapéutico.

Se ha propuesto el uso de exosomas derivados de células del sistema inmune para potenciar la respuesta inmune puesto que dependiendo de su fuente celular los exosomas pueden inducir apoptosis de células tumorales e inhibir el crecimiento tumoral (31,56), inducir la secreción de altos niveles de citocinas como IL-2 e IFN- γ , aumentar la producción de IgG2a y la activación de células T (57), para inhibir el crecimiento tumoral (58). A diferencia de las vacunas tradicionales, los exosomas son fácilmente accesibles, no-tóxicos y dependiendo de las metodologías empleadas para su aplicación podrían ser económicos, por lo que podrían tener un gran potencial como alternativa terapéutica (59) (fig. 4).

Por otra parte, es necesario desarrollar nuevas metodologías que permitan su aislamiento de manera rápida y eficaz para poder usarse en aplicaciones clínicas oportunas como soporte para el manejo de la enfermedad. El análisis clínico de exosomas y otros biomarcadores no invasivos en biopsia líquida, podría ser una estrategia eficaz para identificar marcadores de desarrollo y progresión de tumores y otras enfermedades, para encontrar alternativas que permitan la entrega de medicamentos de manera órgano específica o para el análisis de resistencia a antibióticos, entre otras aplicaciones clínicas.

Bibliografía

1. Quek C, Hill AF. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Feb;483(4):1178–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16315571>
2. Cui S, Cheng Z, Qin W, Jiang L. Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2018 Feb;116:46–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169500217306190>
3. Ilić M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl*

- Lung Cancer Res [Internet]. 2016 Aug;5(4):420–3. Available from: <http://tlcr.amegroups.com/article/view/8950/8064>
4. Fontanilles M, Duran-Peña A, Idbaih A. Liquid Biopsy in Primary Brain Tumors: Looking for Stardust! *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2018 Mar 9;18(3):13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11910-018-0820-z>
 5. Cheng J, Nonaka T, Wong D. Salivary Exosomes as Nanocarriers for Cancer Biomarker Delivery. *Materials (Basel)* [Internet]. 2019 Feb 21;12(4):654. Available from: <http://www.mdpi.com/1996-1944/12/4/654>
 6. Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Battelli N. Urinary Markers in Bladder Cancer: An Update. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Sep 7;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00362/full>
 7. Clery E, Pisapia P, Migliatico I, Pepe F, De Luca C, Russo M, et al. Cytology meets next generation sequencing and liquid biopsy: A case of lung adenocarcinoma presenting as metastasis to the phalanx. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2020 Aug 22;48(8):759–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dc.24438>
 8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar;144(5):646–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>
 9. Lu Y-T, Delijani K, Mecum A, Goldkorn A. Current status of liquid biopsies for the detection and management of prostate cancer. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2019 Jun;Volume 11:5271–91. Available from: <https://www.dovepress.com/current-status-of-liquid-biopsies-for-the-detection-and-management-of-peer-reviewed-article-CMAR>
 10. Hu Y, Yu X, Xu G, Liu S. Metastasis: an early event in cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017 May 29;143(5):745–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00432-016-2279-0>
 11. Joosse SA, Pantel K. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. *Cancer Cell* [Internet]. 2015 Nov;28(5):552–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610815003840>
 12. Brinkman K, Meyer L, Bickel A, Enderle D, Berking C, Skog J, et al. Extracellular vesicles from plasma have higher tumour RNA fraction than platelets. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2020 Jan 1;9(1):1741176. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2020.1741176>
 13. Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *J Dent Res* [Internet]. 2018 Jun 7;97(6):701–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034518762071>
 14. Lousada-Fernandez F, Rapado-Gonzalez O, Lopez-Cedrun J-L, Lopez-Lopez R, Muínelo-Romay L, Suarez-Cunqueiro M. Liquid Biopsy in Oral Cancer. *Int*

- J Mol Sci [Internet]. 2018 Jun 8;19(6):1704. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1704>
15. Iwai K, Minamisawa T, Suga K, Yajima Y, Shiba K. Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2016 Jan 17;5(1):30829. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.30829>
 16. Ogawa Y, Tsujimoto M, Yanoshita R. Next-Generation Sequencing of Protein-Coding and Long Non-protein-Coding RNAs in Two Types of Exosomes Derived from Human Whole Saliva. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2016;39(9):1496–507. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/9/39_b16-00297/_article
 17. Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM, et al. Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags Quantification for Gastric Cancer Detection. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb 25;6(1):22165. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep22165>
 18. Jain S, Lin SY, Song W, Su Y-H. Urine-Based Liquid Biopsy for Nonurological Cancers. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2019 Apr;23(4):277–83. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2018.0189>
 19. Srivastava A, Moxley K, Ruskin R, Dhanasekaran DN, Zhao YD, Ramesh R. A Non-invasive Liquid Biopsy Screening of Urine-Derived Exosomes for miRNAs as Biomarkers in Endometrial Cancer Patients. *AAPS J* [Internet]. 2018 Sep 9;20(5):82. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-018-0220-y>
 20. Elsharkawi F, Elsabah M, Shabayek M, Khaled H. Urine and Serum Exosomes as Novel Biomarkers in Detection of Bladder Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 2019 Jul 1;20(7):2219–24. Available from: http://journal.waocp.org/article_88667.html
 21. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Micali S, Torricelli F, Milandri R, et al. Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2019 Oct;497:76–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898119319485>
 22. Bertero L, Siravegna G, Rudà R, Soffietti R, Bardelli A, Cassoni P. Review: Peering through a keyhole: liquid biopsy in primary and metastatic central nervous system tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2019 Dec 14;45(7):655–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nan.12553>
 23. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, Qi J, Horbinski CM, Tomita T, et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2017 Dec 17;5(1):28. Available from:

<https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-017-0436-6>

24. Saenz-Antoñanzas, Auzmendi-Iriarte, Carrasco-Garcia, Moreno-Cugnon, Ruiz, Villanua, et al. Liquid Biopsy in Glioblastoma: Opportunities, Applications and Challenges. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Jul 5;11(7):950. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/950>
25. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2017 Oct 3;17(10):943–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2017.1374854>
26. Srivastava A, Amreddy N, Razaq M, Towner R, Zhao YD, Ahmed RA, et al. Exosomes as Theranostics for Lung Cancer. In: *Advances in Cancer Research* [Internet]. 2018. p. 1–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X18300265>
27. Kalluri R, LeBleu VS. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science (80-)* [Internet]. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aau6977>
28. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Apr 1;126(4):1208–15. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/81135>
29. Fu M, Gu J, Jiang P, Qian H, Xu W, Zhang X. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 Dec 15;18(1):41. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-1001-7>
30. Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L, et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora’s box. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2016 Oct;5(5):483–91. Available from: <http://tlcr.amegroups.com/article/view/10203/8671>
31. Zhu L, Gangadaran P, Kalimuthu S, Oh JM, Baek SH, Jeong SY, et al. Novel alternatives to extracellular vesicle-based immunotherapy – exosome mimetics derived from natural killer cells. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2018 Nov 12;46(sup3):S166–79. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2018.1489824>
32. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013 Mar;12(3):587–98. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M112.021303>
33. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med* [Internet]. 2013 Apr 22;91(4):431–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00109-013-1020-6>

34. Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. In: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. 2016. p. 103–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242315300056>
35. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):30087. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.30087>
36. Urbanelli L, Buratta S, Sagini K, Ferrara G, Lanni M, Emiliani C. Exosome-based strategies for Diagnosis and Therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov* [Internet]. 2015 Jul 27;10(1):10–27. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-8898&volume=10&issue=1&spage=10>
37. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Erratum: Corrigendum: Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Mar 29;6(1):21447. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep21447>
38. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* [Internet]. 2017;7(3):789–804. Available from: <http://www.thno.org/v07p0789.htm>
39. Yu L-L, Zhu J, Liu J-X, Jiang F, Ni W-K, Qu L-S, et al. A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 Jul 26;2018:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3634563/>
40. Yamauchi M, Shimizu K, Rahman M, Ishikawa H, Takase H, Ugawa S, et al. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2019 Mar 4;45(3):359–64. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2018.1539743>
41. Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PST, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2007 May;292(5):F1657–61. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00434.2006>
42. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov A V. Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2015 Apr 1;2015(4):pdb.top074476. Available from: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.top074476>
43. Sumrin A, Moazzam S, Khan AA, Ramzan I, Batool Z, Kaleem S, et al. Exosomes as Biomarker of Cancer. *Brazilian Arch Biol Technol* [Internet]. 2018 Oct 8;61. Available from:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132018000100309&lng=en&tlng=en

44. Kang Y, Purcell E, Palacios-Rolston C, Lo T, Ramnath N, Jolly S, et al. Isolation and Profiling of Circulating Tumor-Associated Exosomes Using Extracellular Vesicular Lipid–Protein Binding Affinity Based Microfluidic Device. *Small* [Internet]. 2019 Nov 7;15(47):1903600. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml.201903600>
45. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagrath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip* [Internet]. 2014;14(11):1891–900. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4LC00136B>
46. Biswas S, Mandal G, Roy Chowdhury S, Purohit S, Payne KK, Anadon C, et al. Exosomes Produced by Mesenchymal Stem Cells Drive Differentiation of Myeloid Cells into Immunosuppressive M2-Polarized Macrophages in Breast Cancer. *J Immunol* [Internet]. 2019 Dec 15;203(12):3447–60. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1900692>
47. H. Rashed M, Bayraktar E, K. Helal G, Abd-Ellah M, Amero P, Chavez-Reyes A, et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Mar 2;18(3):538. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/538>
48. Tai Y-L, Chen K-C, Hsieh J-T, Shen T-L. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci* [Internet]. 2018 Aug;109(8):2364–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.13697>
49. Mughees M, Kumar K, Wajid S. Exosome vesicle as a nano-therapeutic carrier for breast cancer. *J Drug Target* [Internet]. 2020 Aug 26;1–10. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1061186X.2020.1808001>
50. Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* [Internet]. 1988 May 15;263(14):6884–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129432>
51. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Aug 5;9(8):581–93. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2567>
52. Wiklander OPB, Nordin JZ, O’Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):26316. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.26316>
53. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhai S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat*

- Biotechnol [Internet]. 2011 Apr 20;29(4):341–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.1807>
54. Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2016 Jul;6(4):287–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383515301003>
 55. Batrakova E V., Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2015 Dec;219:396–405. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365915300420>
 56. Lu Z, Zuo B, Jing R, Gao X, Rao Q, Liu Z, et al. Dendritic cell-derived exosomes elicit tumor regression in autochthonous hepatocellular carcinoma mouse models. *J Hepatol* [Internet]. 2017 Oct;67(4):739–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882781732055X>
 57. Cho J, Lee Y-S, Kim S-H, Ko J-K, Kim C-W. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett* [Internet]. 2009 Mar;275(2):256–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508008355>
 58. Cheng L, Wang Y, Huang L. Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. *Mol Ther* [Internet]. 2017 Jul;25(7):1665–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001617300618>
 59. Sarvizadeh M, Ghasemi F, Tavakoli F, Sadat Khatami S, Razi E, Sharifi H, et al. Vaccines for colorectal cancer: an update. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Jun 9;120(6):8815–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.28179>

Pies de figuras.

Fig. 1: Tipos de biopsia líquida y su utilidad clínica en cáncer como fuente de biomarcadores con potencial para el diagnóstico temprano, pronóstico y seguimiento del tumor.

Fig. 2: Proporciones relativas de los componentes tumorales con potencial utilidad clínica para el diagnóstico del cáncer presentes en biopsias líquidas basadas en sangre, plasma, suero, saliva, orina y otros fluidos corporales.

Fig. 3: Biogénesis de los exosomas: en las células se forma el MVB hacia adentro del endosoma por invaginación de su membrana. Al interior se forman pequeñas vesículas que contienen proteínas, RNAm y miRNA del citoplasma. La fusión de la membrana del MVB con la membrana celular conduce a la liberación de las vesículas como exosomas. El MVB puede también fusionarse con lisosomas, para degradar su contenido. Una vez encontrada la célula diana, los exosomas pueden entrar de dos maneras: por la vía endocítica de la célula diana o por fusión con la membrana de la célula diana para liberar su contenido directamente en el citoplasma. Además de los exosomas las células secretan otras vesículas derivadas de la membrana, como ectosomas, micro vesículas y cuerpos apoptóticos.

Fig. 4: Aplicación clínica de los exosomas: A. Los exosomas provenientes de biopsia líquida se pueden aislar mediante diversas técnicas para su uso como fuente de biomarcadores con utilidad clínica. B. Pueden cargarse con moléculas de interés terapéutico por vía endógena, mediante la transferencia génica *in vitro*, para obtener exosomas precargados con la molécula de interés, o por vía exógena empleando técnicas como la electroporación, la sonicación y la fusión con liposomas, entre otras. Para su aplicación terapéutica los exosomas así obtenidos se pueden suministrar utilizando diferentes vías de administración y son internalizados en la célula diana por endocitosis, por interacción receptor ligando o por fusión directa.