

Exosomas: terapia celular regenerativa libre de células

Exosomes: “cell-free” regenerative cell therapy

René Antonio Rivero Jiménez^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-7222-727X>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: riverora@infomed.sld.cu

RESUMEN

La terapia celular basada en células mesenquimales/estromales se aplica ampliamente en la medicina moderna, aun cuando no todos los mecanismos de supervivencia y diferenciación están identificados. Sin embargo, hace pocos años se comenzaron a encontrar elementos extracelulares que generan nuevos paradigmas. En el presente trabajo se explican las principales características y funciones atribuidas a los exosomas, nanopartículas constituidas por microvesículas secretadas por las células con efecto en la matriz extracelular, y su repercusión como alternativa hacia una medicina regenerativa libre de células. Estas estructuras participan de forma notoria y crucial en la comunicación intercelular, lo que ha supuesto un cambio en el concepto de las funciones y el papel que desempeñan estas vesículas en los organismos vivos, en particular en la restauración de tejidos dañados y la respuesta inflamatoria e inmunológica. Se comentan algunos ejemplos de la repercusión biotecnológica de los exosomas en empresas y el mercado biofarmacéutico.

Palabras clave: exosomas; vesículas extracelulares; nanopartículas; células mesenquimales.

ABSTRACT

Mesenchymal/stromal cell-based therapy is widely applied in modern medicine, even though not all survival and differentiation mechanisms are identified. However, a few years ago, extracellular elements began to be found that generate new paradigms. The present work explains the main characteristics and functions attributed to exosomes, nanoparticles

made up of microvesicles secreted by with an effect on the extracellular matrix, and their impact as an alternative towards cell-free regenerative medicine. These structures participate, notoriously and critically, in intercellular communication, which has led to a change in the concept of the functions and role that these vesicles play within living organisms, particularly in the restoration of damaged tissues and the inflammatory and immunological response. Some examples of the exosomes' biotechnological impact on companies and the biopharmaceutical market are discussed.

Keywords: exosomes; extracellular vesicles; nanoparticles; mesenchymal cells.

Recibido: 17/10/2019

Aceptado: 30/01/2020

Introducción

La medicina regenerativa basada en la terapia celular con el uso de las llamadas células mesenquimales/estromales (MSCs) y otras células estromales se ha convertido en un tema recurrente de investigación y ensayos clínicos en humanos a escala internacional durante los últimos años. Esta terapia presenta opciones terapéuticas que van desde el implante de todo el tejido como en el trasplante de médula ósea o la inyección de células autólogas aisladas o en mezclas, o de MSCs alogénicas derivadas de diversos tejidos como adiposo, sangre, huesos y cerebro.

De esta manera el paso del laboratorio a la clínica se desarrolló tanto a través de miles de ensayos clínicos a escala global como de indicaciones que abarcan varias especialidades médicas y, por lo general, con muy buenos resultados prácticos.⁽¹⁾ Sin embargo, algunos atribuyen los efectos de estas células a factores paracrinos emitidos por ellas con propiedades antiinflamatorias, de reprogramación inmunológica y de activación de vías regenerativas por diversos mecanismos debido a pequeñas moléculas, como factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que son secretadas a muy bajas concentraciones en el entorno celular y que contribuyen al efecto terapéutico.

Actualmente se reconoce que además de elementos solubles, estas células también liberan vesículas extracelulares (VEs) que abarcan un grupo de estructuras muy heterogéneas tanto por su tamaño y forma, como por su contenido y las funciones que desempeñan.^(2,3) La hipótesis paracrina inspiró a muchos a desarrollar sus investigaciones en medicina

regenerativa para sustituir las MSCs por las VEs aisladas del medio extracelular y aplicarlas. Es importante señalar que por el descubrimiento del sistema de control del transporte y liberación de contenidos celulares, se le otorgó el Premio Nobel de Medicina 2013 a los doctores E. Rothman, R.W. Schekman y T. C. Südhof.

Generalmente se distinguen tres tipos principales de VEs según su diámetro y funciones: cuerpos apoptóticos (1-5 μm), microvesículas (MVs) (100 nm-1 μm) y los exosomas (30-100 nm), estos con una actividad biológica similar a las células; se distinguen de las anteriores estructuras por su morfología y tamaño.⁽⁴⁾ Los exosomas son nanopartículas constituidas por microvesículas secretadas por las células con efecto en la matriz extracelular. En múltiples publicaciones se plantea que constituyen elementos claves en la comunicación intercelular^(5,6,7) y en la modulación de la inmunidad celular⁽⁸⁾ con efectos terapéuticos; esto ha sido un avance revolucionario para la medicina regenerativa al logarse resultados alentadores sin la aplicación directa de las células que los generan.⁽⁹⁾ En esta comunicación, se ofrece información sobre los mecanismos que están involucrados en las aplicaciones de los exosomas derivados de MSCs (MSCs-exo) en terapias libre de células; es decir, se explican las principales características y funciones atribuidas a los exosomas, y su repercusión como alternativa hacia una medicina regenerativa libre de células

Análisis y síntesis de la información

¿Qué son los exosomas?

Los exosomas son secretados por los cuerpos multivesiculares (MVBs) de las células a través de la fusión de ellos con la membrana celular.⁽¹⁰⁾ Se vieron por primera vez como elementos secretados por los reticulocitos de carnero hace casi 50 años,⁽¹¹⁾ pero hoy se conoce que son secretados por varios tipos de células que incluye los linfocitos B, células dendríticas, mastocitos, linfocitos T, plaquetas, células de *Schwann*, tumorales y espermatozoides.⁽¹²⁾ Sin embargo, se considera que los exosomas son el grupo de vesículas de más reciente descubrimiento en cuanto a su potencial.⁽¹³⁾

A diferencia del resto de las VEs, los exosomas están directamente implicados en la comunicación intercelular y ganan protagonismo en todo tipo de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Se caracterizan por contener una bicapa lipídica con un diámetro entre 40-120 nm, densidad en sacarosa entre 1,13-1,19 g/mL, y pueden sedimentar a la alta velocidad de 100 000 g.⁽¹⁴⁾ Se detectan en la mayoría de los líquidos biológicos que incluye

sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido sinovial, leche materna, saliva y otros,⁽⁶⁾ con una función principal de mensajeros intercelulares.^(9,15)

Se reconoce también que son muy diversos en la composición de su bicapa lipídica y en su contenido, lo que les confiere una alta selectividad de interacción con la célula diana y capacidad de modificación del metabolismo celular, gracias a las proteínas y los ácidos nucleicos que transportan, ya que son ricos en muchas moléculas bioactivas como lípidos, proteínas, mRNAs, RNA de transferencia (tRNA), RNA no codificado largo (lncRNAs), microRNAs (miRNAs) y DNA mitocondrial (mtDNA).⁽¹⁶⁾

La mayoría de los exosomas poseen un grupo de proteínas evolutivamente conservadas como las tetraspaninas (CD81, CD63, y CD9), proteínas del shock térmico (HSP60, HSP70 y HSP90), ALIX y el gen 101 tumor-susceptible (TSG101), así como proteínas específicas y únicas según el tipo de tejido que refleja las células de su origen.⁽¹⁷⁾ Como resultado de su alta selectividad y su capacidad de llevar mensajes entre distintos tipos celulares, junto con su pequeño diámetro y su baja inmunogenicidad, se han convertido en objeto de estudio como agentes terapéuticos en enfermedades cardiovasculares, músculo-esqueléticas, broncopulmonares, dermatológicas, neurodegenerativas y oncológicas, entre otras. También actúan como posibles vectores endógenos para el transporte de medicamentos por su acción inmunomoduladora,⁽¹⁸⁾ y se valora su posible aplicación en terapia génica.⁽¹⁹⁾ Otro aspecto es que se detectan alteraciones en sus características en muchas enfermedades, como en el cáncer, lo que sugiere su importancia no es solo terapéutica sino también diagnóstica.

¿Cómo se obtienen?

Se conoce que las MSCs, en respuesta a condiciones de cultivo primario que mimetizan el nicho del microambiente celular *in vivo*, modulan de forma importante el intercambio de señales intercelulares e incrementan de forma significativa la secreción de exosomas; se plantea que esto se debe a una reprogramación glicolítica que homogeniza el perfil metabólico de las MSCs.^(20, 21) Se informa que los exosomas pueden ser liberados por múltiples tipos de células, incluye a las células dendríticas, T y B,⁽²²⁾ células tumorales⁽²³⁾ y MSCs.⁽²⁴⁾ La formación, liberación y función de exosomas a partir del MSCs se ha identificado y aislado del sobrenadante de cultivo de varios tipos de estas células que ya tienen potencial terapéutico.

¿Cómo interactúan con las células diana en los tejidos dañados?

El abundante contenido de la carga identificada en los MSCs-exo hacen que funcionen principalmente mediante la constante transferencia de miRNAs y de proteínas, > 150

miRNAs y > 850 proteína única. Resulta en la alteración de varios tipos de actividades en las células diana por diferentes vías, ya que muchos miRNA de esos exosomas se han encontrado involucrados en procesos fisiológicos pero también patológicos, tales como desarrollo de organismos, regulación epigenética e inmunoregulación.^(25,26,27)

Asimismo, interactúan con las células diana por adhesión a su superficie mediante los receptores que actúan como ligandos a lípidos, internalización vía captura endocítica o por fusión directa de estas vesículas con la membrana celular, lo que da lugar a la liberación del contenido o carga del exosoma dentro de la célula diana, y así modulan en la fisiología de la célula diana e influyen en la biología del tejido y del organismo como un todo.⁽²⁸⁾

Los MSCs-exo pueden transportar material antigénico y expresar antígenos funcionales del sistema principal de histocompatibilidad (SPH), lo que da como resultado que ellos tienen el potencial de mediar en la respuesta inmunológica a través de la presentación de antígenos.⁽²⁹⁾ Lo que explica sus potentes propiedades inmunomoduladoras y se dice que desempeñan un destacado rol en transportar y presentar los complejos funcionales de antígenos del SPH unidos a péptidos, por ejemplo para modular la activación de células T específicas anti-tumorales.⁽³⁰⁾ Se encontró que los MSCs-exo de médula ósea son efectivos en amortiguar la enfermedad injerto contra huésped (cGVHD) en ratones por inhibición de la activación e infiltración de linfocitos T CD4+. Se logra así la reducción de la secreción de linfocinas pro-inflamatorias y mejora la generación de células T reguladoras (Treg) con expresión de IL-10 e inhibición de células TH17.^(31,32) Las EVs derivadas de células multipotentes estromales humanas suprimen la autoinmunidad en un modelo animal de diabetes tipo 1 (T1D) y de la uveorinitis experimental autoinmune.⁽³²⁾ Los MSC-exo de médula ósea humana promueven la proliferación de células Treg y la capacidad inmunosupresora mediante la acción sobre las citosinas IL-10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF- β 1) en células mononucleares aisladas de sangre periférica en pacientes asmáticos.⁽³³⁾

Ventajas y desventajas en aplicaciones clínico/terapéuticas

Entre las ventajas potenciales del uso humano de MSCs-exo se señala que evitaría la transferencia de células en situaciones en las que podrían ocurrir efectos adversos, como la existencia de ADN mutado o dañado, o un potencial embolismo pulmonar debido al implante celular.⁽³⁴⁾ Además, se puede emplear en aplicaciones sistémicas, los exosomas al ser nanopartículas circulan fácilmente por el organismo y pasan la barrera hematoencefálica con facilidad, mientras que las MSCs son demasiado grandes para circular a

través de los capilares, por lo que quedan retenidas en gran parte en la red capilar pulmonar. Por otra parte, la dosis de MSCs infundidas disminuye rápidamente después de su administración, por lo que sería posible que la administración de exosomas pueda lograr una “dosis” que circule por el organismo en mayor medida en comparación con su contraparte celular.

No obstante, se considera que la principal desventaja de usar exosomas derivados de MSCs es que la dosis sería fija e incapaz de reproducirse *in vivo* a diferencia de las células. A su vez, la utilidad y eficacia de los exosomas depende de ciertos parámetros críticos que incluyen el desarrollo de procesos productivos robustos y de alta reproducibilidad para su producción y almacenamiento estandarizado, así como de estudios clínicos que permitan evaluar su efecto terapéutico.⁽¹⁸⁾

En el portal <https://clinicaltrials.gov/> aparecen 133 ensayos clínicos en diferentes fases relacionados directa o indirectamente con exosomas, de los cuales 55 emplean directamente estos nano elementos en diferentes evaluaciones, en su mayoría relacionados a cáncer.

Repercusión de las investigaciones sobre exosomas en la industria biofarmacéutica y biotecnológica

En la industria de exosomas, actualmente se definen principalmente tres usos:⁽³⁵⁾

- a) como herramienta de diagnóstico a través de biopsias líquidas;
- b) terapéutico de exosomas producidos en forma natural;
- c) terapéutico de exosomas modificados (aproximadamente 34 empresas trabajan en esta área, con un foco principal en cáncer, enfermedades neurodegenerativas y producción e ingeniería de exosomas).

En el área de diagnóstico destaca el caso de la empresa *Exosome Diagnostics Inc.* (EEUU), que cuenta con 23 solicitudes internacionales de patentes publicadas a partir del año 2015; recientemente fue adquirida por *Bio-Techne Corp.* en \$250 millones USD por sus desarrollos para el diagnóstico de cáncer de pulmón y próstata.⁽³⁵⁾

Actualmente hay tres empresas destacadas que están trabajando en la producción de exosomas a gran escala:⁽³⁵⁾

1. Evox therapeutics Ltd. (Reino Unido-Suecia) formada por la asociación entre la Universidad de Oxford y el Instituto Karolinska, con 15 solicitudes de patente

publicadas desde el año 2017; está enfocada en el desarrollo de terapias basadas en exosomas para desórdenes metabólicos.

2. Asociación entre Rooster Bio Inc. & Exopharm Pty. Ltd. (EE.UU.-Australia), la primera dedicada a la comercialización de MSCs y productos asociados para su expansión a nivel de Investigación+Desarrollo y clínico, y la segunda propietaria del proceso para la producción de exosomas a gran escala y bajo costo con foco en enfermedades musculo-esqueléticas.
3. Codiak Bio Sciences (EE.UU.) ha creado líneas celulares inmortalizadas para homogenizar la producción de exosomas y modificar su contenido, posee 5 solicitudes internacionales de patente desde 2017.

En los últimos 10 años, las empresas relacionadas a exosomas han alcanzado un monto global de \$660 millones USD que comprenden principalmente levantamientos de capital y subsidios públicos.⁽³⁵⁾

En Chile, las empresas Cells for Cells y Consorcio Regenero desarrollan dos líneas de trabajo en exosomas:⁽³⁵⁾

- a) Producción de exosomas en sistema de biorreactor con medio de cultivo sin componente animal y acoplado a sistema de ultrafiltración tangencial, para reducir el costo de producción.
- b) Efecto antiangiogénico de MSCs-exoderivado de fluido menstrual (MenSC) para el tratamiento de cáncer; posee 2 solicitudes de patente para demostrar el efecto terapéutico a nivel pre-clínico.

Referencias bibliográficas

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(6):1445-51.
2. Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, Fergusson D, Tay J, Allan DS. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev.* 2015;11(1):150-60.
3. Camussi G, Deregibus MC and Cantaluppi V. Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochem Soc Transac.* 2013;41:283-7.

4. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.
5. Bang C and Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):2060-4.
6. Chivet M, Javalet C, Hemming F, Pernet-Gallay K, Laulagnier K, Fraboulet S, et al. Exosomes as a novel way of interneuronal communication. *Biochem Soc Trans.* 2013; 41(1):241-4.
7. Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ and Calin GA. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. *Pharmacol Ther.* 2012;136(2):169-74.
8. Clayton A. Cancer cells use exosomes as tools to manipulate immunity and the microenvironment. *Oncoimmunol.* 2012;1(1):78-80.
9. Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell.* 2016;164(6):1226-32.
10. Smalheiser NR. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct.* 2007;2:35
11. Johnstone RM. Exosomes: biological significance: a concise review. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:315-321.
12. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med.* 2011;6(4):481-92.
13. György B1, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667-88.
14. Katare R, Stroemer P, Hicks C, Stevanato L, Patel S, Corteling R, et al. Clinical-grade human neural stem cells promote reparative neovascularization in mouse models of hind limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(2):408-18.
15. Babiy B. Exomas, aproximación experimental y aplicaciones clínicas. (Tesis de Grado en Farmacia). Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; 2016.
16. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: a web-based compendium of Exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016;428(4):688–692.
17. Schey KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods.* 2015;87:75–82.
18. Yin K, Wang S, Chunhua-Zhao R. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomark Res.* 2019;7:8.

19. Li S, Yao J, Xie M, Liu Y, Zheng M. Exosomal miRNAs in hepatocellular carcinoma development and clinical responses. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):54.
20. Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(1):7-12.
21. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One.* 2010;5:e15353.
22. Shen M, Ren X. New insights into the biological impacts of immune cell-derived exosomes within the tumor environment. *Cancer Letter.* 2018;431:115-22.
23. Gao L, Wang L, Dai T, Jin K, Zhang Z, Wang S, et al. Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity. *Nat Immunol.* 2018;19(3):233-45.
24. Cosenza S, Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, Blanc-Brude O, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics.* 2018;8(5):1399-410.
25. Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, Gatti A, Kamga PT, Cassaro A, et al. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep.* 2016;6:24120.
26. Burrello J, Monticone S, Gai C, Gomez Y, Kholia S, Camussi G. Stemcell-derived extracellular vesicles and immune-modulation. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:83.
27. Vrijnsen KR, Maring JA, Chamuleau SA, Verhage V, Mol EA, Deddens JC, et al. Exosomes from cardiomyocyte progenitor cells and mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis via EMMPRIN. *Adv Health Mater.* 2016;5(19):2555-65.
28. 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):838-48.
29. Chaput N, They C. Exosomes: immunoproperties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011;33(5):419-40.
30. You L, Mao L, Wei J, Jin S, Yang C, Liu H, et al. The crosstalk between autophagic and endo-/exosomal pathways in antigen processing for MHC presentation in anticancer T cell immune responses. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):165.
31. Lai P, Chen X, Guo L, Wang Y, Liu X, Liu Y, et al. A potent immunomodulatory role of exosomes derived from mesenchymal stromal cells in preventing cGVHD. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):135.

32. Shigemoto-Kuroda T, Oh JY, Kim DK, Jeong HJ, Park SY, Lee HJ, et al. MSC-derived extracellular vesicles attenuate immune responses in two autoimmune murine models: type 1 diabetes and Uveoretinitis. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1214-25.
33. Du YM, Zhuansun YX, Chen R, Lin L, Lin Y, Li JG. Mesenchymal stem cell exosomes promote immune suppression of regulatory T cells in asthma. *Exp Cell Res*. 2018;363(1):114-20.
34. Jung JW, Kwon M, Choi JC, Shin JW, Park IW, Choi BW, et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med J*. 2013;54(5):1293-6.
35. Anónimo. Exosomas: terapia celular libre de células. Santiago de Chile: Cells For Cells. 3 Sept 2018 [acceso 14/10/2019]. Disponible en: <http://www.c4c.cl/exosomas-terapia-celular-libre-celulas>

Conflicto de intereses

El autor declara que no existen conflicto de intereses de ningún tipo.