

Exosomas en la propagación de Enfermedades Neurodegenerativas

Gómez-Chavarín M¹, Morales-Gómez M Rocio²

¹DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM, MÉXICO

²HOSPITAL DE LA MUJER SSA, MÉXICO

Artículo de revisión

Correspondencia

Margarita Gómez-Chavarín. Facultad de Medicina UNAM

E-mail: margaritachavarin@gmail.com

Recibido	21-julio-2018
Aceptado	28-agosto-2018
Publicado	29-noviembre-2018

Resumen

Recientemente la agregación anormal de proteínas ha sido implicada en procesos neurodegenerativos y enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (EA y EP, respectivamente). Estudios recientes han propuesto que la transmisión de estos agregados proteicos entre neuronas, son el mecanismo subyacente al progreso y la patología de las enfermedades. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual se transmiten estos agregados entre las neuronas se desconoce. Se han sugerido que los exosomas, un grupo específico de vesículas extracelulares, pueden participar en la transferencia de proteínas, RNA y DNA entre las neuronas y desempeñar un papel importante en la transmisión de agregados. Este manuscrito describe varios tipos de vesículas y evidencias que apoyan el papel de los exosomas en la transmisión de agregados entre las neuronas, así como su relación con los procesos neurodegenerativos. También describe algunos mecanismos que participan en la transmisión mediada por exosomas, cómo en el caso de los exosomas liberados por las neuronas cuyo contenido tienen perfiles moleculares que representan un momento del estado de salud del cerebro, por lo que pueden utilizarse como biomarcadores del microambiente cerebral y contribuir al progreso de las enfermedades neurodegenerativas al facilitar la propagación de proteínas mal plegada a sitios distantes. Esta revisión también resume algunos estudios realizados con exosomas en la patofisiología de la enfermedad de Parkinson y en modelos experimentales, y su potencial como biomarcadores de enfermedades.

Palabras clave: Exosomas, neurodegeneración, transmisión intercelular, agregación de proteínas, vesículas extracelulares, α -sinucleína, proteinopatías

2018, Gómez-Chavarín M, et. al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 International NC, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor original y la fuente.

Article review

Exosomes and the spread of neurodegenerative diseases

Abstract

Recently the abnormal aggregation of protein has been implicated in diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease and neurodegenerative disorders. Recent studies have suggested that the transmission of these protein aggregates between neurons, are the underlying mechanism to progress and the pathology of the diseases. However, the precise mechanism which transmits these aggregates between neurons is unknown. They have suggested that the exosomes, a specific group of extracellular vesicles, can participate in the proteins, RNA and DNA transfer between neurons and play an important role in the transmission of aggregates. This manuscript describes various types of vesicles and evidence supporting the role of exosomes in the transmission of aggregates between neurons, as well as their relation to neurodegenerative processes. It also describes some mechanisms involved in transmission mediated by exosomes, how in the case of the exosomes released by nerve cells whose contents have molecular profiles that represent a time of the state of health of the brain, so it can be used as biomarkers of the cerebral microenvironment and contribute to the progress of neurodegenerative diseases by facilitating the spread of proteins poorly folded to distant sites. This review also summarizes some studies in exosomes in the pathophysiology of Parkinson's disease and experimental models, and their potential use as biomarkers of diseases.

Key words: Exosomes, neurodegeneration, transmission intercellular, extracellular vesicles, proteins aggregation, proteinopathies, α -synuclein

Introducción

La agregación de proteínas específicas es una característica común en la patología de las enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP)^{1,2}. En ambas, ciertas proteínas forman agregados y forman diferentes tipos de inclusiones. En los pacientes con EA los péptidos β amiloideos ($A\beta$) y la hiperfosforilación de tau se depositan en placas amiloides y ovillos neurofibrilares y en los cuerpos de inclusión contienen agregados de TAR una proteína de unión al ADN (TDP-43)^{1,2}, mientras en la EP la proteína

α -sinucleína se agrega y forma cuerpos y neuritas de Lewy^{1,2,3}.

En general, los agregados proteicos en enfermedades neurodegenerativas tienden a desarrollarse en algunas áreas del cerebro y se diseminan a otras conforme la enfermedad progresa. Cada tipo de patología muestra su propio tipo de agregado con un patrón de diseminación específico^{1,2,4,5}. Por ejemplo, las inclusiones de tau en EA se observan al principio en la corteza entorrinal y se disemina a través del hipocampo hasta la corteza⁶, y los cuerpos y neuritas de Lewy

en la EP, siguen un patrón ascendente del encéfalo y el bulbo olfatorio a través del mesencéfalo y el sistema límbico, hasta alcanzar la neocorteza⁷, sin embargo, existen múltiples neuropatologías que no muestran algún patrón de progresión⁸. Hasta ahora se desconoce, si la difusión de los agregados proteicos por si mismos inducen la neurodegeneración y el progreso de la enfermedad, aunque se ha propuesto una correlación estrecha entre el aumento progresivo de los agregados en una región cerebral y el desarrollo secuencial de los síntomas clínicos de ciertas neuropatologías, por lo que resulta necesario conocer el mecanismo del progreso de la enfermedad clínica y su relación con los mecanismos subyacentes a la diseminación de los agregados. Actualmente existen fuertes evidencias que apoyan la participación de la transmisión de entre células en la difusión de agregados, específicamente los exosomas, han sido considerados como el vehículo para la transmisión entre neuronas.

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno neurodegenerativo que afecta al 1% de las personas mayores de 60 años. Clínicamente se caracteriza por trastorno del movimiento que causa temblor en reposo, bradicinesia, rigidez, inestabilidad postural y diversos síntomas no motores, incluida la demencia y se ha observado que el 80% de los pacientes cursan con una larga duración de la enfermedad⁹. Este hallazgo indica que la EP es un trastorno neurodegenerativo difuso y estudios neuropatológicos detallados han demostrado que una de las características histológicas es la inclusión de cuerpos de Lewy interneuronales, que se componen del inadecuado plegamiento de la proteína α -sinucleína, detectable en áreas corticales y con frecuencia se correlacionan con el grado de deterioro cognitivo¹⁰. A nivel molecular, el tráfico de proteínas defectuosas a los endosomas y

lisosomas se ha convertido en una vía celular potencialmente unificadora en la patogénesis de la EP esporádica^{11,12}.

Debido a que la liberación de exosomas está estrechamente relacionada con el tráfico intracelular de proteínas, es probable que su biología sea relevante en la enfermedad de Parkinson. La secreción de vesículas extracelulares, incluidos los exosomas, es un medio de comunicación entre células del mismo o diferente tipo. Su contenido representa una instantánea de los estados intracelulares, y han atraído la atención como potenciales biomarcadores del microambiente del cerebro, que de otro modo sería inaccesible e imposible conocer, aunque los exosomas también pueden representar el medio de eliminación de proteínas mal plegadas, que contribuyen a la progresión de los trastornos neurodegenerativos. Transmisión de agregados proteicos entre células.

La agregación de proteínas es un proceso que requiere la formación del núcleo durante la fase lag². Los agregados proteicos pre-formados son las simientes de agregados proteicos más complejos, lo que ocurre durante la fase lag del ciclo celular (*figura 1*), principio molecular que subyace a la infectividad priónica y su transmisibilidad, y por lo tanto puede aplicarse a la transmisión interneuronal de los agregados proteicos.

El mecanismo dependiente de las proteína pre-formadas no ha sido totalmente probado; pero otras posibilidades es que los agregados proteicos pueden propagarse por transferencia interneuronal^{13,14}, aunque este mecanismo no está bien definido, evidencias experimentales han mostrado la transmisión de agregados entre neuronas, sin embargo, es un reto el demostrar cómo ocurre la transmisión de agregados proteicos citoplásmicos entre neuronas.

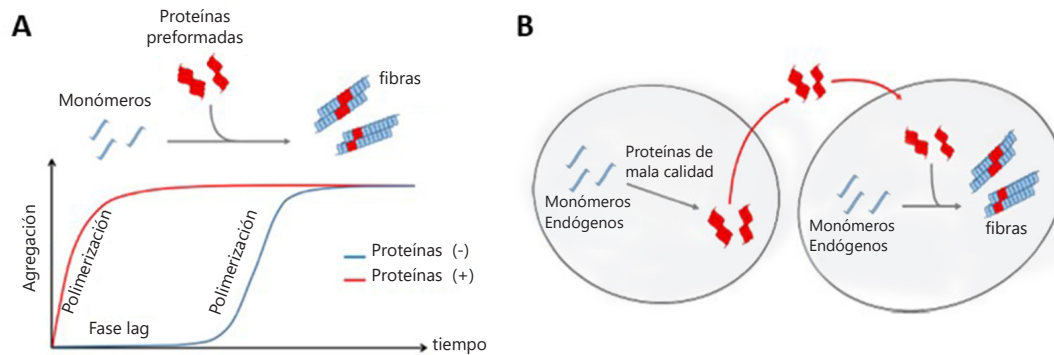


Figura 1. Ilustración de la cinética de agregación de una proteína como base de la transmisión intercelular. A) el esquema ilustra de manera simplificada la cinética de la formación de fibras proteicas y su polimerización. Las fibrillas preformadas reducen drásticamente la fase lag. B) ilustra el principio de polimerización de fragmentos de proteínas que se transmiten de célula a célula. Cuando los agregados de proteicos se transfieren de una célula a otra, estos pueden actuar como simientes en la célula receptora.

Recientemente se demostró que la agregación de las proteínas tau, α -sinucleína y otras se segregan de una neurona a otra¹. Las proteínas α -sinucleína y tau son secretadas por la vía del retículo endoplasmático independiente del Golgi, lo que se conocen como camino secretor no convencional¹⁵⁻²¹ pero las funciones fisiológicas de la segregación de estos agregados proteicos son desconocidas. Los agregados extracelulares pueden también regular la actividad sináptica²² y la respuesta inflamatoria²³, pero la dicotomía entre las funciones fisiológicas y patológicas de estos agregados extracelulares no se ha definido aún. Entre las vías secretoras no convencionales, la exocitosis de exosomas ha atraído la atención, porque este mecanismo en particular ha demostrado estar implicado en la secreción de muchas proteínas ligadas a enfermedades, incluyendo los priones de: α -sinucleína, $A\beta$ y tau, tanto en procesos fisiológicos y como en ciertas patologías.

Vesículas extracelulares y exosomas

Las células secretan varios tipos de vesículas

de membrana como: los cuerpos apoptóticos, microvesículas extracelulares/partículas de membrana, exosomas, etc. (figura 2). Cada tipo de vesículas extracelulares tiene su propio tamaño, proteínas marcadoras y diferentes vías secreción.

Las microvesículas extracelulares son vesículas de membrana grandes (> 100 nm de diámetro) producidas por el desprendimiento de brotes de la membrana celular²⁴⁻²⁸. Estas vesículas tienen formas irregulares y tiene marcadores como las integrinas y selectinas²⁵. Las partículas de la membrana también se originan de la membrana plasmática y son vesículas de forma redonda de 50 a 80 nm de diámetro, cuyo biomarcador es CD133 (prominina-1) que se ha propuesto actúa como un organizador de la topología de la membrana celular²⁹. Los exosomas son vesículas extracelulares intraluminales de los cuerpos multivesiculares que al ser secretados se fusionan con la membrana plasmática, que aparecen de forma natural en los fluidos corporales, por microscopía electrónica y por análisis de rastreo de nanopartículas se ha

demostrado que tienen un diámetro de 50 a 100 nm. Aunque hay descripciones de los exosomas y otras vesículas extracelulares, actualmente no hay ningún criterio que las defina^{30,31}. En particular las microvesículas extracelulares y exosomas, a menudo se superponen en tamaño y comparten algunos marcadores de superficie (por ejemplo, tetraspaninas, CD9, CD63, CD81, etc.)^{24-28,32}. La morfología de copa de los exosomas es conocida por ser un artefacto de fijación³³. Actualmente es necesario diseñar estudios que mejoren los procedimientos de purificación e identificación de los marcadores específicos de exosomas.

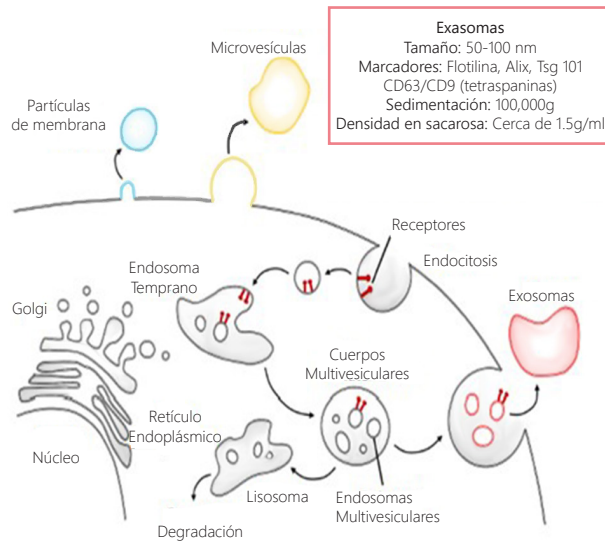


Figura 2. Esquema que muestra exosomas, microvesículas extracelulares y partículas de membrana del espacio extracelular. Los exosomas se generan por la exocitosis de los cuerpos multivesiculares extracelulares por brotes/ampollas de la membrana plasmática. Las partículas de membrana también se forman por un mecanismo similar a las microvesículas extracelulares extracelulares, sin embargo; sus marcadores biológicos son diferentes.

Los exosomas se purifican por ultracentrifugación diferencial de sobrenadantes de células en cultivo celular y fluidos corporales seguido de una centrifugación zonal (*tabla 1*)³³ en donde se encuentran en la fracción con densidad de 1.10 – 1.20 g/mL²⁴⁻²⁸. Aunque este procedimiento ha sido ampliamente utilizado, la contaminación de los componentes del suero no se ha podido evitar³⁰. Existen métodos alternativos disponibles, que incluyen la exclusión por tamaño, el aislamiento por inmunoafinidad y precipitación polimérica³⁴; sin embargo, el beneficio de estos procedimientos sobre la centrifugación convencional aún no es claro. Los exosomas y otras vesículas extracelulares pueden funcionar como vehículos para el transporte de moléculas como proteínas, RNAs y DNAs de una célula a otra, la transferencia de estas moléculas puede desempeñar funciones en procesos biológicos, como la inmunidad, la angiogénesis, carcinogénesis, metástasis y neurodegeneración³¹.

Tabla 1. Procedimiento para la preparación de exosomas

1 Ultracentrifugación diferencial (41)

Sobrenadantes de cultivos o fluidos en cada paso, su utiliza el sobrenadante

- ⇨ 300 x g, 10 min → Pellet: células
- ⇨ 300 x g, 10 min → Pellet: células
- ⇨ 2000 x g, 10 min → Pellet: células muertas
- ⇨ 10,000 x g, 30 min → Pellet: debris celular
- Ultimo 100,000 x g, 70 min → Exosomas + proteínas contaminantes
- ⇨ Lavado en PBS 100,000 x g, 70 min → Exosomas

2 Extracción de los exosomas

Los exosomas se colocan sobre un gradiente de 0.25–2 M de sacarosa y se centrifugan por 14 h a 210,000 x g a 4° C

Con una micropipeta coleccionar 1 ml de la fracción yendo de arriba a abajo

Biogénesis de los exosomas

Las vesículas extracelulares se componen de una bicapa lipídica que contiene proteínas de membrana, proteínas y RNA circulante. Dependiendo de su origen, las moléculas de superficie permiten su absorción por las células receptoras. Una vez unidas a una célula, las vesículas extracelulares inducen la señalización por la interacción receptor ligando o se internalizan por endocitosis y/o fagocitosis, o incluso se fusionan con la membrana de la célula para liberar su contenido en el citoplasma, modificando así el estado fisiológico de la célula receptora. Se sabe que las células liberan vesículas extracelulares de diferentes tipos. Las vesículas grandes denominados ectosomas y salen directamente de la membrana plasmática, tiene un tamaño de 100 a 1,000 nm, contrariamente los exosomas se generan del endosoma y se secretan por la fusión con la membrana plasmática, liberando así a las vesículas intraluminales al medio extracelular. Este proceso se exagera al bloquear la fusión de los cuerpos multivesiculares con los lisosomas, en donde se degrada su contenido, por lo tanto, los exosomas son similares en tamaño de 50-100 nm y contienen proteínas asociadas a las vesículas intraluminales de los cuerpos multivesiculares. La formación de cuerpos multivesiculares y exosomas está dirigida por el complejo endosomica necesario para el transporte o ESCRT, este último se compone de treinta proteínas que se ensamblan en cuatro complejos (ESCRT-0, -I, -II y -III) con las proteínas asociadas VPS4, VTA1 y ALIX, que se conservan de la levadura a los mamíferos. Aunque también se han propuesto mecanismos independientes de ESCRT³⁵. El contenido proteico de los exosomas se ha estudiado usando diversos métodos. Existe una base de datos llamada Vesiculopedia, que se actualiza continuamente por la comunidad científica y está disponible en línea (<http://www.microvesicles.org>). Los estudios de proteómica han mostrado que los exosomas contienen un subconjunto

específico de proteínas celulares, algunas de ellas son específicas de acuerdo al tipo celular y otras genéricas. Estas últimas incluyen proteínas del endosoma, la membrana plasmática y del citoplasma, mientras que las proteínas nucleares, mitocondriales, del retículo endoplasmático y el complejo de Golgi están casi ausentes. Estas observaciones confirman la especificidad de la formación de estas vesículas extracelulares y muestran que representan un compartimento subcelular específico y no fragmentos celulares aleatorios. La comparación proteómica de subpoblaciones de las vesículas extracelulares mostró que varios marcadores de exosomas utilizados clásicamente, como el complejo de histocompatibilidad, flotilina y proteínas de choque térmico, están presentes de forma constante en todas las vesículas extracelulares. En cambio, la syntenina-1 (un regulador clave de la biogénesis del exosoma) y TSG101 representan distintos marcadores de exosomas³⁶. Además de las proteínas, los exosomas son ricos en RNA y miRNA, con los que pueden modular la expresión génica en células distantes, esta transferencia funcional se ha demostrado *in vivo* en ratones³⁷, en los que se inyectó vía intravenosa exosomas diseñados para expresar la proteína transmembranal Lamp2b fusionada a una glicoproteína del virus de la rabia (RVG) para lograr su absorción en el sistema nervioso³⁸. Estos exosomas con siRNA se dirigieron específicamente a neuronas, microglía y oligodendrocitos en el cerebro, lo que originó la eliminación de genes específicos de proteínas implicadas en la neurodegeneración, pero no se sabe hasta qué punto estos efectos fueron mediados por el RNA, porque en la actualidad no está clara la relevancia biológica y fisiológica que esto tiene en el cerebro.

Participación de los exosomas en la transmisión de agregados

Estudios recientes sugieren que los exosomas desempeñan papeles importantes en la

transmisión interneuronal de proteínas patógenas en la neurodegeneración. El primer ejemplo se originó en un modelo de prion celular. Los priones PrP^c y PrP^{sc}, este último genera temblor, ambos se liberaron al espacio extracelular asociados a exosomas. El PrP^{sc}, es de origen infeccioso³⁹, y se comprobó que algunos péptidos A β generados de la ruptura β del precursor de la proteína amiloide (APP) en endosomas se encuentra en cuerpos multivesiculares y se secretan por la vía exosómica. Además, se encontraron proteínas de placas amiloides en exosomas extraídos de cerebro de pacientes con EA⁴⁰. La inyección de preparados de exosomas en cerebros de ratón promueven la agregación de A β 1-42, y es posible inhibir su exocitosis por la inyección intraperitoneal de un inhibidor de la esfingomielinasa neutra-2, que es un regulador de la síntesis de ceramida esencial para la biogénesis de exosomas en cuerpos multivesiculares, reduciéndose de esta manera la carga de placas A β 1-42 *in vivo*⁴¹, lo que sugiere que los exosomas tienen un papel importante en la patología EA, al provocar la agregación y los depósitos de placas amiloides.

Las proteínas tau y la fosfo-tau que se secretan vía exosomas al medio de cultivo de las células N2a y el líquido cefalorraquídeo humanos, pueden transferirse a neuronas y microglía en las que inducen la formación de inclusiones y agregación de tau. La microglía también secreta tau mediante exosomas y su propagación se reduce al inhibir la síntesis o la secreción de exosomas que contienen tau, por el tratamiento con nSMase2, siRNA o GW4869, lo que reduce el desarrollo de la patología asociada a esta proteína⁴²⁻⁴⁴.

En un modelo de la enfermedad de Parkinson, la α -sinucleína se secreta por exosomas dependiendo de calcio⁴⁵ y se transfieren a las células receptoras vía endocitosis⁴⁶ la transferencia se incrementa cuando los lisosomas están deteriorados⁴⁷. Además, los oligómeros de α -sinucleína de los exosomas que son eficientemente captados por las

células tienen mayor toxicidad que, los oligómeros libres de α -sinucleína⁴⁸. Se ha demostrado que los exosomas aislados del líquido cefalorraquídeo de los pacientes EP y demencia con cuerpos de Lewy contiene especies patógenas de α -sinucleína e inducen la oligomerización de la α -sinucleína soluble⁴⁹. La inyección en el cerebro de roedores de exosomas aislados del cerebro de pacientes demencia con cuerpos de Lewy, inducen la propagación de agregados de α -sinucleína⁵⁰.

Otra forma en la que los exosomas contribuyen a la propagación de la enfermedad, es al acelerar con lípidos (gangliósidos) la oligomerización *in vitro* de monómeros de α -sinucleína recombinante, lo que aumenta la toxicidad de estas proteínas⁵¹. Del mismo modo, el ensamblaje de la proteína A β se acelera al incubarse con la fracción de exosomas proveniente del medio de cultivo de células PC12⁵².

Teoría de la transmisión de agregados por exosomas

Aunque la literatura apoya la participación de los exosomas en la propagación interneuronal de los agregados, es necesario aclarar en primer lugar que no todos los estudios preparan adecuadamente exosomas. Una preparación pura de exosomas requiere ultracentrifugación y centrifugación zonal. La ultracentrifugación solo resulta en la mezcla de muchos tipos diferentes de vesículas extracelulares e incluso después de la centrifugación zonal, los exosomas pueden aun contener vesículas extracelulares contaminantes no exosómicas, por lo que se requiere de análisis inmunológico por microscopía electrónica³³. Como se resume en la (tabla 2), en algunos estudios, las preparaciones de exosomas se obtienen por ultracentrifugación sin centrifugación zonal realizando un gradiente de sacarosa, sin embargo, los exosomas también pueden contener microvesículas extracelulares y micropartículas de membrana.

Tabla 2. Proteínas marcadoras de exosomas en enfermedades neurodegenerativas.

	Tamaño	Sedimentación	Obtención por Gradiente de Glucosa	Marcador
Prion	50-90 nm	100,000 g	✓	Flotilina, Tsg101
Aβ	60-100 nm No descrito	100,000 g	✓	Alix, Flotilina Alix, Tsg101
		110,000 g	x	
Tau	60-100 nm 50-100 nm 40-100 nm	100,000 g	✓	Alix Tsg101 Alix
		100,000 g	✓	
		100,000 g	✓	
α-synuclein	50-140 nm 93, 99 nm 60-100 nm ~100 nm	100,000 g	X	Alix, Flotilina Alix, Flotilina, LAMP1 Alix, Flotilina, CD63 Flotilina
		120,000 g	X	
		100,000 g	X	
		100,000 g	X	

Adicionalmente, las proteínas patógenas asociada a exosomas, solo representan una pequeña porción del total de las proteínas secretadas^{16,40}. Por ejemplo; una pequeña fracción (< 1%) del total de proteína Aβ secretada en el espacio extracelular, se asocian con exosomas⁴⁰. En el caso de α-sinucleína, menos del 3% de la proteína total secretada, se asocia con exosomas¹⁶. Sin embargo, la baja representación en cantidad no indica necesariamente insignificantes papeles funcionales. Danzer et al.,¹⁴ demostraron que la α-sinucleína asociada a exosomas derivados de células son más fácilmente absorbidos por las células receptoras, que la proteína no contenida en exosomas y causan más toxicidad.

Sin embargo, puesto que el estudio utilizó una mayor cantidad de α-sinucleína de exosomas que la real, los efectos de la concentración real se desconocen.

Quizás la crítica de la teoría de la propagación de agregados proteicos por los exosomas se basa principalmente en la fenomenología de que al menos algunas proteínas secretadas son patógenas y se encuentran en los exosomas, y la existencia de poca evidencia funcional que muestre la implicación de estas proteínas en

la propagación fisiológica normal. El realizar modificaciones genéticas en la formación de los exosomas y su tráfico en células en animales, sería una manera de resolver este problema. Un estudio de Hasegawa, et al.⁵³, en el que inhiben de la biogénesis de los exosomas por el silenciamiento de la expresión de VPS4, una proteína necesaria para la formación de los exosomas, aumento la secreción de α-sinucleína en lugar de disminuirla, en el mismo estudio, los autores no pudieron detectar proteínas α-sinucleína en exosomas de preparaciones de líquido cefalorraquídeo humano, ni mostró el efecto del silenciamiento de VPS4 en la transmisión intercelular de α-sinucleína, dejando abierta la posibilidad de que los exosomas sigan siendo importantes para la transmisión de agregados.

Mecanismos alternativos

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la transmisión de agregados entre células por la vía de exosomas (*figura 3*). La vía del reciclaje por endosomas es uno de los mecanismos de importancia funcional en el tráfico de la proteína precursora amiloide celular y generación de la proteína Aβ⁵⁴. Otra secreción no convencional que podría estar involucrada en la transmisión de agregados interneuronal es exofagia, que se refiere a la exocitosis mediada por la fusión de autofagosomas/amfisomas con la membrana plasmática. La liberación de monómeros de α-sinucleína y sus agregados esta mediada por exofagia, cuando está deteriorada la fusión de autofagosomas-lisosomas^{15,16}. En células PC12, la proteína que promueve la polimerización de tubulina (TPPP/p25a) se co-localiza con α-sinucleína en autofagosomas e inhibe la fusión de estos últimos con lisosomas, lo que conduce a la secreción de α-sinucleína al medio por exofagia. Este estudio también demostró que la secreción es modulada por Rab27a, un regulador tardío de la exocitosis endosómica y amfisómica¹⁶.

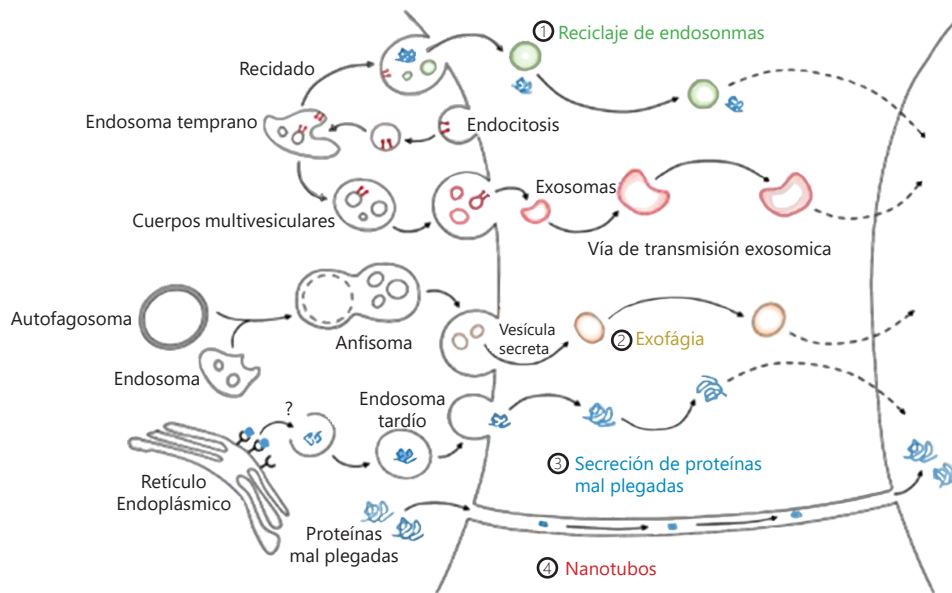


Figura 3. Posible mecanismo de transmisión interneuronal de agregados proteicos, con la participación de exosomas.

Recientemente, se describió un mecanismo de exocitosis no convencionales y se identificó con la secreción de proteínas mal plegadas, que se activa cuando la degradación por el proteosoma está deteriorada⁵⁵. Las proteínas poliubiquitinadas se reclutan en la superficie del retículo endoplásmico por la interacción con USP19, una desubiquitinasa asociada a la membrana de este^{19,55}. Las proteínas mal plegadas se desubiquitinizan y se empaquetan en el endosoma antes de secretarse^{19,55}.

La exocitosis de proteínas mal plegadas, es probablemente parte del sistema de control de calidad de las proteínas, y su eliminación podría jugar un papel importante en la propagación de agregados.

Recientemente se propuso, que la transmisión intercelular de proteínas patógenas puede ser a través de nanotubos^{56,57}, estos son protrusiones de las estructuras de actina enriquecida de la membrana plasmática, tiene un grosor de como 50

a 200 nm de diámetro a lo largo de la célula⁵⁸. En este caso, el citoplasma de las neuronas se conecta directamente, lo que hace obsoleto la teoría de la exocitosis de agregados. Aunque la evidencia del transporte de proteínas y orgánulos a través de nanotubos en el cerebro *in vivo*, aún no ha sido comprobada.

Conclusión

Existe una creciente literatura que propone que los exosomas desempeñan un papel importante en la transmisión de agregados de proteínas patógenas entre las células, lo que contribuye a la progresión patológica y clínica de las enfermedades neurodegenerativas. Esta propuesta sugiere que los agregados proteicos patógenos dentro de los exosomas son encapsulados en vesículas extracelulares intraluminales en cuerpos multivesiculares y liberados de las células por la fusión de estos últimos con la membrana

plasmática. Los exosomas, secretados de las vesículas intraluminales que contiene agregados de proteínas patógenas, se transfieren a células cercanas y/o distantes.

No obstante que la literatura posee ciertas limitantes para probar la teoría de los exosomas, muchos estudios analizan preparados de exosomas crudos, que también contienen diferentes tipos de vesículas extracelulares distintas a los exosomas e incluso proteínas libres no agregadas que son lo suficientemente grandes como para sedimentar con la centrifugación. Falta mucho por hacer, pues no se tiene el análisis cuantitativo del porcentaje exacto de proteínas patógenas secretadas por los exosomas. Es más importante aún, el tratar de emplear a la genética y la farmacología en la formación de los exosomas e investigar su papel en la secreción y la propagación de proteínas. Además, dada la confusión en la definición de exosomas, tal vez sería mejor utilizar el término "vesículas extracelulares" en lugar de "exosomas", hasta que se comprenda mejor los componentes, clasificación y funciones biológicas de estas vesículas extracelulares.

Otro cuestionamiento importante se relaciona con la función de las proteínas patógenas de los exosomas en las células receptoras, cómo se internalizan, cómo se induce la agregación proteica, y en consecuencia como inducen neurodegeneración. Se ha demostrado que formas libres de las proteínas patógenas agregadas pueden internalizarse en las neuronas por endocitosis¹.

Por lo tanto, deben abordarse las ventajas de la agregación proteica en los exosomas sobre formas libres de propagación y la neurodegeneración; así como la base lógica de estos beneficios. Un tema interesante es el abordar la participación de otros componentes del exosoma en la propagación. Aunque muchas preguntas siguen sin respuesta, la propuesta de la participación de los exosomas para explicar propagación intercelular de proteinopatías resulta atractiva. La investigación sobre este tema contribuirá para divulgar el mecanismo de propagación de proteínas y su participación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Referencias

1. Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(2):109-120.
2. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45-51.
3. Oueslati A, Ximerakis M, Vekrellis K. Protein transmission, seeding and degradation: key steps for alpha-Synuclein prion-like propagation. *Exp Neurol*. 2014;23(4):324-336.
4. Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):301-7.
5. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(3):155-159.
6. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-259.
7. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
8. Jellinger KA. A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol*. 2008;116(1):1-16.
9. Hely MA, Reid WG, Adena MA, Halliday GM, Morris JG. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord*. 2008;23(6):837-844.

10. Schneider JA, Arvanitakis Z, Yu L, Boyle PA, Leurgans SE, Bennett DA. Cognitive impairment, decline and fluctuations in older community-dwelling subjects with Lewy bodies. *Brain*. 2012;135(10):3005-14.
11. Tofaris GK. Lysosome-dependent pathways as a unifying theme in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012;27(11):1364-9.
12. Perrett RM, Alexopoulou Z, Tofaris GK. The endosomal pathway in Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2015;66(A):21-28.
13. Lee SJ, Desplats P, Sigurdson C, Tsigelny I, Masliah E. Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(12):702-6.
14. Lee SJ, Lim HS, Masliah E, Lee HJ. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives. *Neurosci Res*. 2011;70(4):339-48.
15. Abrahamson H, Stenmark H. Protein secretion: unconventional exit by exophagy. *Curr Biol*. 2010;20(9):R415-18.
16. Ejlerskov P, Rasmussen I, Nielsen TT, Bergstrom AL, Tohyama Y, Jensen PH, Vilhardt F. Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25 alpha) promotes unconventional secretion of alpha-Synuclein through Exophagy by impairing Autophagosome-lysosome fusion. *J Biol Chem*. 2013;288(24):17313-35.
17. Kim W, Lee S, Jung C, Ahmed A, Lee G, Hall GF. Interneuronal transfer of human tau between lamprey central neurons in situ. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):647-64.
18. Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci*. 2005;25(25):6016-24.
19. Lee JG, Takahama S, Zhang G, Tomarev SI, Ye Y. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2016;18(7):765-76.
20. Oueslati A, Ximerakis M, Vekrellis K. Protein transmission, seeding and degradation: key steps for alpha-Synuclein prion-like propagation. *Exp Neurobiol*. 2014;23(4):324-36.
21. Volkmar N, Fenech E, Christianson JC. New MAPS for misfolded proteins. *Nat Cell Biol*. 2016;18(7):724-26.
22. Busche MA, Grienberger C, Keskin AD, Song B, Neumann U, Staufenbiel M, Forstl H, Konnerth A. Decreased amyloid-beta and increased neuronal hyperactivity by immunotherapy in Alzheimer's models. *Nat Neurosci*. 2015;18(12):1725-27.
23. Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, Joong Lee S, Masliah E, Hwang D, Lee HJ, Lee SJ. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*. 2013;4:1562.
24. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(16):2667-88.
25. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteome*. 2010;73(10):1907-20.
26. EL Andaloussi, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347-57.
27. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(4):575-81.
28. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*. 2008;8(19):4083-99.
29. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, Huttner WB. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 13):2849-58.
30. Mora EM, Alvarez-Cubela S, Oltra E. Biobanking of Exosomes in the era of precision medicine: are we there yet? *Int J Mol Sci*. 2015;17(1).
31. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon- Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel

- M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
32. Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(1):11-15.
 33. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; 3(3):22.
 34. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2:13-15.
 35. Colombo M, Raposo G, Thery C Biogenesis, secretion and intracellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30, 255-89.
 36. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C. 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.
 37. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruij TD, Wurdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6328-33.
 38. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011;29(4): 341-45.
 39. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(26):9683-9688.
 40. Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(30):11172-77.
 41. Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E. Exosome reduction *in vivo* is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35(8):1792-1800.
 42. Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012;287(6):3842-49.
 43. Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Kruger L, Irsen S, Tepper K, Chandupatla R, Maetzler W, Schneider A, Mandelkow E, Mandelkow EM. The release and trans-synaptic transmission of tau via exosomes. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1): 5.
 44. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kugler S, Ikezu T. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*. 2015;18(11):1584-93.
 45. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, Vekrellis K. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci*. 2010;30(20):6838-6851.
 46. Delenclos M, Trendafilova T, Mahesh D, Baine AM, Moussaud S, Yan IK, Patel T, McLean PJ. Investigation of Endocytic pathways for the internalization of exosome-associated Oligomeric alpha-Synuclein. *Front Neurosci*. 2017;11:172.
 47. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, Cooper JM: Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis*. 2011;42(3):360-7.
 48. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener*. 2012;7:42.
 49. Stuenkel A, Kunadt M, Kruse N, Bartels C, Moebius W, Danzer KM, Mollenhauer B, Schneider A. Induction of alpha-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain*. 2016;139(2):481-94.
 50. Ngolab J, Trinh I, Rockenstein E, Mante M, Florio J, Trejo M, Masliah D, Adame A, Masliah E, Rissman RA. Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):46.

51. Grey M, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, Linse S. Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem*. 2015;290(5):2969–82.
52. Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J Neurochem*. 2008;105(1):217–24.
53. Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. *PLoS One*. 2011;6(12):e29460.
54. Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ. Trafficking of cell-surface amyloid beta protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci*. 1996;109(5):999–1008.
55. Volkmar N, Fenech E, Christianson JC. New MAPS for misfolded proteins. *Nat Cell Biol*. 2016;18(7):724–26.
56. Aboutin S, Bousset L, Loria F, Zhu S, de Chaumont F, Pieri L, Olivo-Marin JC, Melki R, Zurzolo C. Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J*. 2016;35(19):2120–38.
57. Victoria GS, Zurzolo C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol*. 2017; 216(9):2633–44
58. Davis DM, Sowinski S. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(6):431–36.

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias