



**Estandarización del proceso de aislamiento de vesículas extracelulares en
células de cáncer de mama triple negativo**

Juan Felipe Rodríguez Hernández

Universidad del Rosario

Facultad de Ciencias Naturales

Bogotá D.C., 2022

**Estandarización del proceso de aislamiento de vesículas extracelulares en
células de cáncer de mama triple negativo**

Juan Felipe Rodríguez Hernández

Tesis presentada como requisito para obtener el título de:

Biólogo

Directora

María Martínez Agüero, Ph.D.

Codirector

Andrés Rincón Riveros, M.Sc.

Universidad del Rosario

Facultad de Ciencias Naturales

Bogotá D.C., 2022

RESUMEN

Las vesículas extracelulares (EV) son estructuras delimitadas por una membrana lipídica que son secretadas por casi todos los tipos de células al espacio extracelular. Están involucradas en diferentes procesos de comunicación celular; particularmente, se ha identificado que las EV derivadas de células cancerosas desempeñan un papel importante en la modificación del microambiente tumoral ya que tienen la capacidad de transportar diferentes tipos de biomoléculas como proteínas y tipos de RNA, que actúan como reguladores en el ciclo celular. Estas características permiten el uso de EV como biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías, entre ellas el cáncer de seno, así como su uso en terapias dirigidas. El objetivo de este estudio consistió en estandarizar una metodología para el aislamiento de EV presentes en el medio sobrenadante de cultivo de dos líneas celulares de cáncer de mama, así como su caracterización mediante el uso de técnicas basadas en anticuerpos. Los resultados muestran que las vesículas producidas por las células, tanto en cáncer luminal A como en triple negativo, tienen micro RNA (miRNA), por lo que se constituyen efectivamente en una herramienta para diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. Finalmente, este estudio permitió el aislamiento de EV a partir de cultivo celular comprobando la eficiencia de las columnas SEC qEV2 de IZON en laboratorios ubicados sobre los 2000 m.s.n.m y eliminando la contaminación por EV provenientes del suero fetal bovino (SFB) sin afectar significativamente la viabilidad del cultivo celular usando medio de cultivo sin suplementar.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are lipid membrane-bound structures that are secreted by almost all cell types into the extracellular space. They are involved in different cell communication processes; particularly, it has been identified that EVs derived from cancer cells play an important role in modifying the tumor microenvironment since they have the capacity to transport different types of biomolecules, such as proteins and types of RNA, which act as regulators in the cell cycle. These characteristics allow the use of EVs as biomarkers for the diagnosis and monitoring of different pathologies, including breast cancer, as well as their use in targeted therapies. The principal aim of this study was to standardize a methodology for the isolation of EVs present in the culture supernatant of two breast cancer cell lines, as well as

their characterization using antibody-based techniques. The results show that the vesicles produced by the cells, both in luminal A cancer and in triple negative cancer, have micro RNA (miRNA), for which they effectively constitute a tool for diagnosis and monitoring of the disease. Finally, this study allowed the isolation of EVs from cell culture, proving the efficiency of IZON qEV2 SEC columns in laboratories located above 2000 m.a.s.l. and eliminating EV contamination from fetal bovine serum (FBS) without significant effect on the cell culture viability using unsupplemented culture medium.

Palabras Clave: Vesículas extracelulares, cáncer de mama, biomarcadores, miRNA, SEC.

Keywords: Extracellular vesicle, breast cancer, biomarkers, miRNA, SEC.

1. INTRODUCCION

El cáncer, en conjunto, es una de las enfermedades con mayor mortalidad a nivel mundial (Siegel et al., 2014) convirtiéndole en una patología de alto interés científico. Una de estas patologías es el cáncer de mama (CM), el cual tan solo en 2020 produjo la muerte de cerca de 685.000 mujeres a nivel mundial (WHO, 2020). Existen 4 diferentes subtipos de cáncer de mama, entre ellos el triple negativo que se caracteriza por la ausencia de expresión de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Zaharia & Gómez, 2014). Este subtipo tiene características clínicas que incluyen alta invasividad, alto potencial metastásico, propensión a recaídas y mal pronóstico clínico (Yin et al., 2020), por lo que los estudios enfocados en el descubrimiento de biomarcadores para diagnóstico y seguimiento así como el desarrollo de tratamientos, tienen una gran importancia a nivel de salud pública.

Gracias a que la biología molecular busca permanentemente estrategias para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las diferentes variantes del cáncer, se han identificado los micro RNA como herramientas para considerar. Los miRNA son una familia de pequeños RNA no codificantes, con un tamaño de entre 21 a 25 nucleótidos, que pueden inhibir la traducción del mRNA y promover su degradación mediante el emparejamiento de bases con los sitios complementarios de los mRNA diana (Wu et al., 2019). A través de este mecanismo, los miRNA alteran la expresión génica de forma postranscripcional, por lo que son importantes en procesos de regulación de la proliferación celular. La amplificación y sobreexpresión de “oncomiRNA” y la subexpresión de miRNA supresores

de tumores se asocian con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Lin & Gregory, 2015), por lo que el estudio de su biogénesis, expresión y transporte es fundamental para el entendimiento de esta enfermedad.

Las células pueden comunicarse entre sí mediante la liberación de vesículas extracelulares (EV), las cuales son estructuras delimitadas por una membrana que son expulsadas al ambiente extracelular (Xu et al., 2018) Estas pueden ser liberadas por cualquier tipo de célula y su contenido es variable, pero incluyen moléculas reguladoras como proteínas, tipos de RNA (miRNA, mRNA y RNA largos no codificantes), lípidos y fragmentos de DNA que contribuyen a la comunicación entre células, manteniendo la homeostasis celular y colaborando en diversas funciones fisiológicas (Medel-Martínez et al., 2020). Por otro lado, las EV están involucradas en una amplia gama de procesos relacionados con cáncer, incluyendo respuestas inflamatorias, angiogénesis, migración y proliferación celular, inmunosupresión y metástasis (Gopal et al., 2017). Se ha identificado que, en ciertos tipos de patologías como el cáncer colorrectal (CCR) las células tumorales liberan una mayor cantidad de EV comparadas con células normales y su contenido molecular es significativamente diferente (Xiao et al., 2020) lo que les confiere un alto potencial como biomarcadores para el diagnóstico, evaluación y tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Debido a sus características, el aislamiento de EV suele requerir equipos y reactivos de alto costo para su ejecución, por ejemplo, centrifugación diferencial, ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Yang et al., 2021). Una de las técnicas con mayor potencial debido a sus costos y requerimientos en términos logísticos y de equipamiento en laboratorios es SEC, donde, utilizando columnas con una matriz de algún polímero, se separan biomoléculas y estructuras por su tamaño (Brennan et al., 2020). El “laboratorio IZON” ofrece la columna comercial SEC con matriz de sefarosa qEV2, la cual, aunque brinda una alta eficiencia en el aislamiento de EV solo se ha probado por el fabricante en laboratorios ubicados por debajo de los 2000 m.s.n.m, altitud superada por un gran número de ciudades alrededor del mundo, entre ellas capitales latinoamericanas como Bogotá, Quito, La Paz y Ciudad de México, por lo que estandarizar su uso permitiría ampliar el alcance y accesibilidad de esta técnica, además de incentivar la investigación y aplicación en el área de EVs. A pesar de sus bondades, SEC es una técnica de reciente uso y no está tan estudiada como otras más tradicionales; en su estudio Böing et al. (2014) describen por primera vez esta técnica para el aislamiento de EVs en plasma, mientras que Monguió-Tortajada et al. (2019) incluyen protocolos para otros biofluidos como orina y efluentes de diálisis peritoneal además de medio acondicionado de cultivo celular, procesándolos con técnicas de

ultrafiltración y fraccionamiento de flujo de campo. Los autores mencionados utilizaron técnicas de detección por anticuerpos como citometría de flujo y western blot. Por lo anterior, el presente estudio se enfocó en estandarizar una metodología para el aislamiento de vesículas extracelulares provenientes de cultivo celular utilizando columnas SEC qEV2 de IZON en el laboratorio de biología molecular de la Universidad del Rosario, ubicado en la ciudad de Bogotá a 2600 m.s.n.m., modificando los protocolos previamente descritos con el fin de reducir su complejidad y evitando comprometer su efectividad, además se propone un método de detección de EVs más rápido y económico (dot blot) dirigido a proteínas de membrana constitutivas, lo que a su vez permite evaluar la posible producción diferencial de EV entre células de CM de los subtipos triple negativo y luminal A.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo y Viabilidad celular

Se emplearon dos líneas celulares de cáncer de mama obtenidas del banco de células de la Universidad del Rosario, MCF-7 y MDA-MB-453, las cuales son representativas de los subgrupos tumorales luminal A (RE+/RP+/HER2-) y triple negativo (RE α -/RP-/HER2-), respectivamente (Vranic et al., 2011). Para el cultivo celular se utilizó medio DMEM Gibco™ con rojo fenol suplementado con SFB al 10%, L-glutamina 1% y solución antibiótica de Penicilina / Estreptomicina al 1%. Las células se mantuvieron en cultivo monocapa en frascos de 25cm² e incubadas a 37°C, humedad del 95% y niveles de CO₂ del 5%. El medio fue renovado cada 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 80%, después de esto se reemplazó por un medio sin suplementar con SFB con el fin de eliminar las EV de origen bovino presentes en él y asegurar que la totalidad de estas provinieran únicamente del cultivo celular.

Para determinar si existían cambios en el crecimiento y en la viabilidad celular en el medio sin suplementar respecto al suplementado, se realizó un conteo celular con cámara de Neubauer para calcular el porcentaje de muerte celular; para ello se cultivó cada línea en cajas de 25cm² a las cuales se les retiró el medio suplementado al alcanzar una confluencia celular del 80% y se incubaron durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se despegaron las células de la caja usando tripsina al 1%, la cual fue inactivada con DMEM enriquecido con SFB. Esta solución con células en suspensión fue mezclada en proporción 1:1 con azul de tripán al 0.4% para su posterior visualización y conteo.

Se utilizó la prueba T de Student para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de mortalidad celular de las líneas cultivadas con medio libre de SFB y sus respectivos controles. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software IBM SPSS® considerando como estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

2.2. Aislamiento de vesículas extracelulares

El aislamiento de las EV se realizó mediante la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), modificando el protocolo a partir de lo publicado previamente por Monguió-Tortajada et al, (2019), usando columnas qEV2 de IZON con matriz de sefarosa, a partir del medio de cultivo celular recuperado pasadas 24 y 48 horas desde la eliminación del SFB. Para esto fue procesado mediante centrifugación a 400 g x 5 min y posteriormente a 2000 g x 10 min a 4°C con el fin de eliminar residuos de mayor tamaño; posteriormente el medio fue concentrado utilizando unidades de filtración Amicon® Ultra-15, centrifugando a 2000 g x 2 minutos a 4°C, obteniendo así 2 ml de medio para la SEC. El buffer utilizado para la extracción fue buffer fosfato salino (PBS) Gibco™ al 1% previamente filtrado con bomba de vacío y filtro de 0.22 µm. Las EV fueron aisladas de las primeras 7 fracciones eluidas de las columnas SEC (2 ml c/u); estas fueron reducidas a 2 ml utilizando unidades de filtración Amicon® Ultra-15 con el fin de obtener una muestra de trabajo concentrada. Las EV fueron congeladas a -80°C para su conservación.

2.3. Detección de EVs

Para comprobar la presencia de EV en el aislamiento, se utilizaron dos tipos diferentes de pruebas: Dot Blot y Citometría de flujo.

La prueba de anticuerpos Dot Blot fue dirigida a 3 proteínas constitutivas de membrana. Para esto fueron utilizados 5 µl de la muestra y 4µl de los anticuerpos anti-human CD81, CD9 y CD63 disueltos en una solución de bloqueo a base de leche en polvo descremada y TBS-T al 0.02% m/v en una proporción 1:1000. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario acoplado a HRP y se activó mediante el *kit fast-western blot*. Por último, se leyeron los resultados en un fotodocumentador ChemiDoc BioRad utilizando la configuración para quimioluminiscencia.

Para el segundo tipo de evaluación, se utilizó un citómetro de flujo FACSCanto™ con el fin de determinar la presencia de EV en el aislamiento además de características como complejidad y tamaño. Las EV fueron unidas a perlas de látex de 4 µm diluidas en proporción 1:100 con PBS 1x; posteriormente, se acoplaron los anticuerpos *anti-human CD81, CD9 y CD63* (marcados con los

fluorocromos FITC y APC respectivamente) y se detectaron 50.000 eventos por muestra.

2.4 Extracción de miRNA

Se llevó a cabo una extracción de miRNA contenidos en las EV; para ello se usó el kit miRNeasy® de Qiagen, ejecutando el protocolo recomendado por el fabricante a partir de 200 µl de muestra. Posteriormente se evaluó su concentración y pureza utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000.

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo y Viabilidad Celular

A pesar de que los valores totales de números de células en los ensayos de proliferación celular disminuyeron en los cultivos privados de SFB durante 24 y 48 horas (Tabla 1), la prueba T de Student arrojó valores $p > 0.05$ con los resultados de las pruebas de viabilidad para MCF-7 y MDA-MB-453 respecto a los controles; lo que permite afirmar que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de viabilidad celular.

Tiempo de incubación	Línea Celular	Control	Medio sin SFB
24 horas	MDA-MB-453	620.500	470.000
	MCF-7	850.000	605.800
48 horas	MDA-MB-453	1.007.500	797.000
	MCF-7	1.150.500	820.000

Tabla 1. Número de células por ml en cultivo con medio suplementado (control) y libre de SFB durante 2 periodos de incubación a partir de una confluencia del 80%.

3.2. Detección de EVs

El éxito de la eficiencia del método de aislamiento de EV fue verificado mediante una prueba de anticuerpos Dot Blot, la cual permite apreciar de forma cualitativa, gracias a la intensidad del brillo de cada muestra, las diferencias en la producción de EV de cada línea celular.

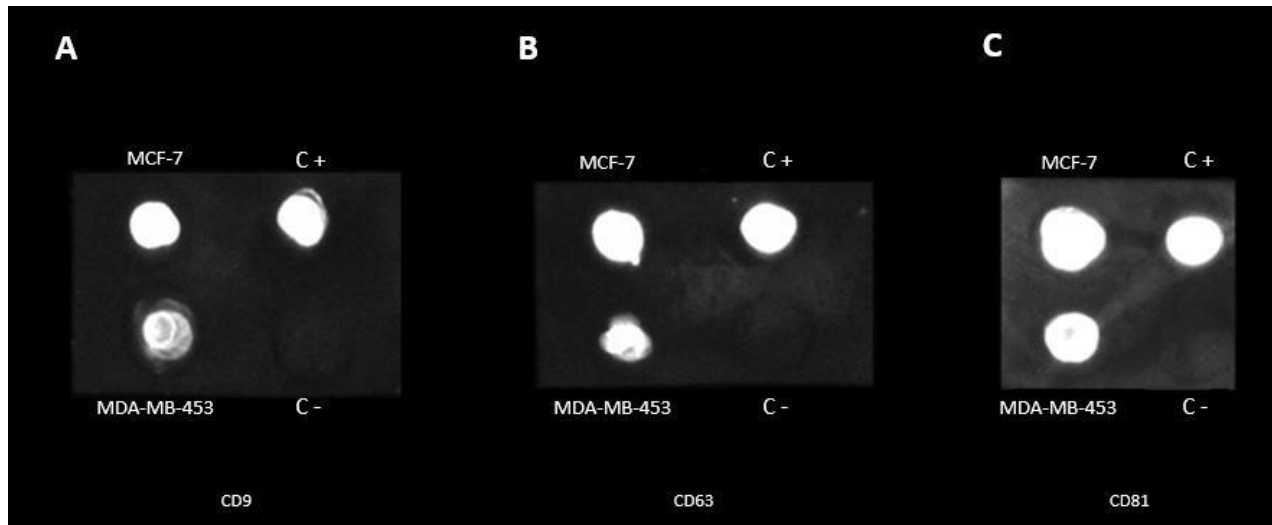


Figura 1. Dot Blot para EV extraídas mediante SEC a partir de cultivo de líneas celulares cancerosas, marcadas con 3 diferentes anticuerpos dirigidos a proteínas constitutivas de membrana A) CD9, B) CD63, C) CD81.

En las pruebas A y B (Figura 1) se aprecia una menor intensidad de fluorescencia en las muestras extraídas a partir de MDA-MB-453 respecto a MCF-7 y el control positivo, mientras que en la prueba C (Figura 1) se observa un punto de menor tamaño en la muestra de MDA-MB-453 respecto a MCF-7. Las características de los puntos (intensidad de fluorescencia y tamaño) están relacionadas de forma directa con el número de receptores de membrana específicos para cada anticuerpo marcado, por lo que las variaciones descritas anteriormente sugieren diferencias en la cantidad de EVs presentes en cada muestra.

Mediante citometría de flujo se caracterizó una población de vesículas extracelulares que fueron marcadas con anti-human CD81 (Figura 2) para verificar su presencia y tamaño aproximado. Se obtuvo una población de eventos (P1) con una complejidad (SSC) de entre 150 y 200 y que además expresan una fluorescencia por FITC entre 103 y 104 (Figura 2, A); además, se identificaron 3 poblaciones con diferente tamaño (FSC) por medio de un análisis de histograma (Figura 2, B), el primer pico (de izquierda a derecha) muestra fragmentos celulares pequeños suspendidos en la muestra, el segundo pico las perlas de látex sin unión a EV y por último el tercer pico (mayor tamaño) corresponde a las EV unidas a las microesferas.

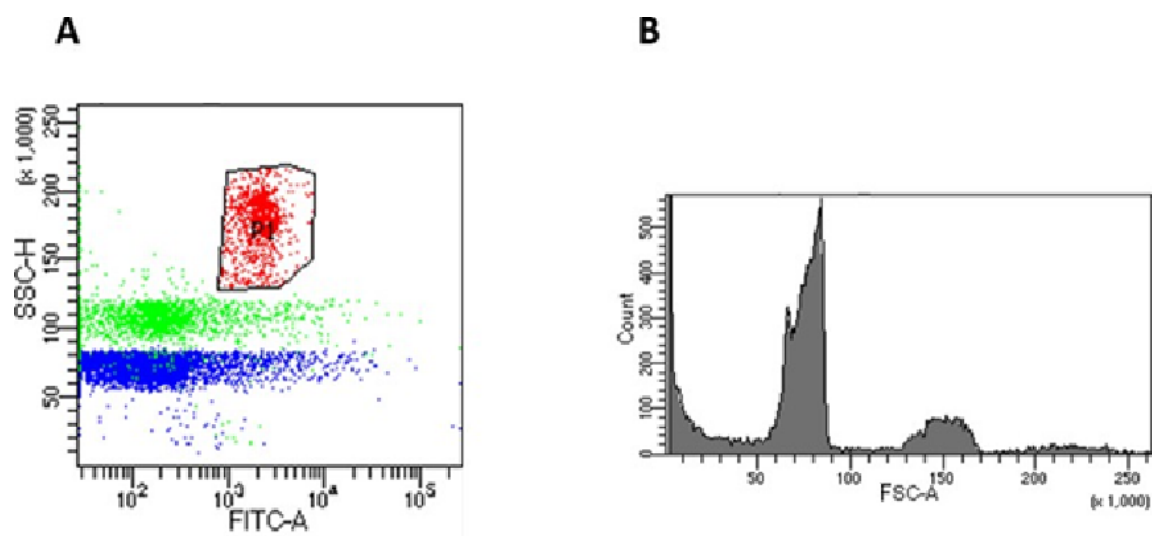


Figura 2. EV marcadas con anti human CD81 (FITC) detectadas mediante citometría de flujo. A) grafico dot plot donde se aprecia la formación de una población de eventos (rojo). B) histograma que indica la formación de 3 poblaciones con diferente tamaño.

3.3. Extracción de miRNA

Se obtuvieron extracciones exitosas de miRNA para ambas líneas celulares. La concentración de miRNA fue calculada obteniendo valores de 5.2 ng/ μ l para MCF-7 y 3.7 ng/ μ para MDA-MB-453 (Tabla 2).

Muestra	Concentración	Unidad	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
MDA-MB-453	3.7	ng/ μ l	0.048	0.008	5.69	0.04
MCF-7	5.2	ng/ μ l	0.087	0.051	1.70	0.37

Tabla 2. Concentraciones de miRNA extraídos a partir de EV medidos por espectrofotometría.

4. DISCUSIÓN

La comunicación intercelular juega un papel importante en el inicio y la progresión del cáncer a través de moléculas secretoras; recientemente, las EV han ganado una relevancia considerable en el estudio de estos mecanismos debido a su capacidad para transportar diferentes tipos de biomoléculas (Naito et al., 2016). En el estudio del cáncer, la evidencia acumulada muestra que las EV juegan un papel importante en la diseminación del tumor, la promoción de la angiogénesis, la inducción de resistencia a los medicamentos y la formación de la heterogeneidad de los fibroblastos

asociados con el cáncer (Naito et al., 2019) Además, dentro de las EV se han descrito una gran variedad de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, que reflejan el fenotipo de sus células parentales (Urabe et al., 2020), lo que las convierte no solo en objetivos terapéuticos si no en potenciales biomarcadores.

El aislamiento de EV a partir de cultivo celular requiere el uso de SFB para mantener las células cultivadas en buenas condiciones y con una tasa de proliferación alta; este se agrega comúnmente como suplemento en los medios de cultivo celular. Sin embargo, el SFB contiene grandes cantidades de EV de origen bovino que interfieren con el estudio de las EV producidas por las células cultivadas (Pham et al., 2021); debido a esto, en la mayoría de los estudios se usa suero empobrecido en EV, que contiene una menor cantidad de EV de origen bovino (Szatanek et al., 2015), el cual se somete a un proceso de ultracentrifugación prolongado, lo que aumenta los costos de las investigaciones. Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se optó por retirar el SFB del medio luego de alcanzar una confluencia celular del 80%, lo cual afectó la tasa de proliferación de las 2 líneas celulares cultivadas; resultados que son congruentes con estudios previos como el reportado por Eitan et al. (2015). A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos demostraron que el porcentaje de viabilidad celular no se vio significativamente afectado respecto al control después de 48 horas, por lo que el cultivo celular seguía siendo apto para la producción de EV, eliminando así la contaminación de EV de origen bovino en el medio extracelular y siendo este el primer ajuste importante a los protocolos previamente publicados.

El estudio y aplicación clínica de las EV depende principalmente de su caracterización morfológica y molecular, por lo que contar con equipos y técnicas de aislamiento estandarizadas es vital para el desarrollo de este campo. Actualmente, la técnica de ultracentrifugación diferencial por gradiente de densidad, es uno de los métodos más aceptados para el aislamiento de EV con alta pureza (Tian et al., 2020), sin embargo, es un proceso que demanda mucho tiempo de espera y equipos especializados, lo cual la vuelve poco práctica en su aplicación para diagnóstico clínico, en especial en países de ingresos medios o bajos. Por otro lado, existen métodos basados en la filtración o la precipitación de EV, pero estos suelen sufrir de contaminación severa por proteínas o por la introducción de materiales químicos exógenos (Guo et al., 2021). Por el contrario, SEC ofrece una importante opción para obtener una pureza comparable a la de la ultracentrifugación sin necesidad de equipos especializados mientras se aíslan las EV usando un polímero para formar una fase estacionaria porosa en una columna, permitiendo que partículas de diferentes tamaños sean

eluidas diferencialmente por flujo de gravedad (Böing et al., 2014). En el presente estudio se utilizó la técnica anteriormente mencionada, usando columnas qEV2 de IZON testeadas por el fabricante en laboratorios ubicados por debajo de los 2000 m.s.n.m.; pese a esa recomendación se logró aislar EV de manera exitosa en el laboratorio de biología molecular de la Universidad del Rosario ubicado en la ciudad de Bogotá (Colombia), la cual se sitúa a 2600 m.s.n.m. Aunque la guía de uso de las columnas SEC indica que solo las primeras 5 fracciones eluidas contienen EV, se recuperaron las primeras 7 fracciones y se concentraron a 2 ml, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de EV.

Debido a que los sobrenadantes de cultivos celulares contienen diferentes tipos de membranas lipídicas y partículas que pueden interferir con el aislamiento de EV (Théry et al., 2006), es fundamental realizar una purificación de este para obtener un aislamiento de buena calidad, por lo cual fue necesario someter el medio recuperado de cultivo a una serie de centrifugaciones diferenciales para asegurar la eliminación de residuos indeseados; además, se realizó el segundo ajuste a los protocolos publicados filtrando el buffer de elución PBS para eliminar posibles cristales de sal con un tamaño de hasta 0.22 μm que además de interferir en el proceso de aislamiento, podrían causar daños estructurales en las membranas de las EV recuperadas interfiriendo con su caracterización y conservación.

Se ha demostrado que los miRNA regulan la expresión génica a nivel postranscripcional y están íntimamente relacionados con el estado del cáncer. Su participación en esta enfermedad se informó por primera vez en la leucemia linfocítica crónica, donde se encontró que una región crítica en el cromosoma 13 no contenía un gen supresor de tumores, sino dos miRNA: miR-15a y miR16-a (Calin et al., 2004). En primer lugar, la expresión de miRNA tiene un efecto causal sobre la tumorigénesis, actuando como oncogenes y genes supresores de tumores, en segundo lugar, la expresión alterada de miRNA se produce como resultado del proceso carcinogénico (McDermott et al., 2014), estas características los hacen potenciales blancos para el diagnóstico de diferentes tipos de Cáncer, así como indicadores de la eficacia de terapias y progresión de la enfermedad. Una de las principales limitantes del uso de miRNA para el diagnóstico clínico es su baja abundancia en el torrente sanguíneo, lo que impide su detección utilizando las herramientas de perfilado estándar (Sabit et al., 2021). Una de las formas de solucionar esta limitante es la extracción de miRNA contenidos en EV, lo cual fue logrado en el desarrollo del presente estudio (Tabla 2). Además, gracias a estos datos fue posible hacer una medición indirecta de la cantidad de EV expresadas por una línea celular con

respecto a la otra ya que en la muestra de MCF-7 se obtuvo aproximadamente 1.5 veces más miRNA que en la de MDA-MB-453, lo cual coincide con la intensidad de fluorescencia y tamaño de los puntos observados en la prueba de dot blot (Figura 1), lo anterior podría significar la existencia de una expresión diferencial entre líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y luminal A. Por supuesto, para confirmar esta hipótesis se requieren estudios adicionales enfocados a verificar dichas diferencias y su significancia. Por otro lado, si bien la concentración y calidad de los miRNA extraídos no fue la más adecuada para su estudio, podrían ser mejoradas mediante ajustes en el protocolo de extracción y purificación con el fin de ejecutar futuros experimentos de retro transcripción y amplificación para así caracterizarlos.

Como se mencionó anteriormente, los miRNA son potenciales biomarcadores para diagnóstico y además pueden ser usados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer; gracias a que estos son transportados dentro de EV, son capaces de viajar entre células sin importar su distancia en el organismo; es decir que las EV pueden ser utilizadas como vehículos para el transporte de miRNA relacionados con la supresión tumoral. Esta aplicación requiere estudios adicionales, especialmente para lograr el óptimo diseño de miRNA y asegurar la especificidad en el ingreso de EV a las células diana, pero, sin lugar a duda, podría ser una opción viable para el desarrollo de terapias dirigidas y personalizadas contra diferentes tipos de cáncer.

La cuantificación y caracterización precisa sigue siendo un desafío en el campo de estudio de las EV. Uno de los métodos más comunes para determinar la cantidad de EV presentes en una muestra es la cuantificación de proteínas, sin embargo, no se puede establecer una correlación directa entre el contenido de proteínas y el número de vesículas en una muestra determinada, no solo por la naturaleza altamente heterogénea de las EV, tanto en tamaño como en composición, sino principalmente por los diferentes niveles de contaminación por proteínas que se obtienen según el método de aislamiento de aislamiento (Christianson et al., 2013). Por lo anterior, la citometría de flujo ofrece una opción con resultados rápidos y de alta precisión para la caracterización de EV; Esta técnica es un enfoque poderoso para el análisis cuantitativo de partículas individuales. La técnica se usa ampliamente para el análisis de células y puede proporcionar información morfológica sobre el tamaño relativo (diámetro) y la estructura interna (complejidad) (Nolan & Jones, 2017), además, el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia puede proporcionar información sobre la abundancia de componentes moleculares específicos de las células y su fisiología funcional (Hedley et al., 2015). Debido a su tamaño nanométrico, las EV no pueden ser detectadas directamente por los citómetros de flujo

convencionales, por esto fue necesario acoplarlas a microesferas (perlas de látex de aldehído/sulfato) con diámetro de 4µm que permite la detección y/o caracterización de EV mediante el etiquetado con anticuerpos específicos haciendo modificaciones al protocolo publicado previamente por Suárez et al, (2017). Si bien se logró identificar la presencia y características como complejidad y tamaño de EV (Figura 2), es necesario realizar ajustes en el protocolo con el fin de estandarizar una metodología que permita la correcta caracterización de EV y eliminación de residuos celulares presentes en la muestra.

5. CONCLUSIONES

Este estudio permitió el aislamiento de vesículas extracelulares presentes en el sobrenadante de cultivo celular de células de cáncer de mama de los subtipos triple negativo y luminal A, mediante la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño. Además, se logró eliminar la contaminación por EV provenientes de SFB sin afectar significativamente la viabilidad del cultivo celular mediante el uso de medio sin suplementar. Por otro lado, se pudo comprobar la eficiencia de las columnas SEC *qEV2* de IZON en laboratorios ubicados sobre los 2000 m.s.n.m y la obtención de miRNA contenidos en las EV, así como su caracterización mediante dot blot y citometría de flujo. Para futuros estudios relacionados con expresión y caracterización de miRNA se sugiere realizar modificaciones al protocolo de extracción mediante el kit miRNeasy® con el fin de mejorar los resultados de calidad y concentración. También se sugiere la estandarización del protocolo para la caracterización de EV mediante citometría de flujo con el fin de eliminar contaminación por residuos celulares y aumentar la eficiencia de la técnica.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad del Rosario a través del Fondo para el Financiamiento de Proyectos de Grado y el Grupo de Investigación en Biología del Cáncer (GIBC) del Instituto Nacional de Cancerología, en el marco del proyecto “Importancia clínica de los exosomas asociados a tumor en el diagnóstico temprano de Cáncer gástrico y sus implicaciones en la modulación del sistema inmunológico”.

Los autores expresan su agradecimiento al Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes de la Universidad del Rosario (CREA) por el préstamo de equipos e instalaciones y al bacteriólogo Jonathan Mora por su apoyo técnico.

7. REFERENCIAS

- Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. 2014.** Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1).
- Brennan, K., Martin, K., fitzGerald, S., Wu, Y., Blanco, A., & Mc Gee, M. M. 2020.** A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*, 23;10(1)
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. 2004.** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999.
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P., & Belting, M. 2013.** Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17380–17385.
- Eitan, E., Zhang, S., Witwer, K. W., & Mattson, M. P. 2015.** Extracellular vesicle depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *Journal of Extracellular Vesicles*, 26;4:26373.
- Gopal, S. K., Greening, D. W., Rai, A., Chen, M., Xu, R., Shafiq, A., Mathias, R. A., Zhu, H. J., & Simpson, R. J. 2017.** Extracellular vesicles: their role in cancer biology and epithelial–mesenchymal transition. *Biochemical Journal*, 474(1), 21–45.
- Guo, J., Wu, C., Lin, X., Zhou, J., Zhang, J., Zheng, W., Wang, T., & Cui, Y. 2021.** Establishment of a simplified dichotomic size-exclusion chromatography for isolating extracellular vesicles toward clinical applications. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(11).
- Hedley, B. D., Llewellyn-Smith, N., Lang, S., Hsia, C. C., MacNamara, N., Rosenfeld, D., & Keeney, M. 2015.** Combined accurate platelet enumeration and reticulated platelet determination by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 88(5), 330–337.
- Lin, S., & Gregory, R. I. 2015.** MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 15(6), 321.
- McDermott, A. M., Miller, N., Wall, D., Martyn, L. M., Ball, G., Sweeney, K. J., & Kerin, M. J. 2014.** Identification and Validation of Oncologic miRNA Biomarkers for Luminal A-like Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9(1).
- Medel-Martínez, A., Sancho-Albero, M., & Martín-Duque, P. 2020.** Use of exosomes as vectors to carry advanced therapies. *RSC Advances*, 10(40), 23975–23987.
- Monguió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., & Borràs, F. E. 2019.** Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion

- chromatography. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 12:773844.
- Naito, Y., Yamamoto, Y., Sakamoto, N., Shimomura, I., Kogure, A., Kumazaki, M., Yokoi, A., Yashiro, M., Kiyono, T., Yanagihara, K., Takahashi, R. u., Hirakawa, K., Yasui, W., & Ochiya, T. 2019.** Cancer extracellular vesicles contribute to stromal heterogeneity by inducing chemokines in cancer- associated fibroblasts. *Oncogene*, 38(28), 5566.
- Naito, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., & Ochiya, T. 2016.** How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 201674:4, 74(4), 697–713.
- Nolan, J. P., & Jones, J. C. 2017.** Detection of platelet vesicles by flow cytometry. *Platelets*, 28(3), 256.
- Pham, C. V., Midge, S., Barua, H., Zhang, Y., Ngoc-Gia Nguyen, T., Barrero, R. A., Duan, A., Yin, W., Jiang, G., Hou, Y., Zhou, S., Wang, Y., Xie, X., Tran, P. H. L., Xiang, D., & Duan, W. 2021.** Bovine extracellular vesicles contaminate human extracellular vesicles produced in cell culture conditioned medium when ‘exosome-depleted serum’ is utilised. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 708, 108963.
- Sabit, H., Cevik, E., Tombuloglu, H., Abdel-Ghany, S., Tombuloglu, G., & Esteller, M. 2021.** Triple negative breast cancer in the era of miRNA. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103196.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. 2014.** Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 9–29.
- Suárez, H., Gámez-Valero, A., Reyes, R., López-Martín, S., Rodríguez, M. J., Carrascosa, J. L., Cabañas, C., Borràs, F. E., & Yáñez-Mó, M. 2017.** A bead-assisted flow cytometry method for the semi- quantitative analysis of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports*, 7(1), 11271–11271.
- Szatanek, R., Baran, J., Siedlar, M., & Baj-Krzyworzeka, M. 2015.** Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 36(1), 11.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. 2006.** Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3.22.1-3.22.29.
- Tian, Y., Gong, M., Hu, Y., Liu, H., Zhang, W., Zhang, M., Hu, X., Aubert, D., Zhu, S., Wu, L., & Yan, X. 2020.** Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flowcytometry. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1).
- Urabe, F., Kosaka, N., Ito, K., Kimura, T., Egawa, S., & Ochiya, T. 2020.** Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 318(1), C29–C39.
- Vranic, S., Gatalica, Z., & Wang, Z. Y. 2011.** Update on the molecular profile of the MDA-

- MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncology Letters*, 2(6), 1131–1137.
- WHO. 2020.** *Breast cancer*. Retrieved June 10, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Wu, K. L., Tsai, Y. M., Lien, C. T., Kuo, P. L., & Hung, J. Y. 2019.** The roles of microRNA in lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1–25.
- Xiao, Y., Zhong, J., Zhong, B., Huang, J., Jiang, L., Jiang, Y., Yuan, J., Sun, J., Dai, L., Yang, C., Li, Z., Wang, J., & Zhong, T. 2020.** Exosomes as potential sources of biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Letters*, 476, 13–22.
- Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D. W., & Simpson, R. J. 2018.** Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15(10), 617–638.
- Yang, J., Gao, X., Xing, X., Huang, H., Tang, Q., Ma, S., Xu, X., Liang, C., Li, M., Liao, L., & Tian, W. 2021.** An Isolation System to Collect High Quality and Purity Extracellular Vesicles from Serum. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 6681–6692.
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. 2020.** Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 1–13.
- Zaharia, M., & Gómez, H. 2014.** Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(4), 2–8.