



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA**

**“CUANTIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DEL
EXOSOMA DE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER MAMARIO
TRIPLE NEGATIVO PARA ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y
PROTEÓMICOS”**

Tesis para optar el título profesional de:

MÉDICO CIRUJANO

Presentado por:

Jorge Alex Alfredo Choque Matos (0000-0001-5273-2009)

Asesor:

Javier Alejandro Enciso Gutierrez (0000-0002-9167-7329)

Lima – Perú

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 25 de febrero de 2022.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Fulton Paul Rivera Albinagorta	<input type="checkbox"/>
Miembro: Méd. Juan Jesús Huaccho Rojas	
Miembro: Méd. Katerine Mayte García Moreno	

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:
CUANTIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DEL EXOSOMA DE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER MAMARIO TRIPLE NEGATIVO PARA ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y PROTEÓMICOS

Presentada por el estudiante:
JORGE ALEX ALFREDO CHOQUE MATOS
 Para optar el título de médico cirujano.

Asesorado por: Mg. Javier Alejandro Enciso Gutiérrez

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de pregrado de la carrera Medicina Humana en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) por mayoría simple () calificar a:

Tesis: JORGE ALEX ALFREDO CHOQUE MATOS			Nota (en letras): Catorce (14)
Aprobado (x)	Aprobado - Muy buena ()	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Mg. Fulton Paul Rivera Albinagorta
 Presidente del Jurado



Mg. Javier Alejandro Enciso Gutiérrez
 Asesor



Méd. Juan Jesús Huaccho Rojas
 Miembro 1



Méd. Katerine Mayte García Moreno
 Miembro 2

**CUANTIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DEL
EXOSOMA DE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER MAMARIO
TRIPLE NEGATIVO PARA ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y
PROTEÓMICOS**

Cuantificación de nanopartículas extracelulares según tamaño y concentración en el secretoma de células con inmunofenotipo CD44+/CD24- de dos líneas celulares del cáncer mamario triple negativo

Jorge Choque-Matos^{1,3}, Javier Enciso-Benavides², Javier Enciso^{3,4}

¹ *Facultad de Medicina Humana. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú*

² *Laboratorio de Células Madre. Clínica Veterinaria Enciso. Lima. Perú*

³ *Grupo de Medicina Regenerativa. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú*

⁴ *Autor principal*

FONDOS Y SUBVENCION



Este trabajo fue apoyado por Proyecto CONCYTEC–Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE (GRANT NUMBER: 104-2018- FONDECYT-BM-IADT-AV).

Dedicatoria y agradecimientos

- *Dedicado a mis padres, Betty y Raúl, que gracias a su amor, esfuerzo y sacrificio estoy aquí, logrando mis metas y les debo la vida por ello.*
- *Agradecer a mi estimado asesor de tesis, Dr. Javier Enciso Gutiérrez. El cual renovó y depositó su confianza profesional en mi al darme esta oportunidad.*
- *Agradecer a Alexandra Elbakyan, fundadora de Sci-Hub, por seguir haciendo libre el conocimiento, que utilice durante todo el pregrado y además el cual aquí se cita; y a cada maestro y persona que ayudo con sus conocimientos y sugerencias tanto en mi vida universitaria como en este proyecto.*

Resumen.

Introducción. Las células madre del tumor mamario triple negativo (CSC-TMTN) producen secretomas cuyas nanopartículas pueden ser biomarcadores, pero no se conoce su frecuencia y concentración en líneas celulares. *Materiales y Métodos.* La concentración y frecuencia de nanopartículas del secretoma de CSC de las líneas MDA -MB-231 y MDA-MB-436 del TMTN, se determinó mediante la técnica TPRS usando el sistema qNano, previamente se concentró mediante filtros de centrifuga Amicon™ (Sigma-Aldrich®, MO, USA) Ultra-15 Centrifugal Filter con un corte de peso molecular de 30kDa. *Resultados.* La mayor frecuencia de nanopartículas se encuentra en el rango de 0-200 nm para las CSC-MDA-MB-436, en tanto que para las CSC-MDA-MB-231 se encuentran entre 201-500 nm. La concentración fue mayor en las células madre del cáncer y su respectiva línea de origen MDA-MB-436. *Conclusiones.* Hay diferencias en frecuencia y concentración de nanopartículas del secretoma de las CSC, lo que permitirá estudios diferenciales para buscar biomarcadores.

Abstract. Background/Aim. Triple-negative breast tumor stem cells (TNBC-SSCs) produce secretomes whose nanoparticles may be biomarkers, but their frequency and concentration in cell lines is unknown. Materials and Methods. The concentration and frequency of CSC secretome nanoparticles from TMTN MDA -MB-231 and MDA-MB-436 lines was determined by TPRS technique using qNano system, previously concentrated by Amicon™ (Sigma-Aldrich®, MO, USA) Ultra-15 Centrifugal Filter with a molecular weight cut-off of 30kDa. Results. The highest frequency of nanoparticles is in the range of 0-200 nm for CSC-MDA-MB-436, while for CSC-MDA-MB-231 they are between 201-500 nm. The concentration was higher in cancer stem cells and their respective line of origin MDA-MB-436. Conclusions. There are differences in frequency and concentration of nanoparticles in the secretome of CSCs, which will allow differential studies to search for biomarkers.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) constituye el subtipo molecular más agresivo entre los tumores de mama [1]. No hay estrategias de tratamiento específicas para este subgrupo de tumores, por lo que el TNBC se maneja con terapias convencionales, lo que a menudo conduce a una recaída sistémica [2]. En tanto que las evidencias actuales sugieren que las células madre del cáncer (CSC) son un objetivo clave para la terapia clínica del cáncer de mama, con el fin de superar la resistencia y la recurrencia, mientras que los hallazgos relacionados con los marcadores y la red de señalización hacen que esté bien fundamentado el desarrollo de modalidades de terapia dirigidas a las células madre del cáncer de mama en general (BCSC) [3], así mismo, se admite que es una estrategia prometedora para el tratamiento del TNBC [4], pero es necesario también estudiar las vesículas extracelulares para comprender su exacto rol en el nicho inductor del cáncer y el microambiente tumoral [5].

Por otro lado, el secretoma es definido como el conjunto global de proteínas secretadas al espacio extracelular por una célula, un tejido, un órgano o un organismo en un momento y unas condiciones determinadas a través de mecanismos de secreción conocidos y desconocidos en los que intervienen orgánulos de secreción constitutivos y regulados [6].

Mientras que las células tumorales regulan su progresión no sólo por factores de sus cuerpos celulares sino también por el secretoma que producen y secretan, el cual altera significativamente el destino de las propias células tumorales y de las células circundantes, tanto células cancerosas y no cancerosas. Sin embargo, múltiples evidencias emergentes sugieren que el secretoma de las células tumorales también puede ser supresor del tumor en respuesta a la señalización paracrina y endocrina [7].

En este conjunto de proteínas del secretoma puede encontrarse moléculas que pueden ser biomarcadores del cáncer, los cuales son sustancias químicas, metabolitos o el producto de una interacción entre una sustancia química y

alguna molécula o célula objetivo que se mide en el cuerpo [8], que se acepta como un parámetro cuantificable, tal como, moléculas, mutaciones o procesos biológicos que son indicadores de diagnóstico, de un tipo de desregulación molecular o de progresión de un determinado tipo de cáncer [9].

En el secretoma se encuentran las vesículas extracelulares (VEs), las cuales son partículas de tamaño nanométrico, que pueden agruparse en: (a) exosomas, con diámetros entre 30 y 200 nm, se forman por la gemación interna de cuerpos multivesiculares, que se fusionan con la membrana plasmática para ser liberados al medio extracelular, (b) microvesículas, también denominadas ectosomas con diámetros que van de 50 a 1000 nm, y brotan directamente de la membrana plasmática, y, (c) cuerpos apoptóticos que tienen un tamaño de entre 500 y 2000 nm y están formados por fragmentos de células muertas o moribundas. Las exploraciones de valor terapéutico se centran actualmente en los exosomas y las microvesículas [10].

Las VEs son liberadas por diferentes tipos de células y tienen la capacidad de transportar ciertas cargas, como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, que han sido reconocidas como un mediador vital en la comunicación entre células, se consideran uno de los vehículos más eficaces de información entre las células. Por ello, varios estudios han llevado a reconocer las VE asociadas a células madre como nuevos complejos capaces de contribuir a la determinación del destino celular de las células normales o tumorales destacándose un papel bidireccional de la comunicación mediada por VE, de las células madre cancerosas al microambiente y también del microambiente a las células madre cancerosas [11]. Se ha planteado que la plena comprensión de las funciones de las EVs derivadas de las CSCs en el desarrollo tumoral proporcionará definitivamente nuevas ideas para las estrategias terapéuticas basadas en las CSCs [12].

Los secretomas son derivados de células y comprenden ingredientes bioactivos pleiotrópicos, Existen estudios previos que resaltan características como tamaño y concentración [13] sin embargo, su propia naturaleza representa un obstáculo importante para la eficacia reproducible que garantice una elevada consistencia

entre lotes y aún no están bien establecidos los parámetros de control de calidad [14].

Con estas consideraciones, se justifica la importancia de conocer el tamaño de las partículas en el secretoma para que los resultados de futuros trabajos tengan consistencia y puedan ser comparables entre muestras de estudio [15], así como en estudios donde se buscan biomarcadores del cáncer mediante ensayos que sean contrastables [16].

Este estudio pretende que sus resultados ayuden a sentar las bases para incorporar como parámetros de control de calidad y estandarización, la concentración y el tamaño de las nanopartículas presentes en la producción de secretoma de células madre del cáncer de mama triple negativo, con el fin de realizar futuros ensayos en búsqueda de biomarcadores de las células madre del cáncer mamario triple negativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Células

En este estudio se trabajó con las líneas celulares MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130™) y MDA -MB 231 (ATCC® HTB 26™), ambas líneas celulares de tumor mamario triple negativo humano del subtipo transcripcional de claudina baja (ATCC. USA) [17]. Como células control negativo se utilizó la línea MCF-7 de cáncer mamario no triple negativo (ATCC). Se mantuvieron y fueron expandidas en medio de cultivo DMEM-F-12 (Sigma) complementado con 4,5% de glucosa, 4 mM de L-glutamina, 1% de antibióticos (Merck-Millipore), 1% de aminoácidos esenciales (MEM, Sigma) y 10% de suero fetal bovino. La diferencia entre los cultivos celulares fue que las células MDA-MB-436 además se complementaron con 0,01 mg/ml de insulina (Sigma) y 16 mcg/ml de glutatión (Sigma).

Inmunoselección de células

El protocolo utilizado en este trabajo estableció dos etapas de selección inmunomagnética de células utilizando el separador magnético MiniMACS (Miltenyi Biotec), conforme a lo descrito en un trabajo previo [18], que en resumen consistió en que tras alcanzar el 70% de confluencia celular, las células se desprendieron con 0,025% de tripsina, se centrifugaron a 300g y se concentraron hasta un total de 10^7 células. A continuación, se etiquetaron con los anticuerpos CD24-biotina y CD44-MACS MicroBeads (Miltenyi) para marcar las células objetivo.

La primera etapa fue la selección negativa para obtener una población de células CD24- utilizando una columna LD (Miltenyi). Luego, las células de la población CD24- fueron sometidas a una selección positiva mediante el paso por columnas LS (Miltenyi) para la captura magnética de células con un fenotipo CD44+, obteniendo así una población de células con el fenotipo CD44+/CD24-, que se corroboró mediante citometría de flujo, como se describe a continuación. Las células con este fenotipo se sembraron en frascos de 175 cm² (SPL Life Sciences Co., Ltd., Corea) y se expandieron en una incubadora (Nuve Incubadora, EC 160, Turquía) a 37° C, 5% de CO₂ y 90% de humedad antes de ser criocongeladas a -170° C en nitrógeno líquido.

Medio Condicionado (MC)

El medio condicionado fue obtenido de las líneas planteadas e inmunoseleccionadas (CSC), considerando 3 aislados por cada tipo de células puestas en Flask 175 (Falcon). Luego que estas células alcanzaron 80% de confluencia como mínimo, se cambió este medio de cultivo por otro sin suero fetal bovino por un tiempo de 48 horas, posterior a ello, fue retirado y centrifugado a 1,500 rpm durante 5 minutos, del cual se retiran con pellet restos celulares. El sobrenadante, medio condicionado, es congelado a -80°C.

Aislamiento del secretoma

Posteriormente se descongeló el sobrenadante del MC siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una vez filtradas, estas se concentraron utilizando filtros de centrifuga Amicon™ (Sigma-Aldrich®, MO, USA) Ultra-15 Centrifugal Filter con un corte de peso molecular de 30kDa, y se centrifugaron a 5000 g por 30 minutos según indicación del fabricante. El material concentrado se separó manualmente en microtubos estériles para luego ser separados en diferentes disoluciones para proceder a analizar cuantitativamente sus partículas

Análisis de Nanopartículas del secretoma

Se realizaron lecturas mediante la técnica Tunable Resistive Pulse Sensing (TPRS) por medio del equipo qNano (Izon Science) para las muestras de secretoma de las líneas celulares de Tumor Mamario Triple Negativo MDA-MB-231 y MDA-MB-436 y de las células inmunoseleccionadas con el inmunofenotipo CD44+/CD24-.

La medición altamente exacta de las propiedades fisicoquímicas de las nano partículas como su tamaño y concentración, se realizaron mediante la técnica TRPS usando el equipo qNano (Izon Science), aplicando el protocolo que establece el fabricante del equipo qNano y del Software Control Suite (Izon Science). El qNano actúa basándose en el principio de Coulter, donde existen dos celdas fluidas que contienen la muestra a analizar (celda superior) y el electrolito (celda inferior), las cuales están separadas por una membrana aislante (el nano poro). Cuando las partículas pasan a través del poro, al tener una mayor resistencia que el electrolito, reducen momentáneamente la corriente que pasa a través del poro, se genera lo que llamamos un bloqueo, el cual no es más que el pulso resistivo, el cual nos da el volumen de la partícula agrupando los datos de su magnitud y duración de cada bloqueo. Por otro lado, cuantas veces se generen estos bloqueos, ó sea su frecuencia, nos dará su concentración. Para lograr ello, se aplica una determinada presión. Es decir, la frecuencia de bloqueos se gradúa linealmente con la presión aplicada, lo que nos da en términos técnicos una concentración de dispersión, el cual se puede observar como la concentración de partículas mediante el software Izon Suite.

Dada las amplias posibilidades de proteínas dentro del secretoma analizado, se comprende la existencia de múltiples compuestos bioactivos pleiotrópicos, por lo cual, se usó de filtrado informático por el software Izon Control Suite, donde se pudo separar cuantitativamente la concentración de partículas en tres diferentes grupos, los cuales fueron clasificados en partículas pequeñas, medianas y grandes (0-200; 201-500; >500 respectivamente); con el fin de poder establecer diferencias y contrastarlas entre sí.

Análisis Estadístico

Los resultados generales se observan mediante histogramas y el sistema indica las SD para cada lectura. Los gráficos informáticos fueron procesados en Excel (Microsoft)

RESULTADOS

Análisis de nanopartículas del secretoma

Se obtuvo la unión de tres medios condicionados para cada CSC y células tumorales de cada línea celular, previo al aislamiento de su respectivo secretoma. Empleando el equipo qNano(Izon) y la tecnología TPRS, se realizaron 5 lecturas, con aplicación de dos presiones (P) diferentes para ambos secretomas de células tumorales y del inmunofenotipo CD44+/CD24- (CSC) de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-436.

Los datos obtenidos en estas múltiples lecturas de su secretoma, no variaron en resultados, por lo cual se procedió a analizar cuantitativamente la lectura con los resultados más intermedios entre todas las lecturas de cada secretoma para ambas líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-436, tanto sus células tumorales y del inmunofenotipo CD44+/CD24- (CSC).

Todas las lecturas de las muestras llegaron a un conteo de 500 partículas como mínimo según lo recomendado por el proveedor del qNano, con el fin de obtener una data estadísticamente aceptable para determinar la concentración y tamaño.

Dada las amplias posibilidades de proteínas dentro del secretoma y en consecuencia de múltiples compuestos bioactivos pleiotrópicos, se decidió hacer uso del filtrado informático mediado por el software Izon Control Suite, donde se pudo separar cuantitativamente las partículas en tres diferentes grupos, cuales fueron clasificados en partículas pequeñas, medianas y grandes (0-200; 201-500; >500 respectivamente); con el fin de poder establecer diferencias y contrastarlo con la literatura actual sobre nomenclatura de acuerdo al tamaño de estas.

Nanopartículas de líneas celulares del cáncer mamario triple negativo

Línea celular L-MDA-MB-231

Para promedio del análisis del secretoma de esta muestra de la línea MDA-MB-23, se obtuvo una concentración total de partículas/mL de 3.26×10^7 , con un diámetro medio 230 nm y una moda de 198 nm. Detalles analíticos en la Figura 1.

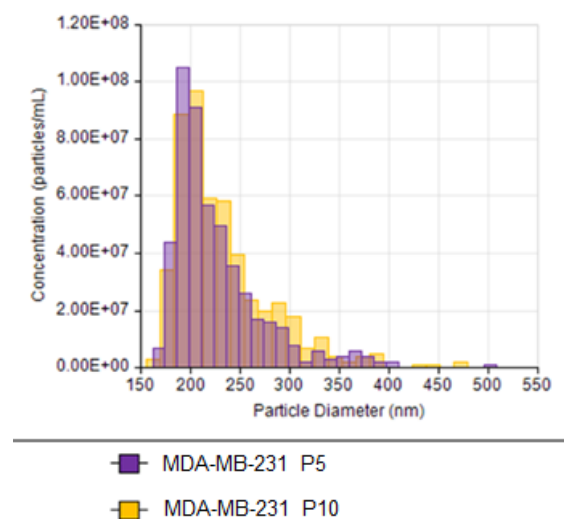


Figura 1. Histograma del análisis de partículas para L-MDA-MB-231. Para la lectura con presión de 5 mbar se tiene una media de 226 nm (SD 46.6), con un diámetro mínimo de 168 nm y un máximo de 499nm. Para la lectura con presión de 10 mbar se tiene una media de 234 nm (SD 52.9), con un diámetro mínimo de 169 nm y un máximo de 558nm.

Línea celular L-MDA-MB-436

Para promedio del análisis del secretoma de esta muestra de la línea MDA-MB-436, se obtuvo una concentración total de partículas/mL de 1.29×10^8 , con un diámetro medio 258 nm y una moda de 213nm. Detalles analíticos en la Figura 2.

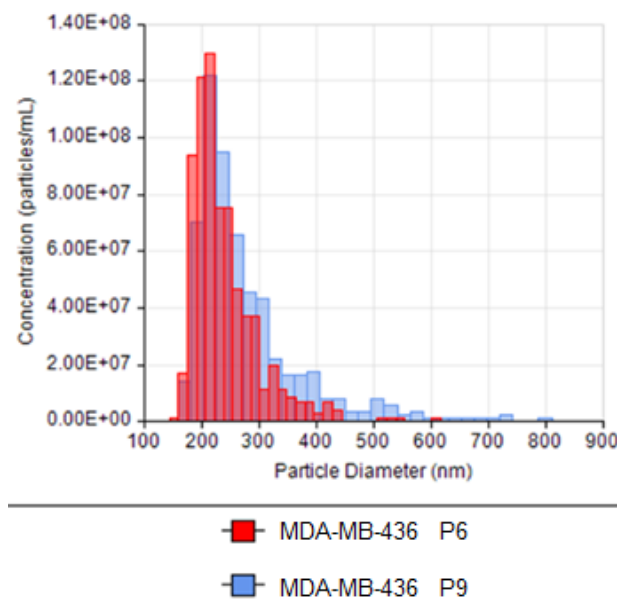


Figura 2. Histograma del análisis de partículas para L-MDA-MB-436. Para la lectura con presión de 6 mbar se tiene una media de 239 nm (SD 60.5), con un diámetro mínimo de 156 nm y un máximo de 607 nm. Para la lectura con presión de 9 mbar se tiene una media de 277 nm (SD 98.8), con un diámetro mínimo de 159 nm y un máximo de 800 nm.

Nanopartículas del secretoma de células con inmunofenotipo CD44+/CD24- (CSC)

Línea celular CSC-MDA-MB-231 (fenotipo CD44+/CD24-)

Para el promedio del secretoma de las CSC de la línea MDA-MB-231, se obtuvo una concentración total de partículas/mL de 1.3×10^{10} , con un diámetro medio 250 nm y una moda de 220 nm. Detalles analíticos en la Figura 3.

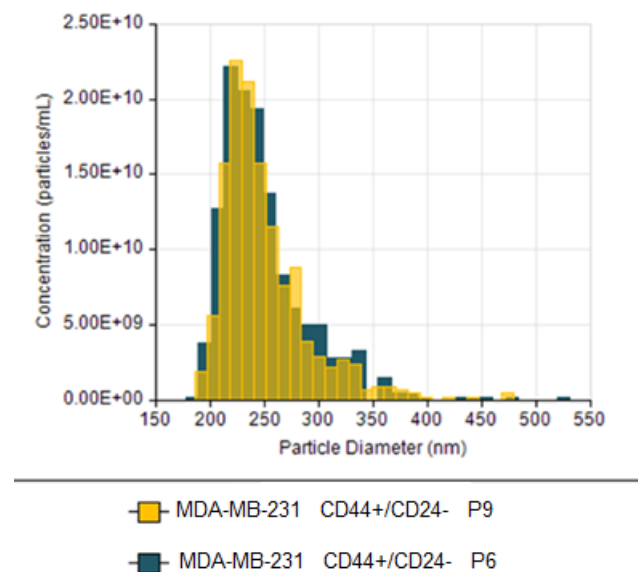


Figura 3. Histograma del análisis de partículas para CSC-MDA-MB-231 (fenotipo CD44+/CD24-). Para la lectura con presión de 6 mbar se tiene una media de 250 nm (SD 43.5), con un diámetro mínimo de 186 nm y un máximo de 523 nm. Para la lectura con presión de 9 mbar se tiene una media de 250 nm (SD 41.3), con un diámetro mínimo de 188 nm y un máximo de 473 nm

Línea celular CSC-MDA-MB-436 (fenotipo CD44+/CD24-)

Para el promedio del secretoma de las CSC de la línea MDA-MB-436, se obtuvo una concentración total de partículas/mL de 2.71×10^8 , con un diámetro medio 183 nm y una moda de 140 nm. Detalles analíticos en la Figura 4.

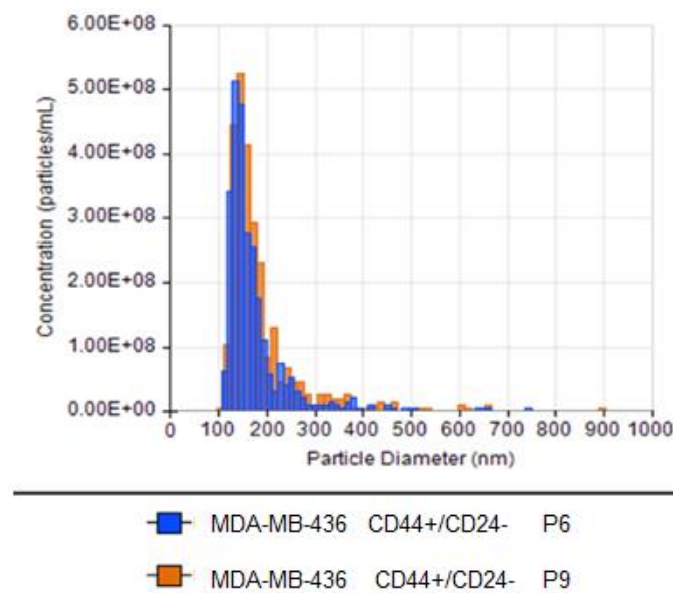


Figura 4. Histograma del análisis de partículas para CSC-MDA-MB-436 (fenotipo CD44+/CD24-). Para la lectura con presión de 6 mbar se tiene una media de 176 nm (SD 76.9), con un diámetro mínimo de 110 nm y un máximo de 739 nm. Para la lectura con presión de 9 mbar se tiene una media de 190 nm (SD 87.4), con un diámetro mínimo de 109 nm y un máximo de 900 nm.

Diferencias entre líneas celulares y las CSC de inmunofenotipo CD44+/CD24-

Se realizaron análisis diferenciados de tipo cuantitativo de acuerdo a la concentración de partículas con respecto al rango de tamaño para cada línea celular y las CSC. Esto se obtuvo mediante el software Izon Control Suite, logrando separar en tres grupos diferentes todas las partículas obtenidas del secretoma de las líneas celulares mencionadas. Estos grupos fueron caracterizados de 0 a 200 nm (pequeños); 201- 500 nm (mediano) y mayores de 501 nm. (grandes).

Los resultados de este trabajo evidenciaron que no hay diferencias significativas en cuanto al tamaño entre las nano partículas del secretoma de células y del secretoma de sus CSC. (Tabla 1 y 2)

LINEA CELULAR MDA-MB-231					
CARACTERISTICAS		L-MDA-MB-231		CSC-MDA-MB-231	
		P5	P10	P6	P9
TAMAÑO DE PARTICULAS EN NANOMETROS	MÍNIMO	168	169	186	188
	MÁXIMO	499	558	523	473

Tabla 1: Diferencias del diámetro mínimo y máximo para lecturas del secretoma de células tumorales y CSC (fenotipo CD44+/CD24-) de la línea celular MDA-MB-231.

LINEA CELULAR MDA-MB-436					
CARACTERISTICAS		L-MDA-MB-436		CSC-MDA-MB-436	
		P6	P9	P6	P9
TAMAÑO DE PARTICULAS EN NANOMETROS	MÍNIMO	156	159	110	109
	MÁXIMO	607	800	739	900

Tabla 2: Diferencias del diámetro mínimo y máximo para lecturas del secretoma de células tumorales y CSC (fenotipo CD44+/CD24-) de la línea celular MDA-MB-436.

Sin embargo, sí se observa notables diferencias entre la concentración de nano partículas del secretoma de líneas de células de cáncer de mama triple negativo (L-TNBC), y entre el de las CSC, para ello se realizaron análisis diferenciados de tipo cuantitativo de acuerdo al diámetro y la concentración de partículas con respecto al rango de tamaño para cada muestra de cada línea celular.

Con respecto a la línea celular L-MDA-MB-231, se determinó que la mayor frecuencia de partículas, para ambos análisis de las muestras de secretoma, se encontraba en el rango de 201 a 500 nm (L-MDA-MB-231:75%; CSC: 97%). Mientras que, se demostró una mayor concentración de nano partículas en el secretoma de las CSC (L-MDA-MB-231 32 millones/ml; CSC: 13000 millones/ml (Figura 5).

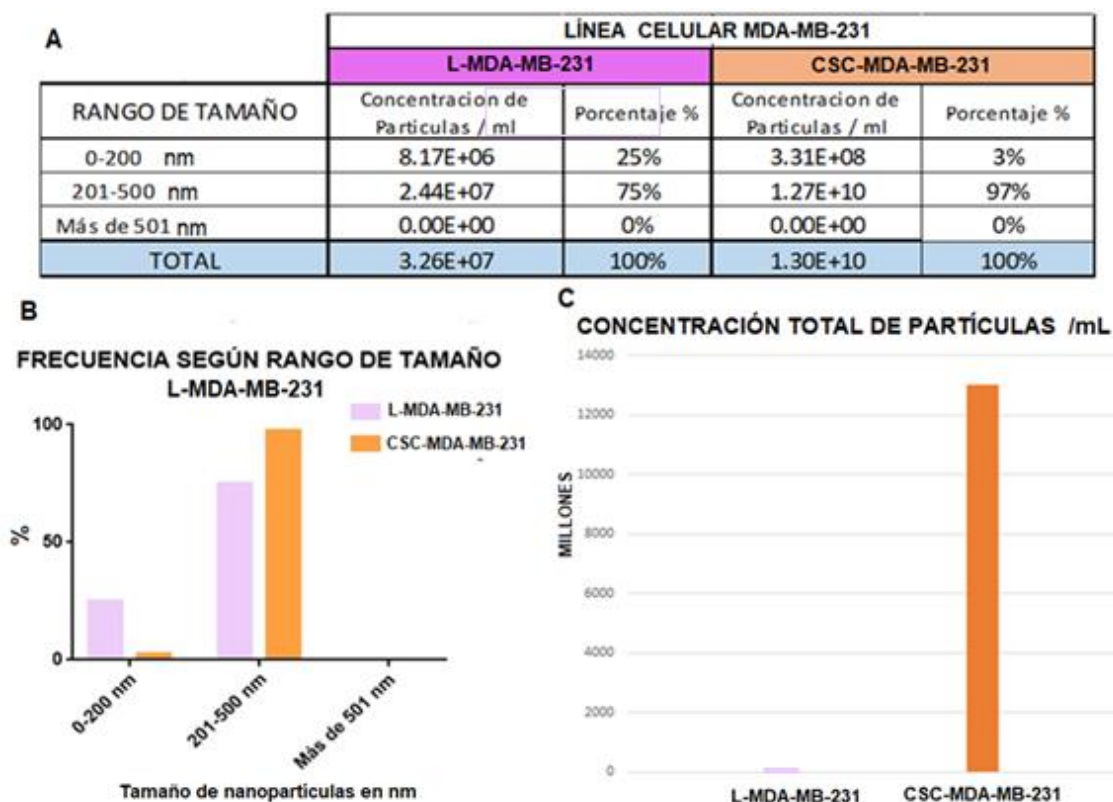


Figura 5. Diferencias entre secretoma de L-MDA-MB-231 versus CSC-MDA-MB-231. A) Porcentajes de partículas diferenciados por su concentración de acuerdo al rango de tamaño. B) Comparativa de frecuencia de partículas por rango de tamaño entre el secretoma de las L-MDA-MB-231 y sus CSC. C) Diferencia de hallazgos en la concentración total de partículas entre el secretoma de las células de L-MDA-MB.231 versus sus CSC.

Por otro lado, las partículas del secretoma de las L-MDA-MB-436, tuvieron una mayor frecuencia en el rango de 201 a 500 nm (77%), mientras que las partículas del secretoma de sus CSC, tuvieron la mayor frecuencia en el rango de 0 a 200 nm (65%). Sin embargo, la concentración de partículas es mayor en el secretoma de las cancer stem cells. (L-MDA-MB-436: 129 millones/ml; CSC: 271 millones/ml) (Figura 6)

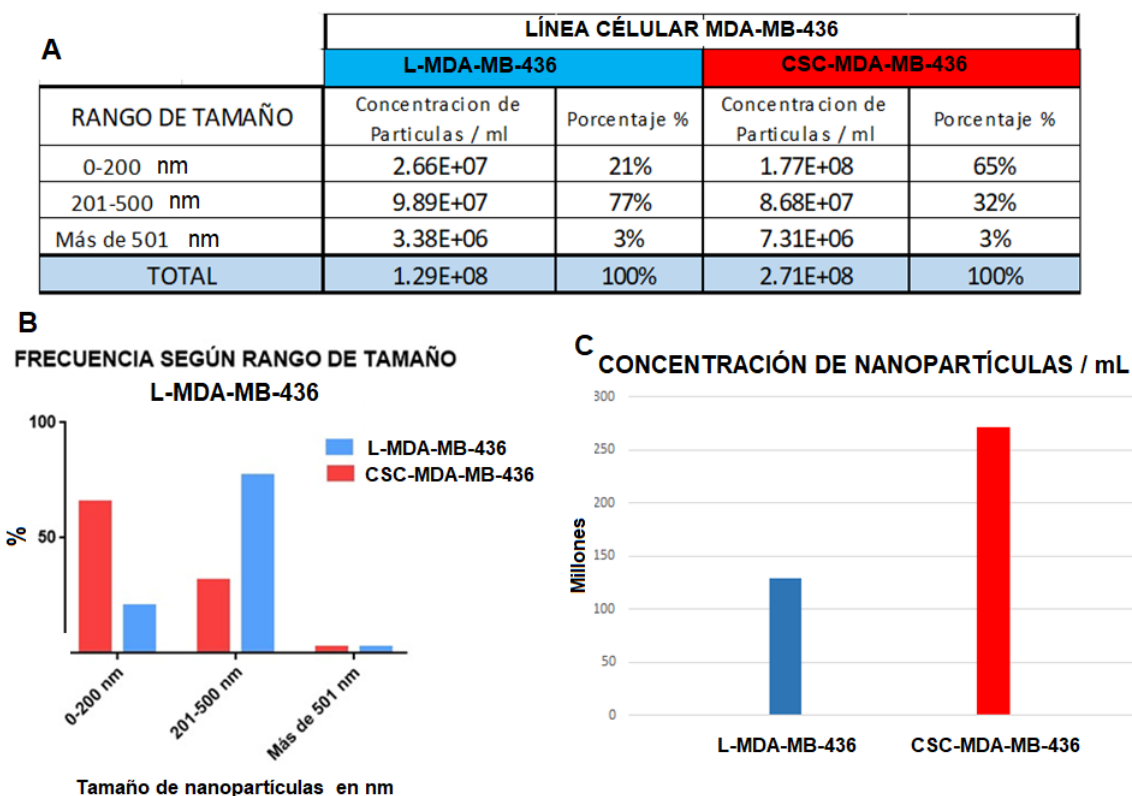


Figura 6. Diferencias entre secretoma de células L-MDA-MB-436 versus CSC-MDA-MB-436. A) Porcentajes de partículas diferenciados por su concentración de acuerdo al rango de tamaño. B) Comparativa de frecuencia de partículas por rango de tamaño entre el secretoma de ambas células. C) Diferencia en la concentración total de partículas entre el secretoma de las células L-MDA-MB-436 versus CSC-MDA-MB-436.

DISCUSIÓN

En este trabajo se da a conocer que se han aislado nanopartículas del secretoma de células madre del cáncer con inmunofenotipo CD44+/CD24- de dos líneas de tumor mamario triple negativo (TMTN) denominadas MDA-MB-231 y MDA-MB-436. Sin embargo, en estudios previos se ha demostrado que existe una amplia variabilidad de tipos de nanopartículas en el tipo de cada muestra estudiada [18], y son designadas en conjunto como vesículas extracelulares (VE) [19].

Por lo que mediante la técnica TPRS y empleando el sistema qNano[20] determinamos el tamaño y cantidad de las nanopartículas del secretoma de las CSC distribuyéndolas en 3 grupos de 0-200 nm (contiene vesículas pequeñas), de 201-500 nm (contiene vesículas medianas) y más de 501 nm (contiene vesículas grandes), en base a una propuesta de la ISEV [14,21,22], determinamos en qué grupo había mayor número de nanopartículas. En este contexto, nuestro estudio demuestra que en el secretoma de las células estudiadas la mayor frecuencia de partículas en la línea MDA-MB-231 se encontraba en el rango de 201-500nm (L-TNBC:75%; CSC:97%), contrastándolo con la nomenclatura, se asociarían por tamaño a ectosomas o vesículas medianas, en tanto que en el secretoma de la línea MDA-MB-436 la mayor frecuencia de partículas se encontraba en el rango de 201-500nm (L-TNBC:77%) similar a la anterior línea celular, pero a diferencia de la línea MDA-MB-231, en esta línea las CSC tuvieron mayor frecuencia (65%) en el rango 0-200nm rango que, contrastándolo con la nomenclatura, se asociarían por tamaño a exosomas o vesículas pequeñas.

Por otro lado, también había diferencias en la concentración de partículas entre la línea celular y sus CSC, así encontramos que las CSC-MDA-MB-231 contenía una mayor concentración de nanopartículas (1.3×10^{10}) que la línea L-MDA-MB-231 (1.3×10^7). En tanto que las CSC-MDA-MB-436, al igual que la anterior línea tenía mayor concentración (2.7×10^8) que la línea L-MDA-MB-436 (1.3×10^8). Por lo que establecimos que en este trabajo la línea MDA-MB-436 y sus respectivas CSC tenían mayor concentración de nanopartículas que la línea CSC-MDA-MB-

231 y sus respectivas CSC. Así mismo las CSC tienen mayor concentración de nanopartículas que las líneas celulares de las que proceden, en las dos líneas celulares estudiadas en este trabajo, a pesar de que todas fueron tratadas con el mismo protocolo de cultivo celular y la producción de su medio condicionado. Esto podría explicarse por el estrés celular al proceso de la criopreservación como se ha demostrado en otros estudios [12], o a diferencias inherentes a su propia biología [23], relevando el hecho de que este trabajo demostró mayor frecuencia y concentración de nanopartículas por parte de las CSC con inmunofenotipo CD44+/CD24- y son células intratumorales asociadas a la quimioresistencia y metástasis, cualidades que exigen alta capacidad migratoria y de crecimiento poblacional [24,25].

Estas cualidades cuantitativas de las nanopartículas del secretoma de las CSC podría explicar el alto grado de comunicación intercelular [26] y la capacidad de alterar el microambiente tumoral regulando así el crecimiento de las células circundantes [1]. También hay evidencias en una línea celular altamente invasiva y metastásica, que ciertas subpoblaciones de nano partículas del secretoma celular tienen una mayor probabilidad de desencadenar este tipo de actividades pro tumorales [27], lo cual, justifica la importancia de identificar los rangos de tamaño donde se observe la mayor presencia de estas partículas. Todo esto plantea la necesidad de identificar cuantitativa y cualitativamente nanopartículas de estas subpoblaciones celulares como son las CSC, para avanzar en el conocimiento de la patogénesis del cáncer de mama triple negativo [11,28,29].

Los datos que reportamos aquí, no han sido aún descritos por trabajos previos y podemos afirmar su importancia para futuros trabajos que busquen biomarcadores de este tipo de células en el cáncer mamario triple negativo, así como para estudios básicos de la biología celular de las CSC en general, pues las diferencias en el tamaño, frecuencias y concentración de nanopartículas contenidas dentro de sus secretomas, permitirán explorar nuevas explicaciones para sus diferentes comportamientos biológicos, clínicos y carcinogénicos. Sin embargo, se recomienda integrar métodos cualitativos para identificar la naturaleza de las subpoblaciones de nanopartoculas. [30]. No obstante, en general, los valores cuantitativos obtenidos en este estudio, son comparables

con la nomenclatura actual para el estudio de nano partículas en diferentes fluidos biológicos como el cultivo celular [2,20,31].

En cuanto al método de aislamiento del secretoma utilizado en este estudio, basado en el uso de filtros centrífugos Amikon, demostró una amplia distribución en cuanto al tamaño, para las nano partículas obtenidas según la desviación estándar de sus resultados, proporcionando una mayor recuperación de nano partículas en comparación con otros métodos de aislamiento, lo cual permite cuantificar la amplia variabilidad de tamaños de nano partículas del secretoma [15]. Actualmente, son considerados como métodos de recuperación y especificidad intermedias, ya que recuperan una mayor cantidad de nano partículas del secretoma, junto con cierta cantidad de proteína [21], las cuales pueden ser limitadas con el uso de un filtrado previo como se realizó en este trabajo.

En este contexto, a pesar de ser aceptados para el aislamiento de nano partículas, es recomendable combinarlos con otros métodos de recuperación [21], por lo cual, es necesario mejores estudios que combinen técnicas de recuperación como la nuestra, con otras más selectivas como la cromatografía por exclusión de tamaño, la cual puede reducir la desviación estándar con respecto a los resultados en el tamaño de las nano partículas al ser un método más excluyente [9] y, en futuros estudios, al agregar técnicas cualitativas de identificación de subpoblaciones, poder centrarnos en nano partículas de subtipos específicos [7].

Mientras que la técnica de Pulso Resistivo Sintonizable (TPRS) utilizado en este estudio empleando el sistema qNano (Izon Science), que son ampliamente reconocidos [4,32], nos permitió acceder a demostrar la presencia de Nanopartículas en el secretoma de las líneas celulares aisladas, para lo cual exige pequeñas cantidades de muestra a analizar, como ha sido descrito previamente [32]. Por la alta recuperación de partículas, es necesario realizar múltiples diluciones, con el fin de obtener una que no obstruya el nanoporo, permitiendo así un completo análisis del tamaño y concentración de partículas en el secretoma y un análisis estadístico completo y detallado de las nanopartículas [33].

CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio demuestra que se pudo aislar y caracterizar cuantitativamente, las Nanopartículas del secretoma de las CSC de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-436, determinándose que la mayor frecuencia de partículas se encuentra en el rango de 0-200 nm para las CSC-MDA-MB-436, en tanto que para las CSC-MDA-MB-231 se encuentran en el rango de 201-500 nm. En cuanto a la concentración de nanopartículas fue mayor en la CSC-MDA-MB-436.

Consideramos que conocer el espectro de nanopartículas del secretoma de las CSC de TNBC, es clave para poder generar mayor conocimiento de sus múltiples propiedades y sea el inicio del camino para futuros ensayos en la búsqueda de biomarcadores de la célula madre de este tipo de cáncer.

Data Availability: All data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest in regard to this study.

Acknowledgments. *This work was supported by Proyecto CONCYTEC–Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE (grant number 104-2018- FONDECYT-BM-IADT-AV).*

REFERENCIAS

1. Vagia, Elena, Devalingam Mahalingam, and Massimo Cristofanilli, “The Landscape of Targeted Therapies in TNBC”, *Cancers*, vol. 12 (4): 916, 2020.
2. Medina, Mauricio A., Goldie Oza, Ashutosh Sharma, L. G. Arriaga, José Manuel Hernández Hernández, Vincent M. Rotello, and Jose Tapia Ramirez, “Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17 (6): 2078, 2020.
3. Bai, Xupeng, Jie Ni, Julia Beretov, Peter Graham, and Yong Li, “Cancer Stem Cell in Breast Cancer Therapeutic Resistance”, *Cancer Treatment Reviews*, vol. 69: 152–63, 2018.
4. O’Conor, Christopher J., Tiffany Chen, Iván González, Dengfeng Cao, and Yan Peng, “Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer: A Potential Target and Prognostic Marker”, *Biomarkers in Medicine* 12 (7): 813–20, 2018.
5. Afify, Said M., Ghmkin Hassan, Ting Yan, Akimasa Seno, and Masaharu Seno, “Cancer Stem Cell Initiation by Tumor-Derived Extracellular Vesicles”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2021.
6. Agrawal, Ganesh Kumar, Nam-Soo Jwa, Marc-Henri Lebrun, Dominique Job, and Randeep Rakwal, “Plant Secretome: Unlocking Secrets of the Secreted Proteins”, *Proteomics*, vol. 10 (4): 799–827, 2010.
7. Liu, Sheng-Zhi, Xun Sun, Ke-Xin Li, Chien-Chi Lin, Sungsoo Na, Bai-Yan Li, and Hiroki Yokota, “Tumor Cell Secretomes in Response to Anti- and pro-Tumorigenic Agents”, *Onco*, vol. 1 (2): 101–13, 2021.

8. Ipcs. 2006, *Principles for Evaluating Health Risks in Children Associated with Exposure to Chemicals*. Genève, Switzerland: World Health Organization, 2006, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43604> .
9. Novak, Daniel, and Jochen Utikal, “New Biomarkers in Cancers”, *Cancers*, vol. 13 (4): 708, 2021.
10. Phelps, Jolene, Amir Sanati-Nezhad, Mark Ungrin, Neil A. Duncan, and Arindom Sen, “Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free Therapeutics”, *Stem Cells International* 2018: 9415367, 2018.
11. Ciardiello, Chiara, Alessandra Leone, and Alfredo Budillon, “The Crosstalk between Cancer Stem Cells and Microenvironment Is Critical for Solid Tumor Progression: The Significant Contribution of Extracellular Vesicles”, *Stem Cells International* 2018: 6392198, 2018.
12. Su, Chaoyue, Jianye Zhang, Yosef Yarden, and Liwu Fu, “The Key Roles of Cancer Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles”, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6 (1): 109, 2021.
13. Paula Silva, Elisangela, Luciana Cavaleiro Marti, et al. 2021. “Extracellular Vesicles Cargo from Head and Neck Cancer Cell Lines Disrupt Dendritic Cells Function and Match Plasma MicroRNAs”. *Scientific Reports* vol. 11 (1): 18534
14. Laggner, Maria, Alfred Gugerell, Christiane Bachmann, Helmut Hofbauer, Vera Vorstandlechner, Marcus Seibold, Ghazaleh Gouya Lechner, et al., “Reproducibility of GMP-Compliant Production of Therapeutic Stressed Peripheral Blood Mononuclear Cell-Derived Secretomes, a Novel Class of Biological Medicinal Products”, *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 11 (1): 9, 2020.

15. Nguyen, Doan C., Holly C. Lewis, Chester Joyner, Vivien Warren, Haopeng Xiao, Haydn T. Kissick, Ronghu Wu, Jacques Galipeau, and F. Eun-Hyung Lee, “Extracellular Vesicles from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Support Ex Vivo Survival of Human Antibody Secreting Cells”, *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 7 (1): 1463778, 2018.

16. Xu, Rong, David W. Greening, Hong-Jian Zhu, Nobuhiro Takahashi, and Richard J. Simpson, “Extracellular Vesicle Isolation and Characterization: Toward Clinical Application”, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 126 (4): 1152–62, 2016.

17. Heiser, Laura M., Anguraj Sadanandam, Wen-Lin Kuo, Stephen C. Benz, Theodore C. Goldstein, Sam Ng, William J. Gibb, et al., “Subtype and Pathway Specific Responses to Anticancer Compounds in Breast Cancer”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109 (8): 2724–29, 2012.

18. Enciso-Benavides, Javier, Luis Alfaro, Carlos Castañeda-Altamirano, Nancy Rojas, José González-Cabeza, Nathaly Enciso, Fernando Riesco, Miluska Castillo, and Javier Enciso, “Biological Characteristics of a Sub-Population of Cancer Stem Cells from Two Triple-Negative Breast Tumour Cell Lines”, *Heliyon*, vol. 7 (6): e07273, 2021.

19. Friend, C., W. Marovitz, G. Henie, W. Henie, D. Tsuei, K. Hirschhorn, J. G. Holland, and J. Cuttner, “Observations on Cell Lines Derived from a Patient with Hodgkin’s Disease”, *Cancer Research*, vol. 38 (8): 2581–91, 1978.

20. Maas, Sybren L. N., Jeroen De Vrij, and Marike L. D. Broekman, “Quantification and Size-Profiling of Extracellular Vesicles Using Tunable Resistive Pulse Sensing”, *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, núm. 92: e51623, 2014.

21. Kahlert, Christoph, Sonia A. Melo, Alexei Protopopov, Jiabin Tang, Sahil Seth, Moritz Koch, Jianhua Zhang, et al., "Identification of Double-Stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and P53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289 (7): 3869–75, 2014.
22. Lee, Tae Hoon, Shilpa Chennakrishnaiah, Eric Audemard, Laura Montermini, Brian Meehan, and Janusz Rak, "Oncogenic Ras-Driven Cancer Cell Vesiculation Leads to Emission of Double-Stranded DNA Capable of Interacting with Target Cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 451 (2): 295–301, 2014.
23. Andreu, Zoraida, and María Yáñez-Mó, "Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function", *Frontiers in Immunology*, vol. 5: 442, 2014.
24. Théry, Clotilde, Kenneth W. Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D. Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, et al., "Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines", *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 7 (1): 1535750, 2018.
25. Tickner, Jacob A., Aaron J. Urquhart, Sally-Anne Stephenson, Derek J. Richard, and Kenneth J. O'Byrne, "Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer", *Frontiers in Oncology*, vol. 4: 127, 2014.
26. Valadi, Hadi, Karin Ekström, Apostolos Bossios, Margareta Sjöstrand, James J. Lee, and Jan O. Lötvall, "Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells", *Nature Cell Biology*, vol. 9 (6): 654–59, 2007.
27. Santos, Juliana Carvalho, Natália da Silva Lima, Luis Otavio Sarian, Ander Matheu, Marcelo Lima Ribeiro, and Sophie Françoise Mauricette Derchain, "Exosome-Mediated Breast Cancer Chemoresistance via MiR-155 Transfer", *Scientific Reports*, vol. 8 (1): 829, 2018.

28. Niel, Guillaume van, Gisela D'Angelo, and Graça Raposo, "Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles", *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 19 (4): 213–28, 2018.

29. Wang, Zhen, Jun-Qiang Chen, Jin-Lu Liu, and Lei Tian, "Exosomes in Tumor Microenvironment: Novel Transporters and Biomarkers", *Journal of Translational Medicine*, vol. 14 (1): 297, 2016.

30. Busatto, S., A. Zendrini, A. Radeghieri, L. Paolini, M. Romano, M. Presta, and P. Bergese. 2020, "The Nanostructured Secretome", *Biomaterials Science* vol. 8 (1): 39–63.

31. Montermini, Laura, Brian Meehan, Delphine Garnier, Wan Jin Lee, Tae Hoon Lee, Abhijit Guha, Khalid Al-Nedawi, and Janusz Rak, "Inhibition of Oncogenic Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Triggers Release of Exosome-like Extracellular Vesicles and Impacts Their Phosphoprotein and DNA Content", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 290 (40): 24534–46, 2015.

32. Ohno, Shin-Ichiro, Gregor P. C. Drummen, and Masahiko Kuroda, "Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17 (2): 172, 2016.

33. Shao, Huilin, Hyungsoon Im, Cesar M. Castro, Xandra Breakefield, Ralph Weissleder, and Hakho Lee, "New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles", *Chemical Reviews*, vol. 118 (4): 1917–50, 2018.

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



CONSTANCIA N° 257-CIEI-CIENTÍFICA-2019

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (CIEI-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado** por el CIEI-CIENTÍFICA.

Código de registro: **534-2019-PRE15**

Título: **Cuantificación de las nanopartículas del exosoma de células madre del cáncer mamario triple negativo para estudios biológicos y proteómicos**

Investigador(a): **Jorge Alex Choque Matos**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 10 de junio del 2021**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 11 de diciembre de 2019




Méd. Fernando M. Runzer Colmenares
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación



RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA No. 120 - DACMH-DAFCS-U. CIENTIFICA-2020

Lima, 21 de febrero del 2020

VISTO:

El informe de revisión independiente académica y la aprobación de un Comité de Ética del proyecto de tesis titulado: **“CUANTIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DEL EXOSOMA DE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER MAMARIO TRIPLE NEGATIVO PARA ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y PROTEÓMICOS”**, presentado por el alumno **JORGE ALEX ALFREDO CHOQUE MATOS** con código No. **4200710242**.

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y los reglamentos de pregrado para obtener para obtener el título profesional de Médico Cirujano en la Facultad de Ciencias de la Salud, se debe desarrollar un trabajo de investigación.

Que, de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de la Carrera.

SE RESUELVE:

ART. 1° **Aprobar** e inscribir el proyecto de tesis titulado: **“CUANTIFICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DEL EXOSOMA DE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER MAMARIO TRIPLE NEGATIVO PARA ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y PROTEÓMICOS”**, con N° de registro: **534-2019-PRE15** Y establecer el inicio del periodo de ejecución del mencionado proyecto.

ART. 2° **Nombrar** al docente **Mg. JAVIER ENCISO GUTIERREZ**, como asesor para el desarrollo de la tesis en cuestión.

Regístrese, comuníquese y archívese.



MC. VICTOR HUMBERTO VALLEJO SANDOVAL
Director Académico
Carrera de Medicina Humana (e)

