



# Identificación de Proteínas blanco en Líneas Celulares de Cáncer de Mama para su acoplamiento con nanopartículas como fundamento de un Biosensor.

L.F.E. Huerta-Nuñez<sup>1,2</sup>, G. Gutierrez-Iglesias<sup>2</sup>, V. Sánchez-Monroy<sup>2</sup>, V.D Alvarez-Jimenez<sup>2</sup>, J.Delgado-González<sup>2</sup>, E. Cortes-Rubio<sup>2</sup>, C. A. González-Díaz<sup>2\*</sup>.

1. Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México.

2 Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina-Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México.

\* Autor de correspondencia: cgonzalezd@ipn.mx

**Resumen**— El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer a nivel mundial, siendo la metástasis la primera causa de fallecimiento en los pacientes con cáncer debido a una falta de detección oportuna. Nuestro grupo de investigación propone una nueva tecnología para la detección de células tumorales circulantes por medio de la identificación de patrones en espectrometría de impedancia asistido con nanopartículas con propiedades magnéticas, las cuales requieren el acoplamiento con anticuerpos que reconozcan proteínas de superficie de membrana celular expresadas en células tumorales. El objetivo de este estudio fue identificar tres proteínas: EpCAM (molécula de adhesión epitelial), MUC 1 (mucina 1) y HER-2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano), en tres líneas celulares de cáncer de mama como potenciales blancos para el empleo de una nanosonda (Nanopartícula Magnética - Anticuerpo). Adicionalmente se realizó un primer ensayo de acoplamiento célula-nanosonda en la línea celular cancerígena SK-BR-3, lo cual permitió un aislamiento inmunomagnético de las mismas y posterior medición por bioimpedancia eléctrica multifrecuencia. Los resultados sustentan la factibilidad de identificar células cancerígenas en una biopsia líquida por medio de mediciones de bioimpedancia.

**Palabras clave**— biosensor, impedancia, nanosonda, células tumorales, proteínas.

## I. INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Mama es uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo. En México a partir del 2006 el Cáncer de Mama ha sido la primera causa de muerte por cáncer y la segunda por muerte general en mujeres entre 30-50 años, es causa de altos niveles de mortalidad debido a una falta de detección oportuna, falta de respuesta al tratamiento y metástasis, siendo esta última una condición incurable ya que en promedio la supervivencia después de 5 años es menor al 25%. Varias investigaciones en las cuales se ha estudiado el proceso de metástasis se ha podido determinar la presencia de células tumorales circulantes (CTC), las cuales podrían ser un importante indicador de diseminación de la enfermedad, pronóstico y respuesta al tratamiento [1,2,3].

La detección de CTC permite monitorear el progreso de la enfermedad al elegir una opción terapéutica y valorar su efectividad al evidenciar la disminución de CTC evitando que los pacientes se expongan a tratamientos ineficaces y

dosis tóxicas. Se ha observado que el número de CTC encontradas en muestras sanguíneas de pacientes con diagnóstico de cáncer está directamente relacionado con el pronóstico y la supervivencia de los mismos [4,5] y debido a su relevancia algunos investigadores han nombrado a este procedimiento de detección “biopsia líquida en tiempo real” [6].

Actualmente existen diferentes tecnologías para la detección de CTC basadas en sus propiedades físicas y biológicas. Sin embargo, la cantidad de CTC en sangre periférica es de 1-10 CTC por  $10^9$  del total de células sanguíneas [7], por lo que continuamente se busca perfeccionar dichas tecnologías lo que demanda equipamiento costoso y procesos especializados, debido a lo cual se requieren de propuestas tecnológicas emergentes que puedan representar alternativas de detección de CTC susceptibles de emplearse en escalones de atención de la salud de bajos recursos.

En un estudio reportado por Hengyi Xu y colaboradores en el 2011 se muestra la viabilidad de emplear técnicas inmunomagnéticas para realizar la separación de CTC de sangre total [8]. En el 2007, Arum Han y sus colaboradores mostraron en un estudio la capacidad de diferenciar células tumorales de cáncer de mama en diferentes estadios a través de la caracterización de sus propiedades eléctricas medidas con Espectroscopia de Impedancia Eléctrica (EIE) la cual es la resistencia que presenta un tejido a la corriente eléctrica y va depender directamente de las propiedades de las células que lo contienen [9].

Por lo que el objetivo de este estudio fue la identificación de proteínas de superficie de membrana en líneas celulares de cáncer de mama las cuales funcionarían como potenciales blancos para el acoplamiento con nanopartículas magnéticas siendo el fundamento para el desarrollo de un biosensor basado en mediciones de espectroscopia de impedancia eléctrica.

## II. METODOLOGÍA

### 1) Análisis de expresión diferencial por RT-qPCR

Se emplearon tres líneas celulares de Cáncer de Mama: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 las cuales fueron cultivadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, utilizando tres réplicas biológicas de cada línea para evaluar la expresión relativa por transcriptasa reversa y reacción en

cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) de tres genes: *EPCAM*, *MUC1*, y *HER-2* utilizando *ACTINA* como gen endógeno.

Para determinar la expresión génica, se extrajo RNA correspondiente a cada línea celular por medio de la técnica fenol/cloroformo y se cuantificó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 260nm. A continuación las muestras fueron tratadas con DNasa (RQ1 RNase-free DNase Promega) para evitar cualquier contaminación con DNA genómico en el RNA previamente obtenido. Posteriormente se realizó la síntesis de DNA complementario correspondiente a cada replica biológica con el kit Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen), sometiendo las muestras a las condiciones de PCR indicadas en dicho protocolo.

Para la amplificación de los genes por PCR en tiempo real se empleó el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión 1.1, utilizando el Kit SYBER Green PCR Master Mix. (Applied Biosystems), para el monitoreo del producto durante cada ciclo de reacción.

El procedimiento de cuantificación se determinó con el método de doble delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) empleando la fórmula aritmética  $2^{\Delta\Delta Ct}$  [10] y finalmente para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01, Figura 1.

## 2) Citometría de flujo:

Con el fin de verificar la expresión de los genes a nivel de proteína posterior al análisis de la expresión de genes a nivel de RNA, se utilizaron 3 anticuerpos monoclonales acoplados con diferentes fluorocromos para determinar la densidad de las proteínas de superficie de membrana: EpCAM, MUC-1, y HER-2, presentes en cada línea celular.

Se realizaron 3 experimentos independientes por cada línea celular: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3, incubando un total de  $1 \times 10^6$  células con 3 anticuerpos monoclonales conjugados por tubo de citometría durante 30 minutos en oscuridad: ficoeritrina (PE) anti-human CD227 (MUC-1) Biolegend, alofococianina (APC) anti-human CD326 (EpCAM)Biolegend, Brilliant Violet 421 anti-human CD340(HER-2) Biolegend.

Posteriormente se retiró el exceso de anticuerpo no acoplado con buffer de fosfatos (PBS 1X) y se bloquearon las uniones inespecíficas con albumina en PBS (PBA) al 1%, finalmente las células fueron fijadas con formaldehído al 1%.

Se analizaron 10,000 eventos en el citómetro de flujo FACS Aria III (Becton Dickinson) y los datos fueron analizados con un software Flow Jo (10.1). Figura 2.

## 3) Funcionalización de nanosondas:

De acuerdo con los resultados obtenidos por medio de citometría de flujo, se realizó un bioconjugado por cada línea celular con base a la proteína de superficie de membrana predominante, generando tres nanosondas mediante la unión de nanopartículas de ferrita-cobalto de 400nm (nanoscreen MAG-ARA Chemicell) con cada anticuerpo monoclonal: EpCAM (CD326, Biolegend) para MCF-7, MUC-1 (CD227 Biolegend) para MDA-MB-231 y HER-2( CD340 Biolegend) para SK-BR-3.

El proceso de bioconjugación se llevó a cabo mediante el método de carbodiimida, la cual reacciona con los grupos carboxilo-terminal de las nanopartículas provocando que se vuelvan altamente reactivos a los productos intermedios de O-asilourea y a su vez reaccionen con los grupos amino presentes en la región constante de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales, lo que permite una unión covalente y por lo tanto la formación de una nanosonda. (protocolo A-10, Chemicell).

## 4) Mediciones de Impedancia:

Como una primera evaluación para determinar la factibilidad de identificar células cancerígenas acopladas a nanopartículas por medio de patrones de impedancia, se cuantificaron 50,000 células de la línea celular SK-BR-3 las cuales fueron incubadas con las dosis correspondiente de nanosonda de acuerdo a su proteína de superficie predominante siendo en este caso HER-2. Posteriormente, se realizaron diluciones para obtener 3 muestras por triplicado con diferente concentración de células: 5000, 500, y 50 en 500µl de PBS para su posterior medición en el equipo de bioimpedancia.

El experimento se realizó bajo dos condiciones para determinar el patrón de impedancia: 1) la línea celular SK-BR-3 incubada con su respectiva nanosonda en 500µl de PBS con 5000, 500 y 50 células y 2) la nanosonda de HER-2 en 500µl de PBS. Ambas condiciones de manera independiente se infundieron a través de la bomba NE-1002X en un tiempo de 15 minutos. Se adquirieron datos en el sistema de medición de impedancia Scio Spec Instruments ISX3 con una señal senoidal de 1KHz-100MHz espaciado logarítmicamente, entre cada uno de los intervalos se obtuvo el promedio de 1024 valores por segundo para ganancia y fase. Al terminar la medición entre cada condición se realizó una limpieza del sistema infundiendo 500µl de PBS.

## III. RESULTADOS

En la figura 1 se grafica la expresión relativa de los tres genes estudiados en cada línea celular, obteniendo una mayor expresión de *HER-2* en la línea SK-BR-3, *EPCAM* con importante expresión en MCF-7 y finalmente *MUC-1* predominando para MDA-MB-231.

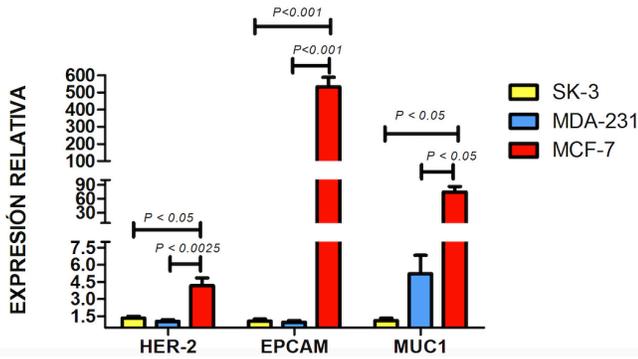


Fig. 1. Expresión relativa de los genes *HER-2*, *EPCAM* y *MUC-1* en cada una de las tres líneas celulares.

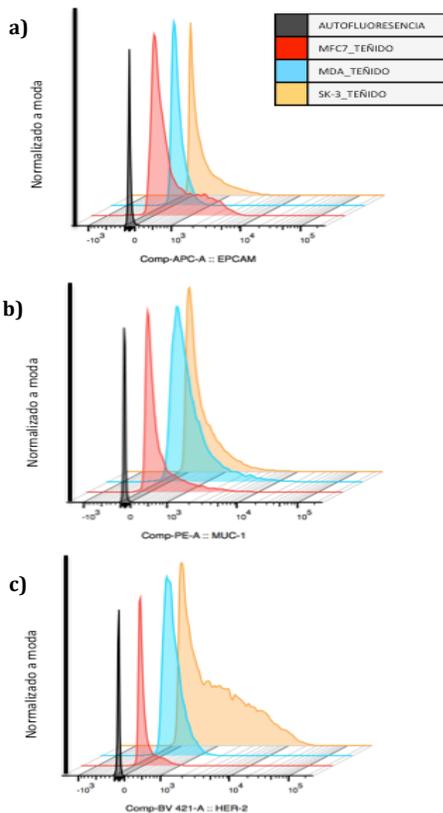


Fig. 2. Determinación de la intensidad media de fluorescencia para cada proteína: a) EpCAM, b) MUC-1 y c) HER-2, en las líneas celulares: MCF-7, MDA-MB-231 y SK-RB-3

Por medio de citometría de flujo al graficar la intensidad media de fluorescencia para cada proteína de superficie de membrana celular en cada línea tumoral se evidencia un predominio de la proteína EpCAM en MCF-7, la proteína MUC-1 en la línea celular MDA-MB-231 y finalmente la proteína HER-2 en la línea celular SK-RB-3, Figura 2.

En la Figura 3, se observa los patrones de impedancia de la línea celular SK-RB-3 con las diferentes concentraciones celulares evaluadas: 5000, 500 y 50 células en 500µl de PBS tomando como punto de comparación la ausencia de las mismas.

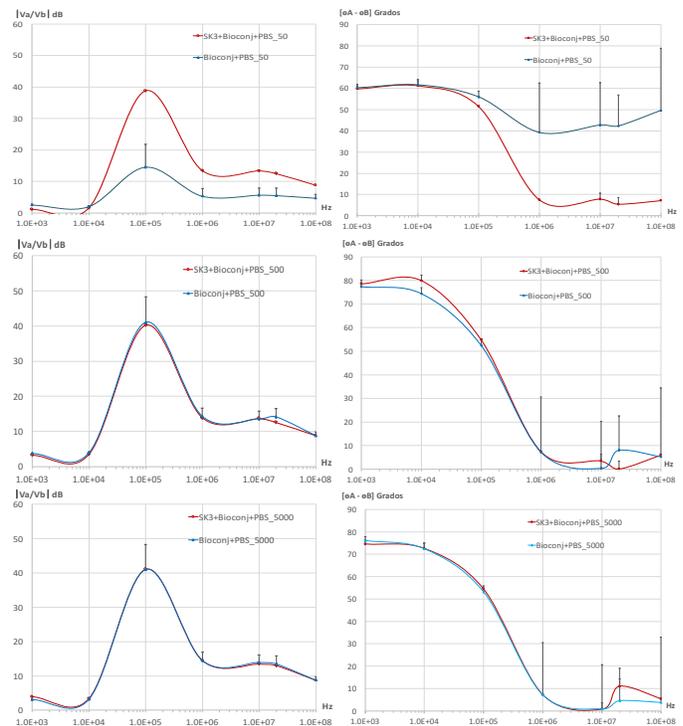


Fig. 3. Mediciones de Impedancia con tres concentraciones de la línea celular cancerígena SK-BR-3.

#### IV. DISCUSIÓN

Actualmente la determinación de proteínas de superficie de membrana celular forman parte de una serie de estrategias para detectar células tumorales circulantes de origen epitelial observando en nuestro estudio una diferencia en la en el patrón expresión de proteínas, predominando la proteína de EpCAM en la línea celular de MCF-7, MUC-1 en MDA-MB-231 y HER-2 en SK-RB-3, esto probablemente debido a las características de las diferentes líneas ya que cada una de ellas representa un estadio: MCF-7 temprano, MDA-MB-231 intermedio y finalmente SK-

RB-3 tardío, lo que explicaría que entre mas avanzado el proceso tumoral disminuye la producción de proteínas características de origen epitelial relacionadas con receptores de adhesión celular como lo es EpCAM, que mantienen *in situ* las células limitando su capacidad de invasión lo que es compatible con un proceso de transición epitelio-mesénquimal que da origen a metástasis, como Walid A. y colaboradores lo reportan [11,12].

A bajas concentraciones celulares y por tanto de nanopartículas con propiedades magnéticas (50 células en 500µl de PBS incubadas con su respectiva nanosonda), es posible la identificación de células tumorales a través de mediciones de impedancia ya que permiten discriminar entre la ausencia y presencia de las mismas, sin embargo a mayores concentraciones no se presenta sensibilidad suficiente para discriminar entre la presencia de células cancerígenas, tal comportamiento estimamos se explica porque a mayores concentraciones de nanopartículas magnéticas emerge el efecto de percolación, es decir el medio se satura con óxido de hierro y por tanto se vuelve muy conductivo, tal incremento de conductividad volumétrica predomina sobre el efecto de alta impedancia de las células cancerígenas.

## V. CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren la factibilidad técnica de identificar bajas concentraciones de células cancerígenas acopladas a nanopartículas con propiedades magnéticas dirigidas a proteínas de superficie de membrana celular.

## RECONOCIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al apoyo de CONACYT a través del proyecto No. CB2012-180536 y al Programa de Fortalecimiento Académico de Posgrado de alta Calidad. La técnica empleada en éste estudio está basada en la aplicación de patente No. MX/a/2017/010319, González CA, Biosensor de Células Tumorales Circulantes basado en Mediciones de Espectroscopía de Bioimpedancia Eléctrica asistida con Nanopartículas Magnéticas.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] Samia A. Ebeed, Nadia A. Abd El-Moneim, Ahmed Saad, Ebsam RE. Zaher , Omayma G. Yassin, Shadwa A. Khamis” Diagnostic and prognostic value of circulating tumor cells in female breast cancer patients” Alexandria Journal of Medicine; vol. 48, pp. 197–206, Febrero 2012.

[2] Esmeralda Morán Mendoza, Jorge Rodríguez Gallegos, Manuel Lara Lozano, Celia Piña Leyva, María del Rocío Thompson Bonilla, Guillermina Rosas Sandoval, Hayde Nallely Moreno Sandoval *et. al.*” Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico.” Rev Esp Méd Quir; vol. 19, pp. 45-51, 2014.

[3] Mario Giuliano Antonio Giordano, Summer Jackson, Ugo De Giorgi, Michal Mego, Evan N Cohen, Hui Gao, *et. al.*”Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination” Breast Cancer Research; vol.16, pp.440, 2014.

[4] Athina Markou, Areti Strati, Nikos Malamos, Vasilis Georgoulas and Evi S. Lianidou. “Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer by a Liquid Bead Array Hybridization Assay.” Clinical Chemistry; vol. 57, pp. 3421–430.2011.

[5] Luz Fernanda Sua Villegas , Nhora María Silva Pérez, Marta Vidaurreta Lázaro, María Luisa Maestro de las Casas, Sara Rafael Fernández y Silvia Veganzones de Castro” Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: su importancia en tumores sólidos epiteliales.” Rev Lab Clin; vol. 4, pp. 163-169, 2011.

[6] Catherine Alix-Panabie’ res and Klaus Pantel “Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer” Clinical Chemistry ; vol. 59, pp. 110–118, 2013.

[7] Daniel L. Adams, Steingrímur Stefansson, Christian Haudenschild, Stuart S. Martin, Monica Charpentier, Saranya Chumsri, Massimo Cristofanilli, Cha-Mei Tang, R. Katherine Alpaugh. “Cytometric Characterization of Circulating Tumor Cells Captured by Microfiltration and Their Correlation to the CellSearchVR CTC Test.” Cytometry Part A (2015);vol. 87A, pp. 137-144, 2015.

[8] X Hengyi Xu, Zoraida P. Aguilar, Lily Yang, Min Kuang, Hongwei Duan, Yonghua Xiong, Hua Wei and Andrew Wang. “Antibody Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Cell Separation in Fresh Whole Blood”. Biomaterials; vol. 32(36), pp. 9758–9765, 2011.

[9] Arum Han, LilyYang and A. Bruno Frazier.” Quantification of the Heterogeneity in Breast Cancer Cell Lines Using Whole-Cell Impedance Spectroscopy Clin Cancer” Res; vol. 13(1), pp.139-43, January 2007.

[10] Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-DDCT</sup> Method.” METHODS; vol.25,pp. 402–408, 2001.

[11] Walid A. Osta, Yian Chen, Kaidi Mikhitarian, Michael Mitas, I Mohamed Salem, Yusuf A. Hannun, David J. Cole, and William E. Gillanders. “EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy.” CANCER RESEARCH; vol. 64, pp. 5818–5824, Agosto, 2004.

[12] Tobias M Gorges, Ingeborg Tinhofer, Michael Drosch, Lars Röse, Thomas M Zollner, Thomas Krahn and Oliver von Ahsen.”Circulating tumour cells escape from EpCAMbased detection due to epithelial-to-mesenchymal transition.” BMC Cancer; 12:178, 2012.