



CITOMETRÍA DE FLUJO A NANOESCALA, PAPEL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA PROYECCIÓN DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA

Álvarez Álvarez, Jesús Armando^{1*}

¹*Beckman Coulter Life Sciences*

* JAALVAREZ@beckman.com

Memoria en formato presentación.





VI CONGRESO INTERNACIONAL DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**Desafíos y avances en salud: lo nuevo en diagnóstico
clínico y seguridad en el trabajo**



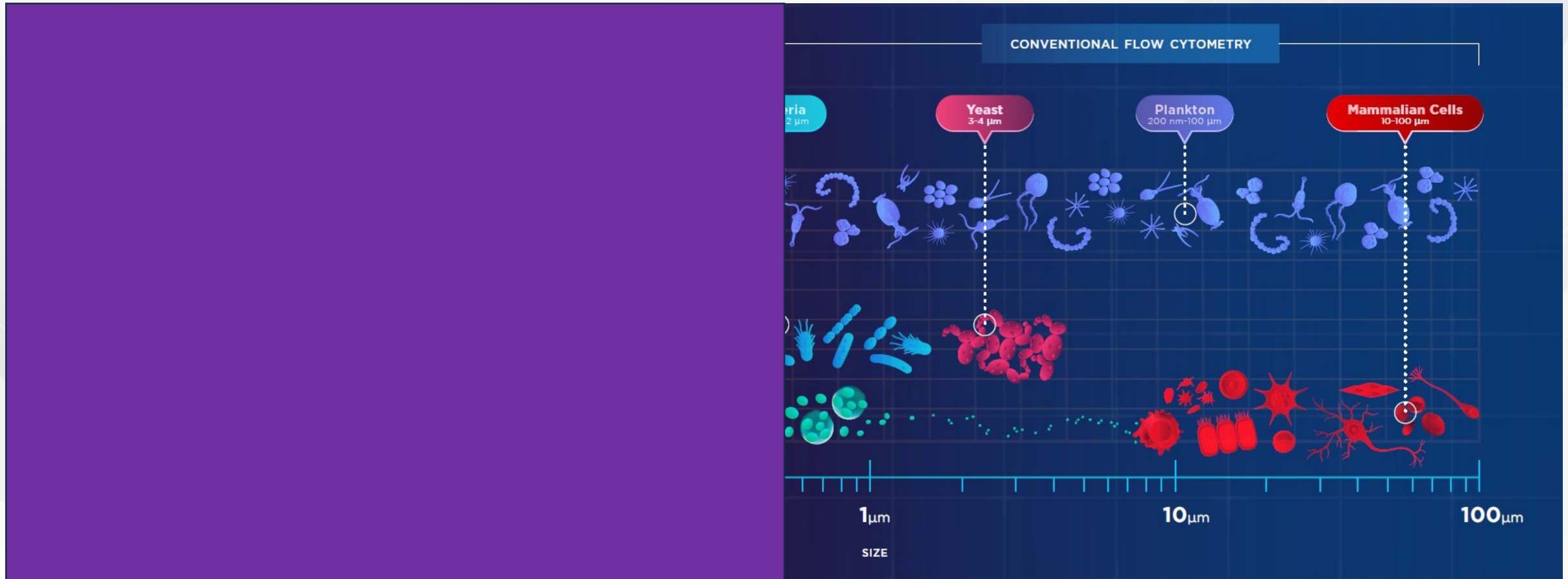
INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA
**COLEGIO MAYOR
DE ANTIOQUIA®**



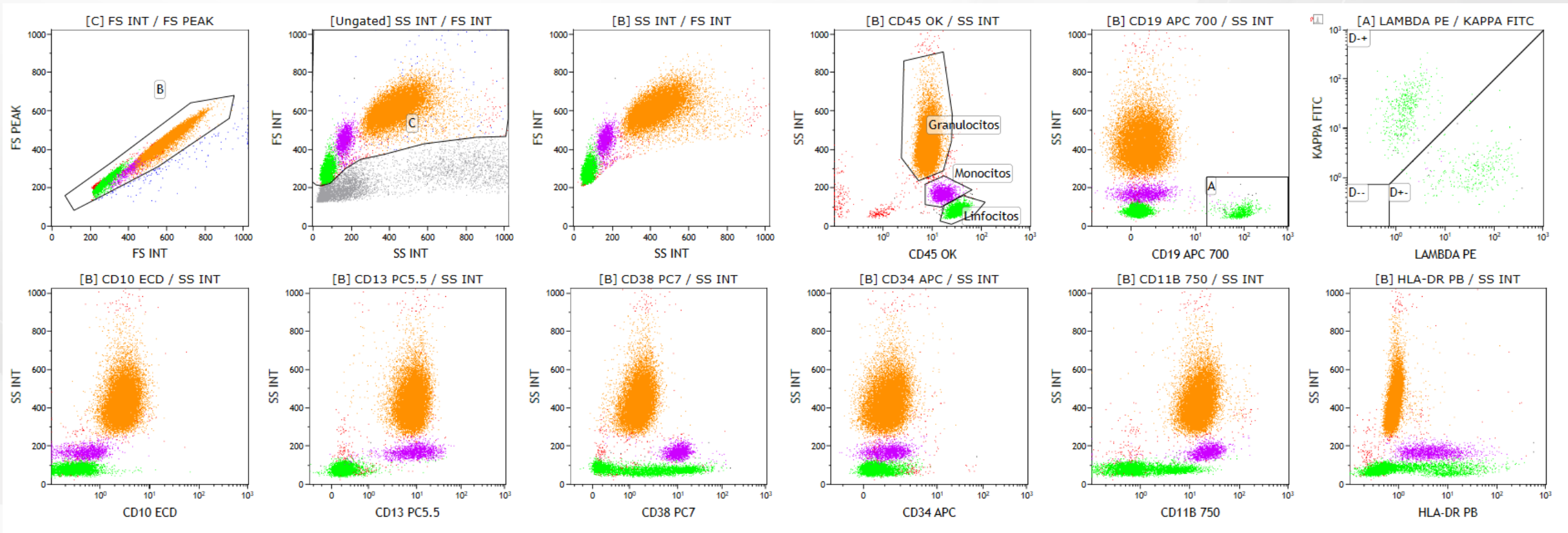
Citometría de flujo a nanoescala, papel de las vesículas extracelulares en la proyección diagnóstica y terapéutica

Jesús Armando Álvarez Álvarez
Especialista de aplicaciones
Beckman Coulter Life Sciences

Citometría de flujo, nuestro aliado en el estudio de células y Vesículas extracelulares (EVs)

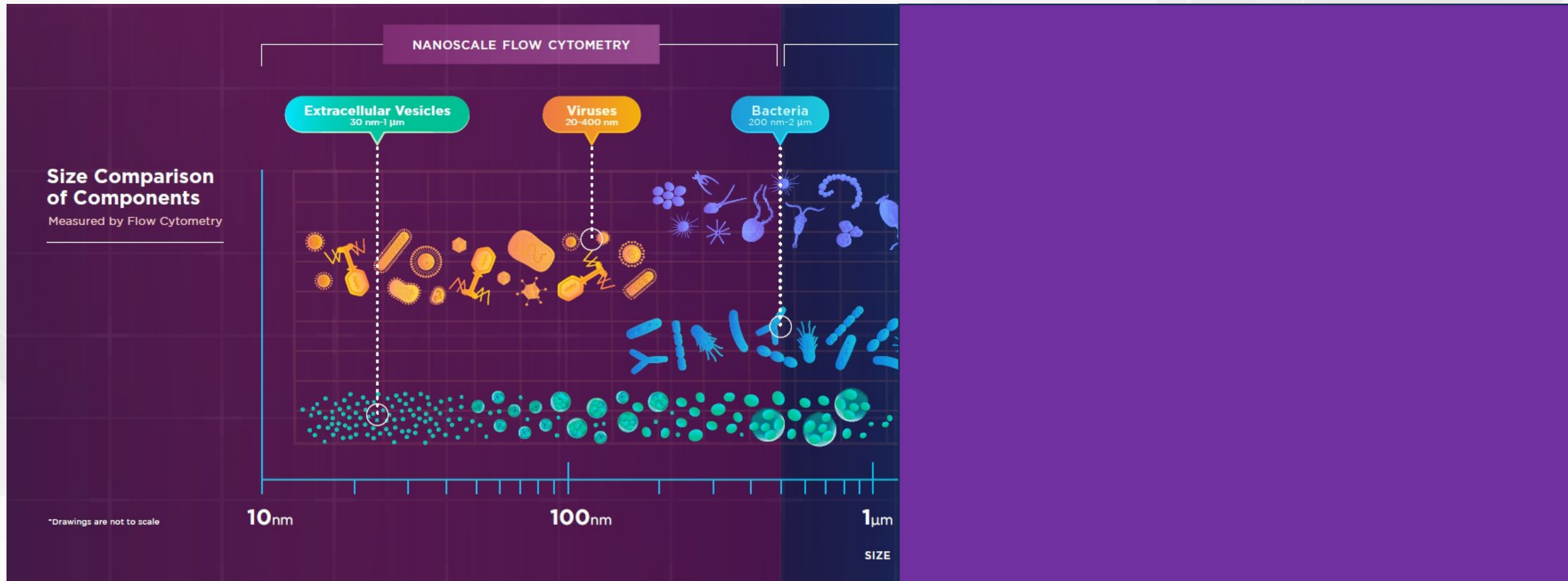


Ejemplo representativo, citometría de células hematológicas

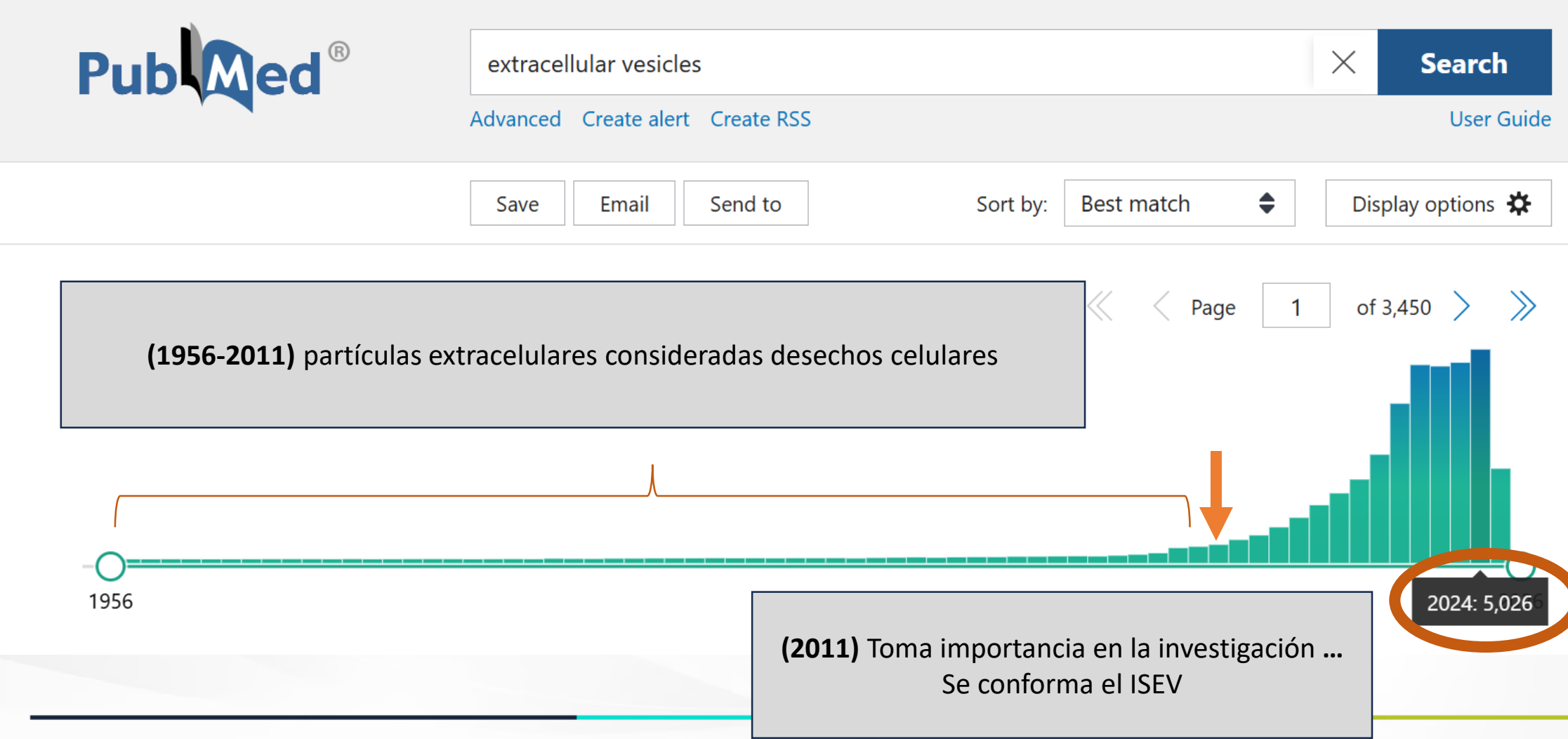


La era de la nanocitometría

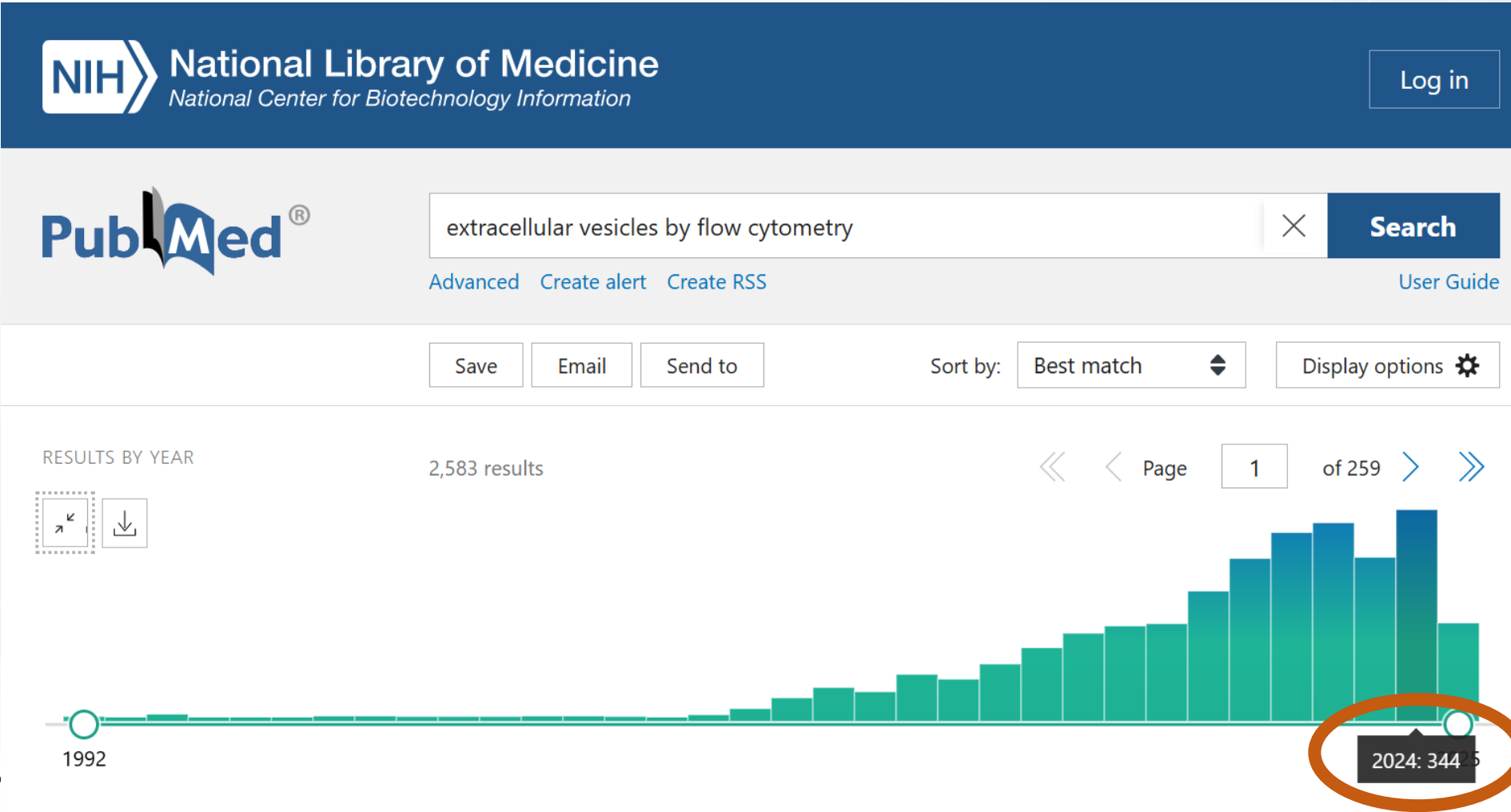
Citometría de flujo con la sensibilidad y resolución para detectar Vesículas Extracelulares (EVs) con tamaño inferior a 1 uM



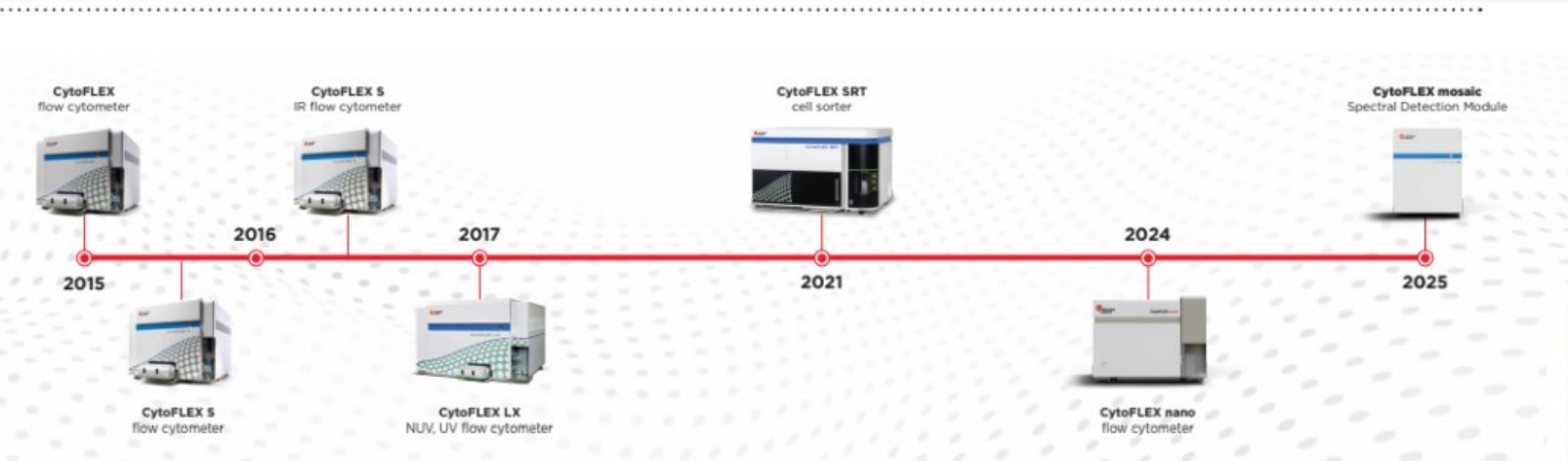
Medio siglo siendo ignoradas, 14 años en el centro de investigaciones científicas



La citometría de flujo, un aliado en el laboratorio para el estudio de vesículas extracelulares



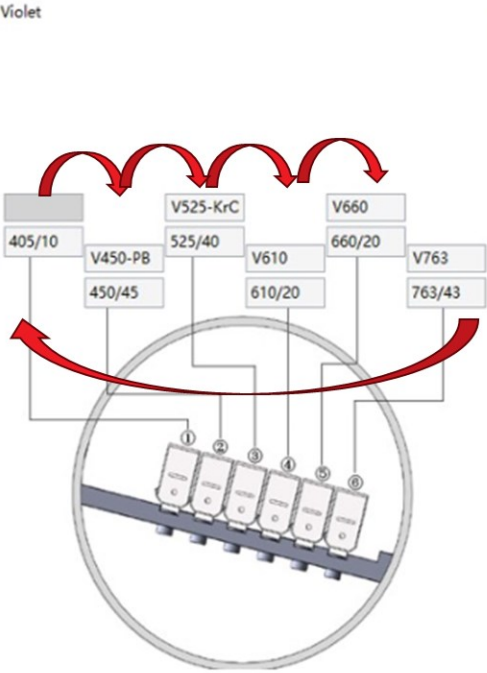
CytoFLEX, más de 10 años de innovación en citometría de Flujo y Cell sorting... La nanocitometría en el mapa.



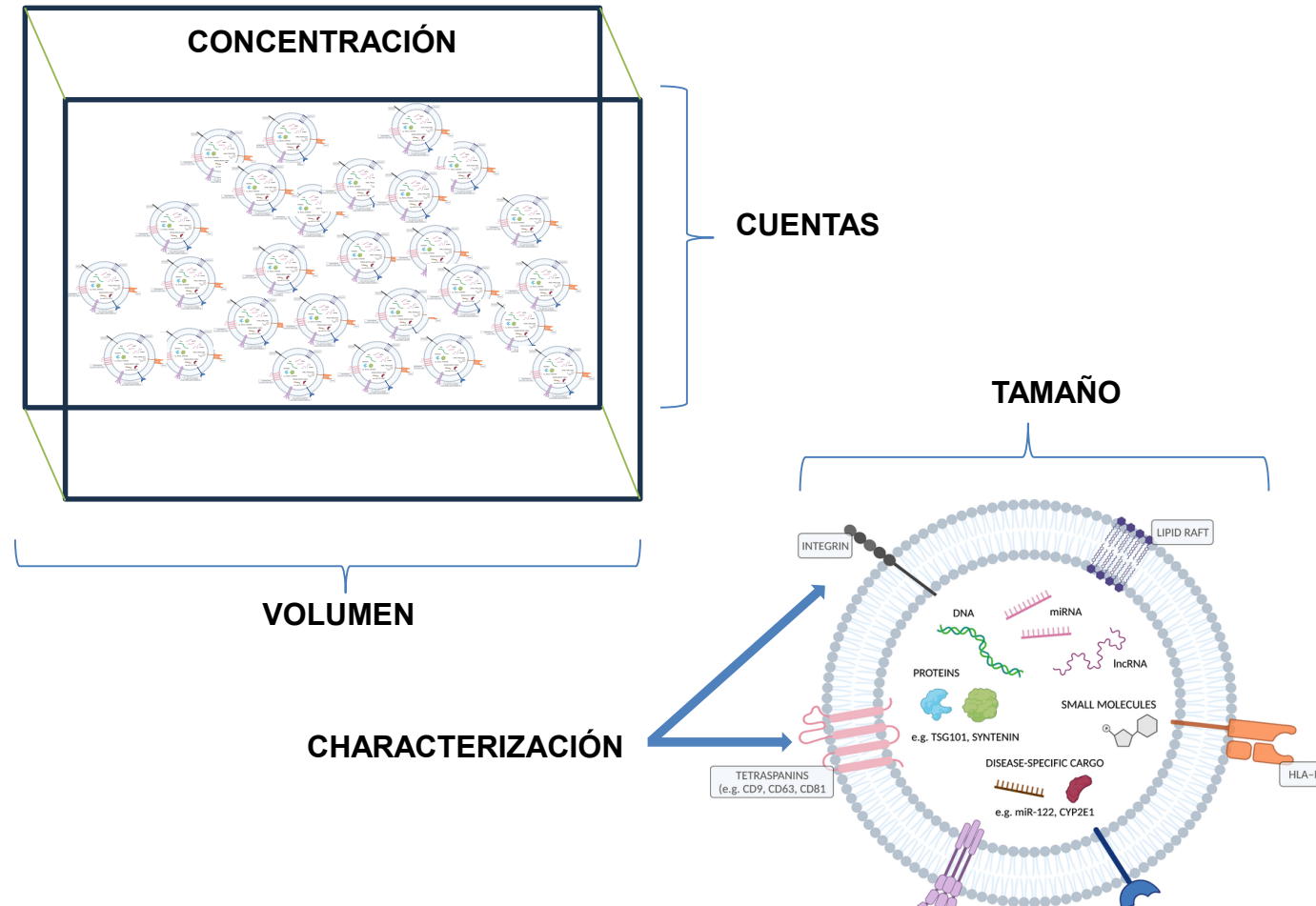
Since its inception, researchers have relied on the CytoFLEX platform for its exceptional sensitivity, state-of-the-art detection technology, and extensive configuration options. Today, a CytoFLEX instrument can be found in nearly **10,000** labs around the world.



Revolucionario sistema óptico
Activación de violet-SSC
Sin intervención de ingeniería



¿Cómo estudiar las Evs?



El método actual de partículas únicas tiene retos para caracterizar completamente las EVs

Comparación de metodologías

- Centrado en reuniones recientes de MISEV

Conteo

- Medición incierta
- Estandar de referencias trazables

Volume

- De entrega de la muestra
- Diseño de experimento

Tamaño

- Polidispersión de la muestra

Caracterización

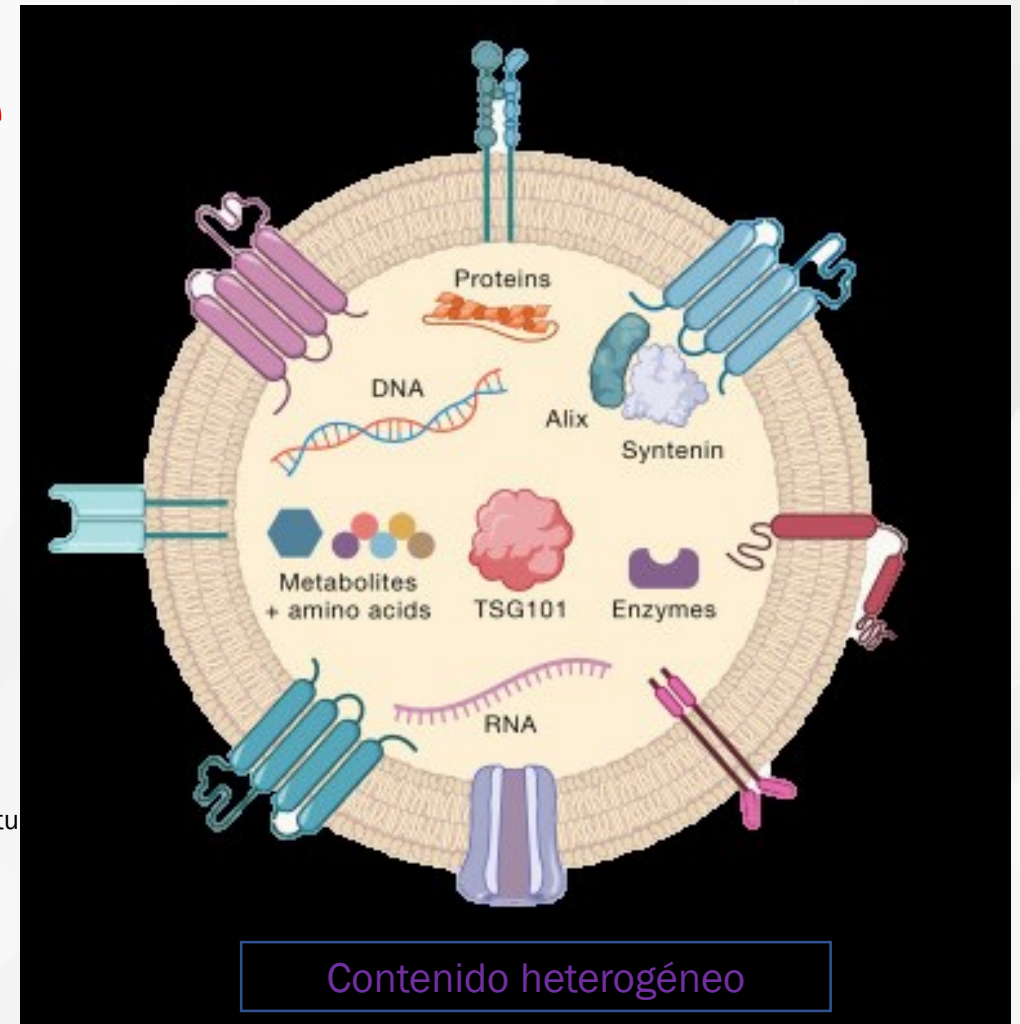
- Medición de la dimensionalidad limitado

Citometría de flujo, detección por tamaños, conteo y inmunofenotipo en un solo tubo

Vesículas Extracelulares ¿Qué



- Son pequeñas partículas liberadas por **células**, delimitadas por una bicapa lipídica y que no pueden replicarse por si mismas (No contienen núcleo funcional). (MISEV2023)



Las VE de múltiples organismos albergan más de 13.476 proteínas, 4000 lípidos, 3500 RNAs mensajeros, 11.000 miRNAs

Proteínas

Proteínas:

- Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81).
- Biogénesis (TSG101, ALIX, Rab).
- Señalización, adhesión, citoesqueleto, presentación antigénica.
- Oncoproteínas (EGFRvIII, Ras mutado, c-Met) → específicas en EVs tumorales

ADNc, ssADN, ADNmt, → reflejan el genoma de la célula de origen.

ARN: ARNm, miARN (predominantes), lncARN, circARN, piARN → modulan expresión génica, implicados en progresión tumoral.

Lípidos:

- Ceramida, colesterol, esfingomielina, fosfatidilserina.
- Ceramida esencial en formación de EVs.
- Perfil lipídico distinto al de células madre → potencial uso como biomarcador.

Ácidos Nucleicos

Lípidos

Moléculas de superficie

Heterogeneidad de EVs

- EVs están en cualquier parte y son célula-específica.
- Se derivan de células circulante y de tejido.
- Pueden ser usados como biomarcadores
- Son colectadas de fluidos del cuerpo:
 - Sangre
 - Orina
 - LCR
 - Leche materna

Small EVs (<200 nm) are having a big impact on the landscape of molecular diagnostics making it possible to diagnose and characterize disease with increasingly non-invasive methods. Once isolated, EVs can provide information about the health and disease profile of their cell and organ of origin. Learn how scientists are interpreting the language of EVs to better understand disease processes and prognoses.



THE LUNG

Source(s):

Bronchoalveolar lavage fluid,
Sputum, Peripheral blood,
Urine, Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Asthma
Non-small-cell lung cancer
Adenocarcinoma
Hyperoxia-induced
neonatal lung disease
Emphysema
Cystic fibrosis



THE CIRCULATORY SYSTEM

Source(s):

Peripheral blood, Urine,
Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Myocardial infarction
Atherosclerosis
Cardiomyopathy



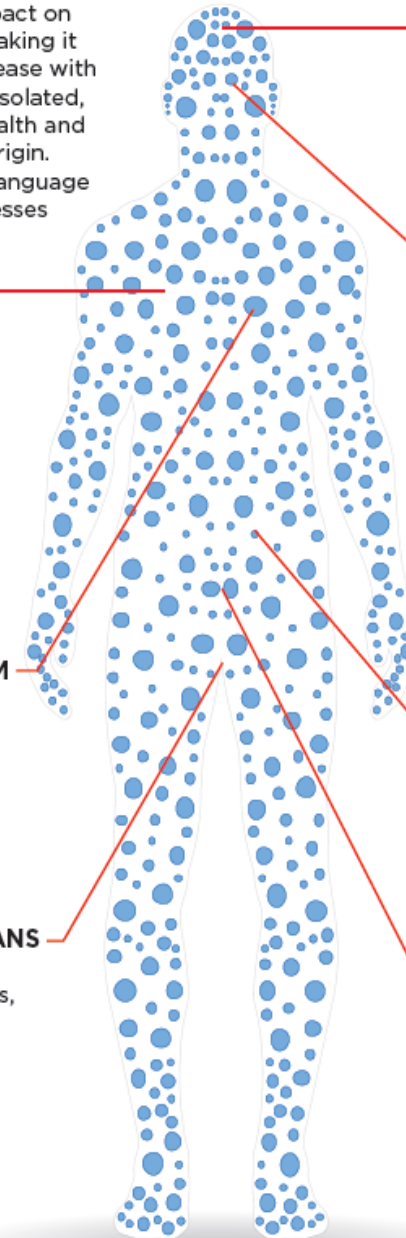
THE REPRODUCTIVE ORGANS

Source(s):

Breast milk, Vaginal secretions,
Seminal fluid, Endometrium,
Peripheral blood, Urine,
Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Cervical cancer
Ovarian cancer
Breast cancer
Prostate cancer
Endometriosis



THE BRAIN

Source(s):

Cerebrospinal fluid (CSF),
Peripheral blood, Urine,
Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Alzheimer's disease
Parkinson's disease
Schizophrenia
Bipolar disorder
Glioblastoma
Medulloblastoma
Autism
Multiple sclerosis



THE EYE

Source(s):

Aqueous humor,
Vitreous humor,
Lacrimal-gland secretion (tears),
Urine, Peripheral blood,
Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Uveal melanoma
Glaucoma



THE DIGESTIVE SYSTEM

Source(s):

Gastric juices,
Peripheral blood, Urine,
Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Gastric cancer
Colon cancer
Oral cancer
Periodontitis



THE URINARY SYSTEM

Source(s):

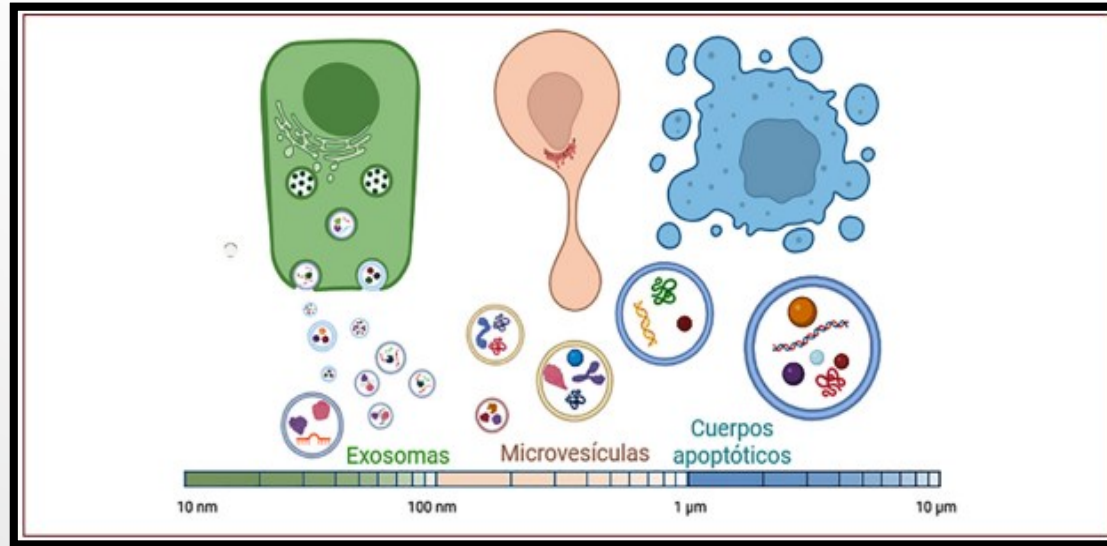
Urine, Peripheral blood,
Tumor cell-line media

Diseases Detected:

Bladder cancer
Renal-cell carcinoma



Tipos de vesículas Extracelulares



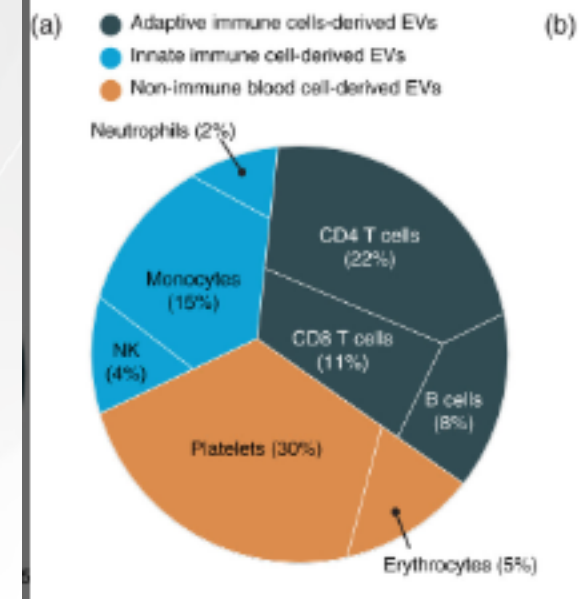
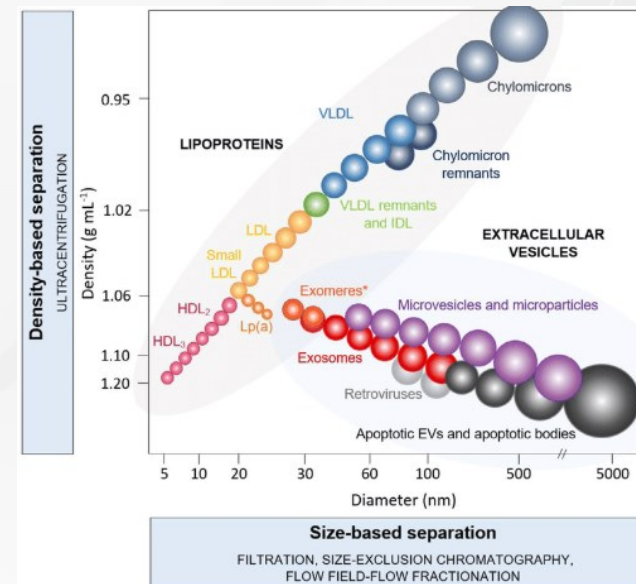
Los criterios actuales para distinguir entre diversas poblaciones de VE se basan en el tamaño, la densidad, la carga molecular, la función, y el origen subcelular.

Los **exosomas** son los mas estudiados a nivel biomédico.

An estimate of extracellular vesicle secretion rates of human blood cells

Martin Auber, Per Svenningsen

First published: 02 June 2022 | <https://doi.org/10.1002/jex2.46> | Citations: 13



Tipos de vesículas Extracelulares

Exosomas

Microvesículas

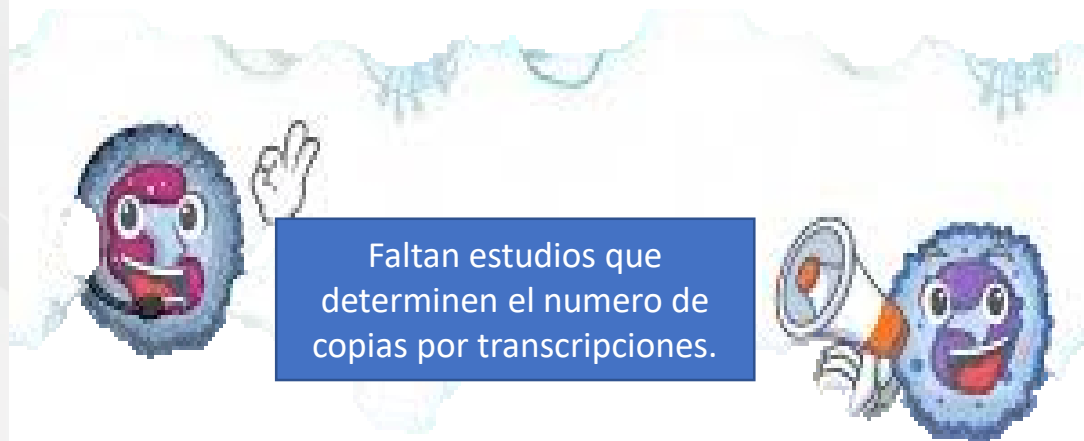
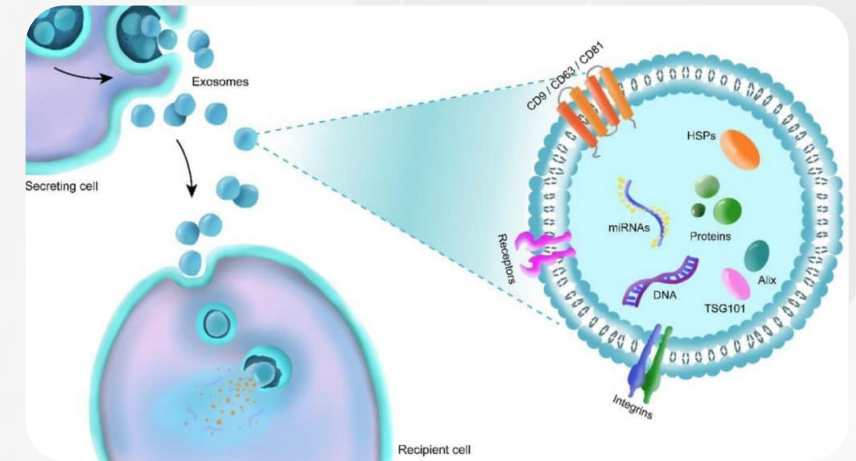
Table 1. Main differences between extracellular vesicles, *in vitro* isolation methods, cargo, size, and function.

	Exosome	Microvesicle, ectosome, shedding vesicles	Apoptotic bodies
Size	40-100 nm	100-1000 nm	1000-5000 nm
Markers	CD63, CD9, Alix, TSG 101, HSP 70	Anexin V, Flotillin-2, selectin, integrin, CD40 metalloproteinase	Anexin V, DNA, histones
Isolation method	Immunoprecipitation (ExoQuick®), ultracentrifugation (100,000-200,000 g), ultracentrifugation with density gradient	Ultracentrifugation (10,000-60,000 g)	No standardized protocol
References	49,53	54	55

Función	Entregan proteínas de señalización y reguladores genéticos	 Presentan moléculas de superficie, activando receptores
Circulación	Circulan ampliamente interactuando a distancia	Rangos más cortos, actuando localmente
Liberación	Liberación continua, persistiendo por más tiempo	Desprendimiento transitorio, y eliminación rápida

EVs y Comunicación celular

Las EV pueden transportar y transferir a las células receptoras **moléculas derivadas de tumores**, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico VIII (**EGFRvIII**), miembros mutantes de la familia **Ras** o **c-Met**, y otras proteínas o transcripciones con funciones oncogénicas que actualmente se proponen como **biomarcadores** en el cáncer.



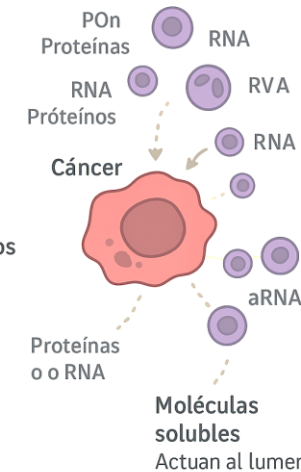
Signos de cambios relacionados con el cáncer

Marcadores pan-EV

- CD9
- HSPA8
- HSP90AB1
- ACTB
- MSN
- RAP1B

Marcadores específicos de tumores

- trombospondina-2
- tenascina C
- VCAN



Biomarcadores

Reflejan cambios oncoépicos y ayudan a comunicación intercelular

Inflamación

EVs derivadas a tumores contienen citocinas vía NF-κB

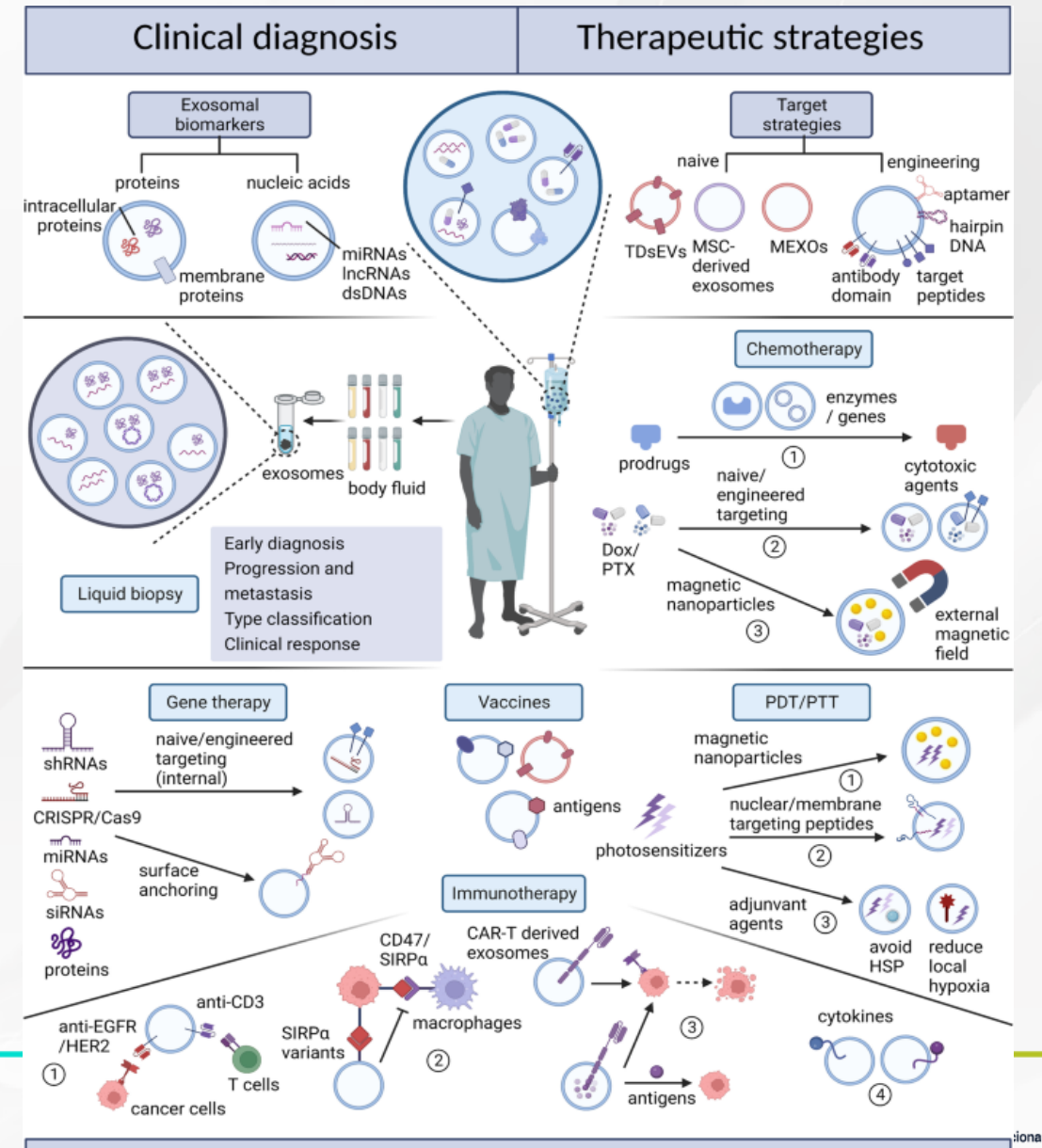
DAMP

Pueden valua S100A13, basigina, galectina 9 biglicano e integrina α y αX

Moléculas solubles

Proteínas o RNA dentro del lumen actúan con mensajeros

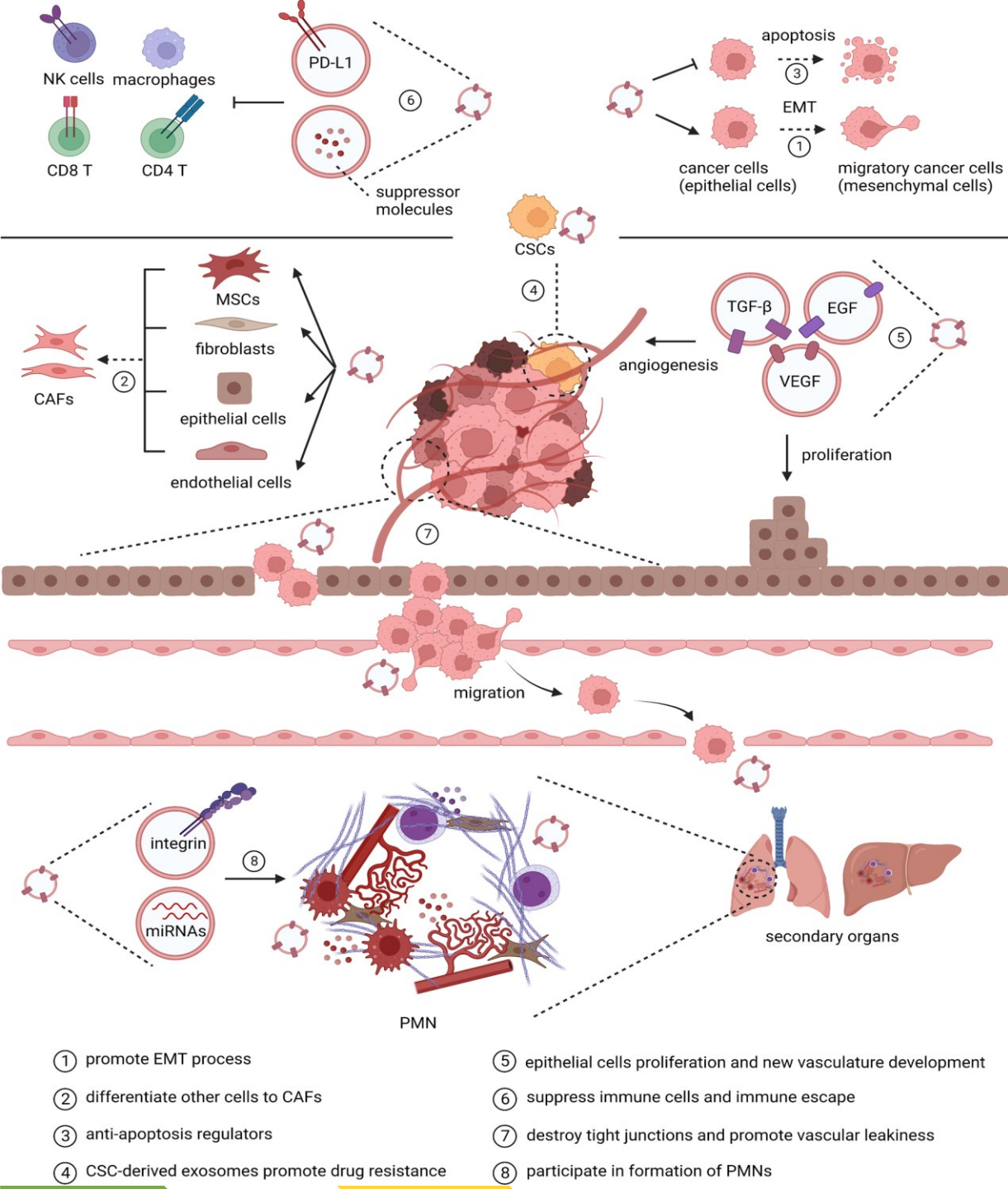
EVs como biomarcadores y en la terapia



Clinical trials

Table S6: Recent and current clinical trials exploring the diagnostic and therapeutic potential of exosomes

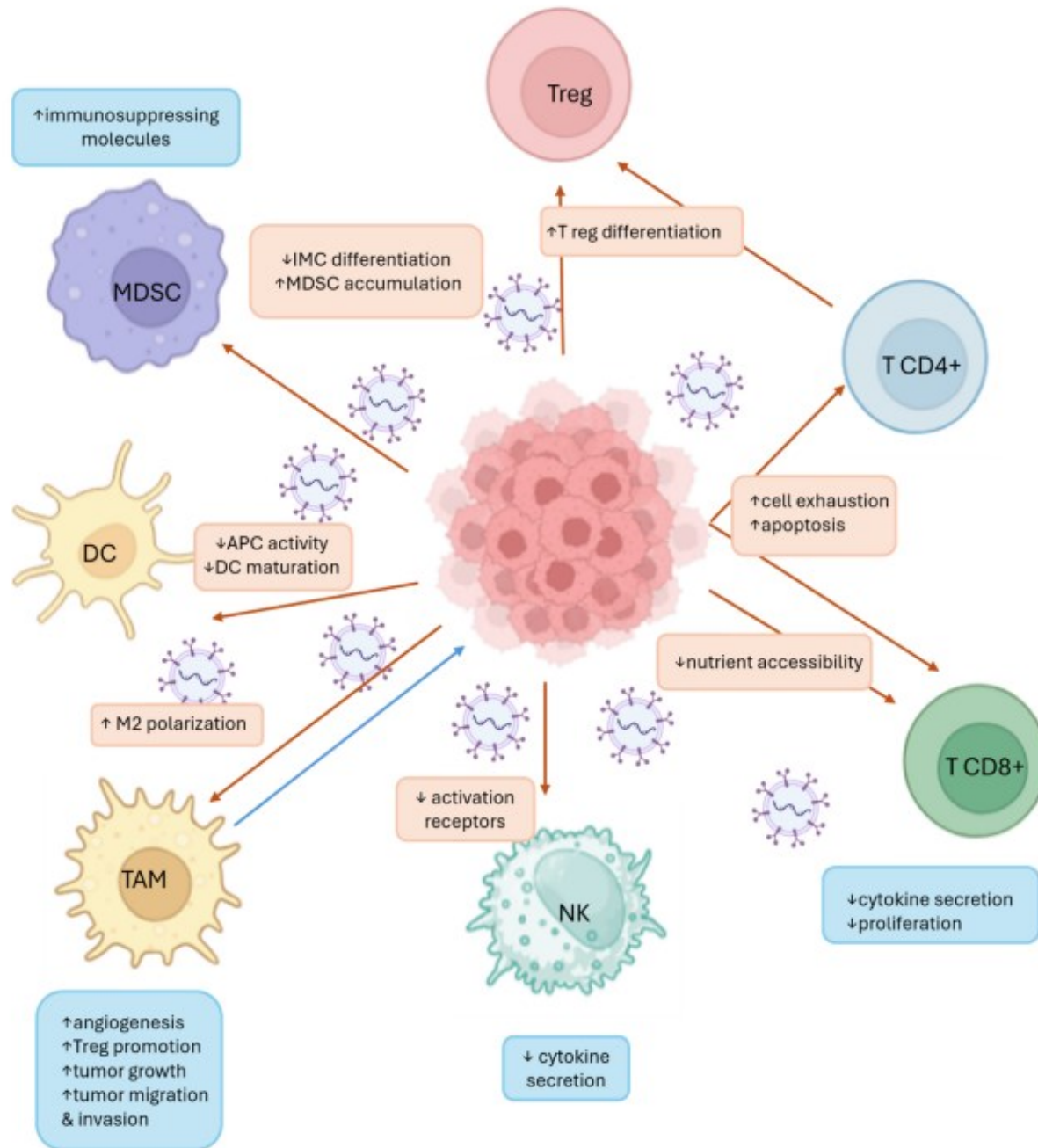
Exosomes as the source of biomarkers					
<i>Tissue</i>	<i>Code</i>	<i>Sample</i>	<i>Markers/class</i>	<i>Type of biomarker</i>	<i>Ref.</i>
Bladder cancer	NCT05270174	Urine	lncRNA-ELNAT1	Metastatic	[1]
	NCT06193941	Urine	RNA ¹	Diagnostic	[2]
Breast cancer	NCT05798338	Plasma	protein ¹	Stage	[3]
	NCT05286684	Cerebrospinal fluid	protein ¹	Metastatic	[4]
Colorectal cancer	NCT04394572	Blood	macromolecules ¹ , integrins ¹ , proteases ¹	Diagnostic	[5]
	NCT06342401	Blood	miRNA ¹	Diagnostic	[6]
Esophageal cancer & gastric cancer	NCT06278064	Plasma	protein ¹	Diagnostic, prognostic	[7]
Gastric cancer	NCT06023121	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	Diagnostic	[8]
	NCT06342427	Serum	miRNA ¹	Diagnostic	[9]
Glioma	NCT06116903	Blood	Nucleic acids ¹	Diagnostic	[10]
Intrahepatic cholangiocarcinoma	NCT06381648	Blood	miRNA ¹	Metastatic	[11]
Liver cancer	NCT06342414	Blood	miRNA ¹	Diagnostic	[12]
	NCT03830619	Serum	lncRNA ¹	Diagnostic	[13]
Lung cancer	NCT06026735	Blood, cerebrospinal fluid	cell-related substances ¹	Metastatic, response to treatment	[14]
Meningioma	NCT06104930	Blood	exosome level, DNA methylation ¹	Progression	[15]
Non-small cell lung cancer	NCT05218759	Blood	miRNA ¹	Response to treatment (anlotinib)	[16]
Oral squamous cell carcinoma	NCT06469892	Saliva, plasma	miR-185	Diagnostic	[17]



Estas vesículas participan activamente en la remodelación del microambiente tumoral (TME), promoviendo procesos fundamentales como el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la invasión, la metástasis y la resistencia a tratamientos.

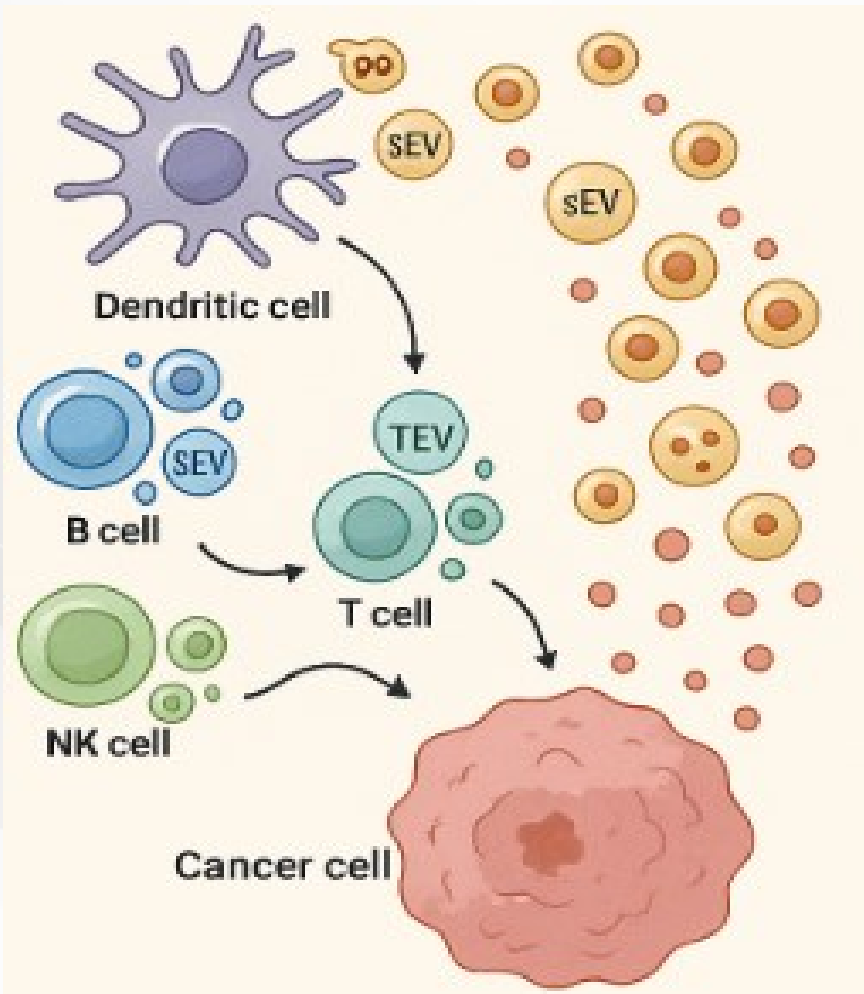


Efectos inmunomoduladores de las vesículas extracelulares (VE)

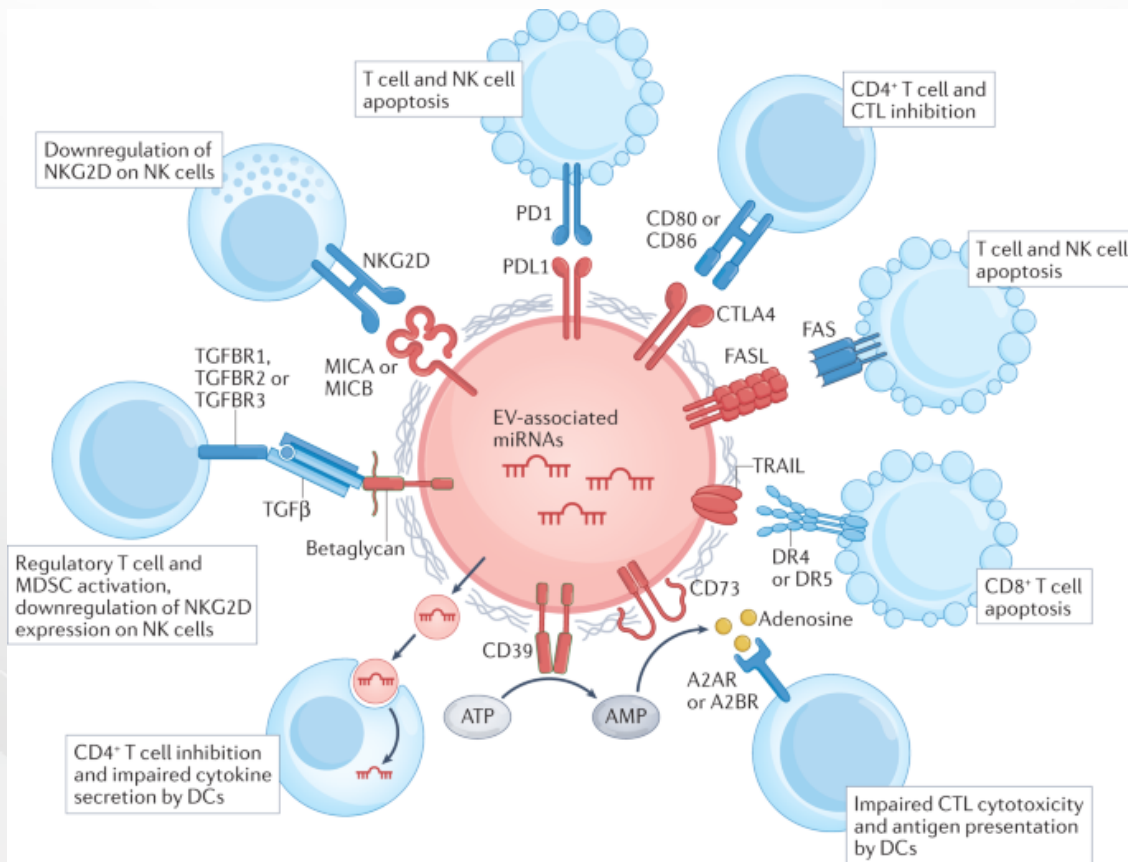


- Las EV modulan negativamente múltiples componentes del sistema inmune.
- Inducen tolerancia, agotamiento, apoptosis o reprogramación de células inmunes.
- Representan un blanco prometedor para estrategias terapéuticas antitumorales.

- Red de VE derivadas de células inmunitarias. median la comunicación y modulación entre células inmunitarias y determinan, directa o indirectamente, los efectos pro-tumorales o antitumorales.



- Las **vesículas de células dendríticas** ayudan a activar las células T que atacan tumores, pero su efecto depende de si las dendríticas están maduras o no. Se usan como base para vacunas contra el cáncer.
- Las **vesículas de células B** colaboran presentando antígenos y activando células T y NK para una respuesta más fuerte contra células dañinas.
- Las **vesículas de células T** llevan señales y material genético que pueden activar o inhibir la respuesta inmune, ayudando a controlar la inflamación y el ataque antitumoral.
- Las **vesículas de células NK** contienen proteínas que pueden destruir directamente células tumorales, y son candidatas para terapias contra el cáncer.



MicroRNA (miRNA) regulation in cancer.

miRNA	Disease	Regulation	Main Characteristics
miR-10b	Breast Cancer	Upregulated	Overexpressed only in metastatic disease In non-metastatic disease—cell invasion and metastasis inducitor High levels correlated to disease progression and poor outcome
miR-196a	Breast Cancer	Upregulated	Oncogenic role Alters apoptosis and angiogenesis High levels associated with advanced disease
miR-4417	Breast Cancer	Downregulated	Prognostic tool for TNBC Levels correlated to the evolution of the disease
miR-200 cluster	Ovarian Cancer	Upregulated	Low levels associated with cell invasion and metastasis Low levels predict poor outcomes and disease recurrence Angiogenesis inhibitors
miR-506	Ovarian Cancer	Dysregulated	Cell invasion, migration and EMT inhibitor High levels confer a good prognosis
let-7 cluster	Ovarian Cancer	Dysregulated	Suppressors of tumor growth and cell invasion
miR-183	Ovarian Cancer	Dysregulated	Overexpressed in low metastatic ovarian cancer
miR-22	Ovarian Cancer	Dysregulated	Overexpressed in low metastatic ovarian cancer

Tecnología FLEX, la Joya de la corona



Since its inception, researchers have relied on the CytoFLEX platform for its exceptional sensitivity, state-of-the-art detection technology, and extensive configuration options. Today, a CytoFLEX instrument can be found in nearly **10,000** labs around the world.



217
CytoFLEX
DxFLEX
Cytoflex SRT

BECKMAN
COULTER Life Sciences

Únete a la revolución de la nanoescala y cuenta con nuestro soporte científico para tus aplicaciones

