

## DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS ENDÓGENOS Y PROTEÍNAS DIANA EN EXOSOMAS AISLADOS DEL SECRETOMA CELULAR Y SUERO DE RATÓN EMPLEANDO ICP-MS

Jaime Martínez-García<sup>1</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>2</sup>, Beatriz Fernández<sup>1</sup>, Rosario Pereiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, Avda. Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Asturias, España

<sup>2</sup>Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, España

[martinezjaimegarcia@gmail.com](mailto:martinezjaimegarcia@gmail.com), <https://e2bna.grupos.uniovi.es/>, @e2bnauniovi (Instagram)

### Abstract

La neurodegeneración es el proceso progresivo de daño y pérdida de función de las neuronas en el cerebro y el sistema nervioso, afectando funciones motoras, cognitivas, y emocionales. Las enfermedades neurodegenerativas son generalmente afecciones graves que alteran la calidad de vida y los biomarcadores son cruciales para la investigación y tratamiento de estas enfermedades. La identificación temprana mediante biomarcadores facilita un diagnóstico más preciso, seguimiento de la progresión y evaluación de la eficacia de nuevos tratamientos, lo que mejora las posibilidades de intervención temprana. Actualmente, las vesículas extracelulares (VEs), como los exosomas, juegan un papel fundamental en el contexto de la neurodegeneración y los biomarcadores debido a su capacidad de transportar y comunicar información entre células. En el presente trabajo se muestran dos metodologías para llevar a cabo la determinación de elementos endógenos y proteínas diana en VEs de muestras de interés biológico empleando espectrometría de masas elemental (ICP-MS).

### 1. Introducción

La neurodegeneración engloba cualquier proceso fisiológico involucrado en la pérdida de estructura y función de neuronas y otras células del sistema nervioso central [1]. Este fenómeno es causante de múltiples enfermedades, conocidas como enfermedades neurodegenerativas, con mayor prevalencia en la población envejecida y una expectativa de aumento prácticamente exponencial en los próximos años, debido a la carencia de terapias lo suficientemente efectivas y métodos de diagnóstico temprano [2]. Entre las enfermedades neurodegenerativas más comunes en el mundo desarrollado están la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson [3], y ciertas patologías oculares neurodegenerativas como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o el glaucoma [4]. Por ello, actualmente existe la necesidad de una investigación más avanzada en este tipo de enfermedades para conocer mejor sus mecanismos de desarrollo a nivel celular, así como ampliar la biblioteca de biomarcadores fiables de neurodegeneración que permitan un diagnóstico precoz de estas enfermedades, con un triple objetivo:

(i) identificar cambios moleculares antes de que se manifiesten los síntomas clínicos, (ii) realizar un seguimiento de la progresión (medir la carga patológica a lo largo del tiempo), y (iii) llevar a cabo una evaluación de los tratamientos (monitorizar la respuesta a terapias mediante los cambios en los biomarcadores).

Uno de los fenómenos que induce la degeneración de las estructuras neuronales es la formación de depósitos de material proteico extracelular que atrofia a las células e impiden su correcta comunicación con el torrente sanguíneo [5]. Este proceso bioquímico se puede estudiar desde diferentes enfoques, pero en este trabajo se ha abordado a través del estudio de la secreción celular, un proceso celular que ha cobrado relevancia en investigación biomédica en la última década. La secreción e intercomunicación celular se realiza principalmente a través de vesículas extracelulares (VEs), unas vesículas formadas a partir de la membrana celular que acoge infinidad de biomoléculas [6], entre las que se podrían encontrar biomarcadores de neurodegeneración.

El análisis de elementos endógenos y proteínas presentes en las VEs tiene una importancia creciente en el campo clínico, especialmente para el diagnóstico, pronóstico y monitorización de diversas enfermedades, incluidas las neurodegenerativas. Se podría decir que su relevancia se debe a las siguientes razones:

- **Diagnóstico no invasivo.** Las VEs se encuentran en fluidos biológicos accesibles como la sangre, la orina, y el líquido cefalorraquídeo. Esto permite obtener información de órganos o tejidos afectados sin necesidad de biopsias invasivas.
- **Monitorización de la progresión de la enfermedad.** Las VEs transportan proteínas relacionadas con el estado patológico de las células de origen. Al estudiar la composición elemental o proteica de las VEs en diferentes momentos, es posible seguir la evolución de una enfermedad o la respuesta a un tratamiento. Esto es especialmente útil en enfermedades crónicas, donde es necesario un seguimiento continuo para ajustar terapias.
- **Personalización de tratamientos.** El análisis de los componentes endógenos de las VEs podría ayudar a comprender cómo un paciente está respondiendo a un tratamiento o si existe

resistencia a una terapia. Esto facilita la medicina personalizada, ya que permite ajustar tratamientos en función de las necesidades individuales de cada paciente.

- **Indicadores pronósticos.** Las proteínas endógenas y otros elementos presentes en las VEs pueden servir como indicadores pronósticos. Por ejemplo, ciertos patrones de expresión proteica en VEs pueden estar asociados con una peor progresión de la enfermedad, lo que permite estratificar a los pacientes en función de su riesgo y ajustar las estrategias de manejo clínico.

El análisis de elementos endógenos y proteínas diana en las VEs resulta actualmente un área de especial interés en el campo clínico al proporcionar herramientas no invasivas para los análisis, con un impacto potencial muy significativo en la mejora de los resultados clínicos.

En este contexto, este trabajo se centra en el desarrollo de metodologías analíticas para llevar a cabo tanto la determinación de elementos endógenos como de proteínas en VEs purificadas de muestras biológicas (cultivos celulares y suero de ratón) empleando la técnica plasma de acoplamiento inductivo – espectrometría de masas (ICP-MS). Además, se describen dos estrategias para la purificación de VEs, así como diferentes sistemas de introducción de muestra en el ICP-MS. Por otro lado, para el análisis de biomoléculas, se propone investigar el empleo de dos tipos de marcas elementales en el inmunoensayo que se ha de llevar a cabo con el anticuerpo (Ab) específico de la proteína diana en las VEs; nanopartículas de oro (AuNPs) y nanoclústeres de oro (AuNCs).

## 2. Determinación de elementos endógenos en VEs purificadas de cultivos celulares *in vitro*

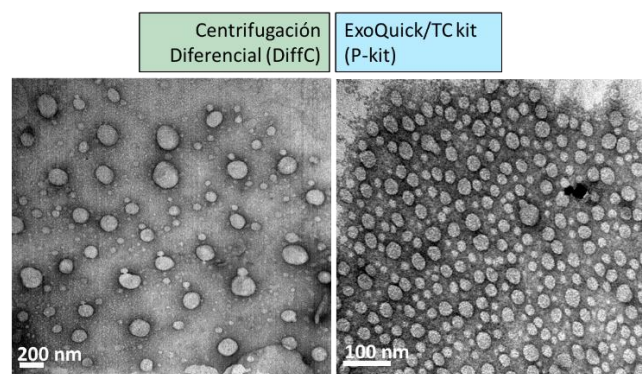
La desregulación de biomoléculas a causa de procesos neurodegenerativos se puede relacionar en muchos casos con diferencias en ciertos elementos endógenos, ya que algunos elementos traza participan en los procesos bioquímicos asociados a proteínas y ácidos nucleicos [7]. A continuación, se presenta una metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación para determinar elementos traza con un papel antioxidante importante, como son Fe, Cu y Zn, en VEs de cultivos celulares, empleando para la detección ICP-MS [8].

El modelo celular investigado es una línea celular inmortalizada de epitelio pigmentario de la retina (hRPEsv40). Este tipo de cultivo *in vitro* resulta de vital importancia en el estudio de una de las patologías neurodegenerativas oculares más prevalentes en la población envejecida como es la DMAE. Como modelo, se ha trabajado con dos grupos muestrales de células: un grupo control y un grupo sometido a un tratamiento de estrés oxidativo, empleando el reactivo generador de radicales libres 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH). Como analitos, se han seleccionado Fe, Cu y Zn a fin de evaluar su posible desregulación en un modelo de estrés oxidativo

Actualmente existen múltiples métodos de purificación de VEs de medios biológicos [9]. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios en los que se evalúe la adecuación de protocolos para el análisis elemental, dado que la mayor parte de las investigaciones publicadas están centradas en el análisis de biomoléculas. En el presente trabajo se han evaluado dos de las estrategias más empleadas en la bibliografía: (i) Centrifugación diferencial (DiffC), y (ii) Precipitación con un kit comercial (P-kit).

En primer lugar, se realizó una caracterización comparativa de las VEs purificadas de los medios de cultivos comparando las dos metodologías por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En ambos casos se analizaron VEs purificadas de células en condiciones CT. En el caso de la purificación empleando DiffC el medio de cultivo de células se somete a diferentes pasos de centrifugación (entre 300-10000 g) y las VEs son finalmente resuspendidas en 100  $\mu$ L de PBS (pH=7,4). En el caso de la purificación por P-kit, se siguen las especificaciones indicadas por el fabricante del kit comercial (ExoQuick-TC kit, System Biosciences) siendo las VEs también resuspendidas en PBS.

En la **Fig. 1.** se muestran las imágenes de TEM obtenidas para las VEs con ambas metodologías de purificación. Observando las dos imágenes, se puede afirmar que con ambos protocolos de purificación es posible obtener VEs de los medios de cultivo. Sin embargo, el tamaño de las VEs es significativamente menor utilizando P-kit frente a DiffC, y la eficacia de purificación es también mayor con P-kit (i.e., se obtiene un mayor número de VEs). A la vista de los resultados experimentales obtenidos en las medidas con TEM se podría concluir que el protocolo P-kit es más eficiente y favorece la purificación de VEs pequeñas (p.e., exosomas) frente a la purificación con DiffC.

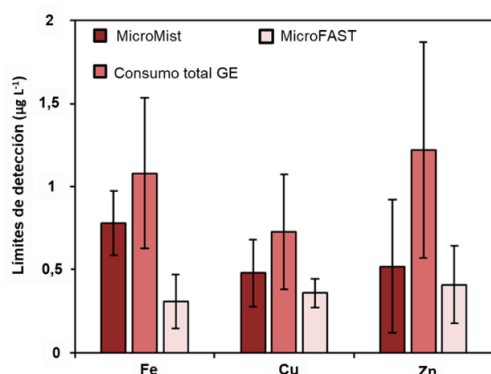


**Fig. 1.** Imágenes de TEM obtenidas para VEs purificadas de cultivos de células hRPEsv40 en condiciones CT por DiffC y P-kit.

A continuación, se evaluó la mejor manera de introducir las suspensiones de VEs purificadas en el ICP-MS para llevar a cabo la determinación de Fe, Cu, y Zn. Los sistemas de introducción de muestra convencionalmente empleados en el ICP-MS no son en principio adecuados para las muestras de VEs debido al limitado volumen de muestra disponible (~ 100  $\mu$ L). De este modo, en este trabajo se han evaluado tres sistemas de introducción de muestra de bajo consumo para determinar cuál es el más adecuado. En

concreto, se han estudiado: (i) Un micronebulizador (MicroMist DC nebulizer), (ii) Un sistema para análisis tipo “single cell” de la casa comercial Glass Expansion, y (iii) Un sistema para análisis tipo “single cell” denominado microFAST de Elemental Scientific, Inc. De aquí en adelante nos referiremos a estos tres sistemas como MicroMist, Consumo total GE, y microFAST, respectivamente.

Para evaluar los tres sistemas de introducción de muestra, se realizaron calibrados metodológicos para Fe, Cu y Zn con patrones de referencia y se calcularon los límites de detección (LDs) para cada uno de ellos. En la Fig. 2 se muestran los LDs obtenidos para Fe, Cu y Zn para los sistemas MicroMist, Single Cell, y microFAST, obteniéndose para los tres elementos una mejor reproducibilidad y LDs con el sistema microFAST.



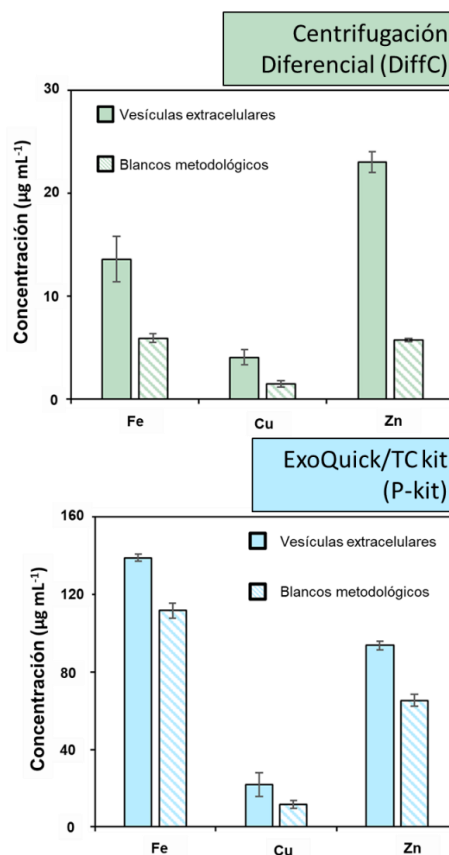
**Fig. 2.** LDs obtenidos para Fe, Cu y Zn en el análisis de patrones de referencia por ICP-MS comparando tres sistemas de introducción de muestra.

Una vez seleccionado el sistema de introducción de muestra óptimo para el análisis de Fe, Cu y Zn en muestras de VEs por ICP-MS, se procede a la determinación de los niveles de estos elementos en muestras de VEs purificadas de los medios de cultivo de células en condiciones CT (empleando DiffC y P-kit) así como en los blancos metodológicos de ambos procedimientos de purificación.

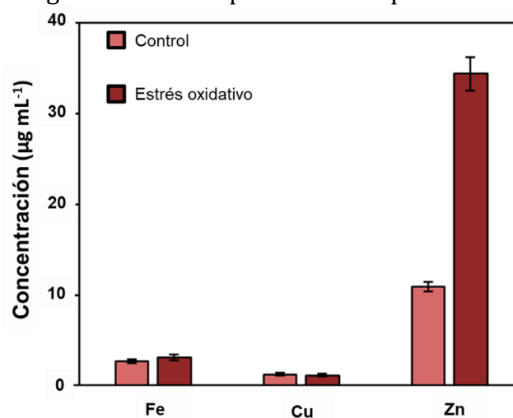
La Fig. 3 muestra los resultados experimentales obtenidos para la determinación de Fe, Cu y Zn de un triplicado para cada tipo de muestra. A la vista de los resultados experimentales se puede afirmar que es posible determinar los elementos traza en las VEs siguiendo los dos protocolos de purificación, siendo los niveles significativamente superiores para todos los elementos en muestras de VEs purificadas por P-kit. Sin embargo, cabe destacar que la concentración de Fe, Cu y Zn en los blancos metodológicos también era significativamente superior para el caso del P-kit, indicando una contaminación de elementos traza en las muestras con este protocolo. Por tanto, el protocolo P-kit es descartado para la determinación de elementos traza en VEs mediante ICP-MS.

A continuación, recurriendo al protocolo de purificación por DiffC y el sistema de introducción de muestra microFAST, se determinó Fe, Cu y Zn en muestra de VEs de los dos grupos muestrales de células de hRPEsv40; control y sometidas a un tratamiento de estrés oxidativo con AAPH. En la Fig. 4 se muestran las concentraciones obtenidas para los elementos traza en los dos grupos de

muestras (triplicado de muestras en todos los casos). Los niveles de Fe y Cu no presentan diferencias significativas, pero los niveles de Zn muestran una sobreexpresión en el grupo sometido a estrés oxidativo. El hecho de observar una mayor concentración de Zn en el grupo tratado con AAPH remarca la importancia de la defensa antioxidante de las metaloproteínas de Zn a través de la intercomunicación celular, y el posible efecto del Zn que se secreta a través de las VEs para reducir este efecto.



**Fig. 3.** Concentración de Fe, Cu y Zn por ICP-MS para muestras de VEs purificadas de medios de cultivo CT (empleando DiffC y P-kit) así como en blancos metodológicos de los dos protocolos de purificación.



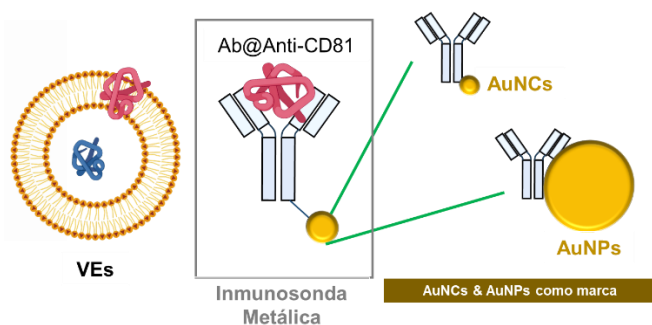
**Fig. 4.** Concentración de Fe, Cu y Zn en VEs purificadas de medios de cultivo de células hRPEsv40 control y sometidas a un tratamiento con AAPH, medido ICP-MS (protocolo de purificación empleando DiffC y sistema de introducción de muestra microFAST).

### 3. Determinación de proteínas diana en VEs purificadas de suero de ratón

En una segunda etapa, actualmente se está investigando no solo la determinación de elementos endógenos en VEs sino también de biomoléculas diana. En este caso, para poder determinar proteínas en VEs con ICP-MS es necesario desarrollar una metodología analítica lo suficientemente sensible como para detectar proteínas a muy bajos niveles de concentración.

En la **Fig. 5** se muestra un diagrama de la metodología que se propone para determinar proteínas (p.e., CD81) en VEs purificadas de muestras de suero de ratón por ICP-MS siguiendo el protocolo de purificación empleando DiffC. Como el objetivo es determinar biomoléculas empleando MS elemental, es necesario una etapa previa de preparación de las muestras donde se utilice una inmunosonda que reconozca la proteína de interés en las VEs y que disponga de una marca elemental fácilmente detectable por ICP-MS. En este trabajo se propone evaluar dos marcas metálicas en la inmunosonda; AuNCs y AuNPs. El empleo de este tipo de inmunosondas aporta por un lado selectividad de la proteína de interés frente a otras proteínas presentes en las VEs, así como una gran sensibilidad para su detección por ICP-MS gracias a la amplificación de la marca metálica (i.e., número de átomos de metal por biomolécula a analizar).

Por un lado, se propone emplear AuNCs como marca elemental. Los AuNCs son NPs con un tamaño promedio menor de 3 nm. Este tipo de marca ha sido aplicada con éxito por nuestro grupo de investigación en diferentes aplicaciones para la determinación de proteínas en fluidos biológicos, secciones de tejidos e incluso cultivos celulares empleando ICP-MS tanto con nebulización convencional como acoplado a sistemas de "single cell" y ablación láser [10-12]. Por otro lado, las AuNPs son un tipo de marca empleada comúnmente en variadas aplicaciones clínicas para la determinación de biomoléculas [13]. A priori, los AuNCs ofrecen menores impedimentos estéricos para bloquear los sitios de unión del Ab debido a su pequeño tamaño, mientras que las AuNPs presentan un mayor tamaño (diámetros alrededor de los 10 nm o superiores), pero también un mayor número de átomos de Au por inmunosonda (i.e., una mayor amplificación).



**Fig. 5.** Representación esquemática de la metodología propuesta para determinar proteínas diana en muestra de VEs con AuNCs o AuNPs como marca elemental para la detección por ICP-MS.

Para evaluar los dos tipos de marcas se propone trabajar con VEs purificadas de suero comercial de ratón y tomar como modelo la tetraspanina CD81, una proteína genérica de VEs, para desarrollar la metodología. El inmunoensayo seleccionado es de formato competitivo con detección directa, al aportar mayor sensibilidad respecto a otro tipo de inmunoensayos. Aunque todavía se trata de una investigación en desarrollo, se han sintetizado inmunosondas estables y biocompatibles marcadas con AuNCs y AuNPs para la determinación de CD81 en VEs de suero de ratón y los primeros resultados obtenidos sugieren que, aunque ambas marcas ofrecen LDs similares para la detección de CD81 (en el rango de  $10^{-7}$   $\mu$ M), se ha observado mejor precisión y mejor ajuste a una respuesta típica de un inmunoensayo competitivo cuando se utiliza AuNCs como marca.

El objetivo final de este estudio es aplicar la metodología desarrollada a diferentes proteínas relevantes en el contexto de la neurodegeneración para evaluar el efecto de la suplementación de Zn frente a la neurodegeneración. Para ello, se dispone como grupo de trabajo un modelo animal de neurodegeneración compuesto por cuatro grupos muestrales: ratones homocigóticos y heterocigóticos, y ratones sometidos a un tratamiento de suplementación con Zn y sin suplementación.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2022-1373190B-C21 concedido por el MCIN/AEI/10.13039/501100011033/. J. Martínez-García agradece la Ayuda Predoctoral Severo Ochoa con referencia BP21-041 (Consejería de Ciencia, Educación y Universidad, Principado de Asturias). Adicionalmente, se agradece el soporte técnico de los Servicios Científico Técnico (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

#### Referencias

- [1] S. Przedborski, M. Vila y V. Jackson-Lewis, Neurodegeneration: What is it and where are we? *J. Clin. Inves.* 111 (2003) 3-10, <https://doi.org/10.1172/JCI200317522>.
- [2] V. L. Feigin, T. Vos, E. Nichols, M. O. Owolabi, W. M. Carroll, M. Dichgans, G. Deuschl, P. Parmar, M. Brainin y C. Murray, The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy, *Lancet Neurol.* 19 (2020) 255-265, <https://doi.org/10.3390/jcm12051709>.
- [3] R. N. L. Lamptey, B. Chaulagain, R. Trivedi, A. Gothwal, B. Layek y J. Singh, A review of the common neurodegenerative disorders: current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 1851, <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>.
- [4] N. Marchesi, F. Fahmideh, F. Boschi, A. Pascale y A. Barbieri, Ocular neurodegenerative diseases: interconnection between retina and cortical areas, *Cells* 10 (2021) 2394, <https://doi.org/10.3390/cells10092394>.
- [5] M. S. Wolfe, Solving the puzzle of neurodegeneration, en: *The molecular and cellular basis of neurodegenerative diseases*, Elsevier, Lawrence, 2018, pp.

1-22, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811304-2.00001-8>.

[6] A. Raghav, M. Singh, G.-B. Jeong, R. Giri, S. Agarwal, S. Kala y K. A. Gautam, Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases: a systematic review, *Front. Mol. Neurosci.* 15 (2022) 1061076, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1061076>.

[7] M. Kawahara, M. Kato-Negishi y K.-i. Tanaka, Dietary trace elements and the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Nutrients* 15 (2023) 2067, <https://doi.org/10.3390/nu15092067>.

[8] J. Martiñez-García, B. Fernández, A. Álvarez-Barrios, L. Álvarez, H. González-Iglesias y R. Pereiro, Determination of endogenous trace elements in extracellular vesicles secreted by an in vitro model of human retinal pigment epithelium under oxidative stress conditions using ICP-MS, *Talanta* 263 (2023) 124693, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124693>.

[9] J. Stam, S. Bartel, R. Bischoff, J. C. Wolters, Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods, *J. Chromatog. B.* 1169 (2021) 122604, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122604>.

[10] M. Cruz-Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro y A. Sanz-Medel, Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: Application to human serum immunoglobulin E determination, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 1055-1061, <http://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.011>.

[11] A. Lores-Padin, B. Fernández, L. Álvarez, H. González-Iglesias, I. Lengyel, R. Pereiro, Multiplex bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation - Inductively coupled plasma - Mass spectrometry using metal nanoclusters as labels, *Talanta* 221 (2021) 121489, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>.

[12] P. Menero-Valdéz, M. I. Chronakis, B. Fernández, C. D. Quarles Jr., H. González-Iglesias, B. Meermann, R. Pereiro, Single Cell-ICP-ToF-MS for the multiplexed determination of proteins: Evaluation of the cellular stress response, *Anal. Chem.* 95 (2023) 13322-13329, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02558>.

[13] K. Omidfar, F. Khorsand y M. D. Azizi, New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 336-347, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.045>.