



II Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas
Extracelulares

12 y 13 de septiembre de 2024

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, ARGENTINA.

El II Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares (GAVE) tuvo lugar los días 12 y 13 de septiembre de 2024 y se llevó a cabo en el Pabellón Cero+Infinito de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. El workshop contó con 3 conferencias plenarias, 10 charlas distribuidas en 3 simposios, 9 comunicaciones orales en 2 sesiones, 26 presentaciones de pósteres y 2 charlas comerciales. En cuanto a los participantes, 103 personas asistieron de manera presencial, mientras que 25 participantes adicionales siguieron el encuentro de forma remota desde distintas regiones de Argentina y otros países de América Latina.

A continuación, se muestran los resúmenes de los trabajos presentados.

Small EVs de células tumorales pancreáticas ayunadas inducen autofagia por activación de la vía FOXO3a

Grasso, Daniel(1,2,3); Diaz, Maximiliano A.(1,2); Sobrado, Laura(1,2); Narváez, Giuliana(1,2); Yzetta, Valentín(1,2); Papademetrio, Daniela L.(2,4); Alvarez, Elida(1); Garcia, Maria Noé(1,2)

(1) Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. (2) Centro Franco-argentino para la Investigación en Cáncer de Páncreas. (3) Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. (4) Unidad de Conocimiento Traslacional, Hospital del Bicentenario Esteban Echeverría, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: mnoegarcia@gmail.com

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es un cáncer agresivo con escasa esperanza de vida. Los tumores pancreáticos suelen encontrarse en un microambiente desmoplásico e hipovascularizado. Es importante comprender la capacidad de las células de PDAC para resistir la habitual limitación de oxígeno y nutrientes. La autofagia es una importante respuesta celular para hacer frente a estas condiciones adversas. Las vesículas extracelulares (EVs) están ganando relevancia exponencial en las comunicaciones intercelulares y en el comportamiento coordinado de las poblaciones celulares. Con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre la respuesta de las células de PDAC a una configuración deficiente de nutrientes, sometimos a ayuno cultivos de células Panc-1. Observamos que, en caso de ayuno, las tetraspaninas asociadas a las EVs, CD9, CD63 y CD81, se movilizan hacia estructuras similares a dominios en la membrana plasmática de las células de PDAC. Asimismo, se observa un aumento específico de small EVs (sEVs) en las células ayunadas. Curiosamente, las sEVs de las células ayunadas, pero no los de las células en condiciones basales, inducen fuertemente el flujo autofágico incluso en cultivos con medios nutricionales óptimos. Además, esta capacidad de inducir autofagia es específica de las sEVs CD63/CD81 doble positivas y es eficaz incluso en la línea celular pancreática no tumoral hTER-HPNE. Esta autofagia mediada por sEVs está intermediada, al menos en parte, por la vía de FOXO3a. Interesantemente, aunque la liberación de EVs vuelve al nivel basal después de 1 h de recuperación del ayuno, esas EVs aún poseen una capacidad efectora residual de inducción de autofagia, lo que sugiere un desacoplamiento cuanti/cualitativo de las EVs secretadas. Nuestros resultados sugieren que las células de PDAC en entornos nutricionales deficientes liberan sEVs específicos que a su vez activan la vía FOXO3a y el flujo de autofagia en las células receptoras.

Cáncer - Póster

Extracellular vesicles derived from TNF- α conditioned macrophages promote endocrine resistance in breast tumor cells

Maria Celeste Rodriguez-Baili ; German Alejandro Gil

CIQUIBIC-CONICET. Química Biológica Ranwel Caputto, FCQ.UNC. Córdoba.Córdoba

Contacto: ggil@unc.edu.ar

Breast cancer is one of the leading tumors diagnosed worldwide and the primary cause of cancer-related death in women. Nearly 70% of diagnosed breast tumors are estrogen receptor-positive (ER+), becoming the receptor a key therapeutic target. Despite the efficacy of hormonal therapies, some patients develop resistance, either initially or during the course of treatment. Understanding tumor progression and resistance mechanisms requires studying the tumor microenvironment, where tumor cells interact closely with endothelial cells, cytokines, soluble factors, fibroblasts, and immune cells, particularly macrophages, which are highly influential in tumor behavior. Cells communicate through direct contact, endocrine and paracrine soluble factors, and extracellular vesicles (EVs). These lipid bilayer vesicles facilitate the transfer of their cargo to recipient cells, inducing phenotypic changes. Here, we isolated EVs derived from TNF- α -conditioned macrophages and investigated their effects on MCF-7 ER+ breast tumor cells. Our findings indicated that these vesicles enhance proliferation, migration, induced epithelial-mesenchymal transition and a tumor stem cell phenotype. Furthermore, we identified a link between these EVs and endocrine resistance, demonstrating that vesicles not only increased cell proliferation in the presence of Tamoxifen, an ER modulator, but also transferred endocrine resistance to previously sensitive cells.

Detección de integrinas en vesículas extracelulares grandes de pacientes con cáncer de mama

Iglesias, M.R. (1) ; Rabassa, M.E. (1)

(1) CINIBA, UNLP, La Plata, Buenos Aires

Contacto: mrabassa@med.unlp.edu.ar

Los tumores liberan en la circulación periférica vesículas de distintos orígenes. Aquellas procedentes de la membrana plasmática son potenciales portadoras de moléculas de adhesión celular relacionadas con los procesos de diseminación tumoral. Con el fin de analizar la expresión de integrinas en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de mama, a partir de plasma almacenado a -80°C se aislaron mediante centrifugación diferencial fracciones de vesículas membranosas a 400 xg, 1500 xg, 10.000 xg y, luego de resuspender el pellet con PBS, nuevamente a 10.000 xg, sucesivamente. Cada centrifugación duró 30 minutos, a 4°C . Finalmente, el último pellet fue resuspendido con PBS, fraccionado y almacenado a -80°C . Se evaluó la concentración de proteínas de las fracciones. El tamaño y forma de las vesículas fue determinado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y microscopía electrónica (EM). Las fracciones fueron analizadas mediante inmunoblot para la detección de CD9, CD63, integrina $\alpha 6$ e integrina $\beta 4$. Resultados: De 43 muestras 41 mostraron material membranoso y concentraciones de proteínas suficientes para el estudio. El análisis mediante DLS y EM mostró vesículas membranosas de más de 200 nm, con agregados de vesículas y un promedio superior a 400 nm mediante DLS. Los inmunoblot mostraron reacción positiva para CD9 en 5/41 (12,2), para CD63 en 10/41 (24,4), para integrina $\alpha 6$ en 27/41 (65,9) y para integrina $\beta 4$ en 5/41 (12,2). Conclusión: Algunas de las fracciones de plasma de pacientes con cáncer de mama contienen vesículas extracelulares grandes, portadoras de integrinas $\alpha 6$ y $\beta 4$.

**miR-122-5p y miR-92a-3p como marcadores de fibrosis hepática en individuos CHC:
EVs plasmáticas vs. plasma**

Cairolí, V. (1); De Sousa, M. (2); Sejas, JC. (2); Preciado, MV. (1); Valva, P. (1)

(1) Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas (IMIPP-CONICET-GCBA), Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, CABA, Argentina. (2) Unidad de Hepatología, Hospital General de Agudos J.M Ramos Mejía, CABA, Argentina.

Contacto: valvapamela@gmail.com

Las vesículas extracelulares (EVs) se estudian como componentes esenciales de la biopsia líquida. Los microRNAs (miRNAs) en las EVs podrían ser biomarcadores de daño por su rol en la regulación de la fibrogénesis mediante la regulación de la expresión génica. El objetivo fue comparar la expresión de miRNAs en EVs plasmáticas (pEVs) y plasma en individuos con hepatitis C crónica (CHC) con distintos estadios de fibrosis hepática y evaluarlos como biomarcadores. Se aislaron pEVs con exoRNeasy kit (QIAGEN) de 50 individuos con CHC, se caracterizaron por ME de transmisión, cryo-ME y NTA. Se extrajo el RNA enriquecido en miRNAs, se secuenció por NGS y se analizó la expresión diferencial significativa (SDE) de miRNAs [fold change (FC) ≥ 1.5 ; false discovery rate (FDR) ≤ 0.2] en fibrosis significativa ($F \geq 2$) vs. fibrosis no significativa ($F < 2$). Se evaluó por RT-qPCR la expresión plasmática de los SDE miRNAs. Por curvas ROC se evaluó el valor diagnóstico de los SDE miRNAs y del score generado con un modelo de regresión logística binomial. Se aislaron partículas esféricas con diámetro medio de 130 nm, homogéneas en tamaño y concentración entre estadios de fibrosis. En pEVs el análisis SDE mostró la up-regulación de miR-122-5p (FC=3,06, FDR<0,001) y la down-regulación de miR-92a-3p (FC=-1,5, FDR=0,051) en individuos con $F \geq 2$. Cada miRNA mostró moderado poder individual, pero excelente poder combinado para discriminar casos $F \geq 2$ (AUROCmiR-122 =0,746; AUROCmiR-92a =0,767; AUROCscore=0,858). En plasma, ambos miRNAs mostraron expresión similar entre estadios de fibrosis (p-valormiR-122= 0,874; p-valormiR-92a=0,650). Los diferentes estadios de fibrosis hepática presentaron firmas de expresión de pEVs-miRNAs específicas. La evaluación combinada de miR-122 y miR-92a en el score mostró excelente valor diagnóstico para discriminar casos $F \geq 2$. La evaluación directa en plasma no refleja los perfiles observados en las pEVs, lo que resalta el valor de éstas como potenciales biomarcadores de daño.

Estudio del impacto de la hormona tiroidea triiodotironina (t3) en la producción y función de vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas murinas

Teixeira, M.P. (1); Negretti-Borga, D. (1); Sandim, V. (2); Verçoza, BRF (3); Blanco, A. (1); Puentes, E. (1); Zingali, R.B. (2); Donadio, A.C. (1); Montesinos, M.D.M. (1); Monteiro, R.Q. (2); Pellizas, C.G. (1).

(1) Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI- CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica, Córdoba, Córdoba, Argentina; (2) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; (3) Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa UFRJ Xerém (NUMPEX-BIO), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil.

Contacto: mari.piress@gmail.com

Las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por células dendríticas (DCs) modulan respuestas inmunes. Nuestro grupo demostró que T3 activa DCs, direccionando respuestas adaptativas proinflamatorias y citotóxicas antígeno-específicas in vitro, explotadas en protocolos murinos de vacunación antitumoral. Sin embargo, aún se desconoce el impacto de T3 en la producción de EVs por DCs, y si esas EVs derivadas de DCs tratadas con T3 (DCs-T3) participan en la modulación de la respuesta inmune registrada. Nuestro objetivo fue cuantificar y caracterizar las EVs de DCs-T3, y evaluar si estas EVs serían captadas por otras DCs inmaduras y afectar su activación. Para ello, utilizamos DCs derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 tratadas con T3 (10 nM) o sin tratar (DCs-Ct). El medio condicionado de DCs fue centrifugado para la remoción de células y debris (300g 10' y 2000g 20'), para la obtención de 10K-EVs (10000g 40') y 100K-EVs (100000g 90'). Un aumento significativo en la concentración de 10K-EVs y una tendencia de aumento de 100K-EVs en las DCs-T3 (vs DCs-Ct) fue evidenciado por NTA ($n \geq 5$, test "t" apareado). No se observaron diferencias significativas por Bradford. Una mayor expresión de TSG101 y sintenina (marcadores de exosomas) y una menor expresión de anexina A1 (marcador de microvesículas) fue demostrada en las 100K-EVs (vs 10K-EVs) por WB. También se evidenció una tendencia de disminución de sintenina en las 100K-EVs de DCs-T3 (vs DCs-Ct). Resultados preliminares de FACs utilizando EVs de DCs-Ct y DCs-T3 marcadas con CFSE, sugieren la captación de ambas EVs por DCs singénicas in vitro. Además, la presencia de EVs de DCs-T3, pero no de EVs de DCs-Ct, promovió la activación de DCs in vitro, evidenciado por la mayor frecuencia de DCs CD86hi (molécula coestimuladora) ($n \geq 3$, test de Tukey). En conclusión, T3 modifica la producción de EVs por DCs y posiblemente su contenido. Estas EVs son captadas por otras DCs, amplifican su activación y por tanto la respuesta a T3.

Análisis de vesículas extracelulares derivadas de ganglios linfáticos y plasma en pacientes con linfoma de células B.

Otero A1, Pérez P (1), Russo C (1), Cordini G (2), Norte M (3), Martínez E (2), Marsol N (2), Rivarola S (4), Cantilo A (4), Leicaj L (1), Adamczyk A (1), Penas F (1), Ernst G (4), Palmer S (4), Ostrowski M (1), Arruvito L (1).

(1) Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA. UBA-CONICET, CABA, Argentina.

(2) División Hematología, Hospital de Clínicas "José de San Martín". UBA. CABA, Argentina. (3)

Departamento de Cirugía, Hospital de Clínicas "José de San Martín". UBA. CABA, Argentina. (4)

Servicio de Hematología, Hospital Británico. UBA. CABA, Argentina.

Contacto: arruvitol@gmail.com

Antecedentes: Los linfomas de células B constituyen el 95% de todos los linfomas. El 50% de los pacientes es refractario o recae bajo tratamiento con terapias de 1° línea. Mientras que las biopsias de tejido conllevan riesgos y no reflejan la heterogeneidad tumoral, las biopsias líquidas pueden superar estas limitaciones. Las vesículas extracelulares (VE) participan en la comunicación entre células y aumentan durante el estrés tisular. Objetivos: • Caracterizar las VE derivadas de ganglios linfáticos (GL) normales y LCB (VEt). • Caracterizar las VE derivadas del plasma (VEp) de LCB y donantes sanos (S). • Determinar la unión del anticuerpo rituximab (RTX) a VEp. Métodos: Fragmentos de GL se cultivaron durante 24h. Las VEt se purificaron mediante UC y las VEp se aislaron por SEC. La caracterización incluyó WB, CF, NTA y TEM. Analizamos la expresión de CD20 en VE, la formación de CI y los niveles de complemento C4. Resultados: Las VEt de LCB y S mostraron características típicas por TEM, enriquecimiento de CD81 y CD107a, y un tamaño de 166.6 ± 81.5 nm (n=1). Las VEt de LCB (n=3) mostraron mayor expresión de CD20 comparado con las VEt de S (n=4, $p < 0.02$) mediante CF. Observamos una correlación positiva entre la frecuencia de células CD20+ en tejido por CF y el porcentaje de VEt CD20+ ($p < 0.01$, $r = 1$). Además, las VEp de LCB y S expresaron ALIX y CD81, con tamaño de 140.6 ± 74.3 nm (n=3). Las VEp de LCB tuvieron mayor expresión de CD20 comparado con S (mayor índice CD20/CD81 en WB, n=7). Las VEp expuestas a RTX formaron complejos inmunes (n=1). Finalmente, encontramos disminución del índice CD20/CD81 y niveles de C4 post infusión de RTX. Conclusión: Las VE liberadas por los GL se encuentran en el plasma y reflejan la expresión de la proteína CD20 de las células parentales. Nuestros resultados podrían contribuir a entender el uso de VEp como posibles biomarcadores de progresión de la enfermedad y respuesta terapéutica.

Vesículas extracelulares como portadoras de microARNs en la muerte celular inmunogénica

Lamberti, María Julia (1) Nigro, Annunziata (2) Leggio, Loredana (3) Ravo, Maria (4) Mensitieri, Francesca (2) Montico, Barbara (5) Salvato, Ilaria (2) Iraci, Nunzio (3) Izzo, Viviana (2) Casolaro, Vincenzo (2) Stellato, Cristiana (2) Dal Col, Jessica (2)

(1) Departamento de Biología Molecular, Universidad Nacional de Río Cuarto, INBIAS-CONICET, Río Cuarto 5800, Córdoba, Argentina; (2) Department of Medicine, Surgery and Dentistry "Scuola Medica Salernitana", University of Salerno, Baronissi, Italy (3) Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, University of Catania, Catania, Italy (4) Genomix 4 Life Srl, Baronissi, Salerno, Italy (5) Immunopathology and Cancer Biomarkers, Centro di Riferimento Oncologico di Aviano (CRO), IRCCS, Aviano, Italy

Contacto: mlamberti@exa.unrc.edu.ar

La muerte celular inmunogénica (MCI) es un proceso donde las células tumorales moribundas liberan señales de daño que activan el sistema inmune, especialmente las células dendríticas (CDs). En nuestro estudio reciente, observamos cambios significativos en los microARNs (miRNAs) durante la inducción de MCI en células de linfoma (Mino) tratadas con ácido retinoico (RA) e interferón- α (IFN α), incrementando notablemente los niveles de miR-212-3p y miR-4284. Preparamos lisados tumorales inmunogénicos (iTCLs) con estos tratamientos y los utilizamos para cargar CDs derivadas de monocitos. Las CDs cargadas con iTCLs mostraron mayor capacidad para inducir respuestas específicas de células T antitumorales en comparación con CDs cargadas con lisados de células no tratadas (TCLs). El objetivo aquí fue investigar si los miRNAs están involucrados en el diálogo tumor-CDs durante la MCI. Para ello, obtuvimos iTCLs y TCLs, aislamos vesículas extracelulares (EVs) usando ultracentrifugación, y las analizamos mediante NTA. Los miRNAs se evaluaron con secuenciación de próxima generación (NGS) y RT-qPCR, y las citocinas con un ensayo multiplex. La NGS reveló una sobreexpresión de miR-212-3p en CDs pulsadas con iTCLs, confirmada por RT-qPCR. El análisis funcional mostró que miR-212-3p interactúa con mRNAs diana implicados en vías de señalización, como la de IL-1, respaldado por patrones de citocinas. Partiendo de la hipótesis de que los miRNAs facilitan la comunicación entre células tumorales y CDs durante la MCI in situ, exploramos su presencia en EVs tumorales como mediadores de esta comunicación. Las EVs de células Mino tratadas con RA/IFN α mostraron mayor concentración, tamaño y heterogeneidad en comparación con EVs de células no tratadas, con un aumento significativo de miR-212-3p. Nuestros resultados sugieren cómo los miRNAs y su transporte a través de EVs podrían orquestar mecanismos inmunes durante la MCI a nivel experimental, con posibles aplicaciones clínicas.

Una compleja red de comunicación mediada por exosomas en la infección por Trypanosoma cruzi: actores y mensajes diversos

Mesías, A.C.(1) ; Poulakidas S.N.(1) ; Acuña, L.(1) ; Pérez Brandán, C.(1) ; Tekiel, V.(2) ; Parodi, C.(1)

(1) Instituto de Patología Experimental "Dr. Miguel Ángel Basombrío", CONICET - Universidad Nacional de Salta, Salta Capital, Salta; (2) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, EByN, UNSAM-CONICET, San Martín, Buenos Aires

Contacto: andreacmesias@gmail.com

La comunicación efectiva entre los actores del sistema inmune es esencial para generar una respuesta equilibrada y a tiempo contra patógenos. Esta red se basa en factores solubles, sinapsis célula-célula y vesículas extracelulares. En este proyecto, estudiamos el mensaje transmitido mediante exosomas derivados de macrófagos ($m\phi$) en respuesta a *Trypanosoma cruzi*, el protozoo causante de la enfermedad de Chagas. Los exosomas liberados por $m\phi$ son inmunológicamente activos y actúan como mensajeros durante el inicio de la infección, transmitiendo información específica hacia células distantes. Utilizando dos cepas del parásito con diferencias en virulencia, CL Brener y TCC, observamos que los exosomas liberados por $m\phi$ infectados provocaron respuestas diferentes en células receptoras naïve. La interacción $m\phi$ -TCC promovió la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y una elevada adhesión, asociada con un perfil de tipo M1, mientras que los $m\phi$ estimulados con exosomas de la interacción $m\phi$ -CL Brener mostraron una mayor producción de IL-10 y actividad fagocítica. Estos exosomas transportan información específica de la cepa del parásito y modularían así una respuesta inmune diferencial en las células receptoras. Además, esta red de comunicación involucra a células no inmunológicas infectadas por *T. cruzi*, haciendo el intercambio de señales aún más complejo. Entre estas, los fibroblastos (fb) pueden diferenciarse a formas especializadas en el depósito de matriz extracelular asociadas con el desarrollo de fibrosis. Por este motivo, también estudiamos el mensaje transmitido por fb infectados hacia otros fb y $m\phi$ distales, con la hipótesis de que esta comunicación puede incidir en la respuesta inmune y promover la diferenciación de los fb. Nuestros resultados *in vitro* destacan la importancia de los exosomas como vehículos de comunicación inmunológica durante la infección por *T. cruzi*, aún es necesario determinar cómo influyen en el desarrollo de la infección y la patogenia.

CD73+ cord blood plasma extracellular vesicles modulate T cell function

Russo C, Otero A, Leicaj L, Grosso T, Pérez P, Ostrowski M, Arruvito L

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA. UBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Contacto: arruvitol@gmail.com

CD39 y CD73 son ectonucleotidasas que hidrolizan secuencialmente el ATP extracelular, generando AMP y adenosina. Los recién nacidos tienen niveles elevados de adenosina en plasma, lo cual regula negativamente la respuesta inmune. Las vesículas extracelulares derivadas de células de sangre de cordón umbilical (CB) humano pueden desempeñar roles inmunosupresores; sin embargo, las vesículas extracelulares derivadas del plasma (CB pEV) están poco estudiadas. Objetivo: Aislar y caracterizar las CB pEV para confirmar la expresión de CD39 y CD73. Evaluar la capacidad de estas CB pEV para hidrolizar ATP y producir adenosina, e investigar el impacto de las CB pEV en la función de las células T. Métodos: las CB pEV se aislaron utilizando cromatografía de exclusión por tamaño y se caracterizaron por WB, citometría de flujo, NTA y TEM. La actividad ATPasa se midió por luminometría y la adenosina por fluorometría. Los efectos de las CB pEV sobre las células T se analizaron mediante citometría de flujo. Las CB pEV aisladas mostraron características típicas de EV, incluyendo una apariencia en forma de copa en TEM (n=1), enriquecimiento de marcadores de vesículas extracelulares CD9, CD81 y ALIX (n=4), y una distribución de tamaño de 131 ± 65 nm (n=2). Establecimos la expresión de tanto CD39 (30 ± 8 , n=5; citometría de flujo) como de CD73 (n=3, WB) en las CB pEV. También, las CB pEV exhibieron una potente y dosis-dependiente actividad ATPasa (n=8), la cual fue parcialmente abolida con un inhibidor de ecto-ATPasas ($p < 0.01$), y demostraron la capacidad de generar adenosina ($5 \pm 2 \mu\text{M}$, n=6). Además, la exposición de las células T a las CB pEV disminuyó significativamente la proliferación, sin inducir apoptosis. Interesantemente, también aumentaron la proporción de células Treg ($p < 0.03$, n=6). Las CB pEV presentaron capacidad para generar la adenosina antiinflamatoria y modular la función de las células T. Estos resultados destacan su potencial para aplicaciones terapéuticas en la regulación inmune.

Diferencias sexuales en el efecto de vesículas extracelulares placentarias humanas en el inmunometabolismo de macrófagos

Avalos, J.(1,2); Aguilera, F. (1,2); Lara, B.(1); Grasso, E.(1); Schafir, A.(1); Rios, D.M.(1); Britos, C.(3); Schapira, M.(3); Mariani, C.(3); Meller, C.(3); Ramhorst, R.(1); Merech, F.(1); Hauk, V.(1); Martí, M.(2); Vota, D.(1); Pérez Leirós, C.(1) & Papparini, D(1).

(1) Laboratorio de Inmunofarmacología. Depto. de Química Biológica, UBA, IQUIBICEN-CONICET. Ciudad Universitaria, Pab. 2, (1428), Buenos Aires, Argentina. (2) Laboratorio de Bioinformática. Depto. de Química Biológica, UBA, IQUIBICEN-CONICET. Ciudad Universitaria, Pab. 2, (1428), Buenos Aires, Argentina. (3) Servicio de Obstetricia, Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina.
Contacto: daniel.papparini@gmail.com

A lo largo del embarazo, la placenta libera factores solubles, entre ellos las vesículas extracelulares (EV), que regulan el funcionamiento de células blanco para establecer una interfaz materno-fetal exitosa. Esta última requiere de un control estricto para garantizar el desarrollo y mantenimiento de la placenta y el feto. Recientemente se reportó que habría una reprogramación inmunometabólica en la interfaz, pero mucho se desconoce, entre ello el rol de las EV en esto. Aquí estudiaremos si las EV placentarias, según el sexo del recién nacido [femenino (F) o masculino (M)], pueden reprogramar el fenotipo y metabolismo de monocitos circulantes obtenidos y diferenciados a macrófagos (MA). Compararemos los resultados con el inmunometabolismo de macrófagos placentarios (HB) obtenidos a término. Metodología: Los HB se aislaron de placentas humanas a término por digestión enzimática. Las EV se caracterizaron luego de aislarse por centrifugación diferencial de medios condicionados (CM) de explantos de placenta (CM-F o CM-M). Monocitos aislados de sangre periférica de voluntarias sanas se diferenciaron a MA con GM-CSF por 5 días. Evaluamos el inmunometabolismo de MA cultivados con CM o EV y los HB con sondas fluorescentes y anticuerpo específico de perfil por citometría de flujo. Resultados: Observamos que solo los MA cultivados con CM-F aumentaron hasta 2 veces la producción de moléculas antiinflamatorias (CD163, CD206 y CD209; $P < 0.05$) y esto fue acompañado por un aumento de gotas lipídicas y genes relacionados al metabolismo lipídico ($P < 0.05$). Se obtuvieron resultados similares al cultivarlos con las EV aisladas y en los HB ex vivo ($P < 0.05$). Conclusión: Los perfiles metabólicos y fenotípicos obtenidos en MA en este modelo in vitro con EV se asemejan a los observados en los HB ex vivo, lo que sugiere la participación in vivo de EV en la modulación sexo-específica del metabolismo de los macrófagos maternos y fetales.

Vesículas extracelulares derivadas de una línea celular de glioblastoma modulan la activación de células T $\gamma\delta$.

Rosato M. (1,2); Saibene Velez PM. (1,2); Infante Cruz AP. (1); Rosso DA. (1); Keitelman IA. (1); Sabbione F. (1); Trevani AS. (1,3); Salamone GV.1,3; Jancic CC.1,3

(1) Instituto de Medicina Experimental – CONICET – Academia Nacional de Medicina, CABA. (2) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Biológica. CABA. (3) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. CABA.

Contacto: cjancic@gmail.com

Las células tumorales pueden modular su microambiente a través de diferentes métodos, tales como la expresión de ligandos, la secreción de factores solubles y la liberación de vesículas extracelulares (VE). Las VE liberadas pueden interactuar con células blanco, entre las cuales se encuentran las células inmunes, por medio de receptores de membrana, endocitosis o fusión de membranas, y así modular sus funciones. Las células T $\gamma\delta$ son linfocitos T no convencionales involucrados en la respuesta inmune innata, que pueden reconocer células tumorales y provocar su apoptosis. Dado a esta capacidad antitumoral de las células T $\gamma\delta$, en los últimos años se los han propuesto en protocolos para tratar patologías como el glioblastoma multiforme (GBM). El GBM es el tumor cerebral más agresivo en adultos y tiene una media de supervivencia menor a un año luego de su diagnóstico. En este trabajo se analizó la interacción y el efecto de VE derivadas de una línea celular de GBM sobre los linfocitos T $\gamma\delta$. Para ello, las células T $\gamma\delta$ de sangre periférica fueron purificadas usando perlas magnéticas anti-TCR $\gamma\delta$ y las VE se obtuvieron por centrifugación diferencial, a partir de medio condicionado de la línea celular U251. Por un lado, los linfocitos T purificados se incubaron overnight con las VE aisladas, y luego de la incubación se midió su activación a través de la expresión de CD69 por citometría de flujo. A su vez, las VE fueron teñidas con el colorante fluorescente PKH26 e incubadas con células T $\gamma\delta$, las cuales fueron previamente estimuladas o no con un agonista específico: el HMBPP. Posterior a esto, las células fueron analizadas por microscopía confocal. Se observó que las VE de U251 estimulan la expresión de CD69 ($p < 0.05$). Interesantemente, se vio una interacción física entre las células T $\gamma\delta$ y las VE de U251, y la misma es mayor cuando las células T se encuentran pre-activadas ($p < 0.0001$). De esta manera, los resultados sugieren que las VE derivadas de GBM son capaces de interactuar con células T $\gamma\delta$ y de modular su estado de activación.

Infección por T. cruzi: estudio de vesículas extracelulares en células de la inmunidad para el desarrollo de nuevas terapia y búsqueda de biomarcadores

Alvarado A., Principato M., Carbajales J., Pincini C

(1) IMPaM, UBA-CONICET (2) Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía, CABA

Contacto: Cvponcini@gmail.com

La persistencia de T. cruzi en los tejidos y la ausencia de daño previa a la aparición de síntomas durante la infección, sugieren la modulación de la respuesta inmune hacia un perfil incapaz de erradicar al patógeno. El estudio de los eventos tempranos tras la entrada de T. cruzi, permitió la identificación de mecanismos celulares potencialmente importantes para el diseño racional de terapias contra el parásito. En estudios recientes confirmamos que la interacción de tripomastigotes con células dendríticas (DCs) derivadas de médula ósea de ratón, favorece la liberación de vesículas extracelulares (EVs) por las DCs. La caracterización de su composición y su uso en ensayos de inmunización mostraron su potencial como terapia profiláctica en el modelo letal de la infección experimental. Resultados preliminares trabajando con células mononucleares de sangre periférica de donantes normales y de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad de Chagas demuestran que la presencia del parásito aumenta la liberación de EVs en cultivo, sin modificar significativamente su tamaño, de forma similar a lo observado en el modelo murino, por NTA. Sin embargo, hasta el momento los resultados fueron analizados en doble ciego. Incluir la variable de estadios de la enfermedad, podrá cambiar los resultados aquí presentados. Además, encontramos que métodos alternativos de centrifugación secuencial a alta velocidad, permiten una buena recuperación de EVs, siendo representativa de lo obtenido por ultracentrifugación. Esto permitirá agilizar el protocolo, de cara al uso de EVs en estudios de aplicación en laboratorios de análisis clínicos. Por lo tanto, proponemos que el estudio minucioso de tales EVs permitirá profundizar en la identificación de componentes relevantes para el diseño de nuevas formulaciones y/o tratamientos, así como de biomarcadores de enfermedad.

Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares de calostro de vacas infectadas con el virus de la leucosis bovina

Pérez, CP (1); Marchetti YC (1); Carignano H (1); Mongini C (1)

(1) INTA, Hurlingham, Buenos Aires

Contacto: mongini.claudia@inta.gob.ar

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus oncogénico que infecta persistentemente al ganado. El BLV infecta principalmente a los linfocitos B CD5+ e inserta aleatoriamente su genoma (provirus) en el genoma de la célula hospedadora. Una vez que el animal infectado desarrolla la respuesta inmune humoral y celular específica, las células infectadas son eliminadas masivamente por el sistema inmune. Esta actividad antiviral persiste a lo largo de toda la vida del animal, lo que indica que el sistema inmune está permanentemente estimulado por los antígenos del BLV. Una característica distintiva de la infección por BLV es la ausencia de expresión de proteínas virales en todos los estadios de la enfermedad, y la expresión viral in vivo se considera restringida a niveles extremadamente bajos. El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar las vesículas extracelulares (VEs) del calostro de vacas infectadas con BLV y determinar la presencia de proteínas virales. Las VEs fueron aisladas del calostro de vacas infectadas o no con BLV mediante un protocolo que combina un pre-tratamiento ácido con la ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Por microscopía electrónica de transmisión y análisis de seguimiento de nanopartículas se determinó una población heterogénea con un tamaño de 40-120 nm, con una morfología característica de VEs. Mediante citometría de flujo se evidenció la presencia de CD9 y CD63, marcadores de VEs y, utilizando anticuerpos IgY anti-BLV, determinamos la presencia de proteínas virales en las VEs provenientes de calostro de vacas BLV +. Desarrollamos una técnica para el aislamiento y la caracterización de VEs a partir de una muestra compleja, como el calostro bovino. La presencia de proteínas virales en las VEs aisladas podría tener relevancia en la inducción de una respuesta inmune antiviral en los terneros recién nacidos.

Medicina regenerativa - Comunicación oral presencial

Estudio de vesículas extracelulares provenientes de células mesenquimales equinas para su implementación en terapias regenerativas.

Vautier M (1); Mutto Adrian (2); Blüguermann C (3)

IIBIO UNSAM. GRAL SAN MARTIN, BUENOS AIRES

Contacto: cbluguermann@iib.unsam.edu.ar

Las lesiones musculoesqueléticas son el tipo de lesión más frecuente que sufren los animales de competencia. Dentro de las alternativas terapéuticas más novedosas se encuentra el uso de células madre mesenquimales (MSC). Estas células son multipotentes y de fácil obtención a partir de diversos tejidos adultos. Se considera que potencial terapéutico es el resultado de un efecto parácrino, el cual consiste en la liberación de diversas moléculas contenidas en pequeñas vesículas extracelulares, como los exosomas y las microvesículas. Los avances presentes hasta el momento han demostrado el potencial terapéutico de estas vesículas en diversas patologías en distintos modelos animales, pero dentro de la medicina veterinaria aún no existen trabajos que reporten protocolos estandarizados. Los resultados aquí presentados demuestran que fue posible purificar y caracterizar las vesículas a partir MSC equinas. Mediante TEM observamos vesículas de 50 a 200 nm, y detectamos mediante western blot los marcadores de superficie específicos TSG-101 y Anexina II. Se evaluó también la transferencia de vesículas a fibroblastos en cultivo in vitro en diferentes dosis (0,5, 2 y 5 µg/ml). Por último, realizamos ensayos funcionales in vitro con el fin de evaluar los efectos de su aplicación la capacidad migratoria de las células y en la proliferación celular. Nuestros resultados indican que las vesículas extracelulares aisladas de células mesenquimales son capaces de ser incorporadas por fibroblastos equinos y tendrían un efecto beneficioso en la migración y proliferación celular. Contar con una terapia libre de células basada en la aplicación de vesículas extracelulares presentaría importantes ventajas frente a otras alternativas terapéuticas desde el punto de vista de la logística de transporte y almacenamiento de las muestras, entre otros aspectos.

Aislamiento y caracterización de exosomas magnéticos derivados de células madre mesenquimales para su empleo en terapias regenerativas.

Soto, P. (1, 2); Rodríguez-Carrascal, D. (1,2); Usach, V. (1, 2); Falcón, J. M. (3); Setton, P. (1, 2)

(1) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Química Biológica. Cátedra de Química Biológica Patológica. Buenos Aires, Argentina. (2) Universidad de Buenos Aires. CONICET. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB). Buenos Aires, Argentina. (3) Exosomes Laboratory, CIC bioGUNE-BRTA, Derio, Spain
Contacto: setton@qb.ffyb.uba.ar

Las terapias biológicas con células madre mesenquimales son una de las herramientas más utilizadas en la medicina regenerativa. En los últimos años se ha propuesto que el mecanismo de acción por medio del cual las células madre (CM) ejercen sus efectos benéficos en términos regenerativos es mediante las vesículas extracelulares que se desprenden de sus membranas plasmáticas. Las más estudiadas son las vesículas generadas por la vía endolisosomal, denominadas exosomas (Ex). Estos portan entidades biológicamente activas y además tienen la ventaja de conservar la capacidad regenerativa de las células, pero nula inmunogenicidad. Es posible incorporar elementos de nuestro interés al Ex, como las nanopartículas magnéticas (NPM), a fin de potenciar su efecto natural y mejorar su eficiencia y selectividad. Las NPM de óxido de hierro (Fe₃O₄), conocidas por su alta biocompatibilidad y baja toxicidad, responden a campos magnéticos externos, permitiendo su direccionamiento hacia un tejido de interés, utilizando pequeños imanes. Objetivo: aislar y caracterizar Ex derivados de CM que contienen NPM -Ex magnéticos (ExM)-. Estos ExM combinarán la funcionalidad biológica de los Ex con la susceptibilidad magnética de las NPM, permitiendo su direccionamiento controlado hacia un sitio de interés. Los Ex fueron aislados a partir de medio condicionado de CM por ultracentrifugación e incubadas o no con NPM. Los Ex aislados se caracterizaron por western blot, microscopía electrónica, análisis de seguimiento de nanopartículas y magnetometría de muestra vibrante. Posteriormente, se realizaron pruebas de incorporación de Ex marcados en células SHSY-5Y. Los resultados obtenidos demuestran que los Ex aislados responden a la aplicación de un campo magnético externo y se internalizan en células neurales sin afectar la viabilidad de las mismas.

pEVs y sus efectos en la reparación tisular asociada a resolución de inflamación

Leicaj, ML (1); Adamczyk, AM (1); Fabiano, MP (1); Barchuck, M (2); Casale, R (3); Bannoud, N (4); Pérez, PS (1); Croci, D (4); Ostrowski, M (1).

(1) Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), (2) Hospital de Clínicas José de San Martín, (3) Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, (4) Instituto De Histología Y Embriología De Mendoza

Contacto: maostro@fmed.uba.ar

Las EVs de plasma (pEVs) cumplen funciones tanto en entornos patológicos como fisiológicos. Sin embargo, sus efectos fisiológicos sobre macrófagos, fibroblastos y células endoteliales han sido escasamente reportados, a pesar de desempeñar un papel fundamental en todas las fases de reparación tisular. En contextos inflamatorios, el aumento de la permeabilidad vascular permite, además de la transmigración celular, el paso de partículas nanométricas, incluyendo EVs. En este sentido, la interacción EVs-macrófagos es particularmente relevante. En heridas crónicas, los macrófagos "M1" persisten sin evolucionar a "M2", contribuyendo a la formación de úlceras crónicas, las cuales siguen representando un desafío en el área clínica. Recientemente demostramos que las pEVs juegan un papel relevante en el control de la inflamación, contrarrestando la activación de los macrófagos inducida por PAMPs, reduciendo la liberación de IL-6 y TNF y aumentando la secreción de IL-10, así como también observamos resultados que apuntan a un perfil pro-resolutivo, desencadenado en estas células al ser estimuladas con pEVs. Nos propusimos, por lo tanto, en el presente trabajo, ahondar en este perfil pro-resolutivo en macrófagos, así como también explorar el efecto de las pEVs en fibroblastos y células endoteliales; contribuyendo así a mejorar nuestra comprensión sobre las funciones de las mismas en estos tipos celulares y a sentar, potencialmente, las bases para futuras terapias regenerativas basadas en pEVs.

Diseminación de nuevas β -lactamasas de origen ambiental mediante vesículas de membrana externa

Gonzales Machuca, A. (1), Knecht, C. (1), Quiroga, María Paula (1) y Centrón D. (1)

(1) Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM), UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Contacto: dcentron@gmail.com

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una seria amenaza para la salud humana. La RAM tiene como origen al medioambiente, donde las bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar sustancias antimicrobianas. Entre estos mecanismos destacan las β -lactamasas, las cuales se han transferido del medioambiente a cepas clínicas mediante transferencia horizontal genética (THG). Las vesículas de membrana externa (VMEs) han sido descritas recientemente como un mecanismo THG de importancia ecológica, lo que subraya la importancia de su estudio como un mecanismo de propagación de RAM. Para investigar el papel de las VMEs en la diseminación de la RAM en el medioambiente, se realizó una campaña de recolección de bacterias en la Isla Grande de Tierra del Fuego. De esta campaña se aisló la cepa 9AL34 que resultó resistente a la ampicilina y sensible a otros β -lactámicos. El estudio de su genoma permitió identificar a la cepa como *Ewingella americana*. El análisis del resistoma reveló la presencia de dos genes codificantes de β -lactamasas y el análisis filogenético de sus secuencias determinó que no habían sido descritas anteriormente. Estos genes fueron denominados blaFONA-like y blaSDFC-like por su similitud con estas β -lactamasas de clase A y C, respectivamente. Posteriormente, se realizó la extracción y caracterización de las VMEs mediante ultracentrifugación, análisis de seguimiento de nanopartículas y microscopía electrónica de transmisión. Parte de las VMEs obtenidas fueron tratadas con DNasa I y tritón X y se realizó la extracción de ADN empleando fenol-cloroformo. Tanto las VMEs tratadas como no tratadas se usaron como molde de PCR, lo que permitió detectar los genes blaFONA-like, blaSDFC-like e int1 en su interior y asociadas a sus membranas, evidenciando la capacidad de transporte de estos elementos. Estos resultados destacan el potencial del medioambiente como reservorio de genes de resistencia y a las VMEs como mecanismo de THG de la RAM.

Efecto de vesículas extracelulares de *Porphyromonas gingivalis* en células trofoblásticas sobre la invasión bacteriana

Ailen Fretes, Brenda Lara, Claudia Pérez Leirós, Paula Tribelli, Vanesa Hauk

Universidad de Buenos Aires - CONICET. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Laboratorio de Inmunofarmacología. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: vchauk@gmail.com

La periodontitis es una de las enfermedades inflamatorias crónicas orales más frecuentes que afecta a mujeres embarazadas y se ha demostrado que se asocia a complicaciones de la gestación. El patógeno *Porphyromonas gingivalis* (Pg) juega un rol clave en esta enfermedad ya que libera vesículas de membrana externa (OMV) que contiene factores de virulencia. Aunque existe evidencia que las OMV influyen en la patogénesis de la periodontitis, al momento no se ha estudiado la interacción entre estas OMV y las células trofoblásticas (tb) ni los mecanismos subyacentes que afectan la invasión y la persistencia bacteriana. Además, se sabe que las bacterias responden a condiciones de estrés y que esto puede alterar la producción y composición de sus OMV pero no se ha investigado cómo estas condiciones afectan a Pg y su capacidad para interactuar con las células huésped, contribuyendo potencialmente a las complicaciones gestacionales. A partir de cultivos de Pg purificamos OMV mediante ultracentrifugación y las utilizamos para estimular células tb y realizar ensayos de invasión in vitro. Los resultados mostraron una mayor tasa de invasión bacteriana cuando las células fueron estimuladas previamente con OMV con respecto al control sin tratar. Además, se probó el efecto de agentes estresores como el H₂O₂ o GSNO en cultivos de Pg y se extrajeron las OMV. Se planean realizar los mismos ensayos bajo estas condiciones y observar si existe un comportamiento distinto al resultado previamente obtenido. Estos resultados demuestran que las OMV aumentarían la invasión de Pg en células trofoblásticas.

Infección por T.cruzi :estudio de vesículas extracelulares en células de la inmunidad para el desarrollo de nuevas terapias y búsqueda de biomarcadores

Alvarado Andres (1), Principato Justo Carabajales (2), Carolina Poncini (3)

(1)Instituto de investigaciones en microbiologia y parasitologia medica(IMPaM),UBA-CONICET,Facultad de medicina ,Universidad de Buenos Aires,CABA,ARGENTINA,(2)Hospital General de Agudos J.M.RAMOS MEJIA ,CABA,ARGENTINA,(3)Instituto de investigaciones en microbiologia y parasitologia medica(IMPaM),UBA-CONICET,Facultad de medicina ,Universidad de Buenos Aires,CABA,ARGENTINA
Contacto: cvponcini@gmail.com

La persistencia de T. cruzi en los tejidos y la ausencia de daño previa a la aparición de síntomas durante la infección, sugieren la modulación de la respuesta inmune hacia un perfil incapaz de erradicar al patógeno. El estudio de los eventos tempranos tras la entrada de T. cruzi, permitió la identificación de mecanismos celulares potencialmente importantes para el diseño racional de terapias contra el parásito. En estudios recientes confirmamos que la interacción de tripomastigotes con células dendríticas (DCs) derivadas de médula ósea de ratón, favorece la liberación de vesículas extracelulares (EVs) por las DCs. La caracterización de su composición y su uso en ensayos de inmunización mostraron su potencial como terapia profiláctica en el modelo letal de la infección experimental. Resultados preliminares trabajando con células mononucleares de sangre periférica de donantes normales y de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad de Chagas demuestran que la presencia del parásito aumenta la liberación de EVs en cultivo, sin modificar significativamente su tamaño, de forma similar a lo observado en el modelo murino, por NTA. Sin embargo, hasta el momento los resultados fueron analizados en doble ciego. Incluir la variable de estadios de la enfermedad, podrá cambiar los resultados aquí presentados. Además, encontramos que métodos alternativos de centrifugación secuencial a alta velocidad, permiten una buena recuperación de EVs, siendo representativa de lo obtenido por ultracentrifugación. Esto permitirá agilizar el protocolo, de cara al uso de EVs en estudios de aplicación en laboratorios de análisis clínicos. Por lo tanto, proponemos que el estudio minucioso de tales EVs permitirá profundizar en la identificación de componentes relevantes para el diseño de nuevas formulaciones y/o tratamientos, así como de biomarcadores de enfermedad.

Aislamiento de vesículas extracelulares de *Streptococcus mutans* a partir de biopelículas adheridas a colágeno

Camila Leiva-Sabadini (1), Christina Schuh (2), Pablo Berrios (1), Mario Vera (1), Sebastian Aguayo (1,3)

1 Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Instituto de Ingeniería Biológica y Médica 2 Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile. Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina.

3 Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Facultad de Odontología

Contacto: sebastian.aguayo@uc.cl

Durante los últimos años ha aumentado el estudio de vesículas extracelulares (VEs) de bacterias Gram positivas, ya que están involucradas en comunicación celular, susceptibilidad a fagos, desarrollo de biopelículas y pueden generar interacción con patógenos y células del huésped, ya que contienen proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, azúcares y factores de virulencia. *Streptococcus mutans* es el principal agente etiológico de la caries dental, una bacteria Gram positiva que utiliza azúcares provenientes de la dieta y de la saliva para su metabolismo. Este proceso genera ácidos que disminuyen el pH de la cavidad oral produciendo la desmineralización del esmalte dental, y así, desarrollo de la enfermedad. *S. mutans* tiene la capacidad de adherirse a superficies e interactuar con proteínas como colágeno presente en la cavidad oral. Estudios recientes han caracterizado las VEs de *S. mutans*, y se ha visto que existe diferencia en su composición proteica y tamaño dependiendo del pH del medio de crecimiento. Sin embargo, aún se desconoce si cambios a nivel del sustrato alteran la producción de VEs en biofilms de *S. mutans*. Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar si la variación de la superficie de colágeno en la cual *S. mutans* se adhiere genera cambios en las VEs. Para ello se realizaron cubiertas de colágeno tipo 1 y colágeno envejecido usando metilglioxal y sobre estos se generó una biopelícula de 24 h. de *S. mutans* para luego aislar las vesículas utilizando ultracentrifugación, se caracterizaron a través de análisis de nanopartícula, microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fuerza atómica y se cuantificó la concentración proteica total. Las VEs obtenidas de biofilm de *S. mutans* sobre colágeno y colágeno modificado con MGO fueron de menor tamaño y menor concentración que las VEs obtenidas de *S. mutans* en estado planctónico. Por lo tanto, la superficie en la cual la bacteria forma la biopelícula afecta en la producción de VEs.

Detección de EVs bacterianas mediante fluorimetría: correlación con el número de partículas/ml por NTA

Barnech, C. (1,2); Cerny, N. (1,2,3); Cucher, M. (2,3); Santana, M.E. (3); Malamud, F. (1); Coluccio Leskow, F. (1,2)*; Cimolai, M.C.*(1,4).

1. Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján. 2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) 3. Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas- Universidad de Buenos Aires) 4. Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires.

*Contribución equivalente.

Contacto: mccimolai@gmail.com

La correcta caracterización y cuantificación de EVs de cualquier tipo es aún hoy en día un tema de debate e investigación. Actualmente se recomienda la cuantificación del número de partículas/mL mediante métodos ortogonales, midiendo más de una propiedad de la muestra al mismo tiempo. Sin embargo, las determinaciones con tecnologías especializadas sólo suelen estar disponibles en los grandes centros de investigación, dificultando las determinaciones cotidianas para la normalización de experimentos. Por lo que es normalmente necesario contar con un método in-house sencillo, reproducible y confiable que permita calcular la cantidad de EVs necesaria para los ensayos. Con este objetivo nos propusimos evaluar la detección de EVs mediante espectrofluorimetría con sondas lipofílicas y comparar los resultados con la cuantificación por NTA (nano-tracking analysis). Se aislaron EVs de diferentes cepas bacterianas (*B. subtilis* 168, *B. subtilis* natto, *X. campestris*, *E. coli* BL23, entre otras n=24) mediante centrifugación diferencial, filtrados y ultracentrifugación. En paralelo se generaron liposomas sintéticos partiendo de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina) disueltos en el mismo buffer que las EVs. Luego, tanto los liposomas como las EVs fueron incubados con una sonda fluorescente durante 15 minutos a 37°C y se determinó la fluorescencia desarrollada en un lector de microplacas. Las curvas de calibración con liposomas resultaron lineales ($R^2 = 0.96-0.99$ reproducibles inter-ensayo) y se logró cuantificar las diferentes EVs, aún aquellas obtenidas a partir de pequeños volúmenes de cultivo bacteriano (25 ml). Las mismas muestras fueron analizadas mediante NTA para la determinación del número de partículas/mL y el potencial Z. Los datos de ambas determinaciones correlacionaron significativamente (Spearman; $r: 0,7623$; $p < 0,0001$) indicando que la cuantificación fluorimétrica resulta confiable para la normalización de la cantidad de EVs de forma rápida in house.

Efecto de la limitación de hierro en las vesículas extracelulares de *R. salmoninarum*

Macarena Echeverría-Bugueño (1,2) , Mauricio Herrera (3) , Rute Irgang (1,2) , Ruben Avendaño-Herrera (1,2,4)

(1) Universidad Andrés Bello, (2) INCAR, (3) Melissa Institute, (4) CIMARQ

Contacto: *mv.echeverriab@gmail.com*

La acuicultura es una de las principales fuentes de ingresos de Chile y ha aumentado exponencialmente a lo largo de los años. Este aumento de la producción va de la mano de la aparición de desafíos, siendo el número uno las enfermedades bacterianas en los peces, que son el producto más exportado. La primera infección bacteriana descrita en peces de cultivo en Chile fue la enfermedad renal bacteriana o BKD, causada por el patógeno *R. salmoninarum*. Este patógeno de crecimiento fastidioso genera la aparición de granulomas en el interior de los peces, principalmente a nivel renal, como principal signo clínico. Su estudio in vitro ha sido limitado a lo largo de los años, y aún existe información no declarada sobre su proceso infeccioso. A pocos años, se describió la producción de vesículas por *R. salmoninarum* y su relación con la citotoxicidad in vitro. Dado que las vesículas extracelulares son capaces de generar un efecto citotóxico, resulta de interés evaluar si existe relación con el factor externo más estudiado asociado a la virulencia: el hierro. En este trabajo hemos caracterizado las diferencias en la liberación, composición y virulencia de las vesículas extracelulares de *R. salmoninarum* producidas en condiciones limitantes y no limitantes de hierro.

Vesículas extracelulares de *Lactocaseibacillus casei* BL23 y su impacto en bacterias de importancia alimentaria

Cecilia L. D'Antoni (1,2,3), A. Paula Domínguez Rubio (1,2), Oscar E. Pérez (1,2), Gregor Fuhrmann (3)

(1) Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. (2) Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (IQUIBICEN), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina. (3) Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Department of Biology, Pharmaceutical Biology, Erlangen, Germany.

Contacto: oscarperez@qb.fcen.uba.ar

Los postbióticos se definen como un preparado de microorganismos inanimados o sus componentes que confieren un beneficio para la salud del huésped. Las vesículas de membrana (MVs) secretadas por probióticos son una generación emergente de postbióticos. El objetivo de este trabajo fue aislar, caracterizar las MVs de *Lactocaseibacillus casei* BL23 y evaluar su actividad antimicrobiana. Las MVs de *L. casei* se aislaron mediante dos protocolos: 1) Ultracentrifugación, y 2) Ultracentrifugación, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y una ultracentrifugación adicional. Las MVs se caracterizaron en cuanto a concentración de proteínas, concentración de partículas y tamaño mediante ensayo de ácido bicinconínico y análisis de rastro de nanopartículas (NTA). Se evaluó el efecto antimicrobiano de las MVs de *L. casei* frente a *Escherichia coli* DH5 α , *Staphylococcus epidermidis* DSM1798 y *L. casei* BL23. El crecimiento bacteriano se monitoreó por espectrofotometría UV-vis (λ 600nm). El contenido de proteínas en la fracción de SEC enriquecida en MVs fue de 271 \pm 89 μ g/ml. Las MVs manifestaron un tamaño hidrodinámico medio de 173 \pm 9 nm y una concentración de partículas de 2,5 \times 10¹¹ partículas/ml. Las MVs aisladas por ambos protocolos (5 \times 10¹¹ partículas/ml) inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *S. epidermidis*, aunque no el de *L. casei*. Sin embargo, las concentraciones más bajas de MVs (<1,25 \times 10¹¹ partículas/ml) estimularon el crecimiento de *E. coli* y *S. epidermidis*. Las MVs de *L. casei* a concentraciones mayores de 5 \times 10¹¹ partículas/ml, ejercieron una actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. epidermidis*. La complejidad de los efectos de las MVs a diferentes concentraciones queda por dilucidar. El efecto antimicrobiano de estos postbióticos contra bacterias gram-negativas y gram-positivas es prometedor para su aplicación en matrices alimentarias o en envases comestibles, disminuyendo la incidencia de enfermedades alimentarias, y en terapias como agentes antimicrobianos.

Las vesículas extracelulares median la transferencia de resistencia al metronidazol en Giardia lamblia

Luna Pizarro G (1), Laiolo J (1,2), Salas N (1), Quassollo G (1), Feliziani C (1), Rópolo AS (1), Touz MC (1)

(1)Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina; (2)Laboratorio de parasitología, Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina

Contacto: ctouz@immf.uncor.edu

La parasitosis intestinal conocida como giardiasis es causada por el protozooario parasito Giardia lamblia y representa una de las principales causas de diarrea y mal nutrición en infantes, especialmente en países en vías de desarrollo. Los medicamentos antiparasitarios más utilizados para tratar la giardiasis pertenecen a la familia de los 5-nitroimidazoles, siendo el metronidazol (MTZ) la primera elección. Sin embargo, el tratamiento con MTZ se asociada a elevadas tasas de fracaso terapéutico debido a múltiples factores como el no cumplimiento del régimen de administración, fallas del sistema inmunológico y/o presencia de cepas resistentes. Actualmente, las vesículas extracelulares (VEs) están siendo ampliamente estudiadas como mecanismo de comunicación entre células y su relación con la transferencia de resistencia antimicrobiana. En este trabajo nos enfocamos en estudiar la comunicación mediada por VEs tipo exosoma (EIVs - del inglés: exosome-like vesicles) como mecanismo capaz de transmitir la resistencia al MTZ en diferentes cepas de G. lamblia. Para esto, inicialmente caracterizamos las EIVs aisladas de cepas salvajes y resistentes a MTZ (generadas in vitro en el laboratorio por selección y subclonado) mediante análisis de seguimiento de nano partículas (NTA) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Para poder estudiar los eventos de internalización celular, marcamos las EIVs con la sonda fluorescente BODIPY-FL-C5-ceramida. Mediante ensayos de viabilidad celular basados en MTT, determinamos las concentraciones inhibitorias 50 (CI50) del MTZ. Además, estudiamos la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo e inmunofluorescencia (IFA). Y finalmente, analizamos la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de MTZ mediante ensayos de PCR cuantitativa y describimos las modificaciones postraduccionales de histonas usando anticuerpos específicos. Nuestros resultados muestran que la comunicación por EIVs en G. lamblia ocurre entre cepas salvajes y resistentes y que, más importante, tiene la capacidad de generar una rápida respuesta moduladora en las células receptoras. Las EIVs aisladas de cepas resistentes modifican la dinámica de las modificaciones postraduccionales de histonas de cepas salvajes receptoras, alterando la expresión de genes asociados al metabolismo del MTZ, lo que genera cambios en la respuesta al fármaco.

Interacción de las Vesículas de Membrana Externa de *Bordetella pertussis* con Células Inmunes y su Rol en la Infección

Alvarez Hayes, J.

CINDEFI - UNLP - CONICET

Contacto: jahayes@quimica.unlp.edu.ar

Bordetella pertussis (Bp), el agente etiológico de la tos convulsa, es un patógeno capaz de modular la respuesta inmune de macrófagos (M ϕ) y neutrófilos (PMN), lo que le permite sobrevivir dentro de estas células. Uno de los principales factores de virulencia involucrados en este proceso es la toxina adenilato ciclasa (CyaA). En el presente trabajo se estudió el rol de las vesículas de membrana externa (OMVs), liberadas espontáneamente por Bp, en la infección de M ϕ o PMN con este patógeno, poniendo especial atención en la CyaA transportada por estas vesículas. Mediante estudios de fagocitosis de Bp por ambos tipos de células inmunes previamente incubadas con OMVs, empleando microscopía de fluorescencia, observamos una disminución en la adhesión bacteriana. Esta disminución está relacionada con la competencia de las OMVs por los mismos receptores en la superficie celular en el caso de los PMN, y con una disminución de la expresión de receptores en la superficie celular mediada por la intoxicación con la toxina CyaA en ambos tipos celulares. Ensayos de RT-PCR en M ϕ y de producción de ROS en PMN demostraron que el transporte de CyaA mediado por OMVs induce una atenuación de la respuesta bactericida celular frente a la infección con Bp. Finalmente, mediante microscopía confocal y ensayos de resistencia a Polimixina B, confirmamos que la interacción de las células con las OMVs previo a la infección con la bacteria conduce a una disminución del tráfico bactericida de Bp y al consecuente aumento de la sobrevivencia intracelular, ambos procesos dependientes de la presencia de CyaA en las vesículas. En conjunto, los resultados descriptos señalan a las OMVs liberadas por Bp como un mecanismo alternativo y eficiente de transporte de la toxina CyaA al interior de las células inmunes del hospedador, lo que le permite a la bacteria escapar de la interacción con PMN y M ϕ , modular la respuesta defensiva y generar un entorno que favorece su persistencia dentro del hospedador.

Las vesículas extracelulares de bacterias probióticas tienen capacidad de adhesión a mucinas y células epiteliales intestinales

Domínguez Rubio Ana Paula, D'Antoni Cecilia, Piuri Mariana, Pérez Oscar Edgardo

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (IQUIBICEN), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: oscarperez@qb.fcen.uba.ar

Los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped”. Los mecanismos implicados en los beneficios de los probióticos no están completamente dilucidados y se han asociado, al menos en parte, a las vesículas extracelulares (EVs) que producen. En trabajos previos demostramos que las EVs de *Lactobacillus casei* BL23 contienen proteínas asociadas a su efecto probiótico y, a su vez, a la adhesión al moco, el cual reviste el epitelio gastrointestinal. Con el objetivo de evaluar la capacidad adhesiva de las EVs de *L. casei* BL23 en el tracto digestivo llevamos a cabo 2 ensayos: uno de adhesión a mucinas (principal componente estructural del moco) y otro a un modelo in vitro de barrera intestinal humana utilizando la línea celular Caco-2. Para ello, las bacterias se cultivaron durante 48 h en MRS y las EVs se aislaron mediante ultracentrifugación. Las EVs purificadas se marcaron con CFSE (ex498nm/em517nm). En ambos ensayos, las concentraciones de EVs/ml incubadas fueron: $1,6 \times 10^{12}$, $1,2 \times 10^{12}$, 8×10^{11} , 4×10^{11} y 0. Para el ensayo de adhesión a la mucina, se recubrió una placa ELISA con mucina tipo III de estómago porcino y se incubó con las diferentes concentraciones de EVs marcadas durante 2 h a 37°C. Después de lavados sucesivos, las EVs unidas a mucina fueron resuspendidas en PBS para medir la fluorescencia en un lector de placas. Por otro lado, a las células intestinales humanas diferenciadas (15 días), crecidas en una placa de 24 pocillos, se procedió como anteriormente. Las EVs de *L. casei* BL23 se adhirieron a la capa de mucina de forma dosis dependiente. El mismo efecto se observó en la capacidad de las EVs para unirse a la barrera de las células epiteliales intestinales (ANOVA de 2 factores; EVs y bloque, $n=3$, $P<0,05$). La adhesión de las EVs de *L. casei* BL23 a mucina y a las células epiteliales intestinales podría ser un primer paso relevante en la interacción con el humano para poder ejercer sus efectos beneficiosos.

Vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* reducen el flujo autofágico en las células trofoblásticas

Lara, Brenda (1); González Perez, Nicolás (1,2); Sassot, Matías (1); Fretes, Ailen (1); Pomillo, Carlos (1,2); Perez Leirós, Claudia (1); Hauk, Vanesa (1)

(1) Universidad de Buenos Aires - CONICET. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Buenos Aires, Argentina. (2) Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME- CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Contacto: vchauk@hotmail.com

Porphyromonas gingivalis (Pg), principal patógeno causante de periodontitis, libera vesículas de membrana externa (OMV) que intervienen en la interacción entre huésped y bacteria. Existe una asociación entre complicaciones gestacionales (CG) y enfermedad periodontal, sin embargo, los mecanismos implicados aún se desconocen. Durante la placentación, los bajos niveles de nutrientes y oxígeno se asocian a una inducción de la autofagia a fin de proveer energía a las células, contribuyendo a la homeostasis celular. En células trofoblásticas (Tb), la autofagia participa en el desarrollo y patogénesis de CG asociadas a insuficiencia placentaria. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de PgOMV sobre la función de las células Tb con foco en la regulación de la autofagia. Las OMV se aislaron de sobrenadantes de cultivo de Pg mediante ultracentrifugación, y se caracterizaron mediante DLS y TEM. En células Tb de primer trimestre humanas (línea HTR-8) estimuladas 24 h con PgOMV (1 µg/ml) se evaluó su capacidad invasiva y migratoria. Se evaluó por microscopía de fluorescencia distintos marcadores de flujo autofágico como LC3 y p62, y de lisosomas mediante el uso de la sonda fluorescente Lysotracker y los marcadores LAMP1-2. Los resultados muestran que el tratamiento con PgOMV disminuye la migración e invasión de células Tb. A su vez, el tratamiento inhibe el flujo autofágico, evidenciado por la falta de acumulación de vesículas LC3 y p62 positivas en presencia de Bafilomicina A1, inhibidor del mismo. Asimismo, el área lisosomal por célula fue menor en células tratadas con PgOMV respecto al control. Estos resultados son consistentes con un rol patogénico de PgOMV en el desarrollo de CG asociadas a infecciones periodontales.

Neurociencias - Comunicación oral presencial

Neuroprotective properties of extracellular vesicles in in vitro models of Parkinson's disease

Mercyleidi Diaz Reyes , Sabrina Gatti, Susana Delgado Ocaña, and Claudia Banchio

Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Lípidos, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET)

Contacto: *banchio@ibr-conicet.gov.ar*

Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative disease in the world. It is caused by death of dopaminergic neurons in the substantia nigra and characterized by the aggregation of the α -Synuclein protein in cytoplasmic inclusions called Lewy bodies, mitochondrial dysfunction, generation of reactive oxygen species and apoptosis. The present study aimed to establish "in vitro" models of Parkinson's disease. For this, SH-SY5Y neuroblastoma cells were transfected with plasmids designed to overexpress the wild type α -Synuclein or the mutant A53T (mutation of adenine by threonine in amino acid 53 that increases protein aggregation), or cells were treated with 6-hydroxydopamine, a drug that induces mitochondrial deficits and stimulates several pro-apoptosis molecular factors. To validate the models, survival and cellular death were analyzed and quantified by biochemical and morphological methods. Considering that there is no treatment, we have analyzed the effect of different molecules in the survival of neurons in the established models of Parkinson's disease

Efectos in vitro e in vivo de la administración intranasal de vesículas extracelulares cargadas con la glicoproteína de membrana neuronal M6a

María Victoria Bühler, Camila Attonaty, Marcela Brocco y Melisa Carolina Monteleone

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas IIBIO-Escuela de Bio y Nanotecnologías EByN-
Universidad Nacional de General San Martín UNSAM

Contacto: mmonteleone@iib.unsam.edu.ar

El estrés crónico contribuye a la etiología de diversas patologías, entre ellas la depresión. Debido a la heterogeneidad de los síntomas, los tratamientos existentes presentan niveles de remisión bajos y efectos secundarios indeseables. Por ello, se plantea como una estrategia alternativa la administración de vesículas extracelulares (VEs) conteniendo factores terapéuticos precargados in vitro. El estrés crónico afecta la arquitectura cerebral y reduce la expresión de genes como el de la glicoproteína M6a que contribuye a la plasticidad neuronal. Por esto, nos propusimos utilizar VEs provenientes de células HT22 cargadas con el plásmido de M6a para la administración intranasal de ratones expuestos a un estrés crónico. Así, evaluamos si se revierten algunos de los fenotipos conductuales y/o moleculares inducidos por el estrés. Primero estandarizamos el aislamiento de VEs de la línea HT22 por ultracentrifugación y su caracterización por Western blot, TEM y NTA. Evaluamos la estabilidad de las VEs al ser almacenadas a -80°C . Luego, cargamos de manera exógena las VEs con plásmidos codificantes para GFP o M6a-GFP. Finalmente administramos las VEs modificadas en ratones C57Bl/6J sometidos a un protocolo de estrés por restricción y evaluamos su comportamiento mediante las pruebas de preferencia por la sacarosa y nado forzado, su peso y la expresión de M6a en el hipocampo. Los análisis por NTA y TEM indicaron que las partículas obtenidas presentaron tamaños y morfología compatibles con VEs. El almacenamiento no redujo el número de partículas en la muestra. Por otro lado, resultados preliminares con los animales que recibieron el tratamiento con VEs cargadas sugieren diferencias en el peso y en la prueba de nado forzado en comparación con los tratados con PBS. Estamos trabajando para determinar cambios moleculares inducidos por las VEs. Estos resultados sugieren que la administración de VEs podría ser una alternativa terapéutica promisoriosa.

El rol de las EVs de plasma en los procesos de desmielinización y remielinización en un modelo animal de desmielinización inducido por cuprizona

Mattera, Vanesa (1); Occhiuzzi, Federico (1); Correale, Jorge (1,2); Pasquini, Juana (1)

(1)Departamento de Química Biológica e Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

(2) Departamento de Neurología, Fleni, CABA

Contacto: juanampasquini@gmail.com

No todo lo que brilla es oro: revelando el papel de las vesículas extracelulares del plasma en la desmielinización y remielinización En la Esclerosis Múltiple, el sistema inmunitario actúa sobre los oligodendrocitos maduros (OLm), dañando la mielina y generando un ambiente pro-inflamatorio con eventual neurodegeneración. La remielinización (Rem) es un ejemplo de reparación espontánea en el sistema nervioso central (SNC) adulto, donde nuevas vainas de mielina se forman alrededor de los axones desmielinizados (Dem). Las terapias actuales están enfocadas en reducir la inflamación, pero se sabe poco sobre fármacos que estimulen la Rem. En este sentido, la metformina (Met), un hipoglucemiante utilizado en diabetes tipo II, surge como un agente de Rem que actúa a través de la vía de señalización de AMPK, aumentando la bioenergética mitocondrial y activando los precursores de OL que dan lugar a los OLm. Las vesículas extracelulares (EVs) están presentes en los fluidos biológicos y participan en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Las EVs están involucradas en la comunicación intercelular, mediando la comunicación a largas distancias. Nuestro objetivo es descifrar el papel de las EVs de plasma circulante en la EM en el contexto de un modelo animal de Dem/Rem inducido por la cuprizona (CPZ). Se utilizaron ratas Wistar intoxicadas con CPZ y tratadas con Met, usando dos vías de administración: oral e intraperitoneal. Los datos obtenidos durante la Rem mostraron que en ambas vías, la Met reduce significativamente la astrogliosis y la microgliosis en el cuerpo calloso, concomitante a un mayor número de OLm en comparación con la condición de Rem espontánea sin Met. De esos animales se aislaron las EVs de plasma circulante para estudiar su efecto sobre los OL en cultivos primarios. Los resultados preliminares muestran que las EVs de todas las condiciones donde los animales recibieron CPZ, aunque hayan sido tratados con Met y mejore la remielinización, muestran un retraso en la maduración de los los OL, sugiriendo un papel de las EVs en la perpetuación y falla madurativa propia de la enfermedad.

Caracterización por nanoscopía sted de la topología de plp (proteína proteolipídica) en vesículas extracelulares

Guendulain, G.G.(1) ; Remedi, M.(1) ; Troncoso Irazola, I. (1) ; Cáceres, A.(1) ; Moyano, A.L. (1)

(1) Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas de Córdoba (IUCBC), Centro de Investigación en Medicina Traslacional "Severo Raúl Amuchástegui" (CIMETSA). G.V. al Instituto de Investigaciones Médicas de Córdoba (INIMEC), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Córdoba, Córdoba, Argentina.

Contacto: ana.moyano@iucbc.edu.ar

Las Vesículas Extracelulares (EVs) son nanopartículas lipídicas que están involucradas en la comunicación intercelular mediante la transferencia de distintos cargos moleculares. Las mismas están enriquecidas en proteínas transmembrana que participan en su biogénesis, la selección de cargos moleculares y en su internalización selectiva por célulasceptoras. Debido a que la topología de estas proteínas sería fundamental en sus funciones biológicas, su estudio resulta de gran interés para optimizar la especificidad de alternativas terapéuticas basadas en EVs. La proteína proteolipídica (PLP) es la proteína transmembrana más abundante en la mielina del sistema nervioso central (SNC) y ha sido identificada en EVs secretadas por distintos tipos celulares del SNC. A nivel celular, sus extremos N y C terminal se encuentran orientados hacia el citosol, y puede formar homo y heterodímeros. Sin embargo, su topología vesicular y su rol en la biología de las EVs del SNC es desconocida. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que PLP podría estar involucrada en efectos regenerativos mediados por EVs de células madre neurales humanas (hNSCs) en condiciones desmielinizantes. El objetivo de este trabajo es caracterizar mediante Nanoscopía de Depleción por Emisión Estimulada (STED) la topología a nivel celular y vesicular de PLP. El análisis topológico permitirá avanzar sobre su rol en los efectos regenerativos de EVs derivadas de hNSCs y constituirá un antecedente para mejorar la distribución funcional de nanopartículas con fines regenerativos.

Efecto de la inhibición de vías de síntesis de ceramidas en un modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer.

Bellotto M. 1,2, Bentivegna M.1,2, González Pérez N.1,2, Presa J. 1,2, Pomilio C. 1,2, Saravia F.1,2, Beauquis J. 1,2

(1) Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina. (2) Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA.

Contacto: *melinabellotto@gmail.com*

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia a nivel mundial. Entre las características más importantes de la enfermedad se encuentran el depósito intracerebral de β amiloide y ovillos intraneuronales de la proteína Tau. Hipotetizamos que las ceramidas, mediadores lipídicos inflamatorios, tienen un rol en la amplificación y la propagación del proceso neurodegenerativo y de la reactividad glial presentes en la EA través de la regulación de la producción de vesículas extracelulares. Se propuso como objetivo evaluar los efectos de la inhibición de dos vías de síntesis de ceramidas sobre el desarrollo de la patología en el modelo transgénico murino de EA PDAPPJ20. Se inhibió farmacológicamente la vía de síntesis de novo, mediada por la Serin-palmitoil transferasa (SPT), y la vía de síntesis mediada por la esfingomielinasa neutra 2 (nSMasa2), esta última involucrada en la síntesis de exosomas independiente de ESCRT. En los experimentos in vivo se trataron ratones hembra PDAPPJ20 de 8 meses con inhibidores de vía de síntesis de ceramidas Myriocin (inh. SPT; 0,3 mg/Kg) y GW4869 (Inh. nSMasa2; 1,25 mg/Kg) por vía i.p.. Los ratones tratados con Myr tendieron a exacerbar el fenotipo comportamental transgénico en las pruebas de Open Field y Barnes Maze. Se analizó el contenido de placas amiloides por tinción con Rojo Congo y se encontró que los ratones Myr tenían mayor cantidad de placas en la región del hilio ($p < 0,01$) y un mayor tamaño de placas en el stratum radiatum ($p < 0,01$) que los inyectados con vehículo. Los resultados del experimento con Myriocin indican que la inhibición de la vía de síntesis mediada por la SPT podría generar la aceleración de la progresión de la enfermedad, quedando pendiente la finalización de los experimentos con GW4869 y la realización de ensayos in vitro que permitan determinar el rol de las EVs en este modelo.

Otro - Póster

Efecto de la Temperatura de Almacenamiento del Medio Condicionado Sobre la Conservación de Vesículas Extracelulares Pequeñas Secretadas por Células Madre Mesenquimales

Santa Cruz, D.M.; Malvicini, R.; Yannarelli, G.G.; Pacienza N.A.

Laboratorio de Regulación Génica y Células Madre, IMeTTyB, Universidad Favaloro-CONICET, CABA
Contacto: npacienza@gmail.com

En los últimos años, estudiamos y caracterizamos las vesículas extracelulares pequeñas (EVs) derivadas de células madre mesenquimales (MSCs). Por eso, optimizamos un sistema de cultivo de MSCs, establecimos y caracterizamos un método cromatográfico de purificación de EVs a partir de medio condicionado (CM) y estandarizamos un ensayo funcional para determinar su actividad anti-inflamatoria. Luego, siendo la temperatura un parámetro determinante sobre la estabilidad de las vesículas, decidimos evaluar cuál es la mejor condición de almacenamiento del CM que permite preservar las características cuali-cuantitativas de las EVs. Para ello se colectó el CM derivado de MSCs de cordón umbilical (48 h) y se almacenó a +4°C o -20°C por 1, 7, 14 y 42 días (n=6). Para cada condición se midió, respecto al día 0 o control: la concentración y distribución de tamaño de partículas mediante NTA, la concentración de proteínas por el método de Bradford, y la presencia del marcador de EVs, CD63, mediante ELISA. La actividad anti-inflamatoria de los CMs se expuso por valoración de la capacidad de inhibición de la adquisición del fenotipo pro-inflamatorio de células RAW264.7 estimuladas con LPS (secreción de IL6 por ELISA). Observamos que el almacenamiento de los CMs a +4°C provoca una fuerte caída en la concentración y el tamaño de las EVs, especialmente en las primeras 24 h (reducción del 30% y 12% respectivamente, $p < 0,01$). Un efecto similar se obtuvo en la expresión de CD63, pero no se registraron variaciones en la concentración de proteínas. Interesantemente, solo los CMs almacenados a -20°C conservaron todos los parámetros evaluados y preservaron el efecto anti-inflamatorio respecto al día 0. En conclusión, el almacenamiento del CM a -20°C nos permite obtener vesículas de mejor calidad y en mayor cantidad que a +4°C. Estos resultados denotan la importancia de establecer un protocolo de trabajo controlado y estricto que asegure el mejor rendimiento y maximice el impacto terapéutico.

Rol de los exosomas de fibroblastos infectados por Trypanosoma cruzi en la diferenciación hacia miofibroblastos.

Poulakidas, S. , Pérez Brandán, C , Acuña, L , Parodi, C , Mesías, A

Instituto de Patología Experimental "Dr. Miguel Ángel Basombrío", CONICET - Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.

Contacto: andreacmesias@gmail.com

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y considerada por la OMS como una de las enfermedades tropicales desatendidas, es endémica de Latinoamérica y responsable de \square 12.000 muertes anuales. Presenta dos fases distintivas: aguda y crónica, esta última, puede evolucionar hacia la cardiopatía chagásica caracterizada por el debilitamiento de la musculatura cardíaca por reducción de la contractibilidad debido a la sobreproducción de matriz extracelular (ECM). Los fibroblastos (Fb) son células que forman parte del tejido conectivo en numerosos órganos y en el corazón, representan el tipo celular más abundante luego de los miocitos. Si bien su función más característica es su participación en la cicatrización de heridas, cada vez se valora más su rol en la inmunidad frente a agentes infecciosos. Estas células, durante el proceso natural de reparación de tejidos, se diferencian en miofibroblastos (mioFb) con elevada producción de ECM. La fibrosis representa la versión patológica de este fenómeno. Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares (EVs) de 30-150 nm de diámetro, producidos por todas las células, que actúan como mediadores de la comunicación intercelular. Así, el presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar los efectos de los exosomas producidos por Fb de la línea L929 infectados con parásitos de la cepa TCC de *T. cruzi*, en la diferenciación de Fb hacia mioFb, fenotipos altamente productores de ECM, para aproximarnos a la comprensión del rol de estas EVs en la patología fibrótica. Los exosomas se obtuvieron mediante ultracentrifugación del medio condicionado del cultivo celular, tanto de Fb infectados con *T. cruzi* (EXOSFb+Tc) como de Fb no infectados (EXOSFb). Brevemente, el medio condicionado se filtró, concentró empleando membranas de ultrafiltración, y se ultracentrifugó en un gradiente de iodixanol. Se aislaron las fracciones correspondientes a la densidad de los exosomas (1.1- 1.2 g/ml), y se confirmó su identidad por TEM y Western Blot. Posteriormente, los Fb L929 fueron estimulados con exosomas aislados (4 μ g/ml) durante 24 h y se evaluaron distintos marcadores de diferenciación celular. Luego, se evaluó si los exosomas modifican el porcentaje de células en apoptosis empleando como indicador la condensación de la cromatina (picnosis). Además, se evaluaron posibles cambios morfológicos hacia mioFb mediante SEM, y finalmente se evaluó si ocurrieron cambios en la proliferación celular de fibroblastos y en la producción de citoquinas. Nuestros resultados preliminares indican que los Fb tratados con EXOSFb+Tc presentaron menores porcentajes de picnosis respecto de los tratados con exosomas control (4.83% vs. 9.20%, respectivamente, $p \geq 0.05$). Esto sugiere una posible mayor diferenciación de los fibroblastos hacia miofibroblastos a partir del estímulo con EXOSFb+Tc, ya que en éstos últimos se reportó una menor susceptibilidad a la apoptosis. Mientras que, a nivel de la morfología, se observaron mayormente células de forma estrellada o fusiforme, típica de los Fb. Si bien aún no podemos concluir de manera definitiva si estos exosomas afectan la diferenciación de Fb, es interesante destacar que las diferencias observadas a nivel de la apoptosis podrían sugerir que estas vesículas transportan señales diferentes cuando provienen de células infectadas con *T. cruzi*. Es decir que, estas células podrían ser capaces de responder ante la infección produciendo un "mensaje" diferente. Esperamos, en un futuro cercano, profundizar en nuestra comprensión del efecto de los EXOSFb+Tc en la diferenciación de los Fb, mediante el análisis de otros parámetros relevantes, como las variaciones en la migración celular, en la producción de α -actina y en los niveles de síntesis de colágenos para así determinar el rol de los exosomas producidos por estas células en el desarrollo de la patología en la enfermedad de Chagas.

La infección por *Brucella* altera la composición y la funcionalidad de las vesículas extracelulares pequeñas liberadas por la placenta

Lucía Zavattieri (1), Victoria Aramburu (1), María Noé García (1), Daniel Grasso (1), Florencia Muñoz González (1), Pablo C Baldi (1), Natalia Szpilbarg (2), Mariana C Ferrero (1).

(1) Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), CONICET- Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; (2) Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO)- CONICET- Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: ferrerom@ffyb.uba.ar

Las vesículas extracelulares placentarias pequeñas (VEp) juegan un papel crucial en la inmunomodulación durante el embarazo. No obstante, se desconoce el efecto de las infecciones bacterianas en las características y funcionalidad de estas vesículas. *Brucella*, una bacteria zoonótica, es conocida por causar complicaciones gestacionales en animales y humanos. Este estudio evaluó los efectos de la infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* en la producción, composición y función de las VEp, utilizando explantos de placentas humanas a término infectados *ex vivo*. A las 18 horas post-infección, se recolectaron sobrenadantes de cultivo y las VEp fueron aisladas mediante ultracentrifugación. Las VEp se caracterizaron en número, diámetro hidrodinámico y potencial zeta mediante análisis por NTA. Se evaluó el efecto de las VEp en la respuesta inmune de células mononucleares de sangre periférica, estimuladas con diferentes concentraciones de VEp durante 24 horas. La producción de interleucina-6 (IL-6), IL-10 y TNF- α se cuantificó mediante ELISA. El análisis de NTA reveló un aumento significativo en el número de VEp provenientes de explantos infectados en comparación con el control (no infectado) ($p < 0.05$). Las VEp de explantos infectados presentaron un tamaño significativamente menor ($p < 0.0001$) y cambios en el potencial zeta que las del control. Tanto las VEp de placentas infectadas como las de control expresaron los marcadores CD63 y CD81, o ambos simultáneamente. Sin embargo, el número de VEp de placentas infectadas positivas para CD63 fue menor que las del control ($p < 0.05$). Las VEp control provocaron un aumento dosis-dependiente en la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α por las células mononucleares estimuladas, en comparación con las células no estimuladas con VEp ($p < 0.0001$). Por otro lado, las VEp de placentas infectadas con *B. abortus* indujeron incrementos significativos en IL-6 e IL-10, aunque menores a los observados con las control, y no provocaron aumentos en los niveles de TNF- α ($p < 0.05$). En contraste, las VEp de *B. melitensis* y *B. suis* solo indujeron un leve aumento en IL-6 a la dosis más alta probada ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran que la infección de la placenta por *Brucella* induce cambios en el tamaño y la composición de las VEp liberadas. Además, la infección modifica las propiedades inmunomoduladoras de las VEp, lo que impactaría en la comunicación entre la placenta y las células inmunes.

Reproducción - Póster

Vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* alteran la interacción de células trofoblásticas con células endoteliales afectando la remodelación vascular.

Matías Sassot, Brenda Lara, Daniel Papparini, Lara Castagnola, Ailén Fretes, Rosanna Ramhorst, Daiana Vota, Claudia Pérez Leirós, Vanesa Hauk.

Universidad de Buenos Aires - CONICET. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Laboratorio de Inmunofarmacología. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: vchauk@gmail.com

La periodontitis es un factor de riesgo para complicaciones gestacionales asociados a insuficiencia placentaria. Los mecanismos involucrados en dicha asociación no han sido aún elucidados. *Porphyromonas gingivalis* (Pg), principal patógeno que causa periodontitis, libera vesículas de membrana externa (Pg OMV) relevantes en la interacción huésped-patógeno. Durante la placentación, las células trofoblásticas (Tb) invaden el tejido decidual y arterias espiraladas para facilitar el flujo de oxígeno y nutrientes. Una transformación deficiente o incompleta de las arterias maternas e insuficiencia placentaria se asocia con patologías gestacionales. En este trabajo enfocamos el efecto de OMV de *P. gingivalis*, sobre la función endovascular de las células trofoblásticas. Las Pg OMV fueron aisladas por ultracentrifugación. El tratamiento de las células Tb con OMV-Pg produce un desequilibrio en el balance de expresión de mediadores angiogénicos respecto a las células control. A su vez, el medio condicionado de dichas células afecta la función de las células endoteliales con una reducción en su capacidad de migrar, un aumento en la adhesión de células inmunes y mayor producción de especies reactivas del oxígeno. A su vez, utilizando un modelo murino de gestación que fue tratado al día 6,5 de gestación con OMV-Pg encontramos que los sitios de implantación al día 8,5 presentan una disminución en la expresión de los marcadores angiogénicos VEGF-A y PIGF respecto a los sitios de las hembras control. En conjunto, los resultados respaldan un papel patogénico de las OMVs de Pg en las primeras etapas del embarazo y la placentación, a través de la disrupción de la contribución de las células trofoblásticas a la transformación vascular y al mantenimiento de la homeostasis placentaria.

Modulación de la migración de células endoteliales de macrovasculatura y microvasculatura placentaria por vesículas extracelulares de trofoblasto tratado con melatonina

Szpilbarg, N.(1); Reppetti, J.(1); Fernández, R.(1); Cabral, E.(1); Sar, J.(2), Damiano, A.(1,3); Martínez, N.(1)

(1) Laboratorio de Biología de la Reproducción, IFIBIO-Houssay (UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina; (2) Servicio de Obstetricia, Hospital Naval Cirujano Mayor Dr. Pedro Mallo, Ciudad de Buenos Aires, Argentina; (3) Cátedra de Biología Celular y Molecular. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: noraalicia.martinez@gmail.com

Las vesículas extracelulares (EVs) placentarias han sido reconocidas como mediadores de la comunicación materno-fetal desempeñando un rol en la regulación de la angiogénesis placentaria, proceso que contribuye al desarrollo adecuado de la macrovasculatura y la microvasculatura placentaria. El trofoblasto sintetiza melatonina y expresa sus receptores. La melatonina actúa de forma autocrina y paracrina en la placenta, y se ha asociado a la regulación de la angiogénesis en condiciones patológicas y fisiológicas. En este estudio investigamos si las EVs de trofoblasto tratado con melatonina o la propia melatonina modulan la migración celular de las células endoteliales placentarias. Se obtuvieron placentas de embarazos a término sanos (n=4) del Hospital Naval de la Ciudad de Buenos Aires (Res.110/22). Los explantos placentarios se cultivaron con y sin melatonina (1-20 μ M), y la viabilidad del tejido se evaluó mediante el ensayo MTT. Las EVs placentarias se obtuvieron mediante centrifugación diferencial, filtración y ultracentrifugación y se caracterizaron mediante DLS, NTA, microscopía electrónica de transmisión y western blot. Cultivos primarios de células endoteliales microvasculares placentarias humanas (hPMEC) y la línea celular de macrovasculatura EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) se cultivaron con y sin EVs placentarias o melatonina durante 24h. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT, y la migración celular se evaluó mediante ensayos de cicatrización de heridas. Los explantos placentarios y la viabilidad celular no se vieron alterados por las diferentes concentraciones de melatonina analizadas. Tanto la melatonina como las EVs de trofoblasto cultivadas con melatonina redujeron significativamente la migración de células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria. Este estudio demuestra que tanto las EVs de trofoblasto tratadas con melatonina como la propia melatonina modularían la migración de las células endoteliales placentarias.