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.