



I WORKSHOP ANUAL DEL GRUPO ARGENTINO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

**Libro de resúmenes
1ª Edición Compendiada**

Editores
**Rocío Corfield, Cecilia Luciana D'Antoni,
María Noé García, Daniel Grasso, Matias Ostrowski**

AUSPICIOS



UBA

Universidad de Buenos Aires

.UBAexactas 
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES

.UBA FARMACIA Y BIOQUÍMICA

VIGENIUS 
 **BIOTECH**

I Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares

Editores/ Editors

Rocío Corfield, Cecilia Luciana D'Antoni, María Noé García, Daniel Grasso, Matías Ostrowski

FECHA DE CATALOGACIÓN: Octubre 2023

ISBN electrónico/ electronic PDF): 978-631-00-1484-5
Compilación / Compilation

62 págs./pages 1ª Edición/ Octubre 2023

Comité organizador / Organizing committee

Dra. Rocío Corfield; Lic. Cecilia L. D'Antoni; Dra. Ana Paula Domínguez Rubio; Dra. María Noé García; Dr. Daniel Grasso; Dra. Daniela Papademetrio; Dr. Oscar E. Pérez; Dra. Mariana Piuri; Dr. Matias Ostrowski.

Contribuciones especiales/ Especial contributions

Vigenius Biotech S. A.

Moderadores de las sesiones

Dra. Ana Carolina Donadio
Universidad de Córdoba (CIBICI)

Dra. María Noé García
Universidad de Buenos Aires (FFyB)

Dra. Natalia de Miguel
Instituto Tecnológico de Chascomús
(IIB-INTECH)

Dra. Ana Paula Domínguez Rubio
Universidad de Buenos Aires (FCEN)

Dra. Daniela Papademetrio
Universidad de Buenos Aires (FFyB)

Dra. Mariana Piuri
Universidad de Buenos Aires (FCEN)

Dr. Matías Ostrowski
Universidad de Buenos Aires (INBIRS)

Dr. Daniel Grasso
Universidad de Buenos Aires (FFyB)

© Las opiniones, conceptos, tablas, gráficas, ilustraciones y fotografías, que hacen parte de cada uno de los capítulos, son responsabilidad exclusiva de los autores. Fotos de tapa / Cover pictures.
Distribución Gratuita/Free distribution

TIPO DE LIBRO: Electrónico
IDIOMA: Español
TIPO DE OBRA: Compilación
TIPO EDICIÓN: 1 Compendiada
TIPO PÚBLICO: Profesional / académico
FECHA de publicación: 10/2023

I Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares: libro de resúmenes/ Matias Ostrowski ... [et al.]; compilación de Rocío Corfield ... [et al.]; editado por Rocío Corfield ... [et al.]. - 1a ed compendiada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Matias Ostrowski, 2023.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-631-00-1484-5

ISBN 978-631-00-1484-5



PRÓLOGO

El campo de las vesículas extracelulares o EVs (por sus siglas en inglés) está experimentando un crecimiento exponencial en todo el mundo ya que plantea un cambio en el paradigma en la comunicación celular. En este sentido, numerosos investigadores/as de nuestro país se encuentran trabajando con las EVs pero aún de manera bastante aislada. Por este motivo, el Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares (GAVE) surge de la necesidad de reunir a todas aquellas personas que ya se encuentran trabajando con EVs o quieren comenzar a hacerlo y tengan el espíritu de compartir trabajos, experiencias, materiales, colaboraciones, conocimiento, etc.

El día 15 de septiembre de 2023, GAVE tuvo su primer encuentro en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. El evento contó con el apoyo y fue declarado oficialmente de interés por las Facultades de Ciencias Exactas y Naturales, y de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires. El objetivo principal de esta primera reunión fue consolidar las bases de este grupo para favorecer lazos entre los investigadores/as y así lograr consolidar un espacio de intercambio enriquecedor. La actividad se desarrolló en una jornada con tres sesiones de mini-orales, más una sesión de posters. Este libro surge como resultado de las discusiones generadas durante este Primer Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares.

Es importante destacar que se trató de una actividad no arancelada para favorecer la participación del mayor número de personas interesadas. En esta ocasión las Jornadas contaron con fondos de la Universidad de Buenos Aires, así como también tuvo el auspicio de Vigenius Biotech S. A. También contó con el valioso apoyo técnico y la colaboración del personal de la FCEN-UBA: Guido Rodríguez-Miguere, Leo Sayat, Omar Metallo, Daniel Gómez del IAFE, Mariana Delgado-personal de cero + infinito; y en las acreditaciones con Maximiliano A. Díaz (FFyB-UBA) y Julia Alonso Suarez (FCEN-UBA).

Participaron investigadores de diferentes provincias de Argentina. El lugar de realización fue el Aula 1403, del edificio 0+infinito de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Se presentaron un total de 48 trabajos, 21 de ellos fueron orales, 28 trabajos libres en formato póster, 2 charlas teórico-prácticas y una mesa redonda.

Agradecemos el trabajo del Comité organizador y de todas las personas que participaron, por su alto grado de compromiso, que permitió la realización de la primera reunión.

*Rocío Corfield, Cecilia Luciana D'Antoni, María Noé García,
Daniel Grasso, Matías Ostrowski
(editores, compiladores).*

Contenido

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| AUSPICIOS..... | 1 |
| PRÓLOGO..... | 3 |
| 1. SESIONES DE MINI-ORALES | 8 |
| 1.1. SESIÓN 1..... | 8 |
| 1.1.1. Aplicación de filtración de flujo tangencial y cromatografía de intercambio iónico para la purificación de vesículas extracelulares de sobrenadantes de cultivo | 8 |
| 1.1.2. Uso de microespectroscopía RAMAN en la caracterización de vesículas extracelulares producidas por la interacción célula tumoral tiroidea – fibroblastos..... | 9 |
| 1.1.3. Evaluación de la sensibilidad de un sustrato <i>SERS</i> para detección de vesículas extracelulares | 10 |
| 1.1.4. Desarrollo y validación de un método magnético de aislamiento de vesículas extracelulares urinarias para aplicación en patologías renales a nivel clínico: estado de avance | 11 |
| 1.1.5. Microvesículas portadoras de toxina Shiga Tipo 2 (MVS-STX2) como un nuevo biomarcador clínico para el diagnóstico rápido de pacientes con riesgo de desarrollar síndrome urémico hemolítico (SUH) | 12 |
| 1.1.6. miR-203 localizado en vesículas extracelulares media la comunicación entre la cresta neural y la placoda necesaria para la formación del ganglio trigémino | 13 |
| 1.1.7. Vesículas extracelulares y trastornos mentales | 14 |
| 1.2. SESIÓN 2..... | 15 |
| 1.2.1. Modulación de la señalización purinérgica de glóbulos rojos debido a incubación con vesículas extracelulares provenientes del cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i> y su efecto en la deformabilidad y adhesión al endotelio..... | 15 |
| 1.2.2. Caracterización de vesículas de membrana externa de aislamientos clínicos multirresistentes a antibióticos..... | 16 |
| 1.2.3. La morfología de los parásitos cestodos condiciona la secreción de vesículas extracelulares | 17 |
| 1.2.4. Metalo- β -lactamasas más allá de los límites de la célula bacteriana: transporte selectivo mediado por vesículas de membrana externa | 18 |
| 1.2.5. Potencial de las vesículas de membrana externa de <i>Brucella suis</i> Δ mapB como candidato vacunal contra la brucelosis | 19 |

| | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.2.6. | Vesículas extracelulares de plasma de individuos sanos modulan la respuesta inflamatoria aguda de neutrófilos | 200 |
| 1.2.7. | Vesículas de membrana externa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> alteran el metabolismo de las células trofoblásticas afectando tanto su funcionalidad como su interacción con células inmunes | 21 |
| 1.2.8. | Detección de AQP3 en EVs provenientes de plasma materno y sobrenadante de cultivo de explantos de placentas normales y preeclámpticas como posible biomarcador de la función placentaria | 22 |
| 1.2.9. | Microbiota, probióticos y postbióticos: rol de las vesículas extracelulares bacterianas ... | 23 |
| 1.3. | SESIÓN 3..... | 24 |
| 1.3.1. | Vesículas extracelulares de fibroblastos asociados al cáncer estimulados por compuestos dietarios desencadenan proliferación celular en células de cáncer de mama | 24 |
| 1.3.2. | El bloqueo de la degradación autofagosomal promueve la liberación de mediadores que incrementan la resistencia a Vemurafenib..... | 25 |
| 1.3.3. | Asociación del contenido total y en vesículas extracelulares de adenosín monofosfato cíclico en orina y la progresión de la poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) | 26 |
| 1.3.4. | El ayuno celular induce en células tumorales pancreáticas la liberación de <i>small</i> EVs capaces de inducir la vía autofágica..... | 27 |
| 1.3.5. | La quimioterapia condiciona la respuesta inmune antitumoral mediante la modulación del contenido de las vesículas extracelulares tumorales | 28 |
| 2. | SESIÓN DE PÓSTERS | 29 |
| 2.1. | Evaluación de las vesículas de membrana externa de <i>Brucella ovis</i> como antígeno vacunal contra la brucelosis ovina..... | 29 |
| 2.2. | Efecto de la comunicación entre macrófagos mediada por exosomas frente a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> | 30 |
| 2.3. | Leucemia linfática crónica: las EVs producidas por los linfocitos T CD4+ activan a las células B malignas y favorecen la resistencia a la droga terapéutica venetoclax | 31 |
| 2.4. | Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: delivery of therapeutics genes for liver cirrhosis | 32 |
| 2.5. | Cuantificación y caracterización de las vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas murinas activadas por la hormona tiroidea triiodotironina (T3)..... | 33 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Identificación de miRNAs expresados diferencialmente en niñas afectadas por el síndrome de Rett para ser utilizados como biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico de la severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad | 34 |
| 2.7. β -lactamasas OXAs: ubicación subcelular e incorporación en vesículas de membrana externa de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 35 |
| 2.8. Infección por <i>T. cruzi</i> : estudio de la respuesta inmune y desarrollo de nuevas terapias | 36 |
| 2.9. Neural stem cell-derived exosomes favour neuronal differentiation and plasticity under stress conditions..... | 37 |
| 2.10. Rol de las vesículas extracelulares pequeñas en la activación glial inducida por β amiloide y ácido palmítico, y su regulación por la síntesis de ceramidas | 37 |
| 2.11. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) produce vesículas con doble membrana en la fase estacionaria de crecimiento, que contienen DNA cromosómico y la proteína protectora del DNA Dps | 38 |
| 2.12. El reconocimiento específico de vesículas extracelulares por anticuerpos modula la función de las células inmunes de forma dependiente del receptor para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G..... | 39 |
| 2.13. Vesículas extracelulares provenientes de bacterias benéficas y patógenas modulan la virulencia de <i>Xanthomonas campestris</i> (XCC) en plantas..... | 40 |
| 2.14. Uso de vesículas extracelulares para aliviar los efectos del estrés crónico | 41 |
| 2.15. Proyecto de trabajo: implicancias terapéuticas de las vesículas extracelulares gliales en la enfermedad de Huntington..... | 42 |
| 2.16. La secreción de vesículas extracelulares varía a lo largo del ciclo de vida del parásito cestodo <i>Echinococcus multilocularis</i> | 43 |
| 2.17. Extracellular vesicles of first trimester trophoblast cell line induced antiinflammatory signals in HB cell and circulating monocytes: regulation of VIP/VPAC2 system | 44 |
| 2.18. Secreción de EVs por tripomastigotes sanguíneos de <i>Trypanosoma cruzi</i> como mecanismo de evasión del sistema inmune | 45 |
| 2.19. MicroRNAs de vesículas extracelulares plasmáticas como biomarcadores de fibrosis en pacientes con hepatitis C crónica | 46 |
| 2.20. Analysis of thyroid hormone effects on the release of extracellular vesicles and their role in chemotherapy response in breast cancer | 47 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.21. Transmisión de resistencia antimicrobiana mediante vesículas extracelulares tipo exosoma en <i>Giardia</i> | 48 |
| 2.22. Estudio de vesículas extracelulares como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer..... | 49 |
| 2.23. Estudio de vesículas extracelulares derivadas de células madre humanas como efectores biológicos de mecanismos regenerativos en condiciones desmielinizantes | 50 |
| 2.24. Puesta a punto del aislamiento de vesículas extracelulares a partir de materia fecal y plasma, para su estudio en la comunicación inter-reino en el marco de la enfermedad inflamatoria intestinal. | 51 |
| 2.25. Diseño de un ingrediente alimentario con probióticos para optimizar el efecto inmunomodulador de vesículas extracelulares producidas por <i>Lactocaseibacillus casei</i> BL23 | 52 |
| 2.26. Impacto de la infección por <i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella suis</i> Y <i>Brucella melitensis</i> en la respuesta inmune innata y la liberación de vesículas extracelulares por la placenta | 53 |
| 2.27. Vesículas extracelulares de plasma como agentes proangiogénicos y promotores de la reparación tisular | 54 |
| 2.28. Detección de biomarcadores de daño renal asociados con el síndrome urémico hemolítico (SUH) | 55 |
| Palabras finales: Perspectivas futuras del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares | 56 |
| Fotografías del evento | 59 |

1. SESIONES DE MINI-ORALES

1.1. SESIÓN 1

Coordinadoras: Ana Carolina Donadio, Maria Noé García

1.1.1. Aplicación de filtración de flujo tangencial y cromatografía de intercambio iónico para la purificación de vesículas extracelulares de sobrenadantes de cultivo

Paula S. Pérez¹, Maximiliano Sánchez Lamas², Nadia Bannoud³, Tomás Grosso^{4,5}, Sofía Masuelli³, Diego O. Croci³, Matías Ostrowski¹

¹Instituto de investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), CONICET- Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ²Securitas Biosciences, Montevideo, Uruguay. ³Laboratorio de Glicobiología y Biología Vascular, Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), CONICET-Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. ⁴Grupo de Investigaciones Básicas y Aplicadas en Inmunología y Bioactivos, INEDES, Universidad de Luján, Luján, Argentina. ⁵Unidad de Ensayos Clínicos, Fundación Huésped, Buenos Aires, Argentina. pausolperez@gmail.com

La purificación de vesículas extracelulares (VEs) de cultivos celulares se realiza usualmente mediante centrifugación diferencial (CD). Este método de referencia presenta grandes desventajas, como la imposibilidad de procesar grandes volúmenes, la baja pureza de las preparaciones, la necesidad de contar con una ultracentrífuga y la posible pérdida de integridad de las vesículas obtenidas. Frente a esto, es necesario evaluar nuevos métodos para la obtención de VEs a partir de sobrenadante.

En este trabajo, optimizamos la purificación de VEs de células HEK-293T mediante metodologías alternativas. Primero, evaluamos el reemplazo de las primeras etapas de centrifugación por una filtración en profundidad con tamaño de corte 0.22 y 0.45 μm . Luego, evaluamos la purificación de VEs mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y cromatografía de intercambio iónico (IEC). Para su caracterización, las VEs obtenidas se concentraron por centrifugación a 100000 g y se analizaron por western blot (WB) y por citometría de captura en beads de látex.

La clarificación por filtración profunda fue eficiente para obtener VEs. Sin embargo, la recuperación fue menor respecto a la CD, en especial con el filtro de 0.22 μm . La TFF con corte molecular de 300kDa permitió obtener VEs, detectadas por WB. En comparación con las VEs obtenidas por CD, se vio menor marca de CD81 y CD63, lo que indicaría un menor rendimiento. Sin embargo, se observó mayor marca de los marcadores citosólicos de VEs ALIX y HSP70, lo cual podría deberse a una mayor recuperación de VEs pequeñas. Finalmente, utilizando una columna de intercambio aniónico fuerte para la purificación de VEs, se observó que las VEs quedan adsorbidas a la matriz y eluyen a 30 mS de conductividad.

En conclusión, tanto la TFF como la IEC son metodologías adecuadas para purificar VEs de sobrenadante de cultivos celulares. Éstas ofrecen la ventaja de ser escalables, lo cual permite abordar el desarrollo de VEs como un producto biotecnológico.

1.1.2. Uso de microespectroscopía raman en la caracterización de vesículas extracelulares producidas por la interacción célula tumoral tiroidea – fibroblastos

Mónica Beatriz Gilardoni¹, Graciela Adriana Borioli², Danilo Guillermo Ceschin³, Esteban Druetta⁴, Gabriela Inés Lacconi⁴, María del Mar Montesinos¹, María Mónica Remedi¹, Claudia Gabriela Pellizas¹, Ana Carolina Donadio¹

¹Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, CIBICI-CONICET, Córdoba, Argentina. ²Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, CIQUIBIC-CONICET, Córdoba, Argentina. ³Centro de Investigación en Medicina Traslacional Severo Amuchástegui. Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas de Córdoba, Córdoba, Argentina. ⁴Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, INFIQC-CONICET, Córdoba, Argentina. E-mail: ana.carolina.donadio@unc.edu.ar

Los carcinomas son sociedades celulares complejas donde la interacción célula tumoral-estroma promueve la progresión tumoral. En este contexto, las vesículas extracelulares (VEs) están implicadas activamente en la comunicación intercelular.

Resultados previos del grupo muestran que la interacción célula tumoral tiroidea-fibroblastos (Fb) conduce a la producción de VEs comprometidas funcionalmente en la remodelación de la matriz extracelular. En el presente trabajo, se utilizó Microespectroscopía RAMAN (MC-RAMAN) para explorar las características bioquímicas de las VEs secretadas y así dilucidar el impacto de la interacción tumor—estroma en el fenotipo y funciones biológicas de las VEs producidas.

Células tumorales tiroideas (TPC-1) o células no-tumorales tiroideas (NThyOri) fueron co-cultivadas con Fb normales como una simulación del microambiente tumoral tiroideo (MT). VEs obtenidas por ultracentrifugación de los sobrenadantes de cultivo producidos por células tiroideas aisladas y/o co-cultivadas se caracterizaron por MC-RAMAN y los espectros obtenidos fueron comparados a fin de distinguir patrones bioquímicos específicos. Se observaron diferencias entre VEs producidas por células TPC-1 aisladas y co-cultivadas. Picos espectrales en el rango 1000–1550 cm⁻¹, compatibles con la señal de carotenoides, y en el rango 2150-2700 cm⁻¹ (grupos C≡C, C≡N, S-H) se evidenciaron en VEs obtenidas de células TPC-1, estando ausentes en VEs secretadas en el contexto Fb-TPC-1. Un grupo de picos en el rango espectral 2800-3000 cm⁻¹, influenciado por moléculas lipídicas, sólo fue evidente en VEs derivadas de células TPC-1 co-cultivadas. No se detectaron diferencias espectrales significativas en VEs obtenidas de células NThyOri aisladas y co-cultivadas.

Estos hallazgos sugieren un rol importante de los Fb en el fenotipo de VEs obtenidas de células tumorales tiroideas y presentan una estrategia alternativa para estudiar el rol del MT y su participación en la progresión tumoral tiroidea.

1.1.3. Evaluación de la sensibilidad de un sustrato sers para detección de vesículas extracelulares

Etcheverry María Eugenia^{1,2}, Garavaglia Leopoldo^{1,2}, Arce Valeria B.^{1,2}, Rabassa Martin E³ y Schinca Daniel^{1,4}

¹Centro de Investigaciones Ópticas, (CIOP), P.O. Box 3 C. P.1897, Gonnet, La Plata, Argentina. ²Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata (UNLP), La Plata, Argentina. ³Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Buenos Aires 1900, Argentina. ⁴Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Plata (UNLP), La Plata, Argentina. mariaeugenia@ciop.unlp.edu.ar

Existe una urgente necesidad en desarrollar tecnologías para detectar presencia tumoral en estadíos tempranos, previo al desarrollo de los síntomas clínicamente observables. En los últimos años los biosensores ópticos basados en nanomateriales han sido extensamente investigados como herramientas sensibles y rápidas para la detección de vesículas extracelulares (EVs). Los tumores malignos son capaces de liberar activamente al medio EVs de diversos orígenes acumulando cantidades crecientes en circulación a medida que avanza la enfermedad maligna. Las EVs también han sido relacionadas con la capacidad de metástasis de los tumores. Diversos trabajos, sugieren que podrían ser utilizadas como biomarcadores en pacientes con cáncer, siendo de particular importancia las moléculas asociadas a procesos de inmunomodulación y aquellas asociadas a los mecanismos de reconocimiento/adhesión y metástasis. En este trabajo se evalúa mediante la espectroscopía SERS (Surface-enhanced Raman Scattering), la sensibilidad de un sustrato para la detección de EVs de origen tumoral usando distintas concentraciones de la misma. Para lo cual, se aislaron EVs de pequeño tamaño (exosomas) provenientes del medio de cultivo condicionado de la línea de adenocarcinoma de mama MCF7 y se combinaron con nanoplatos triangulares de plata con plasmón en 800 nm, sobre una superficie de aluminio. Se obtuvieron distintas bandas SERS de MCF7 que comparando con la bibliografía existente representan resultados consistentes. Estos resultados preliminares son motivadores para seguir trabajando en los factores potenciales que afectan los resultados experimentales.

1.1.4. Desarrollo y validación de un método magnético de aislamiento de vesículas extracelulares urinarias para aplicación en patologías renales a nivel clínico: estado de avance

Juan M. Minoia¹, Vanesa Torbidoni², Marcelo Vasquez Mansilla³, Roberto Zysler³, María Lucía Rosenberg⁴, Pablo Azurmendi⁴, Elizabeth Oddo⁴, Mariana Raineri³, Roxana Peroni^{1,5}

¹Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ²Instituto Argentino de Veterinaria, Ambiente y Salud (IAVAS), Universidad Juan Agustín Maza (UMaza). ³Instituto de Nanociencia y Nanotecnología (INN, CNEA-CONICET), Bariloche, Río Negro. ⁴Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM, UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ⁵Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. rperoni@ffyb.uba.ar

Nuestro objetivo es desarrollar y validar una tecnología de separación y concentración de vesículas extracelulares (EVs) basada en su reconocimiento por parte de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un aptámero de ADN con capacidad de unión a la tetraspanina CD63. Resultados: Sintetizamos nanopartículas de Fe₂O₃ (NPMs) por coprecipitación a altas temperaturas en presencia de carboximetilcelulosa (CMC) para obtener grupos carboxilos, necesarios para la unión posterior al grupo NH₂- del aptámero. Características de las NPM-CMCs obtenidas: 26,14 ± 3,10 nm (TEM); superparamagnéticas y redispersables (magnetización en función del campo); 59,66 emu/g (magnetización de saturación); presencia de pico característico de la unión Fe-O a 552 cm⁻¹, de picos correspondientes a los grupos funcionales de la CMC y de grupos COOH (técnica de cambio de potencial Z en KNO₃ 10 mM a distintos pH); pérdida de carga negativa y consecuente aumento del diámetro hidrodinámico frente a concentraciones crecientes de dadores de grupo amino. Mediante inmunofluorescencia observamos que el aptámero CD63 (aptCD63), mas no uno de secuencia aleatoria (aptScr), reconoció las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que expresan CD63 (1:1000; 16 h a 4°C). Mediante un método de precipitación modificado diseñado por nuestro grupo, obtuvimos EVs urinarias de origen humano que fueron analizadas por TEM, por DLS y por citometría de flujo con anti-CD63. En todos los casos se observa la presencia de vesículas de morfología compatible con EVs de 30-140 nm de diámetro y con un 60% de positividad para CD63. A su vez, incubamos EVs con diluciones de aptámero por 16 h a 4°C y observamos por citometría de flujo una población de EVs urinarias positiva para la marca con aptCD63 significativamente superior a la que aparece cuando las EVs son incubadas con aptScr (1:100 y 1:1000). Conclusiones: Logramos funcionalizar las NPMs con grupos carboxilo con capacidad de unión al grupo amino del aptCD63, el cual a su vez, reconoció de manera selectiva y sensible su blanco en células y en EVs urinarios de 30 a 140 nm. Esperamos avanzar hacia la funcionalización de las NMP-CMCs con aptCD63 y evaluar su capacidad de aislamiento de EVs urinarias por el método magnético. Esta tecnología sería aplicable a otras matrices biológicas.

1.1.5. Microvesículas portadoras de toxina Shiga tipo 2 (mvs-stx2) como un nuevo biomarcador clínico para el diagnóstico rápido de pacientes con riesgo de desarrollar síndrome urémico hemolítico (SUH)

Fernando Gómez^{1,2}, Flavia Sacerdoti^{1,2}, Daniel Girón Reyes^{1,2}, Carla Pascuale³, Tomás Lombardo⁴, Roxane Maria Fontes Piazza⁵, Laura Alconcher⁶, María Marta Amaral^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Laboratorio de Fisiopatología, Buenos Aires, Argentina. ²CONICET – Universidad de Buenos Aires. Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO Houssay), Buenos Aires, Argentina. ³Fundación Instituto Leloir. ⁴Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU). ⁵Laboratorio de Bacteriología, Instituto Butantan. ⁶Hospital Interzonal Dr. José Penna. gomezfernandod@gmail.com

En Argentina, el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) causado por la infección por *Escherichia coli* (STEC) productora de toxina Shiga (Stx-HUS) es una enfermedad endémica y una de las causas más comunes de injuria renal aguda en niños. Hasta el presente, el diagnóstico de SUH se realiza a partir de la clínica del paciente (diarrea sanguinolenta, vómitos, fiebre) y se confirma por la identificación de Stx y/o STEC en materia fecal. Sin embargo, el diagnóstico llega cuando el paciente superó la fase diarreica la cual puede resolverse espontáneamente o evolucionar a los distintos grados de severidad del SUH. Las concentraciones de Stx en la sangre de los pacientes infectados con STEC son prácticamente indetectables debido a que la toxina circula principalmente unida a células sanguíneas y microvesículas (MVs). MVs derivadas de plaquetas y leucocitos se han detectado en el plasma de pacientes con STEC-HUS. El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de Stx2 en MVs (MVs-Stx2) a partir de muestras de sangre de dos pacientes pediátricos que fueron admitidos en el Hospital Prof. Alejandro Posadas con diarrea sanguinolenta. Dos días después de la admisión, se obtuvieron muestras de sangre de estos pacientes (P1 y P2) y se ultracentrifugaron secuencialmente para obtener una suspensión enriquecida en MVs. Además, se reclutaron cinco controles sanos de la misma edad. Luego, las MVs se marcaron con Anexina V-FITC y las MV-Stx2 se detectaron mediante un anticuerpo monoclonal anti-Stx2 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647. Finalmente, las MVs se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como porcentaje de MVs-Stx2 positivas. A partir de los controles se estableció un punto de corte para MVs-Stx2 positivas. Ambos pacientes exhibieron un porcentaje significativamente mayor de MVs-Stx2 en circulación respecto a los controles (P1: 3,63 %, P2: 5,20 %, vs. 1,02-1,90 %, n = 5 p<0,05). La detección de MVs-Stx2 circulantes en pacientes infectados con STEC podría ser útil para la identificación temprana de pacientes con alto riesgo de desarrollar SUH.

1.1.6. miR-203 localizado en vesículas extracelulares media la comunicación entre la cresta neural y la placoda necesaria para la formación del ganglio trigémino

Yanel E Bernardi^{1,2}, Estefania Sanchez-Vasquez^{1,2}, Michael L. Piacentino³, Izadora Rossi⁴, Karina Lidianne Alcântara Saraiva⁵, Antonio Pereira-Neves⁶, Marcel Ivan Ramirez⁴, Marianne E. Bronner³, Natalia de Miguel^{7,2}, Pablo H. Strobl-Mazzulla^{1,2*}

¹Laboratorio de Biología del desarrollo. Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH), CONICET-UNSAM, Chascomús, ARGENTINA. ²Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM). Chascomús, ARGENTINA. ³Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA. ⁴Laboratorio de biología molecular e sistemática de tripanosomatídeos. Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Parana, Brazil. ⁵Núcleo de Plataformas Tecnológicas, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Pernambuco, BRAZIL. ⁶Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Pernambuco, BRAZIL. ⁷Laboratorio de Parásitos Anaerobios, Instituto Tecnológico Chascomús (INTECH), CONICET-UNSAM, Chascomús, ARGENTINA. strobl@intech.gov.ar

Aunque las interacciones entre la cresta neural y las células de la placoda son fundamentales para la correcta formación del ganglio trigémino, los mecanismos subyacentes a este proceso siguen sin estar bien caracterizados. Aquí demostramos que miR-203, cuya represión epigenética es necesaria para la migración de la cresta neural, se reactiva en las células ganglionares del trigémino que se fusionan y condensan. La sobreexpresión de miR-203 induce la coalescencia ectópica de las células de la cresta neural y aumenta el tamaño del ganglio. Recíprocamente, la pérdida de la función de miR-203 en las células de la placoda, pero no en las de la cresta neural, afecta la condensación del ganglio. Hemos demostrado la comunicación intercelular a través de la sobreexpresión de miR-203 en la cresta neural in vitro o in vivo que reprime un sensor que responde al miR en las células de la placoda. Además, las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por la cresta neural, visualizadas mediante la expresión del vector pHluorin-CD63, se incorporan al citoplasma de las células de la placoda. Por último, el análisis RT-PCR muestra que las pequeñas EV aisladas de los ganglios en condensación se cargan selectivamente con miR-203. En conjunto, nuestros hallazgos revelan un papel crítico in vivo de la comunicación cresta neural-placoda mediada por las EVs y su carga selectiva del microARN para la correcta formación del ganglio trigémino.

1.1.7. Vesículas extracelulares y trastornos mentales

Melisa C. Monteleone, Giuliana Torchiana, Catalina Logan, Ma. Victoria Buhler, Ma. Victoria Rodríguez Sbordi, Mateo Barbieri, Marcela A. Brocco

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) – CONICET. Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN-UNSAM) mbrocco@iib.unsam.edu.ar

Nuestro grupo trabaja desde hace veinte años en el estudio de las moléculas implicadas en el estrés. Usando distintos modelos de estrés (prenatal en rata, prenatal variable en ratones, crónico en ratones adultos) encontramos que los niveles de M6a siempre se modifican respecto a los valores control. Para evaluarla como un posible marcador de estrés, cuantificamos M6a en suero donde también se modula por efecto del estrés. M6a participa de la formación de espinas dendríticas y sinapsis. Dado que M6a es una proteína de membrana neuronal demostramos que, en fluidos periféricos como suero y saliva, M6a circula acoplada a vesículas extracelulares (VEs). Por otro lado, mediante electroporación in utero, mostramos que parte de la M6a sérica proviene del cerebro. También mostramos que las VEs con M6a son capaces de inducir cambios fenotípicos en células receptoras, indicando que pueden transferir contenido funcional. Para evaluar esto in vivo, aislamos VEs de animales estresados y control y las administramos vía intranasal a animales sin tratamiento previo (naive). Luego de 24h, encontramos aumento en el tiempo de inmovilidad (prueba de nado forzado) y disminución en los niveles de M6a en el cerebro de los animales que recibieron las VEs derivadas de los ratones estresados. Esto indica que las VEs pueden actuar como *carriers* naturales transportando moléculas capaces de alterar el comportamiento y la expresión proteica. Para conocer el repertorio proteico de las VEs de animales estresados, realizamos una proteómica de las VEs séricas y encontramos proteínas de cerebro y proteínas asociadas con varios trastornos mentales. Finalmente, se comentarán los ensayos para evaluar la capacidad terapéutica de las VEs, mediante la manipulación del contenido de las mismas. Presentamos aquí evidencias in vitro e in vivo de VEs que, por su contenido relacionado con el sistema nervioso, podría utilizarse como tratamiento alternativo a los trastornos mentales inducidos por el estrés.

1.2. SESIÓN 2

Coordinadores: Mariana Piuri, Matias Ostrowski

1.2.1. Modulación de la señalización purinérgica de glóbulos rojos debido a incubación con vesículas extracelulares provenientes del cultivo de *Plasmodium falciparum* y su efecto en la deformabilidad y adhesión al endotelio

Cora Lilia Alvarez^{1,2}

¹Instituto de Química y Físico-Química Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini", Universidad de Buenos Aires (UBA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, C1113AAD Buenos Aires, Argentina. ²Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, C1428EGA, Buenos Aires, Argentina. alvarezcora@gmail.com, cora@qb.ffyb.uba.ar

Los glóbulos rojos (GR) liberan ATP al medio extracelular (ATPe), el cual actúa como ligando de receptores P en las células endoteliales del vaso causando vasodilatación. La acumulación de ATPe dependerá no sólo de la liberación sino también del metabolismo extracelular del ATP. Ese balance parece estar alterado en malaria.

La malaria es una enfermedad causada por parásitos, siendo *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* las especies más peligrosas. La infección por *P. falciparum* produce importantes modificaciones bioquímicas, celulares y reológicas en los GR infectados (GRi) y, debido a su adhesión al endotelio vascular causan obstrucción de los vasos. Las fallas circulatorias y la anemia son las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad. El aporte de los GR no infectados (GRni) ha sido poco estudiado siendo que su contribución a la anemia es significativa. Por otro lado, la presencia de *P. falciparum* en el interior de los GR induce la formación de vesículas extracelulares (VEs). Los resultados previos obtenidos con GRi (Alvarez y col., 2014) y con GRni (Alvarez y col., 2022), sugieren que las VEs podrían explicar la activación de la salida de ATP y la mayor actividad ectoATPasa tanto de GRi como de GRni.

En este proyecto, proponemos incubar VEs, aisladas del sobrenadante de cultivo de GRi por *P. falciparum*, con GR que nunca estuvieron en contacto con parásitos y células endoteliales. Posteriormente analizar: i) la capacidad de modular la regulación de ATP del GR y ii) las alteraciones en su capacidad para circular por el torrente sanguíneo (mayor adhesión al endotelio o retención en el bazo).

El objetivo general del proyecto es estudiar las modificaciones de la señalización purinérgica de GR debido a incubación con VEs provenientes del cultivo de GRi por *P. falciparum*, con consecuencias sobre la integridad de la membrana celular, la deformabilidad y la adhesión al endotelio de los GR. Entender estos fenómenos asociados a la señalización purinérgica en malaria contribuirá a la comprensión de ésta y otras patologías que afectan el sistema vascular.

1.2.2. Caracterización de vesículas de membrana externa de aislamientos clínicos multirresistentes a antibióticos

Carrera Páez LC*, Gonzales Machuca A, Knecht C, Carpio Díaz E, Álvarez VE, Piekar María, Gambino AS, Quiroga MP, Centrón D.

Laboratorio de Investigaciones en Mecanismos de Resistencia a Antibióticos, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. [*laurapaez2131@gmail.com](mailto:laurapaez2131@gmail.com)

Las vesículas de membrana externa (VMEs) son vehículos capaces de albergar genes y proteínas asociados a resistencia a los antimicrobianos. Nuestro objetivo fue investigar la presencia de genes asociados a resistencia antibiótica (GRA) en las VME de algunos aislados clínicos multirresistentes y a su vez describir el contenido proteico de estas VMEs. Los aislamientos escogidos fueron: i) *Serratia marcescens* SM938 pDCASG6-NDM que alberga los genes *int11* y *bla_{NDM-1}*, ii) *Klebsiella pneumoniae* HA31kp que alberga los genes *int11* y *bla_{NDM-5}*, iii) *Pseudomonas aeruginosa* PAE 981 que alberga los genes *int11* y *bla_{VIM-2}*, iv) *Escherichia coli* SM5 que alberga el gen *bla_{CTX-M-15}* y v) *Escherichia coli* M19736 que alberga el gen *mcr-1*. En principio las vesículas fueron separadas del cultivo por centrifugación y filtración. Posteriormente las vesículas fueron obtenidas por ultra centrifugación del sobrenadante libre de bacterias. La cuantificación global de proteínas obtenidas fue hecha con el kit microBCA, posteriormente fueron estudiadas usando NTA o DSL para determinar el rango de tamaños y luego se obtuvieron imágenes de vesículas individuales usando TEM. Finalmente, el contenido proteico fue analizado por LC-MS-MS. Los resultados de DSL y NTA mostraron un tamaño de ~270 nm para *S. marcescens* SM938 y *K. pneumoniae* HA31kp, ~180 nm para *P. aeruginosa* PAE 981 y *E. coli* M19736 y 117 nm para *E. coli* SM5. Los resultados de DSL y NTA son correlativos con las imágenes obtenidas con TEM. Por último, mediante PCR buscamos GRA. Los ensayos de PCR nos permitieron detectar en el ADN de VMEs de HA31kp los genes *int11* y *bla_{NDM-5}*, de SM5 el gen *bla_{CTX-M-15}* y en VMEs de M19736 el gen *mcr-1*. El estudio de proteómica de las VMEs de *E. coli* M19736 nos permitió encontrar 388 proteínas y entre las cuales se encontraba la proteína MCR-1. El presente estudio pone de manifiesto la producción de VME portadores de GRA con potencial para diseminarse a otras cepas susceptibles dentro del nicho nosocomial.

1.2.3. La morfología de los parásitos cestodos condiciona la secreción de vesículas extracelulares

María Eugenia Ancarola^{1,2}, Laura Kamenetzky³, Marcela A. Cucher^{1,2}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ²Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ³Laboratorio de Genómica y Bioinformática de Patógenos, iB3 | Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional, Departamento de Fisiología Y Biología Molecular Y Celular, Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. marcecucher@gmail.com

Los parásitos helmintos afectan a ~ el 20 % de la población mundial, causando enfermedades debilitantes y síndromes en el hombre, animales silvestres y domésticos. Estas enfermedades son crónicas y su erradicación es una meta aún distante dada la falta de vacunas efectivas, la limitada eficacia de la quimioterapia y la ausencia de métodos de diagnóstico temprano. Históricamente, se ha estudiado la interacción con el hospedero mediante la caracterización de las proteínas secretadas en los productos de excreción/secreción. En la actualidad, se sabe que dichos productos además contienen distintas clases de ARNs, denominados ARNs extracelulares (ex-ARNs). En mamíferos, los ex-ARNs son estabilizados en el medio extracelular mediante la asociación a proteínas, lipoproteínas o vesículas extracelulares (VE). En nuestro grupo nos centramos en el estudio de ARNs pequeños de parásitos cestodos, por lo que nos propusimos caracterizar las vías que emplean para su secreción. Para ello, realizamos un estudio comparativo en 3 especies de cestodos: *Taenia crassiceps*, *Mesocestoides corti* y *Echinococcus multilocularis*. De esta forma, observamos que los metacestodos (larvas) de *T. crassiceps* y *M. corti* secretan VE al medio extra-parasitario; sin embargo, la capa laminar de *E. multilocularis* dificulta su liberación. En consecuencia, la presencia de ex-ARNs se observó en la fracción de VE de *T. crassiceps* y *M. corti*, y en la fracción libre de VE en *E. multilocularis*. Luego, corroboramos que la restricción impuesta por la capa laminar disminuye cuando se compromete la integridad del tegumento, con la consiguiente liberación de ARN asociado a VE. Finalmente, evaluamos el uso de los ex-ARNs parasitarios como biomarcadores diagnósticos. Los ensayos in vitro muestran que, según la morfología de cada especie y el estado de integridad del parásito, los metacestodos emplean caminos alternativos para interactuar con el medio ambiente, lo que puede afectar la búsqueda de biomarcadores basados en VE.

1.2.4. Metalo- β -lactamasas más allá de los límites de la célula bacteriana: transporte selectivo mediado por vesículas de membrana externa

Carolina López¹, Alessio Prunotto², Guillermo Bahr^{1,3}, Lucia Capodimonte^{1,3}, Lisandro González^{1,3}, Matteo Dal Peraro², Alejandro Vila^{1,3}

¹Instituto de Biología Molecular de Rosario (IBR-CONICET), Rosario, Argentina. ²École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland. ³Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (FCByF-UNR), Rosario, Argentina. lopez@ibr-conicet.gov.ar

Las vesículas de membrana externa (OMVs) son nanoestructuras liberadas por bacterias Gram-negativas, que actúan como transportadoras de determinantes de resistencia antibiótica, como las enzimas β -lactamasas y los genes que las codifican. Estas vesículas cargadas de β -lactamasas proveen protección a bacterias susceptibles a los antibióticos que co-habitan con las bacterias resistentes. Las metalo- β -lactamasas (MBLs), enzimas β -lactamasas dependientes de Zn(II), incluyen carbapenemasas cruciales que atacan antibióticos de último recurso en la clínica. MBLs como NDMs, VIMs e IMPs son de gran relevancia clínica y distribución geográfica. En estudios previos, hemos confirmado la incorporación de ciertas MBLs en OMVs. Sin embargo, aún queda por desentrañar los mecanismos que gobiernan el transporte selectivo de estas enzimas. Para ello, exploramos las interacciones MBLs-membrana bacteriana usando experimentos de flotación de liposomas, mutagénesis y simulaciones de dinámica molecular. Purificamos OMVs de *E. coli* expresando NDM-1, IMP-1, VIM-2 y sus variantes, y determinamos sus niveles proteicos mediante inmunodetección. Confirmamos que la localización de la enzima NDM, anclada a la membrana, estabiliza a la enzima y promueve su inclusión en OMVs. La variante soluble también se incorpora en OMVs, indicando que el anclaje no es único en la selección de carga. El dominio soluble de NDM-1 establece interacciones electrostáticas con la membrana mediante dos argininas, favoreciendo su inclusión en OMVs. En cuanto a variantes solubles naturales, IMP-1 se transporta con mayor eficiencia en OMVs que VIM-2. Identificamos cuatro residuos de lisina responsables de la interacción IMP-1-membrana, responsables de favorecer su incorporación en OMVs. La ausencia de interacciones electrostáticas entre VIM-2 y la membrana explica los bajos niveles de la enzima en OMVs. Evidenciamos que ciertas MBLs interactúan de manera favorable con la membrana, incorporándose de manera selectiva en OMVs, ampliando y favoreciendo su actividad más allá de la célula bacteriana, lo que impacta en la efectividad de la terapia antibiótica.

1.2.5. Potencia de las vesículas de membrana externa de *Brucella suis* Δ mapB como candidato vacunal contra la brucelosis

Muñoz González Florencia¹, Alonso Paiva Iván¹, Bialer Magalí², Baldi Pablo¹, Ferrero Mariana¹.

¹Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), CONICET-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, ² Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina. flor.mg@live.com.ar

Las vesículas de membrana externa (VME) se han utilizado en el desarrollo de vacunas contra bacterias Gram negativas. Aquí evaluamos la inmunogenicidad y la capacidad protectora de VME de *B. suis* 1330 (wt) y *B. suis* Δ mapB contra el desafío sistémico y mucosal de *B. suis*. Ratones hembra BALB/c fueron inmunizados por vía intramuscular (i.m.) con VME wt (20 μ g), VME Δ mapB (20 μ g) o solución salina a los 0 y 30 días.

Una semana después de la última inmunización se obtuvieron muestras de suero, lavado bronco-alveolar, heces y saliva para medir anticuerpos específicos anti-VME. Una semana más tarde, los ratones fueron desafiados con *B. suis* virulenta a través de las rutas intraperitoneal (i.p.) o intratraqueal (i.t.). Los recuentos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se determinaron en pulmones y/o bazo 20 días después de la infección. La capacidad de los anticuerpos para neutralizar la infección por *Brucella* se determinó en cultivo de células epiteliales pulmonares (línea celular A549). La vacunación con ambas VME indujo IgG específica sérica ($p < 0,0001$), los sueros de los animales vacunados con VME Δ mapB alcanzaron títulos de IgG más altos que el grupo VME wt (1600 VME Δ mapB vs 400 VME wt). Además, los ratones VME Δ mapB mostraron altos niveles de IgG1 específica sérica (51200), IgG2a (3200) e IgA (400), mientras que en los animales VME wt solo se detectaron niveles bajos de IgA específica (100). Se detectó un ligero aumento en los niveles específicos de IgA en la mucosas respiratoria y oral en ratones vacunados con VME Δ mapB ($p < 0,01$). Los anticuerpos específicos en el suero de ratones vacunados tanto con VME wt como VME Δ mapB redujeron la adherencia a *B. suis* y la invasión de células A549 ($p < 0,01$). La inmunización con VME wt y VME Δ mapB logró la misma reducción de la carga bacteriana pulmonar (0,7 log; $p < 0,05$) y esplénica (1,2 log; $p < 0,05$) después de la infección i.t.; y una reducción de 1,67 y 2,11 log, respectivamente, de la carga en bazo luego de la infección i.p. ($p < 0,0001$).

La vacunación con VME de *B. suis* wt y Δ mapB indujo una respuesta inmune humoral específica tanto sistémica y como de mucosas, que puede contribuir a prevenir el ingreso de *Brucella* a través de las superficies mucosas y su posterior diseminación.

1.2.6. Vesículas extracelulares de plasma de individuos sanos modulan la respuesta inflamatoria aguda de neutrófilos

Martina Fabiano¹, Alan Adamczyk¹, Luz Leicaj¹, Ignacio Mazzitelli¹, Fernando Erra Díaz¹, Florencia Sabbione², Analía Trevani², Matías Ostrowski¹

¹Instituto de investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Universidad de Buenos Aires / CONICET. ²Departamento de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. martinafabiano13@gmail.com

La respuesta inflamatoria aguda y, particularmente, la acción de neutrófilos y macrófagos, es necesaria para controlar y erradicar infecciones. Sin embargo, si no es debidamente controlada, la inflamación puede causar un severo daño en los tejidos. Previamente hemos demostrado que las vesículas extracelulares de plasma de individuos sanos (VEs) inhiben la respuesta inflamatoria de los macrófagos estimulados con PAMPs bacterianos y virales. Aquí estudiamos si las VEs también son capaces de modular la activación de los neutrófilos. Las VEs fueron purificadas a partir de plasma de individuos sanos mediante cromatografía de exclusión por tamaño seguida de una centrifugación a 30000 g. Analizamos nuestras preparaciones por la técnica de Western Blot utilizando marcadores de las VEs (CD9, CD63, HSP70, Alix) y contaminantes de otras estructuras del plasma (ApoA1, ApoB100, IgG) demostrando que nuestras VEs son de alta pureza. Los neutrófilos fueron aislados de sangre de donantes sanos mediante un método de separación de gradiente de densidad estándar y estimulados con N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) en presencia o ausencia de VEs. La degranulación de neutrófilos (expresión superficial de CD11b/CD66b) y el estallido respiratorio (oxidación de dihidrorodamina) fueron analizados mediante citometría de flujo (CF). La viabilidad celular (ensayo de TUNEL) también se evaluó mediante CF. La producción de citoquinas fue evaluada mediante ELISA. Los resultados muestran que el tratamiento con VEs no afecta la viabilidad de los neutrófilos, pero reduce el estallido respiratorio en forma dosis dependiente, así como de la degranulación después de la estimulación con fMLP. En cuanto a las citoquinas las VEs reducen la secreción de IL-1 β pero inducen la de IL-8. En conclusión, las VEs de individuos sanos son capaces de modular la respuesta inflamatoria aguda de los neutrófilos tratados con PAMPs bacterianos funcionando como mediadores homeostáticos promoviendo la resolución de la inflamación.

1.2.7. Vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* alteran el metabolismo de las células trofoblásticas afectando tanto su funcionalidad como su interacción con células inmunes

Brenda Lara¹, Matías Sassot¹, Iñaki Loureiro¹, Laura Gliosca², Lara Castagnola¹, Fátima Merech¹, Lucila Gallino¹, Guillermina Calo¹, Rosanna Ramhorst¹, Daiana Vota¹, Claudia Pérez Leiros¹, Vanesa Hauk¹

¹Universidad de Buenos Aires - CONICET. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Laboratorio de Inmunofarmacología. Buenos Aires, Argentina. ²Universidad de Buenos Aires – Facultad de Odontología. Cátedra de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 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. Además, regulan la respuesta inmune materna para mantener la homeostasis en la interfase materno-placentaria. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto de Pg OMV sobre el metabolismo y función de las Tb y su interacción con leucocitos maternos. Las Pg OMV fueron aisladas por ultracentrifugación. Para los ensayos de metabolismo y funcionalidad, se estimularon células Tb HTR-8 con Pg OMV durante 4-24h. La migración Tb fue evaluada por ensayo de herida y la invasión sobre transwell cubiertos con Matrigel. La incorporación de glucosa, ácidos grasos, formación de gotas lipídicas, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) total y mitocondrial (mtROS) fue evaluada por citometría de flujo utilizando 2-NBDG, FLC12 y 493/503 Bodipy, DCFH-DA y MitoSox respectivamente. Los resultados indican que las células Tb internalizan Pg-OMV sin afectar su viabilidad. Por otro lado, Pg-OMV redujo el metabolismo glucolítico y la producción de ROS totales en las Tb. Además, reduce significativamente la migración e invasión Tb. El medio condicionado de PgOMV pierde la capacidad de reducir la producción de ROS inducida por PMA en los neutrófilos y de inducir células dendríticas tolerogénicas HLA-G+. Los resultados muestran que Pg OMV modula el metabolismo de las células trofoblásticas afectando su funcionalidad como su efecto inmunoregulador. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento de los mecanismos patogénicos de alteraciones placentarias asociados a infecciones odontogénicas.

1.2.8. Detección de AQP3 en EVs provenientes de plasma materno y sobrenadante de cultivo de explantos de placentas normales y preeclámpticas como posible biomarcador de la función placentaria

Matías N. Sierra^{1,2}, Belén Ibañez³, Jesenia Acurio³, Fidel O. Castro⁴, Carlos Escudero³, Juan S. Sar⁵, Alicia E. Damiano^{1,2}, Natalia Szpilbarg¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto de Fisiología y Biofísica "Bernardo Houssay" (IFIBIO), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Buenos Aires, Argentina. ²Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ³Laboratorio de Fisiología Vasculat, Universidad del Bio Bio, Chillán, Chile. ⁴Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile. ⁵Servicio de Obstetricia, Hospital Naval Cirujano Mayor Dr. Pedro Mallo, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. nataliaszpilbarg@gmail.com

La preeclampsia (PE) es un síndrome de la gestación humana asociado a una insuficiencia placentaria y a un aumento de vesículas extracelulares (EVs) provenientes del sincitiotrofoblasto en circulación materna. La acuaporina 3 (AQP3) participa en la formación placentaria y disminuye en placentas con PE. Objetivo: Validar un método para detectar AQP3 en EVs de plasma materno y de sobrenadante de cultivo de explantos de placentas para evaluar la posible utilidad de AQP3 como biomarcador de PE. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Naval de la Ciudad de Buenos Aires. Se recolectó sangre materna anticoagulada con EDTA y placentas de embarazos normales y con PE bajo consentimiento informado. Las placentas fueron obtenidas inmediatamente y procesadas dentro de la hora de realizadas las cesáreas. Se prepararon explantos de placentas normales y con PE, se cultivaron 18 h a 37°C y se recolectó el medio de cultivo. Las EVs de plasma y explantos se obtuvieron mediante centrifugación diferencial, filtración y ultracentrifugación. Las muestras enriquecidas en EVs fueron caracterizadas por DLS, NTA, microscopía electrónica de transmisión y western blot para analizar la presencia de CD63 y HSP70. Luego se analizó la expresión proteica de AQP3 en todos los casos y de PLAP (marcador de sincitiotrofoblasto) para confirmar la presencia de EVs de origen placentario en las muestras de EVs de plasma. Los resultados preliminares muestran que se obtuvieron muestras enriquecidas en EVs, que hay presencia de EVs de origen placentario en las EVs de plasma y que la AQP3 es detectable tanto en EVs de plasma como de explantos. Este trabajo sienta las bases para poder evaluar si la AQP3 se expresa en forma diferencial en EVs liberadas por la placenta en condiciones normales y patológicas, si esto se refleja en el contenido de las EVs de origen placentario en plasma materno y si, en un futuro, la AQP3 podría ser un posible biomarcador de la función placentaria en PE.

1.2.9. Microbiota, probióticos y postbióticos: rol de las vesículas extracelulares bacterianas

A. Paula Domínguez Rubio ^{1,2}, Cecilia L. D'Antoni ^{1,2}, Mariana Piuri ^{1,2}, Oscar E. Pérez ^{1,2}

¹Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ²Instituto 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. oscarperez@qb.fcen.uba.ar

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador. Hoy en día, la microbiota intestinal se considera un nuevo “órgano” y se ha demostrado que el consumo de probióticos tiene efectos beneficiosos a nivel sistémico sobre diferentes órganos extraintestinales (eje intestino-cerebro, eje intestino-piel, etc.). Al mismo tiempo, los efectos beneficiosos de los probióticos no están sólo sujeto a los microorganismos vivos sino también a sus componentes solubles que liberan al medio extracelular y recientemente se los ha considerado postbióticos. En esta línea, es donde el conocimiento de las vesículas extracelulares (EVs por sus siglas en inglés) de bacterias probióticas cobra relevancia, ya que podrían estar mediando, al menos en parte, los efectos benéficos sobre la salud del hospedador aunque los factores que regulan su formación y su contenido están apenas siendo elucidados.

En el laboratorio estudiamos las EVs de dos bacterias con propiedades probióticas, *Lactocaseibacillus casei* BL23 y *Bacillus subtilis* 168, y su interacción con el hospedador a través de un modelo *in vitro* de barrera intestinal.

Un mayor conocimiento de las EVs producidas por bacterias GRAS (Generally Regarded as Safe) podría ser una novedad científica con aplicaciones en alimentos funcionales e industria farmacéutica.

1.3. SESIÓN 3

Coordinadores: Natalia de Miguel, Daniela Papademetrio

1.3.1. Vesículas extracelulares de fibroblastos asociados al cáncer estimulados por compuestos dietarios desencadenan proliferación celular en células de cáncer de mama

Solla ED^{1,2}, Roldán Gallardo FF^{1,2}, Mazo TM^{2,3}, Ferrero V^{2,3}, Pasqualini ME^{2,3}, Maldonado CA^{1,2}, Quintar AA^{1,2}

¹Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Facultad de Ciencias Médicas. Centro de Microscopía Electrónica. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA, CONICET-UNC).

³Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Facultad de Ciencias Médicas. Instituto de Biología Celular. erisolla@gmail.com

Estudios sugieren asociación entre nutrición y desarrollo tumoral. Patrones dietarios con alimentos ricos en carbohidratos (PBA) y ácidos grasos saturados (PCS), representados principalmente por fructosa (F) y ácido palmítico (AP), se asocia positivamente con el riesgo de cáncer colorrectal y de mama, aun no dilucidándose mecanismos celulares. El objetivo fue evaluar efectos de la dieta en interacciones del microambiente entre fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) y células tumorales, mediadas por EVs. Ratones Balb/c alimentados 2 meses con PBA, PCS, o mezcla PBA+PCS se implantaron s.c. con células de tumor mamario LM3 (20 días). Comparando con dieta Chow, tumores PBA+PCS crecieron más rápido y desarrollaron mayor volumen ($p < 0,05$). Por MET se vio mayor frecuencia de CAFs, colágeno y signos ultraestructurales de aumento de secreción de EVs. *In vitro*, se cultivó la línea celular F88 de CAFs mamarios, estimulándose con F40mM, AP250uM, F+PA o sus vehículos 24h. Se aislaron EVs de sobrenadantes por ultracentrifugación secuencial (2k, 10k, 100k), se caracterizaron por MET y se marcaron con CD63 utilizando la técnica de inmunoro. F+PA indujo aumento en la frecuencia de EVs de 20-30nm con respecto a los controles o F y PA solos ($p < 0,05$). Se estimularon células tumorales mamarias MCF-7 24h con medios acondicionados derivados de células F88 tratadas con F, AP y F+PA y con EVs de F88 tratadas igualmente. Medios acondicionados de F88 tratados con F+PA y EVs de F88 tratadas con F+PA aumentaron la proliferación celular de las células MCF7, determinado por incorporación de bromodesoxiuridina y el recuento de células ($p < 0,05$). Esta acción protumoral de EVs se inhibió preincubando MCF7 con genistéina, sugiriendo captación independiente a clatrina. EVs de células F88 tratadas con F+AP indujeron disminución en apoptosis celular, medida por citometría de flujo de anexina V en células MCF-7 y MDA-MB-231. Estos resultados indican efecto patogénico de patrones dietéticos ricos en F y PA en el microambiente tumoral mamario, a través de la liberación de EVs pro-proliferativas por CAFs.

1.3.2. El bloqueo de la degradación autofagosomal promueve la liberación de mediadores que incrementan la resistencia a Vemurafenib

Falcón Cristian, Mons Delgado Johinna, Perez Celia, Alvarez Sergio

Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL). cfalconin@gmail.com

El melanoma es el cáncer más agresivo de piel y el 50% de estos tumores poseen la mutación BRAFV600E, la cual produce su activación constitutiva crecimiento descontrolado del tumor. Vemurafenib (Vem) es un inhibidor del BRAF mutado, sin embargo el desarrollo de resistencia a éste inhibidor se produce en corto tiempo. Un mecanismo generador de resistencia es la autofagia, esta vía autodegradativa contribuye a la adaptación de las células tumorales al microambiente hostil propio del tumor así como al generado por la terapia farmacológica. La co-terapia de inhibidores de BRAF junto a inhibidores de la autofagia como la cloroquina (Cq) han sido evaluadas demostrando una mayor eficacia en el tratamiento. En este trabajo nosotros estudiamos la influencia de la inhibición de la autofagia tanto en su inicio como en su finalización sobre la generación de resistencia a Vem. Hemos demostrado de manera contundente que la inhibición de la degradación autofagosomal en células de melanoma promueve la liberación de mediadores al medio extracelular que transfieren resistencia a poblaciones tumorales sensibles a Vem. Más aún, la transferencia de resistencia es dependiente tanto de la inducción de la autofagia como de la liberación de microvesículas ya que el uso de spautin-1 (sp-1) o de GW4869 (inhibidor de exosomas) disminuyó la capacidad de los medios condicionados para transferir resistencia a Vem. Por otra parte, células con resistencia adquirida a Vem mostraron un bloqueo en la degradación de los autofagosomas y fueron capaces de incrementar la resistencia a Vem de poblaciones sensibles a través de sus medios condicionados, capacidad que fue reducida solo mediante la utilización de sp-1 o GW pero no con Cq o Bafilomicina. Estos datos en su conjunto indican que la inhibición de la autofagia en su finalización favorece la generación de resistencia a través de la liberación de mediadores solubles y microvesículas que incrementan la resistencia global del melanoma.

1.3.3. Asociación del contenido total y en vesículas extracelulares de adenosín monofosfato cíclico en orina y la progresión de la poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD)

María Lucía Rosenberg^{1,2}, Agustín Yanéff³, Ezequiel Branca^{1,2}, Natalia Riera^{1,2}, Jorge Toledo^{1,2}, Gonzalo Manuel Ferradas^{1,2}, Carlos Alberto Davio³, Roxana Noemí Peroni^{3,4}, Elisabet Mónica Oddo^{1,2} and Pablo Javier Azurmendi^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ²Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM, UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ³Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA-UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ⁴Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. rosenberg.maria@lanari.uba.ar

La poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) es la enfermedad renal hereditaria más frecuente. Se caracteriza por la presencia de múltiples quistes que, a través de su crecimiento, conducen a una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) y enfermedad renal terminal. Es causada por mutaciones en los genes que codifican para policistina-1 o policistina-2. La actividad deficiente del complejo policistinas produce una depleción de calcio intracelular que, a su vez, aumenta la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) estimulando la proliferación celular y la excreción de soluto y agua hacia la luz del quiste. Sin embargo, no está completamente descrito el comportamiento del AMPc en la progresión de la enfermedad. Las vesículas extracelulares urinarias (VEu) se liberan de diferentes tipos celulares transportando moléculas que intervienen en la comunicación intercelular. Nuestra hipótesis es que el AMPc urinario podría correlacionarse con la progresión de la enfermedad. Este estudio tiene como objetivo determinar si el AMPc está contenido en las VEu y, si el AMPc total y/o VEu participan en la progresión de la enfermedad. Se estudiaron 14 pacientes con PQRAD, sin tratamiento previo con antagonista del receptor V₂ y 7 controles. La progresión se evaluó mediante la TFG estimada (TFGe) y el volumen renal total ajustado por altura (VRT/a). Las VEu se aislaron mediante un método de centrifugación adaptado y se caracterizaron mediante microscopía electrónica, barrido dinámico de luz, citometría de flujo con marcación para CD63, contenido de proteínas y ARN total, y detección de ARNm de AQP2 y GAPDH. De la primera orina de la mañana y de las VEu se determinó el AMPc mediante un ensayo competitivo de radioligando. El AMPc total y en VEu se midió tanto en muestras de orina control como de pacientes. El AMPc total se correlacionó con TFGe y su cambio anual ($R=0.65$, $p=0,012$ y $R=0.67$, $p=0,008$; respectivamente) e inversamente con VRT/a ($R=0.57$, $p=0.04$). El AMPc-VEu mostró un patrón bimodal con VRT/a, aumentando hasta ≈ 1 L/m y cayendo a tamaños más grandes.

Nuestros resultados demuestran que el AMPc en orina se correlaciona con los marcadores de progresión de la PQRAD, y que el patrón de AMPc-VEu podría estar reflejando el cambio de arquitectura que se produce progresivamente con el crecimiento de los quistes renales.

1.3.4. El ayuno celular induce en células tumorales pancreáticas la liberación de *small* EVs capaces de inducir la vía autofágica

Daniel Grasso^{1,2}, Maximiliano A. Diaz¹, Giuliana Narváez¹, Daniela L. Papademetrio^{3,4,5}, Elida Alvarez^{1,5}, Maria Noé Garcia^{1,5}

¹Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ²Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ³Unidad de Conocimiento Traslacional, Hospital del Bicentenario Esteban Echeverría. ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET. ⁵Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es una enfermedad altamente agresiva con una tasa de supervivencia a 5 años de menos del 5%. La autofagia, un proceso celular de degradación y reciclaje, posee un papel importante en el microambiente tumoral, hipóxico y bajo en nutrientes, del PDAC. Las vesículas extracelulares (EVs) son pequeñas estructuras vesiculares liberadas por todos los tipos celulares con implicancias en la comunicación intercelular. El objetivo de este trabajo fue describir la respuesta de las EVs derivadas en respuesta al ayuno. Iniciamos desarrollando la inmunodetección cuantitativa de EVs por medio de citometría de imagen. Adicionalmente, desarrollamos la detección cuantitativa total de EVs usando una tinción fluorescente roja. Luego, la línea celular de PDAC Panc-1 fue sometida a ayunos de 30 y 60 min. En el medio condicionado, detectamos un incremento significativo de la liberación de vesículas para ambos tiempos ($p < 0,05$ and $p < 0,001$ respectivamente). Para verificar la especificidad de la respuesta, repetimos el ayuno de 1 h seguida de 1h y 2h de recuperación de las células en donde detectamos una normalización en la cantidad de EVs liberadas. En las mismas condiciones, aislamos EVs por ultracentrifugación y encontramos que la fracción correspondiente a las EVs pequeñas es la responsable por la respuesta al ayuno ($p < 0,001$). Además, por inmunofluorescencia, el incremento de EVs pequeñas es una consecuencia del aumento de vesículas positiva para CD63, CD81, CD9 y CD63/CD81 doble positivas ($p < 0,001$). Interesantemente, el medio condicionado de células Panc-1 ayunadas posee la capacidad de inducir autofagia, evaluado por agrupamiento de LC3, y que esta capacidad depende al menos en parte de la presencia de EVs pequeñas CD63+. Finalmente, nuestros datos sugieren que las células de PDAC responden al ayuno con una capacidad efectora específica de EVs pequeñas CD63+ que pueden inducir autofagia incluso en célula sin ausencia de nutrientes.

1.3.5. La quimioterapia condiciona la respuesta inmune antitumoral mediante la modulación del contenido de las vesículas extracelulares tumorales

Daniela L. Papademetrio^{1,2,3}, Viviana Pulido¹ Santiago Behr³ Lucy Bonilla³ Martín M. Ledesma¹ Daniel Grasso^{4,5} María Noé García^{3,4} Élica Álvarez^{3,4}

¹Unidad de Conocimiento Traslacional, Hospital del Bicentenario Esteban Echeverría. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET. ³Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ⁴Instituto de Estudios de Inmunidad Humoral (UBA-CONICET), Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ⁵Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. danilpapa@gmail.com

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) se caracteriza por inducir inmunotolerancia. En este proceso, las vesículas extracelulares (EVs) derivadas del tumor desempeñan un papel crucial al transportar mediadores de señalización desde las células tumorales hacia las células inmunitarias. Ha sido demostrado, que aquellos quimioterápicos capaces de inhibir la autofagia son más efectivos que los que la estimulan. Por ello, investigamos el efecto de moduladores de la autofagia, Gemcitabina (Gem), IFN α e IFN β en la composición de las EVs pequeñas derivadas del tumor y su impacto en la actividad de las células Natural Killer (NK) y células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC).

Se recolectaron EVs de los sobrenadantes de las células MIAPaCa-2 y PANC-1 luego de 2 hs de tratamiento con las drogas. Las NK de donantes sanos se purificaron mediante selección negativa. Las MDDC se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica tratadas con IL-4 y GM-CSF. Las EVs-Gem aumentaron ligeramente la citotoxicidad de las NK (19% y 21% para MIAPaCa-2 y PANC-1, respectivamente ($p < 0.05$)) sin modular la liberación de IFN γ . Las EVs-IFN $\alpha 2b$ disminuyeron la citotoxicidad de las NK (49% y 38% para MIAPaCa-2 y PANC-1, respectivamente $p < 0.01$). Las EVs obtenidas a partir de EVs-IFN $\alpha 2b$ disminuyeron la liberación de IFN γ solo en las células MIAPaCa-2 (37% $p < 0.01$). En contraste, las EVs-IFN β aumentaron la citotoxicidad de las NK (36% $p < 0.01$) sin modular la liberación de IFN γ .

Las MDDC fueron tratadas con diferentes poblaciones de EVs y después de 1 hora con LPS. Las EVs provenientes de cultivos celulares sin SP-1 secretaron TGF- β , mientras que las EVs de células con SP-1 indujeron la secreción de IL-12 y un aumento en la expresión de HLA-DR en la membrana de las MDDC (observado mediante citometría de flujo) ($p < 0.01$). No se observaron diferencias en el perfil de IL-10.

Nuestros resultados sugieren que el estado de la vía autofágica en las células tumorales podría modular el microambiente inmunológico tumoral a través de la variación de la composición de las EVs, induciendo perfiles inmunotolerantes o activadores, pudiendo inducir uno u otro según el quimioterápico empleado.

2. SESIÓN DE PÓSTERS

2.1. Evaluación de las vesículas de membrana externa de *Brucella ovis* como antígeno vacunal contra la brucelosis ovina

Tomás A. Landoni, Florencia Muñoz González, Lucía Zavattieri, Pablo C Baldi, Mariana C. Ferrero

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), CONICET - Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ferrerom@ffyb.uba.ar

Brucella ovis es el agente causal de la brucelosis en ovinos. Las estrategias de control para esta enfermedad incluyen diagnósticos periódicos mediante pruebas serológicas y/o cultivos bacteriológicos, además del sacrificio de los animales positivos. Se recomienda la aplicación de la vacuna *Brucella melitensis* Rev 1 cuando la prevalencia es elevada. Sin embargo, esta cepa atenuada vacunal presenta notables inconvenientes vinculados al desarrollo de anticuerpos que interfieren con el serodiagnóstico, su virulencia en humanos y la restricción de uso en naciones consideradas libres de *B. melitensis*. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevas vacunas seguras y eficaces contra la brucelosis ovina. Las vesículas de membrana externa (VME) de bacterias Gram-negativas han sido utilizadas en el desarrollo de vacuna acelulares contra numerosas enfermedades infecciosas.

En este trabajo evaluamos la inmunorreactividad de las VME de *B. ovis* (cepa Reo 198) con el objeto de comenzar a dilucidar su potencial como vacuna acelular. Para ello, *B. ovis* fue crecida en caldo tripteína de soja adicionado con 0.5% extracto de levadura por 72 h. Las VME fueron aisladas del sobrenadante de cultivo libre de células por ultracentrifugación. El contenido de proteína de la fracción de VME fue determinado por el método del ácido bicinónico y el tamaño de las VME aisladas fue determinado por DLS. Para evaluar si los antígenos de VME de *B. ovis* pueden inducir una respuesta inmune de anticuerpos en ovejas durante la infección natural se realizó un ensayo ELISA indirecto empleando 15 sueros de animales enfermos y saludables. Nuestros resultados muestran que las VME derivadas de *B. ovis* tienen un tamaño de 60 ± 5 nm como se determinó por DLS. Los niveles de IgG anti-VME en los sueros de ovejas infectadas fueron significativamente superiores a los de los animales sanos ($p < 0,01$). Resultados similares se obtuvieron cuando se ensayaron sueros de porcinos infectados naturalmente por *B. suis*. Estos resultados sugieren que los antígenos presentes en las VME de *B. ovis* inducen una respuesta de anticuerpos durante la infección natural tanto en el huésped natural como en otra especie doméstica susceptibles de infección por *Brucella*, lo que sugeriría su potencial como vacuna acelular experimental para la brucelosis.

2.2. Efecto de la comunicación entre macrófagos mediada por exosomas frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*

Andrea C. Mesías¹, Leonardo Acuña¹, Cecilia Pérez Brandán¹, Cecilia M. Parodi¹, Valeria Tekiel²

¹Instituto de Patología Experimental “Dr. Miguel Ángel Basombrío”, CONICET - Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.

²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, EByN, UNSAM-CONICET, San Martín, Buenos Aires, Argentina.
andreamesias@gmail.com

La comunicación entre las células del sistema inmune tiene lugar mediante diversas vías como citoquinas, quimioquinas, sinapsis célula-célula e incluso a través de EVs. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que las EVs pueden intervenir en procesos como el transporte conjunto de antígenos y moléculas señalizadoras y la presentación de antígenos de forma directa, cruzada o por *cross-dressing*, siendo capaces de activar células CD4+ y CD8+ incluso en ausencia de células presentadoras de antígeno. En particular, en este estudio aislamos exosomas producidos por macrófagos RAW264.7 (Mφ) ante el contacto con dos cepas del patógeno *Trypanosoma cruzi* (TCC y CL Brener) con el objetivo de estudiar su efecto sobre células receptoras *naïve*. Para esto, cosechamos estas vesículas mediante un gradiente de densidad de iodixanol y ultracentrifugación y las analizamos luego por TEM y *Western blot* αCD9. Finalmente, tratamos Mφ *naïve* con las diferentes poblaciones de exosomas y evaluamos el perfil generado de acuerdo a su producción de citoquinas, capacidad fagocítica, de adhesión y migración. El fenotipo desarrollado por las células estimuladas fue diferente en función de la cepa de *T. cruzi* utilizada para la infección y producción de los exosomas. En cuanto a las citoquinas, las células tratadas con vesículas de Mφ infectados con TCC (cepa no virulenta) generaron un perfil más inflamatorio en comparación con el obtenido para CL Brener. Esto podría indicar que el “mensaje” transmitido por Mφ mediante exosomas frente a estímulos similares –dos cepas de *T. cruzi*– puede ser finamente moldeado por la célula infectada de acuerdo a las características del patógeno. Este mensaje, a su vez, podría tener una gran relevancia para la coordinación de una pronta respuesta inmune que lleve a un control exitoso o deficiente de la infección. En estudios próximos planeamos realizar la caracterización proteómica de estos exosomas para poder obtener una comprensión más profunda de su “mensaje”.

2.3. Leucemia linfática crónica: las EVs producidas por los linfocitos T CD4+ activan a las células B malignas y favorecen la resistencia a la droga terapéutica venetoclax

Sarapura-Martinez Valeria Judith¹, Pérez Paula², Colado Ana¹, Cassarino Chiara¹, Borge Mercedes^{1,3}, Giordano Mirta^{1,3}, Ostrowski Matías^{2,3}, Gamberale Romina^{1,3}

¹Laboratorio de inmunología Oncológica, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina (ANM). ²Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS) UBA-CONICET. ³Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. valeria.sarapuramartinez@gmail.com. rominagamberale@gmail.com

La leucemia linfática crónica (LLC) es una enfermedad incurable caracterizada por la acumulación de linfocitos B clonales maduros en sangre periférica y órganos linfoides. Los linfocitos T autólogos activados (LTaa) son una fuente central de los estímulos que el clon leucémico recibe en los nichos de supervivencia presentes en los órganos linfoides, favoreciendo un microambiente inmunosupresor, anti apoptótico y pro-tumoral. Desde hace unos años, se aprobó la terapia dirigida contra la proteína anti-apoptótica BCL-2, venetoclax. Los pacientes con LLC tratados con venetoclax pueden alcanzar respuestas clínicas profundas, pero la aparición de células resistentes es una complicación frecuente.

Nuestro grupo reportó previamente que los LTaa de pacientes con LLC incrementan la expresión de los marcadores de activación CD86, PD1 y PDL1 en las células leucémicas, su proliferación y supervivencia (1-3). También generan resistencia a venetoclax en el clon leucémico a través de la producción de factores secretados y mediante el contacto celular (2, 4). En este trabajo evaluamos si la producción de EVs por parte de los linfocitos T participaba en estos procesos. Para ello, obtuvimos EVs provenientes de linfocitos T CD4+ activados y las cultivamos con células LLC purificadas. Encontramos que estas EVs incrementan la expresión de CD86 y PD1 en las células leucémicas de los pacientes con LLC y generan resistencia al tratamiento *in vitro* con venetoclax.

En LLC se reportó que las EVs provenientes del propio clon leucémico (5) afectan la funcionalidad de los linfocitos T (6, 7) e incrementan la migración y supervivencia de las células estromales (8). En relación a la producción de EVs por otras células del microambiente tumoral en LLC, las producidas por células estromales fueron capaces de incrementar la supervivencia del clon leucémico (8, 9). Este es el primer reporte donde se describe que las EVs producidas por los linfocitos T afectan al clon leucémico en LLC.

1. Borge M, Nannini PR, Morande PE, Jancic C, Bistmans A, Bezares RF, et al. CXCL12 is a costimulator for CD4+ T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(1):113-24.
2. Elias EE, Almejún MB, Colado A, Cordini G, Vergara-Rubio M, Podaza E, et al. Autologous T-cell activation fosters ABT-199 resistance in chronic lymphocytic leukemia: rationale for a combined therapy with SYK inhibitors and anti-CD20 monoclonal antibodies. *Haematologica.* 2018;103(10):e458-e61.
3. Sarapura Martinez VB, B; Cassarino, C; Bernatowicz, J; Colado, A; Cordini, G; Custidiano, MR; Mahuad, C; Pavlovsky, MA; Bezares, RF; Favale, NO; Vermeulen, M; Borge, M; Giordano, M; Gamberale, R. Venetoclax resistance induced by activated T cells can be counteracted by sphingosine kinase inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Frontiers in Oncology.* 2023.
4. Elias EE, Sarapura Martinez VJ, Amondarain M, Colado A, Cordini G, Bezares RF, et al. Venetoclax-resistant CLL cells show a highly activated and proliferative phenotype. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;71(4):979-87.
5. Haderk F, Hanna B, Richter K, Schnolzer M, Zenz T, Stilgenbauer S, et al. Extracellular vesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(8):1826-30.
6. Bottcher M, Bottcher-Loschinski R, Kahlfuss S, Aigner M, Giessel A, Mackensen A, et al. CLL-Derived Extracellular Vesicles Impair T-Cell Activation and Foster T-Cell Exhaustion via Multiple Immunological Checkpoints. *Cells.* 2022;11(14).
7. Gargiulo E, Viry E, Morande PE, Largeot A, Gonder S, Xian F, et al. Extracellular Vesicle Secretion by Leukemia Cells in Vivo Promotes CLL Progression by Hampering Antitumor T-cell Responses. *Blood cancer discovery.* 2023;4(1):54-77.
8. Dubois N, Crompton E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B. Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front Oncol.* 2020;10:1422.
9. Crompton E, Van Damme M, Pieters K, Vermeersch M, Perez-Morga D, Mineur P, et al. Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica.* 2017;102(9):1594-604.

2.4. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: delivery of therapeutics genes for liver cirrhosis

Esteban Fiore¹, Luciana M. Domínguez¹; Milagros Albornoz¹; Juan Bayo¹; Ma. José Cantero¹; Bárbara Bueloni¹; Catalina Atorrasagasti¹; Mariana García¹; Gustavo Yannarelli²; Guillermo Mazzolini¹

¹Laboratorio de Terapia Génica, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Universidad Austral - CONICET, Buenos Aires, Argentina. ²Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería (IMeTTyB), Universidad Favaloro-CONICET, Buenos Aires, Argentina. estebanfiore@gmail.com

Liver cirrhosis involves chronic damage, wound healing and fibrogenic processes. Mesenchymal stem cells (MSC)-derived extracellular vesicles (EVs) are an interesting therapeutic option for regenerative medicine. We previously demonstrated that EVs mediates the therapeutic effect of human umbilical cord perivascular cells (a type of MSC) over-expressing IGF1 (AdIGF-I-HUCPVC) on liver fibrosis. Our **aim** is to establish a new tool employing EVs derived from MSCs to deliver therapeutic factors for liver fibrosis therapy. **First**, we compared a scalable method by ion exchange chromatography to isolate EVs from HUCPVC conditioned media with classic ultracentrifugation method. By the chromatograph, EVs was collected in 3 elution fractions, showed typical and homogeneous morphology, and CD9, CD63 and CD81 markers expression. **Second**, we evaluated the therapeutic potential on liver fibrosis of EVs derived from different clinical relevant sources of MSC; adipose tissue (ASC-EVs), HUCPVC-EVs and induced pluripotent stem cells-derived MSC (iMSC-EV). *In vitro* EVs antifibrotic effect was tested on hepatic stellate cells (HSC) line. After incubation, EVs from different MSC sources down-regulated pro-fibrogenic genes Col1a2 and α -SMA expression in similar levels. Then, the therapeutic potential of EVs was compared on experimental mice model of liver fibrosis (thioacetamide for 8 weeks in BALB/c mice). On week 6, ASC-EV, iMSC-EV and HUCPVC-EV were i.v. injected every 5 days for a total of 3 doses. At week 8, animals were sacrificed, and liver samples analyzed. The treatment with the three different EVs decreased collagen deposit and α SMA levels in liver tissue. In addition, EVs from different sources induce the hepatocytes proliferation compared with vehicle. **Third**, we confirmed by ELISA that chromatograph isolated' EVs derived from AdIGF-I-HUCPVC transport IGF1. In addition, the proteome of EV-IGF1 showed an anti-fibrotic profile. Incubation of HSCs with EV-IGF1 resulted in downregulation of Col1a2 and α SMA expression demonstrating a reduction of its activation status. Finally, *in vivo* treatment with EV-IGF1 resulted in a further amelioration of collagen deposition and α SMA levels in liver tissue in comparison with controls. Consistently, an increase of PCNA+ cells after EV-IGF1 application show the induction of liver regeneration. **Conclusion:** EVs derived from HUCPVCs load and transport therapeutic factors, enhancing its anti-fibrotic and pro-regenerative potential. The scalable chromatographic method retained the therapeutics potential of engineered EV, emerging as an alternative for the treatment of liver disease.

2.5. Cuantificación y caracterización de las vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas murinas activadas por la hormona tiroidea triiodotironina (T3)

Mariana Pires Teixeira¹, Dana Negretti-Borga¹, Vanessa Sandim², Brunno Renato Farias Verçoza³, Antonella Blanco¹, Elida Puentes¹, Russolina Benedeta Zingali², Ana Carolina Donadio¹, María Del Mar Montesinos¹, Robson de Queiroz Monteiro², Claudia Gabriela Pellizas¹

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

Las células dendríticas (DCs) secretan vesículas extracelulares (EVs) que contienen componentes que podrían activar células T y modular respuestas inmunes. Las EVs derivadas de DCs (DC-EVs) han sido propuestas como una estrategia para el tratamiento del cáncer. Como aún no se han obtenido resultados exitosos en ensayos clínicos, es necesario mejorar la inmunidad antitumoral inducida por las DC-EVs. Nuestro grupo demostró que la T3 estimula DCs, direccionando respuestas citotóxicas antígeno-específicas *in vitro* y en protocolos murinos de vacunación antitumoral. El objetivo de este trabajo fue cuantificar y caracterizar las EVs obtenidas de DCs estimuladas con T3 (DCs-T3). Para ello, utilizamos DCs derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6, tratadas o no con T3 por 18h. El medio condicionado fue centrifugado a 300g por 10' y a 2000g por 20' (remoción de células y debris), y posteriormente a 10000g por 40' y a 100000g por 90' para obtención de las 10K-EVs y 100K-EVs, respectivamente. Se observó un aumento significativo en el número de 10K-EVs y una tendencia de aumento de 100K-EVs en las DCs-T3 (vs controles) por NTA, como de 10K-EVs por Bradford. Por western blot, observamos una mayor expresión de TSG101 y sintenina (marcadores de exosomas) en las 100K-EVs (vs 10K-EVs), y de anexina A1 (marcador de microvesículas) en las 10K-EVs (vs 100K-EVs). Además, se registró una tendencia de disminución de sintenina en las 100K-EVs de DCs-T3 (vs controles). Por microscopía electrónica, observamos que las DCs producen principalmente EVs $\leq 200\text{nm}$ (SEM) y que la fracción 10K tiene un mayor porcentaje de EVs $>200\text{nm}$ vs 100K (STEM). Resultados preliminares utilizando DCs-EVs marcadas con CFSE (controles y T3) indican que éstas son captadas por DCs singénicas *in vitro* (FACS). En conclusión, la T3 aumenta la producción de DC-EVs y podría modificar su contenido. Estudios en curso nos permitirán dilucidar la capacidad de las EVs de DCs-T3 de modular respuestas inmunes.

2.6. Identificación de miRNAs expresados diferencialmente en niñas afectadas por el síndrome de Rett para ser utilizados como biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico de la severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad

M. Belén Cardillo¹, Patricia A. Paloscia², Bruno G. Berardino¹, Eduardo T. Cánepa¹

¹Laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades Tempranas – Departamento de Química Biológica – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Buenos Aires / Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

²Departamento de Química Biológica – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Buenos Aires / Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). E-mail: belencardillo@gmail.com

El síndrome de Rett (RTT) es una severa enfermedad neurológica que afecta el desarrollo y la función del cerebro mayoritariamente en mujeres. En el 90-95% de los pacientes diagnosticados con RTT clásico, la enfermedad es causada por mutaciones en el gen MeCP2, ligado al cromosoma X, que codifica la proteína de unión al DNA metilado, MeCP2. La pérdida de función de esta proteína deriva en un deterioro progresivo en la salud física y mental de las niñas afectadas. A pesar de que han sido identificadas centenares de mutaciones en MeCP2, solo 8 mutaciones puntuales, y deleciones en el extremo C-terminal y en los exones 3 y 4, explican la mayoría de los casos. Actualmente, el diagnóstico del síndrome de Rett sigue siendo clínico y se basa predominantemente en la historia de regresión del desarrollo, siendo frecuentemente tardío. Estudios preclínicos demostraron que esta proteína regula el procesamiento y expresión de miRNAs sugiriendo que pueden constituir mediadores importantes en la fisiopatología de la enfermedad.

El objetivo del proyecto consiste en evaluar la expresión de miRNAs circulantes en plasma en personas afectadas por RTT a fin de encontrar un biomarcador diagnóstico temprano de la enfermedad y analizar el perfil de expresión global de los miRNA en vesículas celulares derivados de neuronas de pacientes RTT y evaluar si su expresión diferencial presenta una asociación significativa con la severidad de las manifestaciones clínicas.

La presencia de mutaciones en MeCP2 respalda, pero no confirma, la severidad de la enfermedad, debido a las limitadas correlaciones genotipo-fenotipo en el síndrome de Rett. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores de diagnóstico, progresión y gravedad de la enfermedad adquiere relevancia.

2.7. β -lactamasas OXAs: ubicación subcelular e incorporación en vesículas de membrana externa de *Acinetobacter baumannii*

Lucía Capodimonte^{1,2}, Carolina López¹, Alejandro Vila^{1,2}

¹Instituto de Biología Molecular de Rosario (IBR-CONICET). ²Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (FCByF-UNR). vila@ibr-conicet.gov.ar

La producción de enzimas β -lactamasas son por amplia diferencia el principal mecanismo de resistencia a antibióticos. Esta problemática limita las opciones terapéuticas y constituye un problema de salud pública a nivel mundial, a tal punto que es una de las principales preocupaciones de la OMS.

En bacterias Gram-negativas, las β -lactamasas han sido consideradas históricamente enzimas solubles periplasmáticas. Hace unos años, se reportó que NDM-1, unas de las β -lactamasas de mayor relevancia clínica está anclada a la cara interna de la membrana externa. Asimismo, se demostró que dicha localización celular, promueve su incorporación en vesículas de membrana externa (OMVs), prolongando y favoreciendo la protección de bacterias susceptibles a los antibióticos en un modelo de infección *in vivo*.

En este trabajo, mediante un estudio bioinformático utilizando softwares que infieren ubicación subcelular a partir de las secuencias de los péptidos señal obtuvimos predicciones que indican que la lipidación sería una característica particularmente frecuente en las β -lactamasas OXAs, resultando más del 60% de ellas lipoproteínas putativas. Curiosamente, todas las OXAs putativas lipidadas provienen de *Acinetobacter spp.*, y, al mismo tiempo, ninguna de las OXAs putativas solubles está presente en este género.

Se corroboraron experimentalmente las predicciones para las OXAs de mayor importancia clínica: OXA-23, OXA-24 y OXA-48; y se estudió la correlación de la ubicación subcelular con la incorporación en OMVs. Se encontró que las OXAs lipidadas se incorporan a OMVs en proporciones mucho mayores que las OXAs solubles estudiadas.

Se comprobó que las OMVs cargadas con OXAs son capaces de proteger a otras bacterias susceptibles coexistentes de la acción de antibióticos. Esto es un dato muy importante a la hora de abordar el estudio de la diseminación de la resistencia y las infecciones polimicrobianas, donde *Acinetobacter spp.* tienen una gran prevalencia.

2.8. Infección por *T. cruzi*: estudio de la respuesta inmune y desarrollo de nuevas terapias

Carolina Poncini

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM), UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. 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*, permite la identificación de mecanismos celulares potencialmente importantes para el diseño racional de terapias contra el parásito. En estudios recientes confirmamos que la interacción de trypomastigotes con células dendríticas (DCs) derivadas de médula ósea, 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 de infección experimental letal. Por lo tanto, proponemos que el estudio minucioso de tales partículas (EVs) permitirá la identificación de componentes relevantes para el diseño de nuevas formulaciones y/o tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

2.9. Neural stem cell-derived exosomes favour neuronal differentiation and plasticity under stress conditions

Susana Delgado Ocaña¹, Dario Magaquian¹, Mercyleidi Díaz Reyes¹ and Claudia Banchio^{1,2*}

¹Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Lípidos, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET).

²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
banchio@ibr-conicet.gov.ar

Exosomes are released by all cell types and are involved in intercellular communication. We evaluated if neural stem cells-derived exosomes (NSC-Exo) regulate NSCs proliferation and differentiation under control and stress conditions. We found that NSC-EVs treatment increases cell proliferation and promotes neuronal differentiation and plasticity. The fact that nervous tissue poorly recovers after cellular damage, encouraged us to evaluate the effect of NSC-Exo supplementation under oxidative stress and inflammation. We demonstrate that NSC-Exo restore the proliferative potential of the NSCs affected by oxidative stress. In addition, we provide evidence that oxidative stress and inflammation induce neuronal differentiation. Interestingly, the aberrant cell phenotype induced by inflammation is restored by NSC-Exo treatment, suggesting that these vesicles modulate neuronal plasticity. These results contribute to understand the role of the NSCs-Exo as key players for brain tissue generation and regeneration and open new pathways to the development of therapies.

2.10. Rol de las vesículas extracelulares pequeñas en la activación glial inducida por β amiloide y ácido palmítico, y su regulación por la síntesis de ceramidas

Melina Bellotto^{1,2}, Ángeles Vinuesa^{1,2}, Melisa Bentivegna^{1,2}, Amal Gregosa^{1,2}, Carlos Pomilio^{1,2}, Nicolás González Pérez^{1,2}, Jessica Presa^{1,2}, Flavia Saravia^{1,2}, Juan Beauquis^{1,2}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina. ²Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA. C.A.: melinabellotto@gmail.com

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente y la principal causa de demencia. Uno de los signos más importantes es el depósito intracerebral de β amiloide ($A\beta$), acompañado de inflamación y activación glial. En el LCR de pacientes se han reportado niveles aumentados de ceramidas, mediadores lipídicos inflamatorios con un rol en la producción de vesículas extracelulares. Previamente, demostramos que las vesículas extracelulares pequeñas (SEVs) propagan señales inflamatorias entre microglía y neuronas en un modelo de lipotoxicidad con palmitato (PA). Nuestro objetivo es caracterizar a las SEVs, su rol en la propagación de la inflamación y el efecto de la inhibición de la síntesis de ceramidas sobre la liberación de SEVs. Se trató microglía BV2 con péptidos $A\beta$ 1-42 o PA, con o sin los inhibidores de síntesis de ceramidas Myriocin (inh. SPT) y Cambinol (inh. nMasa2Por RT-qPCR, se observó que los tratamientos con $A\beta$ y PA aumentaron la expresión de las citoquinas pro-

inflamatorias IL1 β y TNF α (P<0,05) y que Cam atenuó el efecto del A β sobre TNF α . A partir del medio condicionado (MC) de las células tratadas, se extrajeron y analizaron las fracciones enriquecidas en SEVs por citometría de flujo, encontrando que los tratamientos podrían aumentar la secreción de SEVs. Por último, se trataron astrocitos C6 con MC de microglía BV2 tratada con PA encontrando una mayor expresión de IL1 β (P<0,001). Este efecto no ocurrió con los MC de BV2 co-tratadas con Cambinol. Estos resultados sugieren un rol de la síntesis de ceramidas glial en la inducción y propagación de procesos inflamatorios entre células gliales, posiblemente por medio de SEVs. Nuestro objetivo futuro es determinar el rol de las ceramidas en la propagación de neurodegeneración asociada con A β .

2.11. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) produce vesículas con doble membrana en la fase estacionaria de crecimiento, que contienen DNA cromosómico y la proteína protectora del DNA Dps

Marta Almirón¹, Ludmila de Arauco E Sá², Camila De Ferrari², Norberto Sanjuan²

¹Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. ²Laboratorio de Microscopía Electrónica y Patología Experimental. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Aires.nasanjuan@gmail.com

Tanto las bacterias como las células eucarióticas pueden liberar vesículas que intervienen en la interacción con el medio y con otras células. En las bacterias Gram negativas las vesículas se originan de la membrana externa (OMVs) y contienen una variedad de enzimas, toxinas y fragmentos de ácidos nucleicos. Durante experimentos de caracterización de adhesinas en *Escherichia coli* enteroagregativa, observamos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) la liberación de vesículas de mayor tamaño que las previamente descritas (100-120 nm), con doble membrana y contenido electrón denso. El objetivo de este trabajo fue caracterizar esas estructuras empleando TEM y métodos biomoleculares clásicos. Se realizaron cultivos de la cepa 17-2 en caldo LB de los que se purificaron vesículas por ultracentrifugación y gradientes de sacarosa en diferentes tiempos post-inoculación (pi), desde 1 hora pi hasta 8 días pi. Tanto la tinción negativa cuanto los cortes ultrafinos de TEM demostraron la presencia de una doble membrana, a diferencia de las OMVs clásicas y mayoritariamente en la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Por geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones y Western blot se caracterizaron algunas proteínas contenidas en las vesículas, como Flagelina y adhesinas pero, especialmente, la proteína Dps, que es protectora del DNA cromosómico. El ácido nucleico en el interior de las vesículas fue caracterizado como DNA cromosómico por el método RAPD. Se concluye que *Escherichia coli* enteroagregativa libera vesículas rodeadas por ambas membranas de la bacteria y que contienen DNA cromosómico asociado a la proteína Dps, especialmente durante la fase estacionaria. Se plantea que este podría ser un mecanismo de sobrevivencia en condiciones desfavorables del medio en estas bacterias no esporuladas.

2.12. El reconocimiento específico de vesículas extracelulares por anticuerpos modula la función de las células inmunes de forma dependiente del receptor para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G

Otero A¹, Pérez P¹, Russo C¹, Seery V¹, Sananez I¹, Ostrowski M¹, Arruvito L¹.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA. UBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. adrianvotero@gmail.com

Antecedentes: Las vesículas extracelulares (VEs) son vesículas de tamaño nanométrico, con membrana lipídica, que intervienen en la comunicación entre células e influyen en condiciones fisiológicas y patológicas. Debido a su capacidad para transferir componentes bioactivos las VE se exploran cada vez más como potencial blanco terapéutico. Sin embargo, aún se desconoce si las VE pueden formar complejos inmunes con anticuerpos (CI) y, en caso afirmativo, qué función podrían ejercer.

Objetivo: Determinar las consecuencias funcionales del reconocimiento por anticuerpos de un antígeno presente en la superficie de VE en células inmunes portadoras del receptor para el fragmento Fc de la IgG (FcγR).

Métodos: Se utilizaron células de un linfoma de células B (línea celular Ramos) que liberan VEs portadoras de la molécula CD20 y el anticuerpo terapéutico anti-CD20 Rituximab (RTX) para generar CI (EVs+RTX). Las VEs se aislaron mediante la técnica de ultracentrifugación y se caracterizaron por western blot, citometría de flujo basada en microesferas, análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La formación del CI se confirmó mediante citometría de flujo y tinción con proteína A-oro coloidal. Se expusieron neutrófilos purificados a VE y/o CI y se analizó la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). La citotoxicidad mediada por células NK se evaluó sobre las células blanco K562 en presencia de VE y/o CI mediante citometría de flujo.

Resultados: Las EVs purificadas, derivadas de células Ramos, presentaban las características propias de EVs, es decir, estructura en forma de copa en microscopía electrónica, enriquecimiento para proteínas marcadoras de EVs como ALIX, CD63, CD81, HLA-DR y CD107a y una distribución de tamaño de $90,53 \pm 27,01$ nm. Es importante destacar que las EVs también portaban la proteína CD20, molécula marcadora de células B reflejando la expresión de esta proteína en las células parentales. Confirmamos que estas EVs, tras su exposición al anticuerpo terapéutico anti-CD20, formaban complejos inmunes, como revelaron la inmunomarcación con oro coloidal (n=1) y la citometría de flujo basada en microesferas (n=5). También observamos que la exposición a las VE promovió la producción de ROS, tanto espontánea como inducida por PMA, en los neutrófilos ($p < 0,01$, n=9), que fue potenciada en presencia del CI (n=4). Mientras que las VE aisladas disminuyeron la citotoxicidad mediada por células NK ($p < 0,001$, n=9), la adición del CI la aumentó ($p < 0,01$). El bloqueo de las células NK con anticuerpos neutralizantes anti-CD32 y CD16

disminuyó el índice de citotoxicidad, lo que demuestra que el efecto observado se debe, al menos en parte, a la activación específica de estos receptores.

Conclusiones: En conjunto, nuestros datos describen que el reconocimiento específico de un antígeno expresado en las VEs por anticuerpos modifica el efecto de las mismas VEs cuando este CI interactúa con células inmunes portadoras de receptores Fc-gamma. Se necesitan más estudios para evaluar cómo este novedoso concepto combina el efecto de las VE como agentes biológicos con la terapia de anticuerpos monoclonales.

2.13. Vesículas extracelulares provenientes de bacterias benéficas y patógenas modulan la virulencia de *Xanthomonas campestris* (XCC) en plantas

Dana A. Garacoche¹, Carolina Barnech¹, María Isabel Bianco², Pablo Marcelo Yaryura³, María Cecilia Ciolai¹, Federico Coluccio Leskow^{1,4}, Florencia Malamud^{1,4,*}

¹UNLU, departamento de Ciencias Básicas. ²Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. César Milstein", Fundación Pablo Cassará CONICET. ³CIT-VM, CONICET, UNVM. ⁴CONICET. *flomalamud@gmail.com

Numerosos estudios han demostrado que las vesículas extracelulares (VE) juegan un importante rol en la comunicación entre células. Estas pueden ser de la misma o de diferentes especies. Además, también se ha visto que son utilizadas en la comunicación entre reinos incluyendo la comunicación entre hospedador y patógenos humanos. Por el contrario, no existe un consenso en la función que estas vesículas tienen durante la interacción planta-patógeno. Por este motivo en este trabajo proponemos estudiar vesículas provenientes tanto de bacterias fitopatógenas como de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la infección con *Xcc*.

Xanthomonas campestris es una bacteria que causa la podredumbre negra de las crucíferas que ocasiona grandes pérdidas económicas mundialmente. Se han reportado trabajos en donde se han aislado vesículas de estas bacterias (OMV, por *outer membrane vesicles*). Las bacterias pertenecientes a *Bacillus* spp son bacterias PGPR, y se encontró que son capaces de producir VE, con alta concentración de bactericidas, proteínas antimicrobianas y enzimas. *Bacillus velezensis* VMA11m se aisló de la rizósfera de plantas de tomate sanas en Córdoba.

En este trabajo aislamos tanto vesículas extracelulares de *B. velezensis* VMA11m como de *Xanthomonas*. Ambas demostraron tener una función biológica. Inhibiendo la infección de *Xcc* en plantas de *Arabidopsis thaliana* y de rabanito (*Raphanus sativus*).

2.14. Uso de vesículas extracelulares para aliviar los efectos del estrés crónico

Giuliana Torchiana, Catalina Logan, Silvia Billi, Marcela A. Brocco, Melisa C. Monteleone

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) – CONICET. Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN-UNSAM). mmonteleone@iib.unsam.edu.ar

Los trastornos mentales afectan alrededor de mil millones de personas y uno de sus agentes causales es el estrés crónico. El mismo produce una hipersecreción de glucocorticoides que puede provocar alteraciones cognitivas y del estado de ánimo. En particular, el suero de individuos estresados contiene proteínas relacionadas con el estrés y las enfermedades neuropsiquiátricas, varias de ellas transportadas por vesículas extracelulares (VEs). Entre ellas, hemos identificado a M6a, una proteína neuronal sensible al estrés cuya expresión se reduce en el hipocampo de animales estresados. Nuestro objetivo fue estudiar si la modulación de los niveles de M6a en las VEs y su administración pueden aliviar algunos de los efectos nocivos inducidos por el estrés. Aislamos VEs de la línea celular de hipocampo HT22y para modular los niveles de M6a usamos dos estrategias: 1- tratamiento del cultivo con el glucocorticoide sintético dexametasona (DEX) y 2- carga de las VEs con un plásmido codificante de M6a (VEs-M6a). Las células tratadas se evaluaron por inmunocitoquímica o Western blot y qPCR y las VEs fueron aisladas del medio de cultivo por ultracentrifugación.

Ambos tratamientos, DEX y VEs-M6a, aumentaron los niveles de M6a en las células respecto al control. Además, la administración intranasal en ratones naive (no estresados) mostró que después de 24 h los animales tenían una mejora en su rendimiento en la prueba de nado forzado. Evaluaremos entonces si la administración de VEs con niveles modificados de M6a a animales expuestos a estrés crónico puede aliviar algunas de las consecuencias del estrés. Presentamos aquí una fuente in vitro de VEs cargadas que podrían utilizarse como tratamiento alternativo a los trastornos inducidos por el estrés.

2.15. Proyecto de trabajo: implicancias terapéuticas de las vesículas extracelulares gliales en la enfermedad de Huntington

Julieta Saba, Federico López Couselo, Carla Mariana Caruso

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), UBA-CONICET, Paraguay 2155, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. jsaba@fmed.uba.ar

La enfermedad de Huntington (HD) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la muerte selectiva de neuronas del estriado y corticales, que producen una pérdida progresiva de las funciones motoras y cognitivas. Ocurre una mutación en la proteína huntingtina (Htt) que se agrega y se acumula principalmente en neuronas, pero también en astrocitos. Los astrocitos proporcionan apoyo nutritivo y metabólico para las neuronas, mientras que en condiciones neurodegenerativas alteran la expresión de factores que perjudican la supervivencia neuronal. Las vesículas extracelulares (EVs) son pequeñas estructuras membranosas heterogéneas derivadas de células que surgen del sistema de endomembranas o se desprenden directamente. Resultados previos indican que las EVs gliales reducen los agregados de Htt mutada (Httm) y antecedentes del laboratorio muestran que el medio condicionado de astrocitos (MCA) tratados con BDNF protege a neuronas del estriado que expresan Httm de la muerte por disfunción mitocondrial. Creemos que es probable que las EVs contenidas en el MCA, sean las responsables de la neuroprotección observada. Por lo tanto, nuestro objetivo es caracterizar las EVs producidas por astrocitos de tipo salvaje (WT) y de ratones zQ175 (HD) tratados con y sin BDNF y estudiar su posible acción terapéutica sobre modelos in vitro de HD. Identificamos por western blot, diversos marcadores de EVs y además observamos la morfología de las EVs por microscopía electrónica. Luego, analizaremos el efecto de EVs obtenidas de ratones WT o HD con y sin BDNF sobre neuronas que expresan o no Httm, se cuantificará la viabilidad neuronal y se medirá su efecto sobre la formación de agregados de Httm. Por último, se evaluará sobre astrocitos WT el efecto de EVs obtenidas de neuronas que expresan Httm. El estudio integral de las EVs liberadas por astrocitos y por neuronas, será crucial para establecerlos como herramientas terapéuticas para prevenir la neurodegeneración.

2.16. La secreción de vesículas extracelulares varía a lo largo del ciclo de vida del parásito cestodo *Echinococcus multilocularis*

María Eugenia Ancarola^{1,2}, Lucas Maldonado^{1,2}, Lucía García^{1,2}, Johannes Herbig³, Sonja Horvat³, Antonio Marcilla⁴, Krystyna Albrecht³, Laura Kamenetzky⁵, Klaus Brehm⁶, Marcela Cucher^{1,2}

¹Departamentode Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ²Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ³Department of Functional Materials for Medicine and Dentistry and Bavarian Polymer Institute (BPI), University of Würzburg, Würzburg, Germany. ⁴Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Universitat de València, València, Spain. ⁵Laboratorio de Genómica y Bioinformática de Patógenos, iB3 | Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional, Departamento de Fisiología Y Biología Molecular Y Celular, Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ⁶Institute of Hygiene and Microbiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany. meancarola@gmail.com

La comunicación intercelular entre parásitos y hospederos es esencial para el desarrollo de la infección y la supervivencia del patógeno. Esta interacción está regulada por productos de excreción/secreción, como las vesículas extracelulares (VE). *Echinococcus* spp. es un género de parásitos cestodos (filo *Platyhelminthes*) causantes de la equinococosis. El ciclo de vida involucra carnívoros cánidos, que alojan al estadio adulto en el intestino y liberan huevos al ambiente junto con las heces. Los hospederos intermediarios son herbívoros que se infectan al consumir oncósferas en vegetales contaminados. El metacestodo (MC) es una vesícula rellena de un fluido interno que contiene protoescólices (PE) y se desarrolla en órganos viscerales. Los PE se activan al ser ingeridos por el hospedero definitivo y se diferencian a adultos en el intestino. El hombre actúa como hospedero intermediario accidental. En este trabajo comparamos la secreción de VE en distintos estadios del ciclo de vida de *Echinococcus multilocularis* mantenidos en cultivo *in vitro*.

Realizamos cultivos axénicos de cultivo celular primario, MC y PE no activados y activados y aislamos las VE del sobrenadante de cultivo. Se analizó la presencia de VE por microscopía electrónica de transmisión y se cuantificaron por análisis de seguimiento de partículas. Se determinó que el MC secreta más VE hacia el medio intra-parasitario (>20 veces) que al medio extra-parasitario. Además, los PE activados secretan una población de VE de mayor tamaño respecto a los PE no activados. El contenido proteico de las VE indica la presencia de proteínas clásicas de VE, así como de marcadores de biogénesis de VE. Por último, se observó que una línea celular de hepatocitos es capaz de internalizar VE de cultivo celular primario *in vitro*.

Estos resultados demuestran que la secreción de VE en *E. multilocularis* podría tener distinta relevancia de acuerdo al estadio larval y que su secreción varía a lo largo del ciclo de vida del parásito.

2.17. Extracellular vesicles of first trimester trophoblast cell line induced antiinflammatory signals in HB cell and circulating monocytes: regulation of VIP/VPAC2 system

Daniel Paparini¹, Esteban Grasso¹, Facundo Aguilera^{1,2}, Brenda Lara¹, Vanesa Hauk¹, Fátima Merech¹, Claudio Schuster², M. Agustina Arslanian³, Victoria Lella³, Cesar Meller³, Marcelo Martí², Rosanna Ramhorst¹, Daiana Vota¹ & Claudia Pérez Leirós¹

¹Immunopharmacology lab. Department of Biological Chemistry, School of Sciences, University of Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET. Ciudad Universitaria, Pab. 2, (1428) Buenos Aires, Argentina. ²Bioinformatic Lab. Department of Biological Chemistry, School of Sciences, University of Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET. Ciudad Universitaria, Pab. 2, (1428) Buenos Aires, Argentina. ³Obstetric Service, Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina. daniel.paparini@gmail.com

Aims: Trophoblast cells release microvesicles and exosomes (Ex) that regulate target cell function during pregnancy. We have previously shown the regulatory role of vasoactive intestinal peptide (VIP) and their VPAC receptors in human first trimester placenta and in trophoblast cell lines (Tb). Also, we reported that the overexpression of VPAC2 receptors in Tb increase cell migration and invasion. Here we studied the effect of extracellular microvesicles released by Tb overexpressing VPAC2 (Tb-VPAC2) on the phenotype and metabolism of human placental Hofbauer cells (HB) and circulating monocytes (Mo) of non-pregnant (NP) or pregnant (P) women at term.

Methodology: Ex were characterized after isolation by differential centrifugation from Swan 71 cell line basal or transfected with VPAC2 receptor or with empty vector (EV) as control. NP peripheral blood Mo were obtained from healthy female donors and P Mo from normal pregnant women at term along with homologous HB cells from placental tissue by enzymatic digestion. HB and Mo were cultured with Ex to assess phenotypic profile, and glucose uptake by flow cytometry.

Results: Tb Ex increased the production of CD39 and CD36, molecules associated to an anti-inflammatory profile, ATP and lipid metabolism respectively in HB cells ($P < 0.05$). Tb-VPAC2 secrete fewer small Ex (50 to 90 nm) and lower total Ex proteins than control cells. Tb-VPAC2-Ex reduced CD40 production but increased CD163 in CD14+ HB vs. control Ex ($*P < 0.05$). Moreover, Tb-VPAC2 Ex decreased 20% glucose uptake in HB ($*P < 0.05$) compared with control Ex. Similar results were observed in NP and P Mo. Furthermore, increased endothelial cell migration was induced by Ex from Tb-VPAC2 which expressed lower levels of the anti-angiogenic gene TSP-1.

Conclusions: Results suggest a regulatory role of exosomes from Tb and Tb-VPAC2 on HB and Mo that promote an M2-like signals accompanied by endothelial cell migration, consistent with a favoring role of VPAC2 Ex at placentation.

2.18. Secreción de EVs por tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* como mecanismo de evasión del sistema inmune

Lucas Caeiro, Valeria Tekiel

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN), UNSAM-CONICET. San Martín, Buenos Aires, Argentina. valet@iib.unsam.edu.ar; vtekiel@gmail.com

El tripomastigote (tryp) es el estadio sanguíneo circulante de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Durante la infección *in vivo* los tryp circulantes (BloodTryp) están adaptados para sobrevivir en circulación, evadir el sistema inmune y establecer la infección. Sin embargo, la mayor parte de los estudios se realizan con tryp derivados de células *in vitro* (CulTryp), muy ineficientes para establecer infecciones *in vivo*. En el presente trabajo realizamos un análisis proteómico comparativo de BloodTryp, CulTryp y sus EVs, de una cepa de *T. cruzi* muy virulenta. Los BloodTryp fueron purificados a partir de sangre de animales infectados, y las EVs obtenidas por shedding (6 hs, 37°C) y ultracentrifugación (100000xg; 16 hs). El mismo procedimiento se realizó con sangre de animales no infectados (control), CulTryp y sus EVs. Cada condición fue procesada por triplicado en un Q Exactive HESI-Orbitrap acoplado a nano HPLC Easy-nLC 1000 (CEQUIBIEM, FCEyN, UBA). Los datos crudos se analizaron contra bases de datos de *T. cruzi* y *Mus musculus*, con PatternLab for Proteomics. De las proteínas identificadas en las muestras *in vitro*, 305/1210 fueron compartidas entre CulTryp y EVs; el término más frecuente en las exclusivas de EVs fue “pathogenesis” (GO analysis). Entre BloodTryp y sus EV sólo se encontró un núcleo menor de proteínas compartidas (18/117); la mayor parte de proteínas de *T. cruzi* identificados en EVs de BloodTryp fueron factores de virulencia y/o relacionadas con la evasión del sistema inmune (TS grupo II y V, GP63). Por otro lado, entre las proteínas de ratón identificadas solamente en EVs, se encontraron mayoritariamente proteínas relacionadas con el sistema inmune (complemento (23/97) [vía clásica, alternativa y lectinas] y anticuerpos (41/97)), indicando que los BloodTryp estarían sheddando proteínas de ratón a través de la secreción en EVs, para evadir la acción del sistema inmune. Además, identificamos marcadores de EVs de mamíferos en BloodTryp (70/139), lo que sugiere una posible comunicación interespecie mediante EVs y/o la evasión del sistema inmune por mimetismo molecular. En conjunto, este trabajo nos permitió identificar nuevos factores de virulencia y potenciales blancos de intervención, y entender mejor la biología de *T. cruzi* y su interacción con el hospedador *in vivo*.

2.19. MicroRNAs de vesículas extracelulares plasmáticas como biomarcadores de fibrosis en pacientes con hepatitis C crónica

Victoria Cairoli¹, Daniel Valle-Millares², Amanda Fernández-Rodríguez², María Victoria Preciado¹, Pamela Valva¹

¹Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas (IMIPP-GCBA-CONICET) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Dr. Ricardo Gutiérrez, CABA, Buenos Aires, Argentina. ²Laboratorio de Referencia e Investigación en Hepatitis Viricas, Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España. valvapamela@gmail.com

Las vesículas extracelulares (VE) han adquirido gran importancia en la medicina de precisión como posible herramienta para evaluar el daño hepático en pacientes con hepatitis C crónica (CHC). Los microRNAs (miRNAs) de las VE serían potenciales biomarcadores de daño dado su rol esencial en la regulación de la expresión génica y, en consecuencia, en el proceso de fibrogenesis. El objetivo del trabajo fue caracterizar la firma de miRNAs de VE plasmáticas en pacientes con CHC con distintos estadios de fibrosis hepática y evaluar su rol como biomarcadores de daño hepático.

Se purificaron VE de plasma de 50 pacientes con CHC [36 % fibrosis significativa ($F \geq 2$)] con *exoRNeasy kit* (QIAGEN). que se caracterizaron por microscopia electrónica (ME) de transmisión y cryo-ME y por NTA. Luego, se extrajo el RNA enriquecido en miRNAs, se secuenció masivamente, se identificaron los miRNAs y se realizó el análisis de expresión diferencial significativa (SDE) [*fold change* (FC) ≥ 1.5 ; p-valor ajustado (p.adj) ≤ 0.2] con respecto a la severidad de la fibrosis. Mediante el análisis de curvas ROC se evaluó el valor diagnóstico de los SDE miRNAs y de un *score* generado mediante un modelo de regresión logística múltiple que los incluye.

La ME reveló la presencia de partículas esféricas con un diámetro medio de 130 nm. No se observaron diferencias significativas en el tamaño [$F < 2$: 172,2 nm (155,7; 186,7), $F \geq 2$: 175,1 nm (162,5; 192,2), $p = 0,287$] o concentración [$F < 2$: 5,5E09 partículas/ml (4,2E09; 1E09), $F \geq 2$: 5.2E09 partículas/ml (4.0E09; 7.1E09), $p = 0.897$] de las VE entre estadios de fibrosis. El SDE entre estadios de fibrosis 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). Ambos miRNAs mostraron un moderado poder para discriminar casos $F \geq 2$ (AUROC_{miR-122-5p} = 0,746; AUROC_{miR-92a-3p} = 0,767). Sin embargo, el *score* generado con ambos miRNAs mostró un excelente poder discriminativo (AUROC = 0,858, sensibilidad: 100%, especificidad: 74,1%).

Los pacientes con CHC con diferentes estadios de fibrosis hepática presentan perfiles específicos de miRNAs en VE plasmáticas. Esta firma específica permite la evaluación de los VE-miRNAs como posibles biomarcadores pronóstico y diagnóstico.

2.20. Analysis of thyroid hormone effects on the release of extracellular vesicles and their role in chemotherapy response in breast cancer

Johanna Díaz Albuja¹, Pablo Fagúndez², Juan Pablo Tosar², Mateo Campos Haedo¹, María Mercedes Debernardi¹, Gonzalo Gonzalez¹, Florencia Menay¹, Graciela Cremaschi¹, María Celeste Díaz Flaqué¹

¹*Instituto de Investigaciones Biomédicas BIOMED-UCA-CONICET.* ²*Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400, Montevideo, Uruguay.* diazalbuja@gmail.com

Chemoresistance is a major cause of cancer treatment failure. Extracellular vesicles (EVs) from resistant cells have been associated with the transfer of drug resistance to sensitive cells. Many breast cancer cells acquire multidrug resistance (MDR) by upregulating the level or activity of membrane proteins such as MDR1, which enables the exclusion of cytotoxic substances from the intracellular environment. Previously we have demonstrated that thyroid hormones (THs) modulate Doxorubicin response in T lymphoma cells. However, related to the chemoresistance of breast cancer cells, little is known about TH-induced mechanisms that influence tumor chemotherapy response. To this aim we first generate and characterized MDA-MB-231 Doxorubicin-resistant cells (MDA-DR). In these cells, we found that THs induce the expression of proteins involved in drug response such as MDR1, BCRP, and CYP3A4 ($p < 0,05$). In addition, we found that THs induce the release of EVs of 80-400 nm in size, as could be seen by nanoparticle analysis and transmission electron microscopy. In these EVs, we found protein expression of MDR1 and BCRP, the major proteins involved in the efflux of cytotoxic agents in breast cancer. Also, CD44 protein, associated with MDR1 transfer from vesicles to cells, was also found by western blot. Interestingly, the transfer of these EVs to doxorubicin-sensitive MDA-MB231 cells modulates the tolerance of sensitive cells to this drug.

In conclusion, THs regulate the release of EVs and their protein cargo, containing MDR-transporters that could transfer drug tolerance to sensitive breast cancer cells.

2.21. Transmisión de resistencia antimicrobiana mediante vesículas extracelulares tipo exosoma en *Giardia*

Luna Pizarro G¹, Laiolo J^{1,2}, Salas N¹, Touz MC¹

¹Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.

²Laboratorio de parasitología, Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Católica de Córdoba. Córdoba.
glpizarro@immf.uncor.edu

El parásito *Giardia* es el agente causal de la parasitosis intestinal conocida como giardiasis, la cual se asocia a elevadas tasas de fracaso terapéutico, en gran parte debida a la aparición de cepas resistentes. La generación de resistencia puede ocurrir de forma espontánea en pacientes, pero también se puede producir *in vitro* aumentando gradualmente la concentración de la droga a la cual se exponen los trofozoítos. Los principales medicamentos antiparasitarios utilizados para tratar la giardiasis pertenecen a la familia de los 5-nitroimidazoles, siendo el metronidazol (MTZ) su principal representante. La relación entre los mecanismos de comunicación extracelular mediados por vesículas extracelulares y la adquisición de resistencia a drogas está siendo profundamente estudiada. En este trabajo, nos propusimos conocer si la comunicación extracelular mediada por EIVs (del inglés: exosome-like vesicles) ocurre en los ensamblajes de *Giardia* patogénicos para humanos y evaluar su rol en la transferencia de resistencia a MTZ. Para ello, generamos *in vitro* trofozoítos resistentes a MTZ mediante selección y subclonado. Luego, aislamos EIVs provenientes de las células resistentes, mediante filtración y ultracentrifugación, y, posteriormente, marcamos la membrana de los EIVs con la sonda fluorescente BODIPY-FL-C5-ceramida. Primero, incubamos distintas cepas salvajes con las EIVs marcadas y visualizamos si eran efectivamente internalizadas. Luego, realizamos ensayos de viabilidad celular, basados en la técnica de reducción de MTT, y determinamos las concentraciones inhibitorias 50 (CI50). Los resultados mostraron, por un lado, que la comunicación extracelular mediada por EIVs ocurre en *Giardia* entre trofozoítos salvajes y trofozoítos resistentes a MTZ e incluso entre trofozoítos de diferentes cepas. Más importante, se observó un aumento de la CI50 de los trofozoítos incubados con EIVs provenientes de trofozoítos resistentes, indicando una clara participación de las EIVs en la adquisición de resistencia a MTZ. Estos resultados proporcionan evidencia directa de la influencia de las EIVs en la adquisición de resistencia a un medicamento clave para tratar la giardiasis. Esto tiene implicancias tanto para la comprensión de la biología del parásito como para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas.

2.22. Estudio de vesículas extracelulares como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

Michela Tecco Ruiz, Mónica Remedi, Laura Gastaldi, Gonzalo G Guendulain, Alfredo Cáceres, Ana Lis Moyano

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, Argentina. ana.moyano@iucbc.edu.ar

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas. Aunque se desconocen los mecanismos biológicos por los que se produce el daño cerebral, en la EA se presentan dos características neuropatológicas principales: la acumulación del péptido beta amiloide ($A\beta$) en placas seniles (extracelulares) y de la proteína tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares (intracelulares) que afectan distintas regiones del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, no existen técnicas de detección ni biomarcadores clínicos para el diagnóstico temprano (antes de la aparición de síntomas neurológicos) ni el seguimiento de pacientes con EA. Las vesículas extracelulares (VEs) son mensajeros que participan en la comunicación de células del SNC y pueden dirigirse a múltiples células blanco dentro y fuera del cerebro. El análisis del contenido de las VEs podría reflejar la actividad y el estado fisiológico o patológico del SNC. El **objetivo** de este proyecto es caracterizar de forma integral el uso potencial de VEs como biomarcadores de EA utilizando células madre pluripotentes inducidas humanas obtenidas de pacientes con EA hereditario. El análisis del contenido de las VEs podría brindar un método de diagnóstico simple, económico y seguro, con la potencialidad de abrir nuevas posibilidades para el estudio, seguimiento y tratamiento presintomático de pacientes con EA.

2.23. Estudio de vesículas extracelulares derivadas de células madre humanas como efectores biológicos de mecanismos regenerativos en condiciones desmielinizantes

Gonzalo G. Guendulain, Laura Gastaldi, Mónica Remedi, Alfredo Cáceres, Ana L. Moyano

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, Argentina. ana.moyano@iucbc.edu.ar

Las vesículas extracelulares (VEs) son un grupo heterogéneo de nanovesículas (50-250 nm) que participan en la comunicación intercelular mediante el transporte de moléculas bioactivas. En medicina regenerativa existe un gran interés en el uso de VEs derivadas de células madre como alternativa a la terapia celular, ya que exhiben una actividad biológica similar al trasplante de células madre, presentan menor inmunogenicidad, son más fáciles de manipular y no forman teratomas. En modelos animales de patologías del sistema nervioso central (SNC) las VEs derivadas de células madre neurales humanas (hNPC-VEs) promueven procesos regenerativos y restablecen funciones neurológicas. Sin embargo, *se desconocen qué componentes bioactivos asociados a VEs son determinantes de estos mecanismos regenerativos*. Resultados preliminares de nuestro laboratorio revelan que las VEs de rosetas neurales (hNR-VEs), derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs), reducen la desmielinización y la degeneración de axones en un modelo de desmielinización *ex vivo*. Mediante el análisis del perfil de proteínas por espectrometría de masa encontramos que las hNR-VEs transportan componentes neurogliales que podrían explicar parcialmente sus efectos biológicos en condiciones desmielinizantes. El **objetivo general** de este proyecto es caracterizar de forma integral la contribución en el transporte y la transferencia de componentes neurogliales mediado por VEs para determinar sus efectos biológicos en condiciones desmielinizantes.

2.24. Puesta a punto del aislamiento de vesículas extracelulares a partir de materia fecal y plasma, para su estudio en la comunicación inter-reino en el marco de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Sofía Quesada^{1,2,4}, Ayelén D. Rosso^{1,2,4}, Ma. Jimena Cerezo³, Renata A. Spiazzi³, Ma. Carolina Conlon³, Claudia Milano³, Alberto Penas-Steinhardt^{1,2,4,5}, Fiorella S. Belforte^{1,2,4,5}

¹Lab. de Genómica Computacional, Dto. Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján (GeC-UNLu). ²Programa de Estudios de Comunicación y Señalización Inter-Reino (PECSI-UNLu). ³Servicio de Gastroenterología, Hospital Nacional A. Posadas. ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. sofyq0624@gmail.com

INTRODUCCIÓN: Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) representan un trastorno crónico complejo, poligénico y de etiología desconocida. Se cree que podrían ser resultado de una respuesta desregulada del sistema inmune a la microbiota comensal. Con el fin de estudiar la comunicación inter-reino entre las células de nuestro organismo y de nuestro microbioma, nos propusimos aislar vesículas extracelulares (EVs), decodificar los mensajes que transportan e intentar encontrar en dichos mensajes biomarcadores que nos permitan establecer un seguimiento y pronóstico de la enfermedad. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Las EVs se aislaron de dos matrices: Fracción Acelular de Materia Fecal (FAMF) y la Fracción Acelular de Sangre Periférica (FASP). Se probaron dos tipos de aislamientos, uno con kit comercial *Total Exosome Isolation Kit* (from serum) de Invitrogen y el otro con una secuencia de ultracentrifugación (UC) en colchón de sacarosa y filtrado. Se compararon las eficiencias de los distintos aislamientos por DLS, TEM y calidad/cantidad de RNA obtenido. Además se probaron distintas estrategias de extracción de RNA para aumentar el rendimiento y mejorar la calidad del mismo. La integridad del RNA se evaluó a través del equipo Fragment Analyzer, en el INTA Castelar. **RESULTADOS:** Comparando la calidad y cantidad de RNA obtenido de los aislamientos con kit y con UC no se observaron diferencias entre ambos métodos. El volumen de muestra inicial resultó no alterar la cantidad de RNA final obtenida. Se logró optimizar el aislamiento por UC de manera tal de llegar a obtener EVs en la FAMF de tamaños de alrededor de 400 nm, y en la FASP de 200 nm. **CONCLUSIONES:** Los mencionados resultados sientan una base experimental a partir de la cual continuar con los aislamientos individuales de las muestras de pacientes para el screening y posterior validación de biomarcadores moleculares asociados a EVs en población de pacientes con EII.

2.25. Diseño de un ingrediente alimentario con probióticos para optimizar el efecto inmunomodulador de vesículas extracelulares producidas por *Lactiseibacillus casei* BL23

Rocío Corfield¹, Ana Paula Dominguez Rubio², Carolina Schebor^{1*}, Oscar E. Pérez^{2*}

¹Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ, UBA-CONICET). Universidad de Buenos Aires. Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. ²Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN-UBA-CONICET). Universidad de Buenos Aires, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. oscarperez@qb.fcen.uba.ar, cschebor@gmail.com

Lactiseibacillus casei BL23 es una cepa que ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y antitumorales. Se ha postulado que *L. casei* BL23 una vez llegada al intestino podría liberar vesículas extracelulares (VEs), las cuales generarían una modulación en la respuesta inmune. Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta interesante generar ingredientes o alimentos que vehiculicen a *L. casei* BL23 hasta el intestino con el fin de que liberen VEs y generen beneficios para la salud. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es diseñar ingredientes deshidratados constituidos por *L. casei* BL23, fructooligosacáridos (FOS) y Maltodextrina (MD) y posteriormente evaluar el potencial efecto inmunomodulador que podrían ejercer las VEs liberadas por *L. casei* BL23 post digestión *in vitro*. Se destaca que el uso de FOS en la formulación de los ingredientes presentaría un doble beneficio dado que por un lado favorecería al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de algunas bacterias benéficas del tracto gastrointestinal, incluyendo a *L. casei* BL23, y por otro lado, presentaría un efecto tecnológico sobre los ingredientes dado que junto con la MD aportaría los sólidos suficientes para generar ingredientes fisicoquímicamente estables. Para llevar a cabo este trabajo, el plan consiste en mezclar suspensiones de *L. casei* BL23, con soluciones de FOS y MD y posteriormente secarlas mediante secado por aspersion o liofilización. A continuación, se planea: 1) evaluar la influencia de los constituyentes de los ingredientes en relación con la producción de VEs y la actividad inmunomoduladora y 2) evaluar la viabilidad de *L. casei* BL23, así como la actividad inmunomoduladora que presentan los ingredientes post digestión gastrointestinal en un modelo *in vitro* de células intestinales. Entre los resultados, se espera que *L. casei* BL23 aumente su producción de VEs post digestión *in vitro* debido a los FOS y que por tanto se observe mayor respuesta inmune.

2.26. Impacto de la infección por *Brucella abortus*, *Brucella suis* Y *Brucella melitensis* en la respuesta inmune innata y la liberación de vesículas extracelulares por la placenta

Lucia Zavattieri¹, María Noe García ¹, Daniel Grasso¹, Florencia Muñoz González¹, Pablo C Baldi¹, Natalia Szpilbarg², Mariana C Ferrero¹.

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

La inmunidad placentaria resulta crucial para el bienestar fetal en la gestación, ya que los patógenos invasores se transmiten de la sangre materna al feto a través de este órgano. No obstante, respuestas inflamatorias excesivas en la placenta pueden ser perjudiciales tanto para el feto como para la madre gestante. Las vesículas extracelulares (VE), estructuras membranosas vitales en la inmunidad placentaria, son generadas por los trofoblastos placentarios y regulan la tolerancia inmunológica hacia el feto y la propia placenta, pero también pueden desencadenar respuestas inflamatorias. Las infecciones por *Brucella* están ligadas a complicaciones reproductivas en humanos y animales. Investigamos el impacto de la infección por *B. abortus* y *B. melitensis* en la respuesta inmunitaria innata de la placenta y la producción de VE, mediante un modelo de explantos de placenta humana a término infectados *ex vivo*. A las 18 horas postinfección, recolectamos sobrenadantes de cultivo para determinar citoquinas, quimiocinas y MMP por ELISA comerciales y zimografía, respectivamente. Las "VE pequeñas" se aislaron por ultracentrifugación de sobrenadantes de cultivo de explantos infectados y no infectados.

Nuestros hallazgos revelan que la infección con *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* inducen la producción de MCP-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β y se observa producción de actividad colagenasa total y actividad MMP

El análisis de microscopía electrónica de transmisión reveló la presencia de VE pequeñas esféricas con doble membrana. Resultados iniciales indican que las VE de explantos infectados con *B. melitensis* son más pequeñas que las del control no infectado ($p < 0.05$), según se determinó por DLS. Las VE pequeñas en placentas infectadas con estas especies de *Brucella* o no infectadas resultaron en poblaciones positivas para CD63, otras positivas para CD81 y otra población positiva para ambos marcadores en microscopía de fluorescencia. A continuación, proponemos evaluar el impacto de las VE pequeñas en placentas infectadas en la diferenciación, migración y modulación de la respuesta inmunitaria de monocitos/macrófagos, además de caracterizar el contenido proteico mediante proteómica.

En conjunto, estos resultados preliminares sugieren que la infección de explantos de placenta con *B. abortus*, *B. suis* o *B. melitensis* induce una respuesta inmunitaria innata y afecta el tamaño de las VE pequeñas liberadas.

2.27. Vesículas extracelulares de plasma como agentes proangiogénicos y promotores de la reparación tisular

María L. Leicaj, Alan M. Adamczyk, Martina P. Fabiano, Paula S. Pérez, Nadia Bannoud, Roberto A. Casale, Diego Croci, Matías Ostrowski.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), CABA, CONICET-UBA. ²Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos"(IHEM), Mendoza Capital, CONICET-UNCUYO. ³ Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Servicio de Obstetricia, El Palomar, Pcia. de Buenos Aires. luz.leicaj@live.com

La inflamación crónica altera el normal funcionamiento de los tejidos, siendo la causa subyacente de la patogénesis de un conjunto de enfermedades de creciente prevalencia. Recientemente demostramos que las vesículas extracelulares del plasma (VEp) de dadores sanos regulan la inflamación en macrófagos expuestos a PAMPs. Por lo tanto, nos propusimos indagar también en sus funciones pro-resolutivas.

Las VEp fueron obtenidas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) seguida de centrifugación a 30000 g durante 90 min. La identidad y pureza de las VEp obtenidas fue realizada por western blot, microscopía electrónica y NTA. Las VEp fueron utilizadas para estimular macrófagos primarios derivados de monocitos sanguíneos los cuales fueron simultáneamente expuestos a los PAMPs, LPS (5ng/ml) o Resiquimod (R) (2ug/ml), respectivamente, por 24hs. La modulación de la expresión de genes relacionados con angiogénesis/reparación tisular (VEGF, HB-EGF, TIMP1, MMP9, SERPIN-E1, SERPIN-F1, CD300e, CD93, RGS2) fue analizada mediante PCR cuantitativa. A su vez, se evaluó en el sobrenadante de los macrófagos expuestos a los diferentes estímulos la secreción de proteínas implicadas en reparación/angiogénesis, mediante dot blot. Finalmente, se analizó la capacidad de los sobrenadantes de macrófagos expuestos a los diferentes estímulos de promover la formación de túbulos y la expresión de marcadores de superficie en células HUVEC.

La presencia de VEPs indujo un aumento de la expresión de VEGF, HB-EGF, TIMP-1, MMP-9, SERP-E1, CD300, CD93, RGS2 y una disminución de SERP-F1. Asimismo, detectamos un aumento de liberación de VEGF y promoción de la tubulogénesis utilizando como estímulo sobrenadantes de macrófagos tratados con R+VEp/VEp. Finalmente, observamos una disminución de la marca de ICAM, V-CAM, VE-CADH en HUVEC estimuladas con sobrenadantes de R+VEp/VEp y, en las mismas muestras, se observó aumento de liberación de PF4 y THBS-1 mediante dot blot.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las VEp inducen en los macrófagos la expresión de factores proangiogénicos y su capacidad de promover la reparación tisular, incluso en ausencia de factores proinflamatorios. Estos hallazgos apoyan la utilización terapéutica de las VEp en la resolución de heridas crónicas.

2.28. Detección de biomarcadores de daño renal asociados con el síndrome urémico hemolítico (SUH)

Ana B. CELI², Noelia A. MELIAN³, Romina GLISONI⁴, Agostina PRESTA², Dante CITCIOGLU⁵, Analía LOPEZ DIAZ², Lucia GARBINI², Federico OCHOA^{1,5,6}, Elsa ZOTTA^{1,5,6}.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Laboratorio de Patología. (2) Conicet-Universidad de Buenos Aires. Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (Houssay-Ifibio), Buenos Aires, Argentina. (3) Conicet- Universidad de Buenos Aires. Departamento de Química Biológica-IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Argentina. (4) Conicet-Universidad de Buenos Aires. Departamento de Tecnología Farmacéutica, Instituto de Nanobiotecnología (Nanobiotec), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Argentina. (5) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de ciencias biológicas. Catedra de Fisiopatología. (6) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Unidad Académica 2. Laboratorio de Patología y Nefrología Experimental. annabe.celi@gmail.com

La toxina Shiga (Stx), producida por *E. coli*, es el principal agente etiológico responsable de causar el síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad se basa en la presentación clínica. La detección de biomarcadores asociados con el daño renal durante los primeros días de la diarrea sanguinolenta y antes de la aparición de los signos y síntomas podría ser crucial para iniciar un tratamiento oportuno y adecuado para mejorar el pronóstico. En informes anteriores, se mostró una disminución en la expresión de proteínas como Nefrina y Podocalixina en el diafragma de filtración en un modelo de SHU agudo a las 48 horas. También se observó proteinuria en la primera semana y a los 3 meses en un modelo subletal.

El objetivo de este estudio es identificar la presencia de proteínas provenientes del tejido renal en vesículas extracelulares de orina (VEs), que podrían ser consideradas como biomarcadores de daño renal. Para ello, ratas Sprague-Dawley (SD) con un peso entre 150 y 200 g fueron inoculadas por vía intraperitoneal con una dosis subletal de Stx. Las muestras de orina se recolectaron a las 96 horas posteriores a la inoculación para el aislamiento de VEs mediante centrifugación diferencial. Las VEs se caracterizaron en términos de identidad, cantidad y tamaño utilizando técnicas como Western blot con el marcador Alix, ensayo de ácido bicínico (BCA) y *Dynamic Light Scattering* (DLS). En las VEs del grupo experimental se identificó mediante inmunodetección la proteína NEPH-1, mientras que no se detectó en el grupo control.

Este estudio describe, por primera vez, el aislamiento de VEs derivados de la orina de ratas con HUS. Teniendo en cuenta que NEPH-1 forma un complejo con la Nefrina, que disminuye a las 48 horas y que únicamente se detectó en el grupo experimental, esta técnica podría servir como una herramienta para la detección temprana de daño renal.

Palabras finales: Perspectivas futuras del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares

El workshop finalizó con una asamblea abierta para todos los participantes de la jornada. Durante la misma, se plantearon y discutieron diferentes temas, que se resumen a continuación:

1) Organización Formal del Grupo:

- Se discutió sobre la posibilidad de conformar una sociedad (Sociedad Argentina de Vesículas Extracelulares), propuesta que fue desestimada por diferentes causas. Entre las principales, cabe resaltar el costo de establecer la sociedad y la complicación burocrática que ello implica.
- También se discutió y desestimó la posibilidad de sumarse a alguna sociedad biomédica ya existente. Esta propuesta se desestimó dado que no se acuerda en abonar una cuota a una sociedad que luego no le aporte al grupo.
- Se propuso la conformación de una Red CONICET.

Dos propuestas quedaron abiertas a la espera de que consigamos mayor cantidad de información para luego proceder a analizarla para tomar una decisión. Estas propuestas son:

- Conformación de una RED CONICET. Oscar Pérez se propone para hacer las averiguaciones respecto a este tema y compartirlas para el grupo para luego discutir si esta propuesta es acorde a nuestros intereses y expectativas.
- Organizar al grupo como una organización no gubernamental o como una asociación.

Carolina Poncini (cvponcini@gmail.com) realizó algunas averiguaciones al respecto y si bien son opciones más sencillas que las anteriores, ambas requieren un estatuto y asistencia jurídica/legal, lo cual representa un costo que, en principio, nuestro grupo no podría afrontar en este momento.

La propuesta que tuvo mayor aceptación durante la asamblea fue:

- Funcionar tal como estamos hasta ahora: como un grupo de científicos reunidos informalmente por el interés en el tema de Vesículas Extracelulares. Un punto importante que se discutió respecto a esta propuesta es la necesidad de organizarse en diversas comisiones (ver más abajo).

2) Integración de GAVE a la red latinoamericana de vesículas extracelulares y a ISEV.

Durante la discusión de este tópico, participó de forma virtual la Dra. Ana Claudia Torrecillas de la Universidad de San Pablo, Brasil, quién nos contó su experiencia en la organización de una sociedad y de la red latinoamericana de vesículas extracelulares. Asimismo, la Dra. Torrecillas demostró una alta predisposición de ella y de ISEV (de la cual ella es el vínculo con Latinoamérica) para una fuerte integración a nivel regional.

Respecto a ISEV, Matías Ostrowski, quien participó en el congreso de ISEV 2023, presentó formalmente el proceso de creación de GAVE. También se mencionó que el grupo ya se encuentra en la web de ISEV (figura como “Argentinean Group of Extracellular Vesicles), listado dentro de la red internacional de sociedades de EVs (Global EV Network (isev.org)).

3) Modalidad de comunicación entre la comunidad GAVE.

Se decidió que, por el momento, la comunicación entre los miembros del grupo se continúe realizando mediante evs-arg@googlegroups.com.

4) Propuesta de generación de comisiones y sus finalidades.

Se acordó que la forma más práctica y democrática de organizar las tareas del grupo es a través de comisiones, cuyos miembros se propongan voluntariamente. En algunos casos, durante la asamblea se definieron los miembros de las comisiones (se mencionan a continuación). Sin embargo, es de esperar que la cantidad de miembros de cada una de las comisiones se incremente cuando nuevos voluntarios decidan sumarse a cada comisión a través del envío de un email al grupo o a uno de los miembros ya propuesto.

En una próxima asamblea virtual se terminarán de constituir y organizar estas comisiones. A continuación, se mencionan las comisiones que fueron propuestas durante la asamblea, sus objetivos y las personas que las constituyen, en el caso de que ya haya sido definido.

a) Comisión de Seminarios Mensuales: La comisión se encargará de la organización de seminarios mensuales virtuales. Por el momento se vienen haciendo los últimos viernes de cada mes a las 13h a convenir con el disertante. Cualquier persona que desee dar un seminario ya puede contactar directamente a los miembros actuales de la comisión (Matías y Florencia), para ir armando una lista. Miembros: Matías Ostrowski (maostro@fmed.uba.ar) y Florencia Muñoz González (flor.mg@live.com.ar).

b) Comisión de cursos: Esta comisión estará encargada de la organización de cursos/talleres, y, por otro lado, de vincular personas de GAVE en cursos particulares donde se requiera una persona especializada.

Con respecto a este tema por el momento hay dos propuestas:

- Curso de microscopía electrónica: Norberto San Juan (nasanjuan@gmail.com) propone dar un taller/charla sobre la realización de microscopía TEM con una duración aproximada de 4 horas totales distribuidas en dos días, en modalidad virtual. Adicionalmente, Norberto invitó a la comunidad GAVE a realizar los preparandos previos a la visualización por TEM en su laboratorio en la Facultad de Medicina (UBA). En dicha facultad disponen de un TEM, cuyo uso cuesta alrededor de \$4000/h.

- Curso Brasil-Argentina: Matías Ostrowski junto con Ana Claudia Torrecillas (Brasil) van a organizar conjuntamente un curso de EVs a realizarse en Argentina a comienzos de 2024 sobre aspectos básicos metodológicos relacionados al aislamiento y caracterización de las Vesículas Extracelulares.

Se mencionó la importancia de buscar financiamiento para los cursos en diversas organizaciones (CABBIO; ICGEB, UBA, CONICET, otras universidades, etc.)

Miembros: Daniela Papademetrio (danilpapa@gmail.com)

c) Comisión de Difusión: Comisión encargada de la difusión de todas las actividades de GAVE, así como también lo que cada miembro de GAVE desee difundir relacionado a las EVs de sus actividades, resultados, etc. Esto incluye, página web (actualmente en construcción) y redes sociales como Instagram.

Respecto a la página web, Martín Rabassa indicó que compró el dominio (gavear.org), y que ya está en marcha el desarrollo de la página web.

Respecto al manejo del Instagram del grupo, actualmente se encuentra a cargo de Cecilia D'Antoni y Carolina Barnech.

Miembros: Cecilia D'Antoni (cecidantoni1@gmail.com), Martín Rabassa (mrabassa@med.unlp.edu.ar), Carolina Barnech (carobarnech88@gmail.com)

d) Comisión administrativa: Esta comisión se encargará de revisar/contestar los mails. Se tiene que decidir cuál es la cuenta que se va a usar, por el momento se está usando gave.arg@gmail.com y gave.arg@fmed.unlp.edu.ar; asimismo se siguen respondiendo mails de la cuenta que se usó para el workshop: gave.contact@gmail.com. Asimismo, la comisión se encargará de la coordinación entre las diferentes comisiones.

Miembros: Aún no cuenta con miembros

e) Comisión de gestión en CONICET: Esta comisión se encargará de averiguar posibilidades de crecimiento para GAVE. En este punto se plantearon dos propuestas:

- Matías Ostrowski propone la generación de un Laboratorio Central de Vesículas Extracelulares. Al respecto, Sergio Álvarez comenta de un programa del Ministerio de Ciencia y Técnica que da facilidades para el diseño/construcción de laboratorios.

Miembros: Matías Ostrowski (maostro@fmed.uba.ar), Sergio Álvarez (sealvar@email.unsl.edu.ar), Oscar Pérez (oscarperez@qb.fcen.uba.ar)

f) Comisión de organización de reuniones periódicas de GAVE: Esta comisión estará encargada de organizar la reunión anual/bianual de GAVE. Es una comisión que duraría un periodo y luego cambiaría. En este punto se propuso (a trabajar por la comisión):

3. Reunión cada 2 años
4. Reunión anual, un año organizado por GAVE y otro por alguna sociedad (como la reunión anual de las sociedades biociencias).

Miembros: Aún sin miembros

Fotografías del evento



Presentación del evento: (de derecha a izquierda): Dr. Oscar E. Pérez, Decano FCEyN (UBA) Dr. Guillermo Duran y la Subsecretaria de Transferencia Tecnológica de la FFyB (UBA) Dra. Gabriela Berg.



Algunos integrantes del Comité organizador del I Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares. Aula 1403 del Pabellón cero + infinito (FCEyN-UBA).



Asistentes del I Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares. Aula 1403 del Pabellón cero + infinito (FCEyN-UBA)



Asistentes del I Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares. Aula 1403 del Pabellón cero + infinito (FCEyN-UBA)



Sesión de posters en el Pabellón cero + infinito (FCEyN-UBA)



Sesión de posters en el Pabellón cero + infinito (FCEyN-UBA)



Foto grupal de GAVE y de los asistentes del I Workshop Anual del Grupo Argentino de Vesículas Extracelulares. Pabellón cero + infinito (FCEyN-UBA)