

Trabajo Final de Grado para la Licenciatura en Ciencias Biológicas

# **Caracterización del perfil de vesículas extracelulares producido por una línea celular trofoblástica (Swan-71) en respuesta a diversos estímulos inflamatorios.**

Camila Tosar Lewin

Tutora: Dra. Paula Arbildi

Co-tutor: Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin

Unidad Asociada de Inmunología - IQB - Facultad de Ciencias

Área Inmunología - DEPBIO - Facultad de Química

Departamento de Inmunología - Instituto de Higiene

Universidad de la República.

Montevideo, 2025

## **Agradecimientos**

Gracias a Paula y a Gustavo, por no solo guiarme y acompañarme en este camino, sino que hacerlo con una inmensa apertura y calidez, haciéndome sentir bienvenida y parte desde el primer momento. Por lo mates, las charlas y el entusiasmo compartido.

Gracias a Jenny y Amy, por tomarse el tiempo de leer y corregir este trabajo.

Al laboratorio de Inmuno y a todos mis compañeros de la Casita de Adelante, por el encuentro, las risas y el compañerismo, que alivianaron frustraciones y cansancios. Particularmente, gracias a Ana, por las horas de compañía y aliento en el NTA.

Gracias a mis amigos, por escucharme, enseñarme y acompañarme a ser.

Especialmente a mis amigas, por ser sostén y refugio, por el amor y el cuidado, por, con su ternura, ayudarme a construirme. Gracias a Jaz, Lu L, Euge, Majo, Clari, Lu B, Naty y Guille. A cada una de ellas le estoy inmensamente agradecida.

Gracias a mi familia, por apoyarme con entusiasmo en todas mis decisiones y confiar en mis caminos; por darme las oportunidades y herramientas para tomar estas decisiones. A mi padre, por su escucha y su calma. A mi madre, por su fuerza, su fuego y su abrazo. A mi hermano, por las risas y recordarme que nada es tan importante. A Boniato, mi perro, por la alegría, y a Curry, mi gato, por su compañía constante durante largas jornadas de estudio.

A mis abuelas, mujeres de una fortaleza inigualable. Gracias por inspirarme.

A mi abuelo, por las charlas, por compartir la sabiduría.

A la tribu festiva de tíos y primos.

A la comunidad que hace a la Facultad de Ciencias, estudiantes, docentes, funcionarios, y al Centro de Estudiantes de Ciencias, por enseñarme a pensar críticamente y en colectivo, por enseñarme que lo sólido se construye en red y con muchas manos diferentes.

A la Universidad de la República por la educación crítica y de calidad.

Gracias a todos quienes, hoy o ayer, trotan, caminan, saltan, o se arrastran conmigo.

## Índice

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
Vesículas extracelulares y su estudio	6
Vesículas extracelulares en la gestación	11
Vesículas extracelulares trofoblásticas en embarazos patológicos	14
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Condiciones de cultivo	18
Mantenimiento celular	18
Criopreservación y recuperación de la línea celular	19
Tratamiento del cultivo celular	19
Preparación de antígenos solubles de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Ensayos de viabilidad celular	20
Ensayo de MTT	20
Ensayo de reducción de la resazurina	21
Enriquecimiento de vesículas extracelulares	22
Análisis del perfil de vesículas extracelulares	22
Cuantificación de citoquinas	23
Estadística	23
RESULTADOS	24
Puesta a punto de un protocolo para la evaluación del perfil de VEs liberadas por Swan-71	24
Optimización de parámetros para el análisis por NTA	24
Puesta a punto de ensayos de viabilidad celular	28
Determinación de las condiciones de cultivo para obtención de VEs derivadas de Swan-71.	30
Caracterización del perfil basal de VEs producidas por la línea celular Swan-71	32
Respuesta a estímulos inflamatorios	33
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	45
BIBLIOGRAFÍA	46

## RESUMEN

Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras delimitadas por membranas lipídicas liberadas por las células como parte de sus mecanismos de comunicación intercelular, con capacidad para modular procesos fisiológicos o patológicos en células receptoras. Su biogénesis y composición molecular determinan estos efectos y dependen del estado de la célula de origen. Durante el embarazo, la comunicación intercelular es clave para sostener procesos complejos como el establecimiento de la interfaz materno-fetal y la regulación del sistema inmune materno. En este contexto, el trofoblasto (tejido embrionario en estrecho contacto con células maternas) libera VEs que median el diálogo materno-fetal, modulando respuestas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Actualmente, la información disponible acerca de VEs trofoblásticas en contextos de infección es limitada, y no se han reportado estudios que evalúan su perfil ante la exposición de *Toxoplasma gondii*, patógeno causante de la toxoplasmosis, la segunda infección intrauterina más frecuente.

En este sentido, el objetivo de este trabajo es establecer condiciones experimentales para el estudio *in vitro* del perfil de VEs producido por la línea celular trofoblástica de primer trimestre Swan-71, en respuesta a estímulos inflamatorios de distinta naturaleza: TNF- $\alpha$  como modelo de estímulo proinflamatorio general y antígenos solubles de *Toxoplasma gondii* como modelo de estímulo infeccioso. Para esto, se optimizaron las condiciones de cultivo para la obtención de VEs, y los parámetros para el análisis de estas mediante rastreo de nanopartículas (NTA, ViewSizer 3000). Además, para monitorear el estado del cultivo, se implementaron ensayos de viabilidad celular y, en ciertos casos, se evaluó la liberación de citoquinas.

Los resultados obtenidos permitieron estandarizar un sistema experimental definido para el análisis de VEs liberadas por Swan-71. Se obtuvieron condiciones de análisis por NTA que permitieron una caracterización consistente, se validaron ensayos para el monitoreo de la actividad celular, y se definieron condiciones de cultivo que aseguraron la adecuada obtención de VEs para su evaluación. Bajo estas condiciones definidas, se logró por primera vez caracterizar el perfil basal de VEs liberado por Swan-71 mediante NTA, obteniéndose

distribuciones de tamaño consistentes con lo reportado para células trofoblásticas. Frente a  $\text{TNF-}\alpha$  y antígenos solubles de *T. gondii*, se indujeron respuestas celulares detectables (disminución moderada de la actividad metabólica y aumento en la liberación de IL-6, respectivamente), sin afectar significativamente la viabilidad del cultivo ni el perfil de VEs liberadas.

En conjunto, este trabajo establece un sistema reproducible para el estudio por NTA de VEs liberadas por la línea celular Swan-71, permitiendo caracterizar su perfil vesicular basal y constituyendo un punto de partida para la investigación del rol de estas VEs durante la inflamación y la infección.

# INTRODUCCIÓN

## Vesículas extracelulares y su estudio

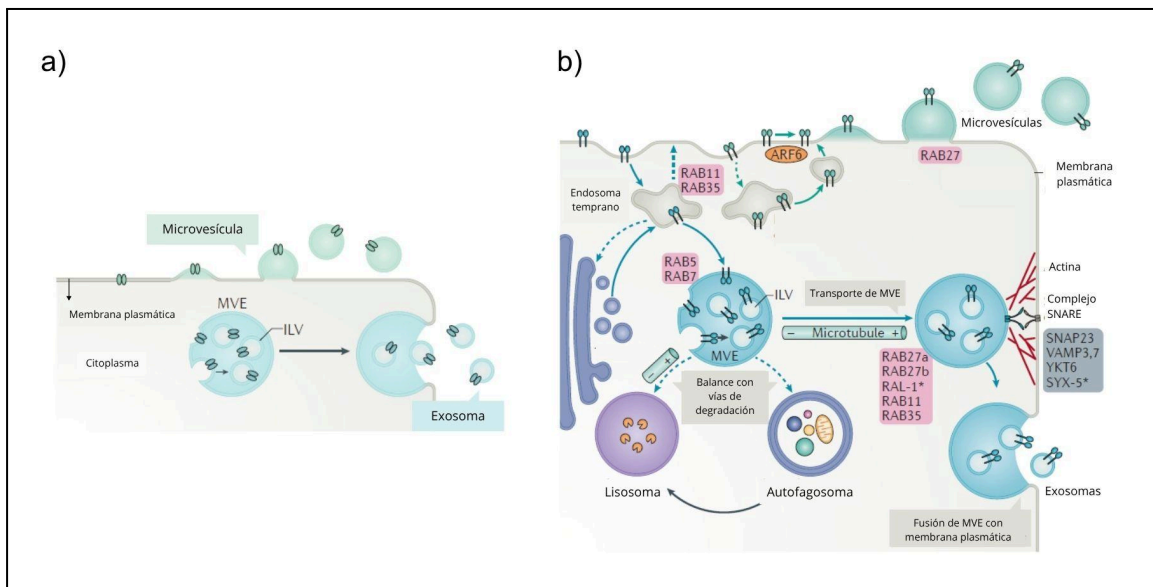
Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras liberadas por células, delimitadas por membranas lipídicas en las cuales se empaquetan diversas biomoléculas, y sin capacidad de autorreplicación (1). Son generadas en el interior celular y luego liberadas al espacio extracelular, donde, al llegar a células blanco, actúan como señales mediadoras de comunicación intercelular. Según los componentes presentes en ellas, tienen la capacidad de modular la actividad celular afectando el desarrollo de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Un ejemplo de esto último es la regulación de la expresión génica post-transcripcional en la célula blanco mediada por microARNs y ARN mensajeros transportados por VEs (2,3).

El término vesículas extracelulares engloba una gran diversidad de estructuras, con diversos tamaños, contenido, composición de membrana y orígenes. Según su biogénesis pueden clasificarse dos tipos principales: exosomas y microvesículas.

Además las células apoptóticas, también liberan una gran diversidad de estas estructuras lipídicas a partir de diferentes procesos biogénicos, tales como ampollas apoptóticas generadas por gemación externa de la membrana plasmática, cuerpos apoptóticos o VEs derivadas de la fragmentación de apoptopodios (2).

Los exosomas se generan como vesículas dentro del lumen de endosomas por gemación interna de su membrana, dando lugar a endosomas multivesiculares, una estructura intermedia del sistema endosomal. Este proceso es mediado por maquinarias celulares particulares, las cuales se asocian a microdominios en la membrana del endosoma para generar su gemación y fisión. Otras maquinarias también reclutan y seleccionan los componentes citosólicos a ser empaquetados por los exosomas a estos microdominios. La secreción de los exosomas, requiere del transporte intracelular de los endosomas multivesiculares hacia la membrana celular para su fusión, permitiendo la liberación de las vesículas intraluminales (exosomas) al medio extracelular (3).

Las microvesículas son generadas por la gemación externa de la membrana plasmática celular, liberándose directamente al espacio extracelular. Su formación y liberación ocurre en respuesta a diversas señales mediadas por la concentración aumentada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para que el proceso de gemación ocurra, se requieren cambios en la composición proteica y lipídica de la membrana, que permitan su deformación y la reestructura del citoesqueleto de actina subyacente. Los componentes citosólicos por empaquetar se asocian al lado interno de la membrana en el sitio de gemación (3) (**Figura 1**).



**Figura 1. Vías de biogénesis de microvesículas y exosomas.** Adaptado de “Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles”, Van Niel et al. 2018 (3). a) Esquema general del origen celular de microvesículas y exosomas. b) Se detalla biogénesis de exosomas y el sistema endosomal celular. ILV: vesículas intraluminales; MVE: endosomas multivesiculares.

La definición de esto dos subtipos por abordajes metodológicos no es sencillo, sus tamaños se superponen (los exosomas pueden tener un tamaño de 30 a 100 nm, y las microvesículas de 50 a 1000 nm), sus morfologías son similares, y actualmente no existen marcadores proteicos universales ni protocolos que permitan diferenciar las vías de biogénesis. Los protocolos utilizados actualmente para la obtención de VEs resultan en una mezcla heterogénea de vesículas de biogénesis desconocidas. Debido a esto y para evitar un uso incorrecto de la terminología, se recomienda utilizar el genérico “vesículas extracelulares”, seguido de los términos descriptivos definidos en caso de ser necesario (por ejemplo, haciendo referencia a su tamaño o densidad, como “VEs pequeñas”); la nomenclatura

referida a la biogénesis debe usarse solo en presencia de evidencia sólida que la respalde (1,3). Además, la investigación en VEs enfrenta múltiples desafíos y complejidades metodológicas, entre ellos la adecuada separación de partículas no vesiculares, la unificación de la nomenclatura y la caracterización de sus poblaciones. En vistas del rápido avance de este campo, surge con mayor fuerza la necesidad de contar con directrices mínimas que permitan la estandarización de su estudio, favoreciendo el rigor metodológico, la reproducibilidad y transparencia de los resultados obtenidos en el trabajo en este campo de estudio (1).

El trabajo con VEs involucra ciertos pasos comunes y esenciales: elección de una muestra de partida desde la cual se obtendrán VEs, separación, concentración y caracterización de VEs. Luego pueden desarrollarse estudios relacionados a su liberación e impacto en otras poblaciones celulares por estudios funcionales (1).

La separación y concentración de VEs puede realizarse por diversas metodologías basadas en diferentes características biofísicas de estas partículas, como su tamaño, densidad, carga y componentes de superficie (marcadores específicos). Una metodología ampliamente utilizada es la ultracentrifugación diferencial. Esta permite, mediante la aplicación de fuerza centrífuga, la separación por tamaños dentro de una muestra que contiene VEs, y de la cual las células donantes o tejidos ya han sido eliminados por centrifugaciones previas de menor velocidad. Este proceso, como muchos otros de separación, no logra un aislamiento total de VEs, sino que muchas veces estas son co-aisladas junto con nanopartículas de tamaños similares (como por ejemplo partículas de lipoproteínas o ribonucleoproteínas) (1). Por lo tanto, términos tales como “muestra enriquecida en VEs” pueden ser más apropiados para referirse al producto obtenido luego de la separación y concentración de VEs.

Por otro lado, una vez obtenida la muestra enriquecida en VEs, su caracterización impone nuevos desafíos. Estos se deben a: la heterogeneidad molecular y de tamaños de las partículas en la muestra, y la falta de especificidad por VEs de muchas de las técnicas utilizadas para su caracterización. Para sortear estas dificultades, se recomienda la utilización de métodos ortogonales (métodos que no presentan las mismas limitaciones de medida). La caracterización de las VEs en la muestra puede implicar: la cuantificación del número de

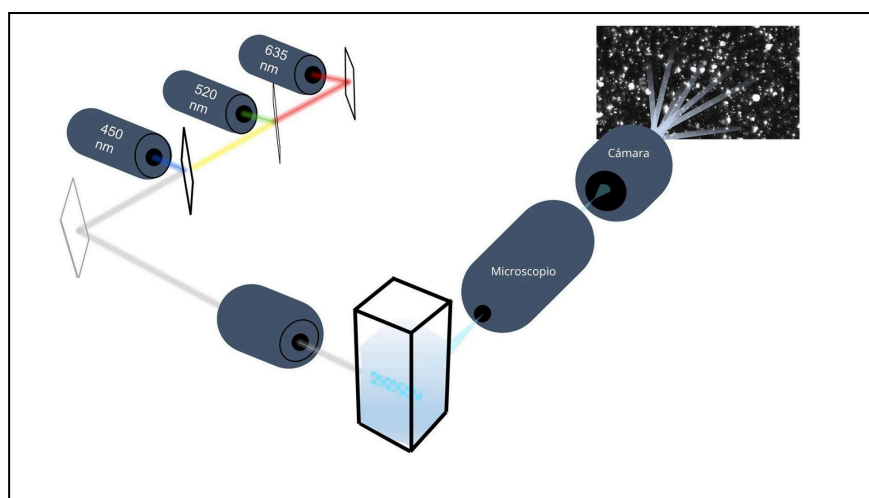


partículas, su tamaño, la cuantificación de proteína, lípidos y/o ARN totales, la evaluación de su morfología, la determinación de su composición proteica, entre otros (1).

Una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de muestras de VEs es el rastreo de nanopartículas o NTA por sus siglas en inglés (*Nanoparticle Tracking Analysis*). Esta técnica permite estimar la distribución de tamaño y concentración de partículas de una muestra, superando dificultades presentes en otros métodos ópticos para la caracterización de nanopartículas en suspensión, como el DLS (*Dynamic Light Scattering*).

El NTA se basa en la capacidad de rastrear el movimiento browniano de las partículas individuales en suspensión, para determinar su coeficiente de difusión, y a partir de este calcular el diámetro de cada partícula por la ecuación de Stokes-Einstein. Para esto, un láser monocromático atraviesa la suspensión, y la luz dispersada por las partículas presentes en ella es registrada en video por una cámara instalada sobre un microscopio óptico. A partir del video registrado, se rastrea el desplazamiento de cada partícula en función del tiempo (4–6) (**Figura 2**). Esta técnica presenta múltiples ventajas, como su realización en fase líquida (lo cual evita la disrupción de las propiedades fisicoquímicas de las VEs estudiadas) la fácil preparación de la muestra y la capacidad de recuperación de la misma luego de realizadas las medidas. Sin embargo, una de sus principales ventajas, es la capacidad de evaluar poblaciones de nanopartículas heterogéneas en tamaño dentro de una misma muestra (muestra polidispersa), lo cual no es posible mediante DLS, el cual ha sido por varias décadas uno de los principales métodos para la evaluación de tamaños de nanopartículas (7).

El DLS sigue principios similares al NTA, registrando la dispersión de la luz y evaluando el movimiento browniano de partículas suspendidas. Sin embargo, el DLS solo otorga datos fiables cuando un solo tamaño de partículas está presente en la suspensión (muestra monodispersa), y sus medidas se ven influenciadas por las partículas más grandes cuando una muestra polidispersa es evaluada. El NTA logra evitar esta limitante al considerar a las partículas de forma individual, permitiendo la evaluación de muestras polidispersas. Además, el NTA, a diferencia del DLS, permite una visualización en tiempo real de las partículas analizadas, permitiendo detectar si un fenómeno de agregación estuviera presente (6,7).



**Figura 2. Esquema del equipo de NTA ViewSizer 3000 (HORIBA).** El sistema óptico de este equipo utiliza tres láseres con diferentes longitudes de onda (635, 520 y 450 nm) que atraviesan la muestra. La luz dispersada por las partículas es captada por una cámara acoplada a un microscopio, lo que permite la proyección digital de la imagen aumentada. Adaptado de “Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles”. Comfort et al. 2021(5).

A pesar de sus ventajas, una de las mayores limitaciones del NTA para la caracterización de VEs (también presentada por el DLS) es que no es un método específico para la detección de VEs, sino para partículas en determinado rango de tamaño, pudiendo detectar también partículas co-aisladas no vesiculares (como lipoproteínas o complejos proteicos) en la muestra analizada. Debido a esto, los resultados obtenidos por esta técnica deben ser considerados cuidadosamente. Por ejemplo, al hacer referencia a las medidas obtenidas por NTA es correcto referirse a “partículas” (o “nanopartículas”) y no estrictamente a “vesículas extracelulares”. Además, actualmente no se ha podido establecer un límite de detección claro para el NTA (1).

El ViewSizer 3000 (HORIBA), el instrumento de NTA a utilizar en este trabajo, fue recientemente introducido al mercado y logra, a través de mejoras en hardware y software, sobreponerse a diversas limitaciones en equipos anteriores. Su actualización más destacada es la inclusión de tres láser (450 nm, 520 nm y 635 nm), permitiendo el análisis simultáneo de la muestra con tres longitudes de onda y, en consecuencia, la obtención de información sobre un rango más amplio de tamaños de partículas dentro de una misma muestra (5) (Figura 2).

## Vesículas extracelulares en la gestación

El potencial de las VEs en la comunicación intercelular cobra especial relevancia en procesos que requieren de un alto nivel de diálogo celular entre poblaciones celulares, tales como la generación y establecimiento de la interfaz materno-fetal en el embarazo.

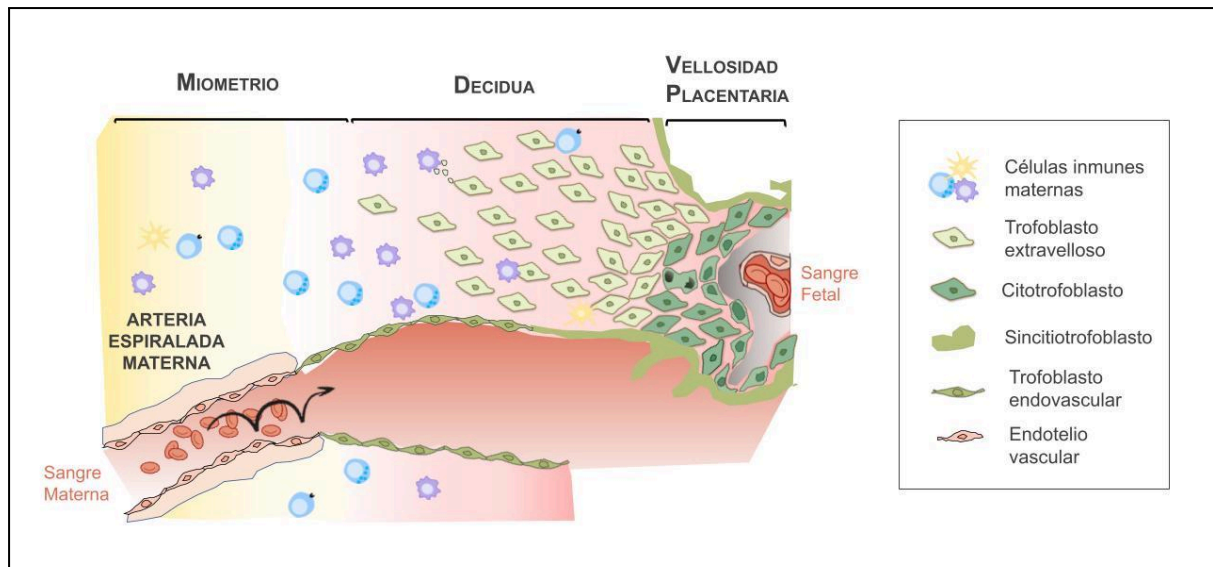
El desarrollo del embarazo es acompañado por una serie de adaptaciones inmunológicas particulares que permiten la tolerancia, desarrollo y protección del feto, mientras mantienen la homeostasis inmune. Por un lado, el sistema inmune de la mujer gestante debe adaptarse para acompañar los diversos cambios fisiológicos que ocurrirán a lo largo de la gestación. Por otro, la presencia de aloantígenos paternos en el feto podrían provocar su rechazo por el sistema inmune materno, por ende, es crucial el desarrollo de la tolerancia frente a los mismos, al tiempo que deben mantenerse defensas competentes para continuar protegiendo a la madre frente a diversos patógenos (2,8).

Para sostener esta compleja regulación y adaptación inmune en el embarazo, a lo largo del proceso intervienen diferentes mecanismos en la interfaz materno-fetal, en el cual el diálogo entre células maternas y fetales resulta clave. Algunas de estas adaptaciones incluyen: la disminución de la actividad citotóxica de las células natural killer uterinas (uNK), la polarización de macrófagos deciduales a un fenotipo alternativo M2, el aumento de células T reguladoras, la liberación de citoquinas inmunosupresoras, entre otros (2,9). Debido a su estrecho contacto con células maternas, el trofoblasto se destaca por desempeñar un papel fundamental promoviendo y regulando muchas de las adaptaciones mencionadas (**Figura 3**).

El trofoblasto es un tejido embrionario clave en los procesos de implantación y placentación, que interactúa con las células maternas contribuyendo a la formación de la interfaz materno-fetal. Asimismo, se diferencia en diversos subtipos especializados, tales como sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto y trofoblasto extravelloso (10).

La modulación inmune llevada a cabo por el trofoblasto puede darse tanto a nivel local como sistémico. Los procesos de modulación inmune en el cual participa el trofoblasto son

múltiples, estando mayormente estudiados los desarrollados a nivel del microambiente uterino (11). Sin embargo, recientemente, está siendo mayormente considerada la liberación de material fetal proveniente del trofoblasto (vesículas extracelulares, ADN fetal libre y células fetales), pudiendo impactar tanto a nivel local como sistémico por su liberación a la circulación materna (11).



**Figura 3. Representación de la interfaz materno-fetal.**

Particularmente, las vesículas extracelulares se han identificado como mediadores centrales del diálogo intercelular necesario para diferentes procesos fisiológicos durante el embarazo, tales como la implantación, la decidualización, y el establecimiento de la interfaz materno-fetal, transportando proteínas inmunorreguladoras, antígenos fetales, ARN y lípidos (2,12). En la circulación de mujeres gestantes se ha identificado un aumento de concentración de VEs a medida que progresa la gestación llegando a aumentar hasta 50 veces en comparación con mujeres no embarazadas (13). Este incremento en la concentración de VEs es atribuida principalmente a VEs provenientes del trofoblasto (14), las cuales son identificables por la presencia de marcadores proteicos propios de dicho tejido, como las moléculas HLA-G (proteína solo presente en el trofoblasto extravascular) (15) y PLAP (fosfatasa alcalina placentaria) (14).

Las vesículas extracelulares derivadas del trofoblasto pueden provenir de diferentes vías de biogénesis (16) y ejercer efectos locales, al interactuar con células de la decidua y el

miometrio, o bien alcanzar la circulación materna y distribuirse hacia órganos sistémicos y tejidos linfoides. Estas han demostrado desempeñar un papel relevante en el desarrollo del embarazo, contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de la tolerancia materno-fetal (17–19) y a la regulación de las distintas etapas gestacionales, caracterizadas por perfiles inmunológicos específicos. Este efecto es logrado mediante la interacción de estas VEs con diversos tipos celulares, a través de componentes de membrana y citosólicos que modulan múltiples actividades celulares —como la migración (20)— con impacto sobre sus funciones inmunes, promoviendo fenotipos tolerogénicos o inflamatorios según el contexto.

En embarazos saludables predomina una modulación inmune hacia un fenotipo tolerogénico o inmunosupresor. En este contexto, numerosas evidencias muestran cómo las VEs trofoblásticas, mediante moléculas citosólicas o de membrana reconocidas por células inmunes maternas, regulan la actividad y capacidad de respuesta de estas últimas. Por ejemplo, se ha observado *in vitro* que la presencia del ligando NKG2D en VEs disminuye la actividad citotóxica de células NK, T CD8+ y T  $\gamma\delta$  al inducir la internalización de sus receptores NKG2D (21). Asimismo, la presencia de sincitina-1 en VEs reduce la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células maternas (22), entre otros ejemplos.

También se hipotetiza que las VEs podrían contribuir al establecimiento de un fenotipo tolerogénico a nivel sistémico, al transportar antígenos fetales junto con moléculas inmunomoduladoras hacia órganos linfoides, donde serían internalizados por células presentadoras de antígenos y posteriormente presentados a linfocitos maternos, induciendo en estas un estado tolerogénico frente a antígenos fetales (2).

Además de sus funciones tolerogénicas, se plantea que las VEs trofoblásticas en un embarazo sano también pueden favorecer un fenotipo inmunológico más activo o inflamatorio, de acuerdo con la etapa del embarazo, dado que las fases iniciales y finales se caracterizan por un microambiente inflamatorio (2).

## **Vesículas extracelulares trofoblásticas en embarazos patológicos**

El estado celular es un factor determinante que influye directamente en el proceso de liberación de VEs, sus vías de biogénesis predominantes, así como su composición proteica, lipídica y de ácidos nucleicos (3). Consecuentemente, durante embarazos patológicos, que pueden deberse a causas infecciosas o no infecciosas, se observan alteraciones en las VEs liberadas desde la placenta, las cuales pueden desempeñar un papel activo, tanto como parte del mecanismo patológico o como defensa ante este (2,23).

Durante la gestación se pueden presentar patologías no infecciosas que afectan tanto la salud materna como fetal, tales como preeclampsia, diabetes gestacional, síndrome antifosfolipídico, entre otras. En varias de estas condiciones se ha observado un cambio en los patrones de liberación de vesículas extracelulares derivadas de la placenta, tanto en su perfil como en su contenido. Esta alteración principalmente favorece a la generación o el mantenimiento de un microambiente inflamatorio que contribuye al desarrollo de la patología (24–29).

En embarazos con preeclampsia, se ha documentado un cambio en el perfil, contenido y funciones bioactivas de las VEs placentarias, lo que favorece un ambiente inflamatorio. A partir de muestras obtenidas de embarazos preeclámpicos, se ha registrado un aumento en la liberación de VEs derivadas de la placenta (24), cambios en sus propiedades angiogénicas (28), así como un cambio en su contenido de microARN (24) y en su perfil lipídico. Este último hallazgo fue asociado con la capacidad de estas VEs de inducir la polarización de macrófagos hacia el fenotipo inflamatorio M1 (a diferencia del perfil tolerogénico tipo M2 que adquieren los macrófagos durante gestaciones sanas) (27). Asimismo en estudios que utilizan células trofoblásticas sometidas a condiciones de hipoxia como modelo de preeclampsia, se ha observado que las VEs liberadas por estas células presentan alteraciones en su contenido de ARN, las cuales se asocian con la activación de vías inflamatorias en células blanco (26).

Por otro lado, en estudios de diabetes gestacional y síndrome antifosfolipídico también se ha observado cambios en los patrones de liberación de VEs placentarias con impacto en la inflamación local. En este contexto, en embarazos que cursan con diabetes gestacional se ha

observado un aumento de VEs derivadas de la placenta y la capacidad de estas de aumentar la liberación de citoquinas proinflamatorias por células endoteliales del cordón umbilical (25). Además, en estudios *in vitro* se observó que el estímulo de líneas celulares trofoblásticas con anticuerpos antifosfolipídicos, genera tanto un aumento de la liberación de pequeñas VEs, como del contenido de microARNs activadores de TLR 7 y 8 presentes en ellas. Esto último produce un aumento de IL-8 en células endometriales expuestas a estas VEs, contribuyendo así a la generación de un ambiente inflamatorio (29).

Las patologías del embarazo de origen infeccioso pueden originarse tanto por infecciones maternas que generan un ambiente inflamatorio desfavorable, como por patógenos capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar directamente al feto. El primer caso ocurre ante una respuesta inflamatoria local o sistémica descontrolada frente a una infección no contenida, la cual puede alterar la función placentaria y comprometer el desarrollo fetal, aun sin existir transmisión vertical (30). El segundo caso implica la infección fetal y las complicaciones asociadas, y es causada por un grupo de patógenos particulares reunidos bajo el acrónimo TORCH (*Toxoplasma gondii*, Rubéola, Citomegalovirus, Herpes Simple Virus y otros) (31).

En ambos tipos de infección, resulta esencial mantener un balance entre factores pro/antiinflamatorios, tanto locales como sistémicos, para desplegar las respuestas inmunes necesarias contra el patógeno sin inducir respuestas que dañen la función placentaria o generen el rechazo inmunológico del feto implantado (32). En este contexto, es razonable intuir que mecanismos regulatorios como las VEs liberadas por la placenta se vean afectados. En cultivos de células trofoblásticas infectadas con Citomegalovirus se ha observado un cambio de expresión en varios marcadores de superficie de las VEs liberadas (33). Por otro lado, un estudio con una línea trofoblástica infectada con *Listeria monocytogenes* (bacteria que infecta la placenta y frente a la cual el embarazo constituye un estado de mayor vulnerabilidad), mostró que las VEs liberadas por el trofoblasto presentaron un cambio en su contenido de ARN, induciendo un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  llevando a una mayor susceptibilidad a la infección en células receptoras (34). Estos cambios podrían contribuir a la modulación de la respuesta inmune materna, ya sea a favor de las defensas maternas o a favor del patógeno para mantener su infección. Sin

embargo, existen pocos estudios que evalúen las características y el rol de la VEs derivadas del trofoblasto frente a una infección.

Las patologías del embarazo generadas por infecciones que logran alcanzar tejidos fetales son causadas por patógenos pertenecientes al grupo TORCH, que comprenden bacterias, virus o parásitos específicos adaptados para sortear los diversos mecanismos presentes en la interfaz materno-fetal que constituyen la barrera placentaria y así establecer la transmisión vertical de patógenos al feto, la cual puede tener graves consecuencias para su desarrollo.

Las barreras pueden ser tanto físicas, como químicas o celulares. Dentro de estas, el sincitiotrofoblasto tiene un papel esencial, por su naturaleza sincitial los patógenos no pueden atravesarlo debilitando uniones celulares, y posee una zona densa de filamentos de actina por debajo del borde apical que dificulta el anclaje e ingreso de microorganismos al tejido; protegiendo así los tejidos fetales subyacentes. Por otro lado, también existen barreras químicas constituidas por la secreción constitutiva de diferentes inmunomoduladores por parte del trofoblasto, que actúan de forma autocrina y paracrina, tales como IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$  (generados por la activación constitutiva del inflamosoma en el trofoblasto) y componentes antivirales (35). Estos últimos engloban a interferones de tipo III y microARNs antivirales, que son liberados a través de VEs, confiriendo resistencia a las células trofoblásticas y no trofoblásticas frente a infecciones virales (36).

Dentro de los patógenos TORCH, se encuentra el protozooario *Toxoplasma gondii*, el parásito intracelular obligado causante de la Toxoplasmosis, una de las infecciones parasitarias zoonóticas más prevalentes en todo el mundo y la segunda infección intrauterina más frecuente (37,38). En Uruguay la seroprevalencia es de 45,5% y tiene una tasa de transmisión congénita del 0,58% (37).

Si la infección es contraída durante el embarazo, el parásito puede ser transmitido al feto generando múltiples consecuencias que varían dependiendo de la edad gestacional al momento de la infección y el genotipo del parásito (37,38). En estos casos, las respuestas inmunológicas desencadenadas a raíz de la infección juegan un papel clave en determinar el destino de la infección. Por ejemplo, una respuesta inflamatoria materna de tipo Th1 puede, además de generar daños en la función placentaria, promover la transmisión vertical del parásito (32). Este hecho se debe a que las células inmunes de la decidua materna al



activarse en respuesta a *T. gondii* pueden infectarse y transportar al parásito a través del trofoblasto extraveloso; pudiendo infectar luego diversos tejidos fetales (36).

Las VEs placentarias liberadas durante la infección podrían jugar un papel clave en el establecimiento de las respuestas inmunes locales. En infecciones con *T. gondii* se ha reportado que tanto las VEs de origen parasitario como las del hospedero participan en la modulación de la interacción entre ambos. En este contexto, es particularmente relevante la capacidad de *T. gondii* para alterar la secreción de VEs en las células que infecta, favoreciendo así mecanismos de evasión o modulación de la respuesta inmune del huésped (32,39). Sin embargo, la posible alteración de la liberación de VEs por parte del trofoblasto frente a la infección por *T. gondii* aún no ha sido abordada, lo que constituye un aspecto de alto interés para comprender la inmunoregulación en la placenta.

En este trabajo se pondrá a punto, por primera vez en el país, una metodología para caracterizar el perfil de VEs liberadas en un modelo *in vitro* de trofoblasto ampliamente utilizado, la línea celular Swan-71. Para ello se empleará el equipo ViewSizer 3000, un sistema de análisis por rastreo de nanopartículas (NTA), único disponible en Uruguay. El desarrollo de esta metodología no solo permitirá evaluar si el perfil de VEs se modifica frente a estímulos patológicos de distinta naturaleza (TNF- $\alpha$ , como modelo de ambiente inflamatorio aumentado, y antígenos solubles de *T. gondii*, como modelo de patología de origen infeccioso), sino que además abrirá la posibilidad de explorar nuevos estudios sobre el diálogo celular en contextos fisiológicos y patológicos de la gestación.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es establecer las condiciones experimentales óptimas para el estudio *in vitro* del perfil de vesículas extracelulares (VEs), producido por la línea celular trofoblástica de primer trimestre Swan-71, en respuesta a estímulos inflamatorios.

Los objetivos específicos son:

1. Optimizar las condiciones de cultivo celular, enriquecimiento y análisis de VEs, para evaluar la producción de VEs en células Swan-71.
2. Analizar los perfiles de VEs producidas *in vitro* por células Swan-71 en respuesta a estímulos inflamatorios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de cultivo

#### *Mantenimiento celular*

La línea celular Swan-71, derivada de trofoblasto humano de primer trimestre fue gentilmente cedida por el Dr. Gil Mor de la Universidad de Wayne (EE.UU). Dicha línea se aisló a partir de una placenta normal de siete semanas y luego se inmortalizó mediante introducción de la subunidad catalítica de la telomerasa (40).

Los cultivos se mantuvieron en botellas de 25 o 75 cm<sup>2</sup> hasta llegar a un 80% de confluencia, en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12, Capricorn Scientific) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Capricorn Scientific) al 10% (v/v) y antibióticos (penicilina 6 mg/mL y estreptomicina 10 mg/mL), en condiciones estándar de 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en incubador humidificado (Esco Lifesciences). Para la realización de los ensayos, las células se despegaron con tripsina 2% (m/v) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 µM en amortiguador fosfato salino (PBS). Se contaron las células en cámara de Neubauer y la concentración se ajustó para el trabajo en placa de pozos según se indica en cada experimento.

Las células se mantuvieron en cultivo hasta llegar a 10-15 pasajes (según comportamiento de cultivo).

### *Criopreservación y recuperación de la línea celular*

En función de la preservación de la línea celular, se generó un banco de células conservado en nitrógeno líquido. Para esto se prepararon criotubos con suspensiones celulares de  $2 \times 10^6$  cel/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) 10% en SFB. Las alícuotas se dispusieron en un recipiente de congelado Nalgene® Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific) y colocadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , asegurando un enfriamiento lento hasta una temperatura final de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego de un mínimo de 24 horas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fueron transferidas a nitrógeno líquido.

Las alícuotas de células se descongelaron en baño de agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, de inmediato, se resuspendieron en 12 mL de DMEM-F12 a la misma temperatura. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 350 g a temperatura ambiente para obtener el pellet celular. Se mantuvo el cultivo celular en 12 ml de DMEM-F12, SFB 20% y antibióticos en botellas de  $75\text{ cm}^2$ , se renovó el medio (12 ml de DMEM-F12, SFB 20% y antibióticos) a las 24 h para eliminar células muertas o no adheridas. Al alcanzar un 80% de confluencia, las células se despegaron con tripsina 2% (m/v) EDTA  $1\text{ }\mu\text{M}$  y se dejó el 10% de las células del cultivo en DMEM-F12 con SFB 10% y antibióticos hasta alcanzar nuevamente el 80% de confluencia. En este punto se consideró el cultivo celular apto para emplear en ensayos.

### **Tratamiento del cultivo celular**

Para el cultivo de células Swan-71 en ausencia de suero fetal bovino (SFB), estas fueron inicialmente cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con SFB 10% y antibióticos por 16 a 24 h para permitir su adherencia. Una vez adheridas, se realizó un lavado con PBS y se realizó un cambio de medio a DMEM-F12 con antibióticos en ausencia de SFB. Los tiempos de incubación celular en ausencia de SFB, el sistema de cultivo utilizado y la cantidad de réplicas biológicas realizadas, se detallan para cada ensayo.

Para la incubación de células Swan-71 con estímulos inflamatorios, fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pozo, utilizando medio DMEM-F12 suplementado con SFB 10% y antibióticos por 16 a 24 h para permitir su adherencia. Una vez adheridas, se descartó el medio, se realizó un lavado con PBS y se incubaron con diferentes concentraciones de estímulos inflamatorios disueltos en

DMEM-F12 con antibióticos, en ausencia de SFB. Los estímulos inflamatorios evaluados fueron el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a 10 y 50 ng/ml, y antígenos solubles de *Toxoplasma gondii* a 3 y 30 ug/ml. Las células fueron incubadas a 24 y 48 h. Se incluyeron réplicas biológicas (el número de réplicas se detalla para cada experimento) y un grupo control sin estímulo inflamatorio.

## **Preparación de antígenos solubles de *Toxoplasma gondii***

Una muestra de parásitos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, cepa representativa del tipo I de *T. gondii* adaptada al cultivo *in vitro* (41), fue donada por el Laboratorio de Apicomplejos del Instituto Pasteur de Montevideo, y almacenada a -20 °C hasta su procesamiento. La muestra fue centrifugada a 350 g por 5 minutos a 4 °C, y resuspendida en 1 mL de PBS. Posteriormente, se realizó una sonicación de 15 ciclos de 10 s de pulso y 30 s de descanso, al 60% de potencia. Durante todo el procedimiento de sonicación la muestra se mantuvo en hielo. Para obtener los antígenos solubles de *T. gondii*, se realizaron una serie de centrifugaciones. En primer lugar se realizó una centrifugación de 15.000 g por 20 minutos a 4 °C, luego el sobrenadante obtenido fue sometido a una ultracentrifugación a 120.000 g por 80 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante con antígenos solubles libre de VEs. Este fue almacenado a -20 °C. Para la cuantificación proteica en el sobrenadante fue utilizado un ensayo de micro BCA.

## **Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad de los cultivos fue evaluada mediante dos ensayos colorimétricos distintos: ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y ensayo de reducción de la resazurina. Ambos determinan la actividad metabólica celular por un cambio en la absorbancia. La absorbancia en ambos ensayos fue medida en un lector de placas Labsystem multiscan MS.

### ***Ensayo de MTT***

En el ensayo de MTT la actividad metabólica se mide como la acumulación de formazán (cristales violetas insolubles en agua) producidos tras la reducción del reactivo MTT

mediante la acción de enzimas presentes en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (42).

Para la puesta a punto de esta técnica, se sembraron células en placas de 96 pocillos a diferentes densidades. Se incluyeron cuatro réplicas biológicas de las diferentes concentraciones y un control negativo sin células. Luego de adheridas (16 a 24 h luego del sembrado), se removió el medio y se incubó con el reactivo MTT diluido en PBS a 0,5 mg/mL, en un volumen de 200 uL por pocillo. La incubación fue realizada a diferentes tiempos para optimizar el protocolo. Para evaluar la acumulación de cristales de formazán, estos fueron solubilizados con dimetilsulfóxido (DMSO) para su posterior medida de absorbancia a 570 nm.

### *Ensayo de reducción de la resazurina*

El ensayo de reducción de la resazurina, se basa en la reducción de la resazurina por reductasas mitocondriales y/o citoplasmática produciendo resorufina. La acción de estas enzimas y por ende de la actividad metabólica, se observa como la disminución de resazurina en el medio (disminución de su absorbancia a 600 nm) y el aumento de resorufina (aumento de su absorbancia a 570 nm). Esta variación se interpreta mediante el cálculo del cociente  $\text{Abs } 570 \text{ nm} / \text{Abs } 600 \text{ nm}$ . A diferencia del ensayo de MTT, el sustrato y el producto son permeables a las membranas celulares y solubles en agua, por lo cual no requieren de un paso adicional de solubilización (43).

Para la puesta a punto de esta técnica, se sembraron células en placas de 96 pocillos a diferentes densidades. Se incluyeron cuatro réplicas biológicas de las diferentes concentraciones y un control negativo sin células. Luego de adheridas (16 a 24 h luego del sembrado), se removió el medio y se incubó con resazurina diluida en PBS a 50 ug/mL, en un volumen de 200 uL por pocillo.. La incubación fue realizada a diferentes tiempos para optimizar el protocolo, y se midió la absorbancia a 570 y 600 nm.

Para la evaluación de la viabilidad celular de las células cultivadas en ausencia de SFB y en presencia de estímulos inflamatorios, luego de retirar el sobrenadante se incubaron las células por 2 h con resazurina 50 ug/mL. El volumen de resazurina utilizado por pocillo fue de 500 uL en placas de 12 pocillos. Para todas las condiciones evaluadas se incluyeron

réplicas biológicas (el número de réplicas se detalla en cada ensayo) y sus respectivos controles.

## **Enriquecimiento de vesículas extracelulares**

Las vesículas extracelulares (VEs) fueron obtenidas a partir del sobrenadante de células incubadas en ausencia de suero fetal bovino (SFB), por 24 o 48 horas. Se considera el tiempo 0 como el momento del cambio de medio. Para enriquecer los sobrenadantes en VEs se adaptaron protocolos de centrifugación y ultracentrifugación previamente reportados (44). Los sobrenadantes obtenidos de las células se centrifugación a 400 g por 10 min a 4 °C, seguido por una centrifugación de 15.000 g por 20 min a 4 °C para separar células no adherentes y posibles debris celulares, recuperando el sobrenadante (fracción S15). Posteriormente, los sobrenadantes recuperados de estas centrifugaciones fueron sometidos a una ultracentrifugación a 120.000 g por 80 min a 4 °C en un equipo Sorvall MX 120 (Thermo Scientific), con seteo de aceleración y desaceleración a 9 y 5 respectivamente, para obtener el pellet (fracción P120). Se utilizó un rotor de ángulo fijo de 30° (S120-AT2) y un rotor oscilante (S52-ST). El pellet obtenido fue resuspendido en 400 uL de PBS filtrado por filtros Amicon de 3 kDa, y almacenado a 4 °C para su análisis al día o a los dos días siguientes de su obtención.

## **Análisis del perfil de vesículas extracelulares**

La caracterización del tamaño, y la cuantificación de la concentración de VEs purificadas de los sobrenadantes en estudio, fue evaluada mediante rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés Nanoparticle Tracking Analysis), mediante el equipo de NTA ViewSizer 3000 de Horiba. Los parámetros de grabación y procesamiento fueron ajustados para el sistema a evaluar (muestra biológica enriquecida en VEs), tomando como referencia los parámetros sugeridos en el manual del equipo, la literatura existente y pruebas empíricas. En los casos en los cuales fue necesario, se realizó una dilución de la muestra con PBS filtrado, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó un volumen mínimo de 400 uL de muestra para el análisis por NTA y se evaluaron las réplicas biológicas individualmente. Luego de su análisis,

la muestra fue recuperada. En todos los casos, se realizó la medida de un blanco, el cual consistió en el análisis por NTA de la solución diluyente (PBS filtrado por Amicon de 3 kDa).

## **Cuantificación de citoquinas**

Para los ensayos de estimulación con antígenos solubles de *T. gondii*, se evaluó la concentración de interleuquina 6 (IL-6) liberada por las células utilizando el sobrenadante obtenido de la ultracentrifugación, mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Se utilizó el kit de ELISA comercial DUOSET (R&D System) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante y las concentraciones de anticuerpo indicadas en el kit. El ensayo fue realizado en placas de 96 pocillos de alta adherencia (Nunc) que fueron sensibilizadas con 100 µL/pocillo del anticuerpo de captura en PBS por mínimo 16 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de realizar tres lavados con PBS-Tween 20 0.05%, se bloqueó con 200 µL/pocillo de PBS-BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se repitieron los lavados y se agregó 100 µL/pocillo de las muestras a dilución adecuada o las soluciones estándar de citoquinas en PBS-BSA 1%, durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se repitieron los lavados y se incubó con 100 µL/pocillo del anticuerpo de detección diluido en PBS-BSA 1% y con 2% suero normal de cabra durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se repitieron los lavados y se agregó 100 µL de estreptavidina conjugada a peroxidasa en PBS-BSA y se incubó por 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizaron los lavados y se incubaron las placas con 100 µL de la solución de revelado (buffer acetato de sodio 0.1 M pH 5.5; tetrametilbencidina 6 mg/mL en DMSO; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%) durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Por último, la reacción se detuvo agregando 50 µL/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Labsystem multiscan MS.

## **Estadística**

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba t de Student para la comparación entre dos grupos, ANOVA de una vía para la comparación entre más de dos

grupos, y ANOVA de dos vías para analizar el efecto de dos factores simultáneamente en más de dos grupos. La significancia se indicó como: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  y \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . En todos los casos se empleó el programa GraphPad Prism 8.

El número de réplicas varió según el ensayo y se especifica en la sección de resultados, junto con la prueba estadística aplicada en cada caso.

## RESULTADOS

### **Puesta a punto de un protocolo para la evaluación del perfil de VEs liberadas por Swan-71**

En esta sección se presentan los procedimientos realizados para la puesta a punto de las condiciones experimentales destinadas a evaluar el perfil de liberación basal de VEs de la línea celular Swan-71. Se optimizaron tanto las condiciones de cultivo celular como los parámetros de medición para el análisis por NTA.

#### *Optimización de parámetros para el análisis por NTA*

Con el objetivo de garantizar resultados reproducibles y confiables obtenidos de las mediciones de concentración y tamaño de partículas mediante la técnica de NTA se optimizaron diversos parámetros instrumentales y de análisis. Estos ajustes deben definirse en función de las características de la muestra analizada. Se consideró tanto las condiciones de adquisición de los videos en los que se registran las trayectorias de las partículas, como los criterios aplicados para su procesamiento y análisis.

En el manual de uso del equipo ViewSizer 300 se indican parámetros recomendados de grabación y el procesamiento de datos para el análisis de muestras de VEs (45). Estas recomendaciones se incorporaron al protocolo de medición, lo que mejoró la detección, cuantificación y determinación de tamaño de las VEs. Dos ajustes en particular fueron evaluados para establecer su valor óptimo: el número de videos adquiridos y el tiempo de espera luego de la agitación (wait time).



Para la realización de estas pruebas se utilizaron VEs provenientes de suero fetal bovino (SFB). Se analizó la fracción S15 obtenida a partir de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con un 10% de SFB, realizando las diluciones necesarias para su análisis por NTA, hasta obtener una densidad de partículas en pantalla óptima (determinada empíricamente siguiendo guía visual del manual del equipo). En este caso y debido la alta concentración de VEs en el SFB (46), no se realizó la concentración de las VEs por ultracentrifugación.

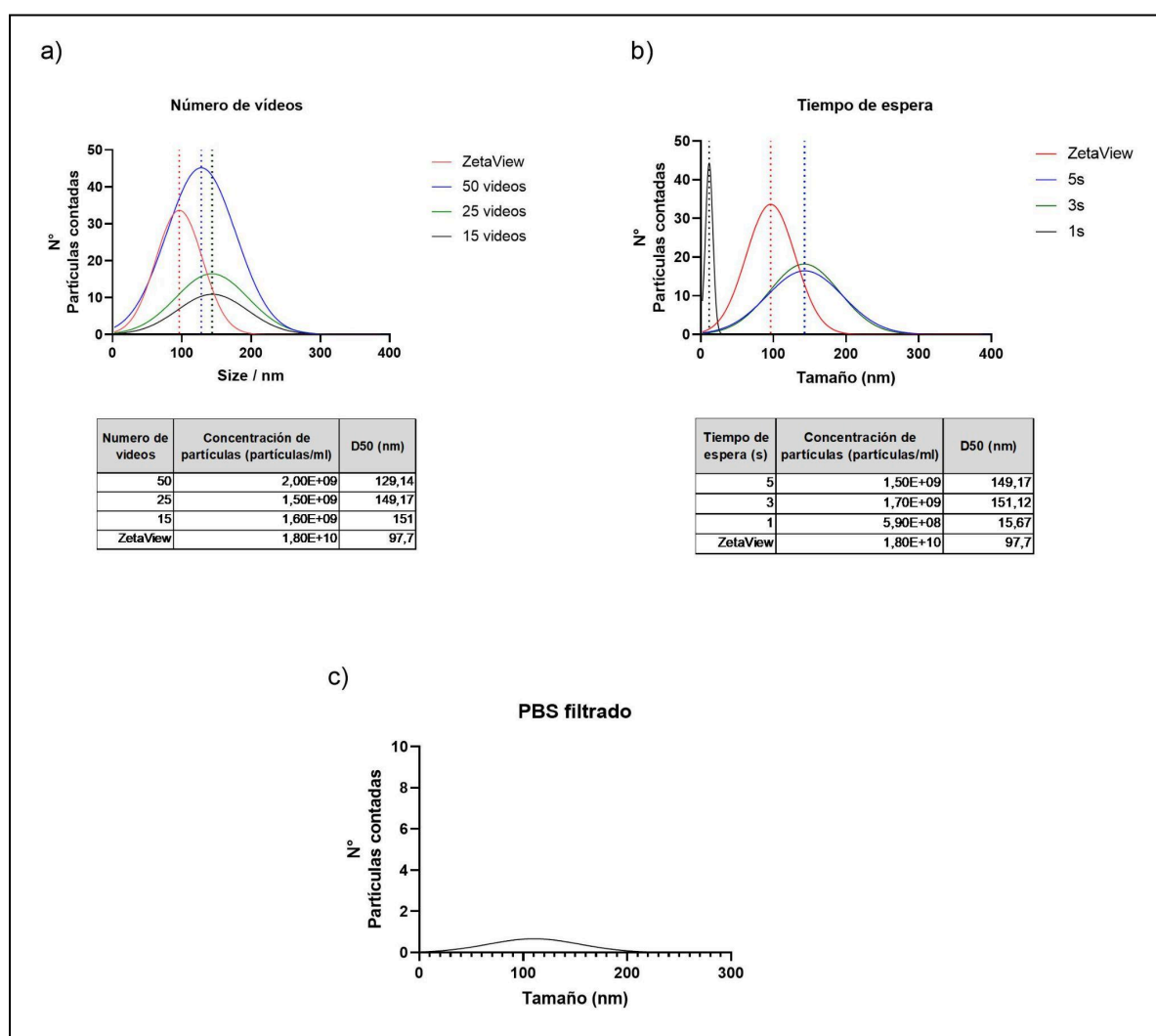
El número de videos recomendados por el fabricante para la detección de VEs es de 50, donde cada uno de estos videos representa un campo de registro. Sin embargo, debido al tiempo que implica adquirir ese número de registros (lo que limita la cantidad de muestras que pueden procesarse), se evaluaron mediciones realizadas con 25 y 15 videos. Para este análisis se evaluó la misma muestra manteniendo los parámetros de registro (con un tiempo de espera de 5s), variando únicamente la cantidad de vídeos adquiridos. De forma general se observó que al aumentar la cantidad de videos se aumenta la cantidad de partículas detectadas por el equipo, sin impactar de forma significativa en la concentración de partículas (partículas/ml) y el tamaño de partículas determinado (**Figura 4a**). Aunque todas las condiciones registraron cantidades de partículas por arriba del umbral recomendado, posteriormente al realizar el análisis de VEs trofoblásticas esto no fue posible con 15 videos. Considerando estos resultados, en las siguientes medidas se continuó registrando 25 videos, permitiendo así disminuir el tiempo de medida por muestra.

El tiempo de espera luego de la agitación, refiere a la cantidad de segundos de reposo que se le da a la muestra entre la agitación y el comienzo de la grabación del video para el registro de un nuevo campo. Este tiempo de espera tiene como objetivo la estabilización de las partículas a medir, de forma que el único tipo de movimiento que persista en ellas sea el movimiento browniano. La recomendación del fabricante para este parámetro es de 3 segundos.

Se evaluaron mediciones realizadas con tiempos de espera de 1, 3 y 5 s utilizando la misma muestra de VEs de SFB y adquiriendo 25 videos por muestra. Para los tiempos de espera 3 y 5 s no se observaron diferencias en la distribución de tamaños obtenida (D50 de 149,17 nm

y 151,12 nm respectivamente), mientras que con un tiempo de espera de 1 s los tamaños registrados fueron menores (D50 de 15,67 nm) (**Figura 4b**).

Adicionalmente, con el fin de contar con un control de referencia para las mediciones realizadas, se efectuó el análisis por NTA de una muestra equivalente (DMEM-F12 y SFB del mismo lote) utilizando un equipo ZetaView previamente optimizado para el análisis de VEs en el Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, CONICET-UBA) . El análisis mostró una tamaño de partícula caracterizado por un D50 de 97,7 nm.



**Figura 4. Optimización de parámetros para NTA.** Se midieron las nanopartículas presentes en SFB, provenientes de la fracción S15 de un medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con SFB 10%. Las diferentes distribuciones fueron obtenidas a partir de una misma muestra analizada bajo diferentes parámetros de medida (cantidad de videos y tiempo de espera). a) Representación del perfil de nanopartículas en el medio de cultivo por NTA frente a la adquisición de 50, 25 y 15 videos (en todas las medidas se utilizó un tiempo de espera de 5s). Se representa la medida control realizada en el ZetaView. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (la línea punteada indica la media) en un rango de 20 a 400 nm. Se indican

valores promedio de concentración (partículas/ml) y D50 (nm) para las diferentes condiciones de medida. b) Representación del perfil de nanopartículas en el medio de cultivo por NTA frente a la adquisición con 5, 3 y 1 segundo de tiempo de espera (en todas las medidas se tomaron 25 videos). Se representa la medida control realizada en el ZetaView. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (la línea punteada indica la media) en un rango de 20 a 400 nm. Se indican valores promedio de concentración (partículas/ml) y D50 (nm) para las diferentes condiciones de medida. c) Representación del perfil de nanopartículas en el PBS filtrado por 3 kDa utilizado como blanco/diluyente. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana en un rango de 20 a 300 nm. Una única réplica biológica fue analizada.

Con el fin de seleccionar el diluyente más adecuado para las muestras de VEs obtenidas de sobrenadantes de cultivo de Swan-71, se evaluó la cantidad de partículas presentes en PBS filtrado por diferentes metodologías. Observamos que el PBS filtrado a 0,22  $\mu\text{m}$  y posteriormente por Amicon de 3 kDa, mostró una cantidad de partículas despreciable (**Figura 4c**), por lo que fue seleccionado como blanco/diluyente para los ensayos posteriores.

En la Tabla 1 se resumen los parámetros de adquisición y procesamiento seleccionados a partir de esta puesta a punto para el posterior estudio por NTA de VEs producidas por la línea celular Swan-71.

Además de contribuir a la optimización de medida, estos ensayos permitieron confirmar la alta presencia de nanopartículas en el rango de tamaño esperado para VEs presentes en el SFB, lo que evidencia la necesidad de incubar las células en condiciones libres de SFB para la obtención de VEs.

**Tabla 1. Parámetros de adquisición y procesamiento definidos para el estudio de VEs.** Se indica si la selección de las condiciones optimizadas se basó en las recomendaciones del fabricante o en evaluaciones empíricas.

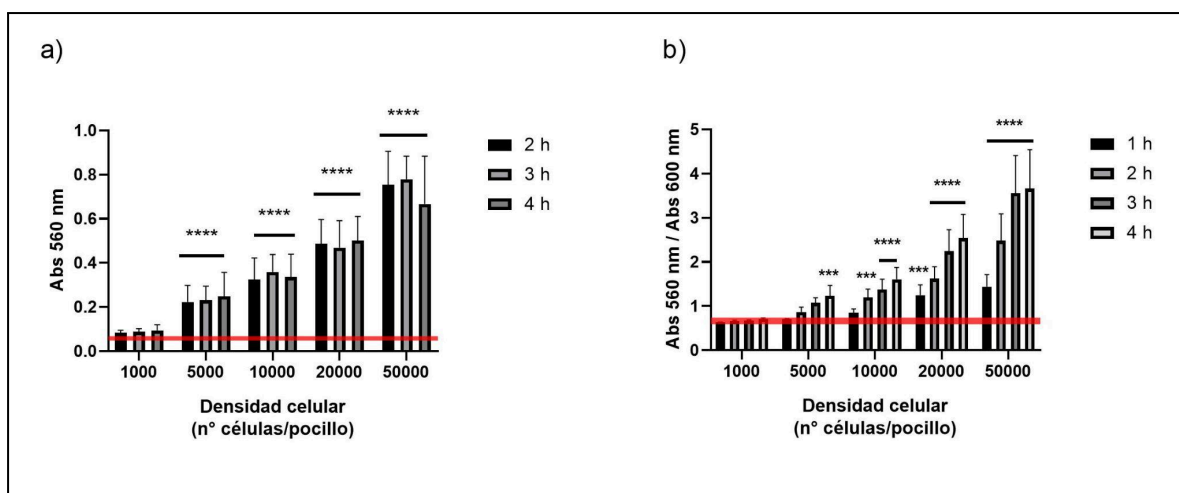
Parámetros de adquisición		
Láser azul	210 mW	Sugerido por fabricante
Láser verde	12 mW	Sugerido por fabricante
Láser rojo	8 mW	Sugerido por fabricante
Camera gain	30 dB	Sugerido por fabricante
Exposure	15 ms	Sugerido por fabricante
Stirring time	1 s	Sugerido por fabricante
Wait time	3 s	Evaluado empíricamente

Stir speed	350 rev/s	Sugerido por fabricante
Number of Videos recorded	25 videos	Evaluado empíricamente
Frames per video	300	Sugerido por fabricante
Frame rate (frames per second)	30 fps	Sugerido por fabricante
Temperatura	22 °C	Sugerido por fabricante
Parámetros de procesamiento		
Detection threshold / Type	2 / Polydisperse	Sugerido por fabricante
AutoThreshold	Disabled	Sugerido por fabricante
Feature radius	30 [pixels]	Sugerido por fabricante
Tracking starts on	1 [frame]	Sugerido por fabricante
Drift correction	0 [%]	Sugerido por fabricante

### *Puesta a punto de ensayos de viabilidad celular*

Una vez confirmada la necesidad de incubar las células en condiciones libres de SFB para la obtención de VEs del sobrenadante de cultivo de Swan-71, surge la necesidad de evaluar la viabilidad celular en estas condiciones. Para ello se realizó la puesta a punto de ensayos de viabilidad mediante la evaluación de la actividad metabólica para la línea Swan-71; se optimizaron el ensayo de MTT y el ensayo de reducción de la resazurina. En ambos la puesta a punto se realizó en condiciones de cultivo estándar (ver sección Materiales y métodos) , en placas de 96 pocillos y se evaluó el tiempo de incubación de las células con el reactivo (MTT o resazurina) así como diferentes densidades celulares de sembrado.

Para el ensayo de MTT, se pudo detectar actividad metabólica en todas las condiciones ensayadas (5000 – 50.000 células/pocillo y 2 – 4 h, **Figura 5a**). Adicionalmente se observó que el ensayo fue más sensible a la densidad celular de sembrado que al tiempo de incubación evaluado, ya que al aumentar la densidad celular se registró un aumento general de la actividad metabólica en todos los tiempos. Sin embargo, al analizar los pocillos con la misma densidad celular, no se detectaron diferencias significativas al variar los tiempos de incubación.



**Figura 5. Puesta a punto de ensayos de actividad celular.** a) Puesta a punto de ensayo de MTT. La franja roja indica el rango basal de la absorbancia a 560 nm (Abs 560 nm), correspondiente al medio de cultivo. b) Puesta a punto de ensayo de reducción de resazurina. La franja roja indica el rango basal de la relación de Abs 560 nm/Abs 600nm, correspondiente al medio de cultivo.

Para ambos se muestran los resultados promediados de dos ensayos independientes de 4 réplicas biológicas cada uno. Se indican con asteriscos los grupos que presentan aumento significativo en la relación de absorbancia, con respecto al blanco (One way - ANOVA).

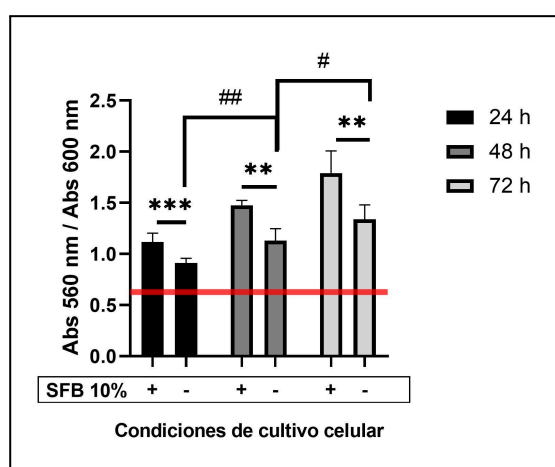
En la puesta a punto del ensayo de reducción de resazurina, también se pudo detectar actividad metabólica a partir de 5000 células/pocillo. En este caso, la sensibilidad de la técnica dependió tanto de la densidad celular como del tiempo de incubación. A densidades altas (20.000 y 50.000 células/pocillo), se detectó actividad metabólica en todos los tiempos evaluados, la cual aumentó al incrementar el tiempo de incubación. En densidades intermedias (5.000 y 10.000 células/pocillo), la señal aumentó progresivamente con el tiempo de incubación. En contraste, en la densidad más baja (1.000 células/pocillo) no se evidenció reducción de resazurina en el rango de tiempo analizado (**Figura 5b**).

Para ambos ensayos, determinamos trabajar con un tiempo de incubación del cultivo celular con el reactivo de 2 horas, y una densidad de siembra de 10.000 - 20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Estos valores permiten detectar la actividad metabólica sin requerir tiempos largos de incubación y evitan alcanzar la saturación del ensayo. Por otro lado, tomando en cuenta la simplicidad y reproducibilidad de la técnica, decidimos solo continuar con el ensayo de reducción de la resazurina como metodología para evaluar la viabilidad celular.

## *Determinación de las condiciones de cultivo para obtención de VEs derivadas de Swan-71.*

Como última etapa de optimización, procedimos a determinar las condiciones de cultivo para garantizar la obtención de una cantidad suficiente de VEs para su análisis por NTA. Evaluamos, el área de cultivo, y la densidad celular de sembrado a diferentes tiempos finales para la cosecha de los sobrenadantes.

En primer lugar, se evaluó la viabilidad celular al incubar las células en ausencia de SFB durante 24, 48 y 72 h. En todos los tiempos evaluados se detectó actividad metabólica. Se observó una disminución de dicha actividad en las células mantenidas sin SFB en comparación con aquellas cultivadas con medio suplementado con SFB al 10 %. Sin embargo, aún en ausencia de SFB, se registró un aumento de actividad metabólica celular al aumentar el tiempo de incubación (**Figura 6**). Estos resultados, nos habilitaron a continuar en los siguientes ensayos con cultivos sin suplementación de SFB.



**Fig 6. Evaluación de la actividad celular en ausencia de SFB.** Se sembraron 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, en ausencia y presencia de SFB 10%, se incubaron a 24, 48 y 72 h para la realización del ensayo de reducción de la resazurina. Se realizaron 4 réplicas biológicas por condición. La franja roja indica el rango basal de la relación Abs 560 nm / 600 nm correspondiente al medio de cultivo. Los \* indican diferencias significativas entre condiciones en ausencia y presencia de SFB en un mismo tiempo (t-test), mientras que los # indican diferencias significativas entre tiempos en grupos en ausencia de SFB (ANOVA).

Luego, se estudió el área de cultivo como variable en los cultivos de células Swan-71, buscando obtener muestras con VEs suficientes para ser medidas por NTA. Evaluamos la concentración de VEs obtenidas en una fracción enriquecida del sobrenadante de: 2 botellas

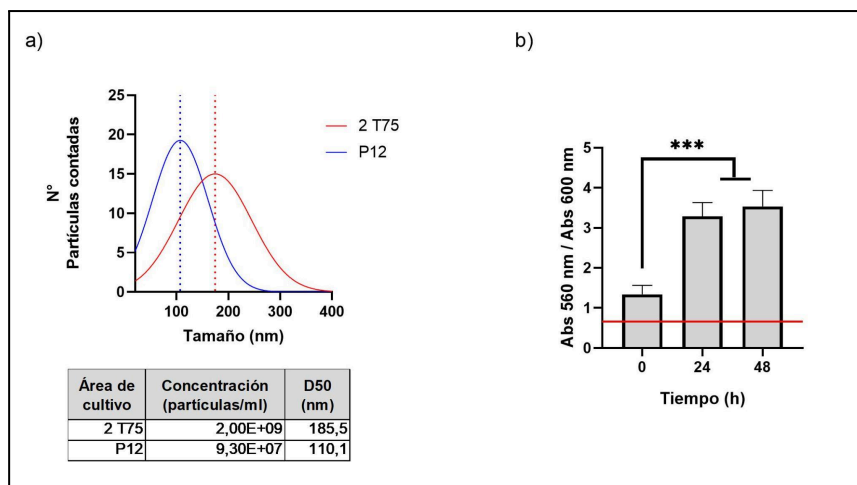
de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (T75) y un pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos (P12). En ambos casos, una vez alcanzada su confluencia, las células fueron incubadas en ausencia de SFB por 48 horas, y se obtuvieron las muestras enriquecidas en VEs por protocolo de centrifugación y ultracentrifugación. Posteriormente se evaluó tanto la concentración de VEs como su tamaño por NTA. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad celular al momento de cosechar los sobrenadantes por ensayo de resazurina de las células en la placa P12. Las superficies de cultivo y el tiempo de incubación correspondientes se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones de cultivo evaluadas.** Se muestran las superficies de cultivo, y el tiempo de incubación en ausencia de SFB, iniciando a partir de cultivos en confluencia.

Condiciones de cultivo evaluadas		
Soporte de cultivo	Área de crecimiento	Tiempo de incubación
Pool de 2 T75	150 cm <sup>2</sup>	48 h
1 pocillo P12	3,5 cm <sup>2</sup>	48 h

En ambos sistemas de cultivo se detectó una concentración de partículas medibles por NTA, observándose una reducción proporcional al área de cultivo. Para lograr una concentración adecuada de partículas en la celda de medición (45), fue necesario diluir entre 1/20 y 1/100 las muestras obtenidas del pool de 2 frascos T75, mientras que las muestras provenientes de un pocillo P12 pudieron medirse con diluciones de 1/2 o incluso sin dilución previa (**Figura 7a**).

Respecto a la evaluación de la actividad metabólica, se observó un aumento a las 24 y 48 h en relación con el tiempo 0 (**Figura 7b**). A partir de estos resultados se optó por continuar trabajando con los cultivos celulares en P12, ya que permiten obtener una cantidad analizable de VEs con un menor número de células.



**Fig 7. Evaluación de dos áreas de cultivo para la obtención de VEs.** Se evaluaron las nanopartículas obtenidas de la fracción P120 del sobrenadante de células cultivadas en dos botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (T75) y en un pocillo de una placa de 12 pocillos (P12), incubadas 48 h en ausencia de SFB. En la placa de 12 pocillos también se realizó un ensayo de reducción de la resazurina evaluado a tiempo 0, a 24 y a 48 horas. a) Representación del análisis por NTA del perfil de nanopartículas obtenidas de ambos sistemas de cultivo. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (la línea punteada indica la media) en un rango de 20 a 400 nm. Se indican valores promedio de concentración (partículas/ml) y D50 (nm) para ambos sistemas. b) Evaluación de la actividad metabólica en células cultivadas en placa de 12 pocillos por ensayo de reducción de la resazurina en ausencia de SFB a tiempo 0, 24 y 48 horas.

Para las áreas evaluadas, se analizaron 2 y 4 réplicas biológicas respectivamente. Los asteriscos indican diferencias entre los grupos evaluados (One way- ANOVA).

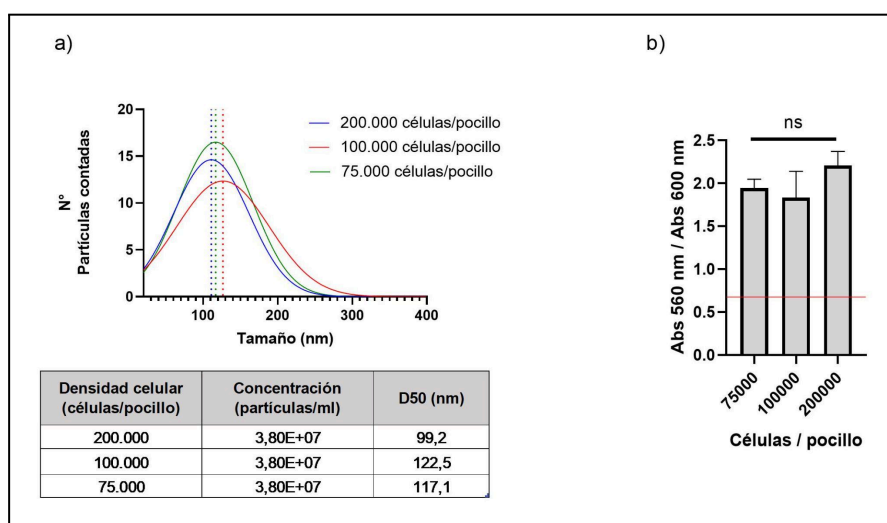
Por último, se evaluó la densidad de siembra en P12 para el análisis de VEs en las fracciones enriquecidas obtenidas de los sobrenadantes de cultivo. Para ello, se ensayaron tres densidades celulares (75.000, 100.000 y 200.000 células/pocillo), en las cuales se evaluó el perfil de VEs por NTA, y la viabilidad celular. Las células se incubaron por 24 h en ausencia de SFB, y se realizaron dos réplicas biológicas para cada condición.

No se observó diferencias en la actividad metabólica entre las condiciones ensayadas. Así mismo, el perfil de liberación de VEs, considerando tanto la concentración de partículas, así como el tamaño de las mismas (D50), no mostró diferencias significativas entre las densidades de siembra evaluadas (**Figura 8**). Por lo tanto, y considerando la posibilidad de realizar ensayos con tiempos de incubación más prolongados, se decidió continuar trabajando con una densidad de siembra de 100.000 células/pocillo en P12.

## Caracterización del perfil basal de VEs producidas por la línea celular Swan-71

Una vez optimizadas las condiciones de medida y cultivo celular se realizó la caracterización del perfil de liberación basal de VEs de la línea celular Swan-71, a 24 y 48 horas.





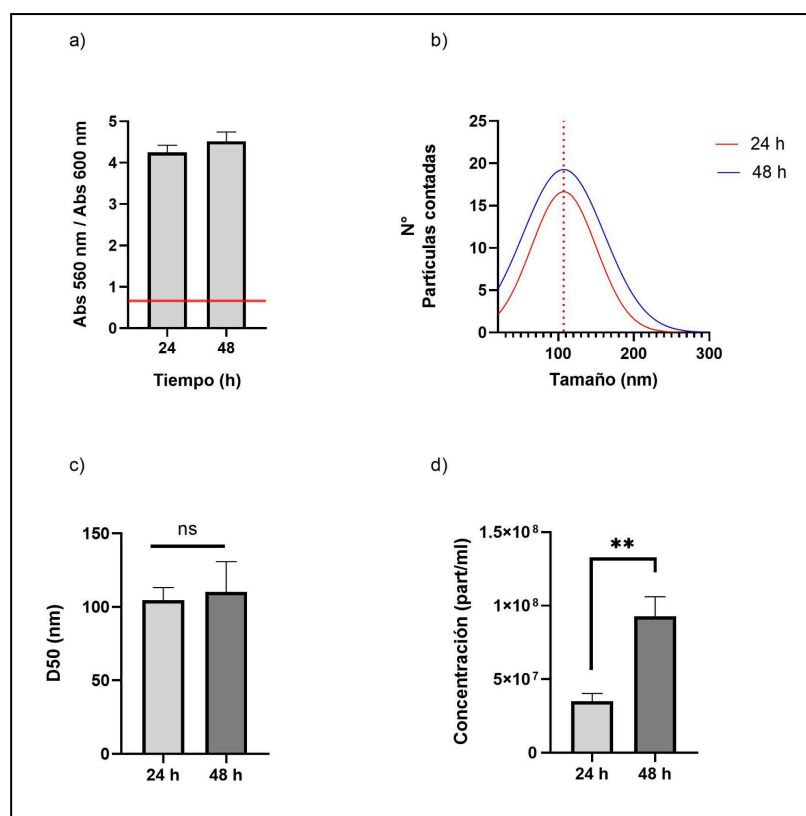
**Figura 8 - Evaluación de la densidad celular de siembra en placa de 12 pocillos para la obtención de VEs.** Se evaluaron tres densidades celulares en placas de 12 pocillos, cultivadas por 24 h en DMEM F12 sin SFB. a) Representación del análisis por NTA del perfil de nanopartículas liberadas. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (la línea punteada indica la media) en un rango de 20 a 400 nm. Se indican valores promedio de concentración (partículas/ml) y D50 (nm) para las diferentes densidades celulares. b) Actividad metabólica celular por ensayo de reducción de resazurina. La franja roja indica el rango basal de la relación de Abs 560 nm/Abs 600 nm, correspondiente al medio de cultivo. Los grupos fueron comparados por ANOVA.

Se promedian datos de dos réplicas biológicas

Se sembraron 100.000 células/pocillo en P12, que fueron incubadas por 24 y 48 h en ausencia de SFB. A partir de los sobrenadantes de cultivo se enriquecieron las VEs por centrifugación y ultracentrifugación para su posterior análisis por NTA. Adicionalmente se evaluó la viabilidad celular a tiempo final. Observamos que las células se mantuvieron metabólicamente activas (**Figura 9a**) y el tamaño medio de las VEs liberadas no varió con el tiempo de incubación, manteniendo un valor medio de  $107 \pm 15$  nm (**Figuras 9b y c**). Sin embargo, la concentración de VEs aumentó significativamente a las 48 h de incubación (**Figura 9d**).

## Respuesta a estímulos inflamatorios

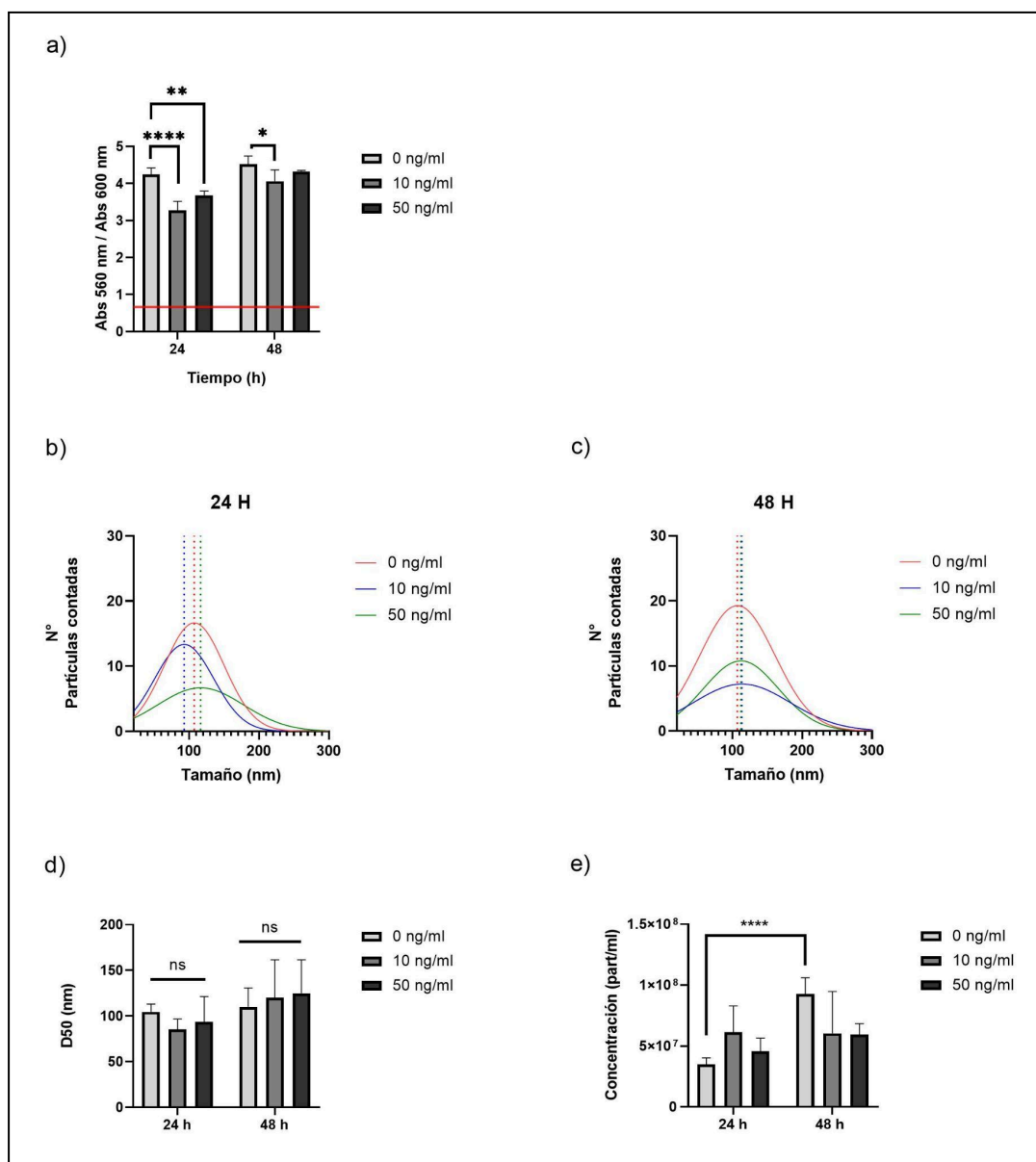
Una vez caracterizado el perfil de liberación basal de VEs de Swan-71, se estudió el efecto de estímulos inflamatorios sobre su producción. Para ello se empleó TNF- $\alpha$  como estímulo inflamatorio genérico y antígenos solubles de *Toxoplasma gondii* representativos de la estimulación en contexto infeccioso. Evaluamos adicionalmente la viabilidad celular en cada ensayo, y en el caso de la estimulación con antígenos solubles de *T. gondii* también la liberación de interleuquina-6 (IL-6) como medida de la respuesta celular



**Figura 9. Caracterización del perfil de liberación de nanopartículas liberadas por células Swan-71.** Se sembraron 100.000 células/pocillos en placas de 12 pocillos, y se incubaron por 24 h y 48 h en ausencia de SFB. a) Actividad metabólica por ensayo de reducción de resazurina. La franja roja indica el rango basal de la relación de Abs 560 nm/Abs 600 nm, correspondiente al medio de cultivo. b) Representación del análisis por NTA del perfil de nanopartículas liberadas. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (la línea punteada indica la media), en un rango de 20 a 300 nm. c) Tamaño (D50) de nanopartículas por NTA (t-test). d) Concentración de nanopartículas promedio por NTA, los asteriscos indican diferencias entre los grupos evaluados (t-test). Se muestra el promedio de al menos tres réplicas biológicas para cada condición.

Frente al estímulo con TNF- $\alpha$  se observó una disminución de la actividad metabólica; sin embargo, en ningún caso dicha reducción superó el 23%. (**Figura 10a**). En relación con la liberación de VEs, la estimulación con TNF- $\alpha$  no produjo cambios significativos en el perfil obtenido para ninguna de las concentraciones de estímulo evaluadas (10 ng/ml y 50 ng/ml). El rango de tamaños de las partículas registrado se mantuvo comparable al control y, tal como se evidenció en ensayos previos, se mantuvo constante en el tiempo (**Figura 10b y c**). Del mismo modo, la concentración de partículas liberadas no se modificó significativamente tras la estimulación con TNF- $\alpha$ , aunque a las 48 h se observó una tendencia a la disminución de concentración de partículas en presencia de estímulo inflamatorio (basal vs. TNF- $\alpha$  10

ng/ml p-valor=0,07; basal vs. TNF- $\alpha$  50 ng/ml p-valor=0,06) y no se registra el incremento en la concentración de VEs por acumulación observado en la condición basal (**Figura 10d**).



**Fig 10. Viabilidad celular y perfil de nanopartículas liberadas por células Swan-71 frente a diferentes concentraciones de TNF- $\alpha$ .** Se sembraron 100.000 células/pocillos en placas de 12 pocillos, se incubaron por 24 h y 48 h en ausencia de SFB y presencia de TNF- $\alpha$  a dos concentraciones diferentes (10 ng/ml y 50 ng/ml). El grupo control fue tratado en las mismas condiciones en ausencia de estimulación (0 ng/ml). a) Actividad metabólica por ensayo de reducción de la resazurina (la franja roja indica el registro del blanco). Los asteriscos indican diferencias significativas en la relación de absorbancia (2 way ANOVA). b) Representación del análisis por NTA del perfil de nanopartículas liberadas a 24 y 48 h frente a las distintas concentraciones de TNF- $\alpha$ . Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (la línea punteada indica la media), en un rango de 20 a 300 nm. c) Tamaño (D50) de las nanopartículas evaluadas por NTA (2 way ANOVA). d) Concentración de

*nanopartículas promedio evaluadas por NTA. Los asteriscos indican un aumento significativo de nanopartículas a 48 h en condiciones basales (2 way ANOVA).*

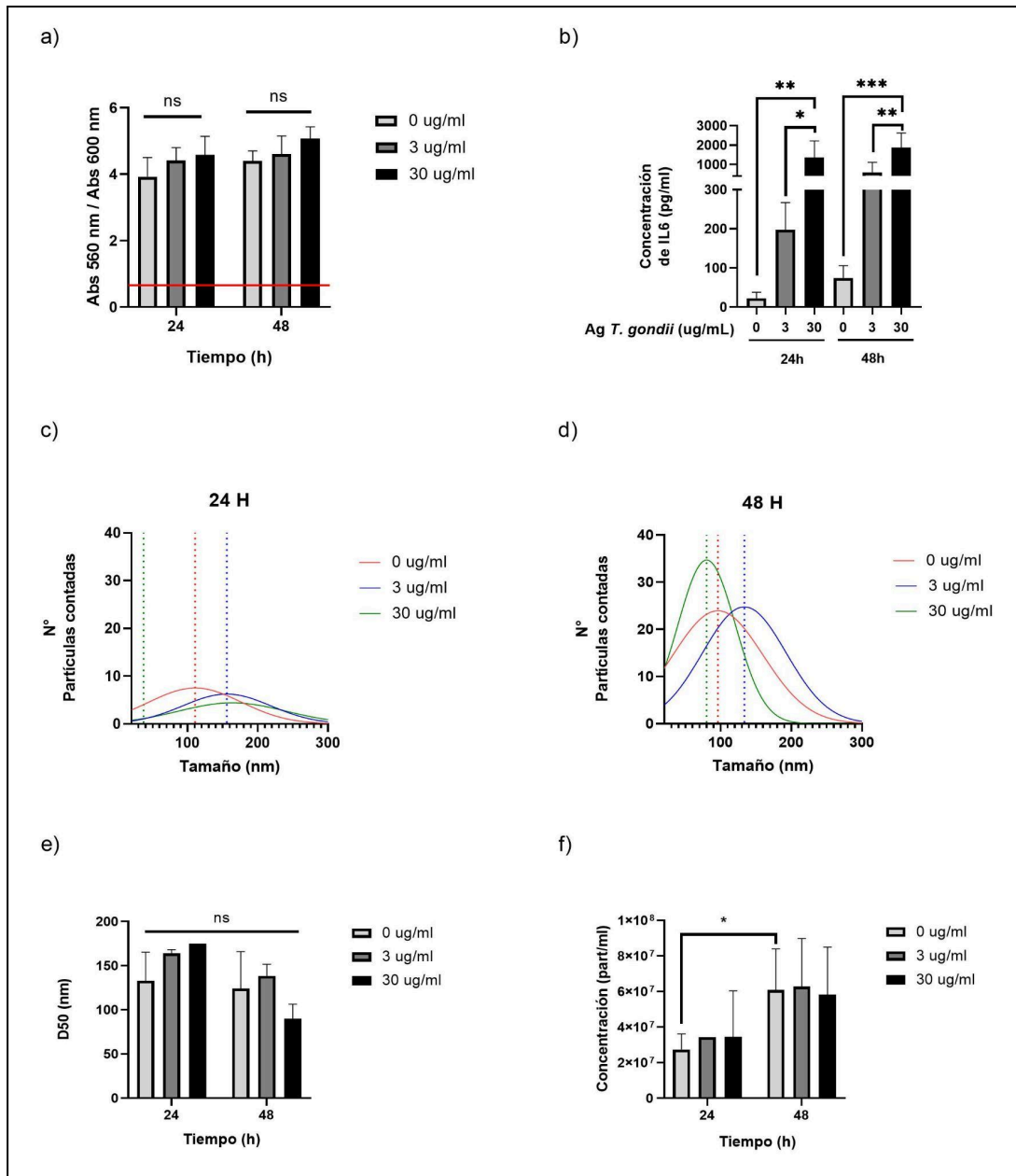
*Se muestra el promedio de al menos tres réplicas biológicas para cada condición.*

Finalmente se estudió el perfil de liberación de VEs de Swan-71 incubadas con antígenos solubles de *T. gondii* (3 µg/ml y 30 µg/ml). Para la realización de estos ensayos, se preparó un extracto de antígenos solubles de *T. gondii* utilizando la cepa de referencia RH, una cepa de alta virulencia, obteniéndose una preparación con un contenido proteico total de 888 µg.

En primera instancia, se realizó un estudio cinético (24 y 48 h) empleando distintas concentraciones de antígenos solubles de *T. gondii* con el fin de caracterizar la respuesta inicial de las células. La estimulación incrementó la producción de IL-6 (**Figura 11b**) sin afectar la actividad metabólica celular (**Figura 11a**) ni el perfil de VEs liberadas al sobrenadante de cultivo, tanto en tamaño (**Figuras 11e**) como en concentración (**Figura 11f**). En los sobrenadantes de células estimuladas durante 24 h se observó una cantidad limitada de partículas dentro del rango de tamaños analizado (20–300 nm) lo que dificultó las mediciones y redujo la cantidad de réplicas aptas para el análisis, restringiendo así el tratamiento estadístico.

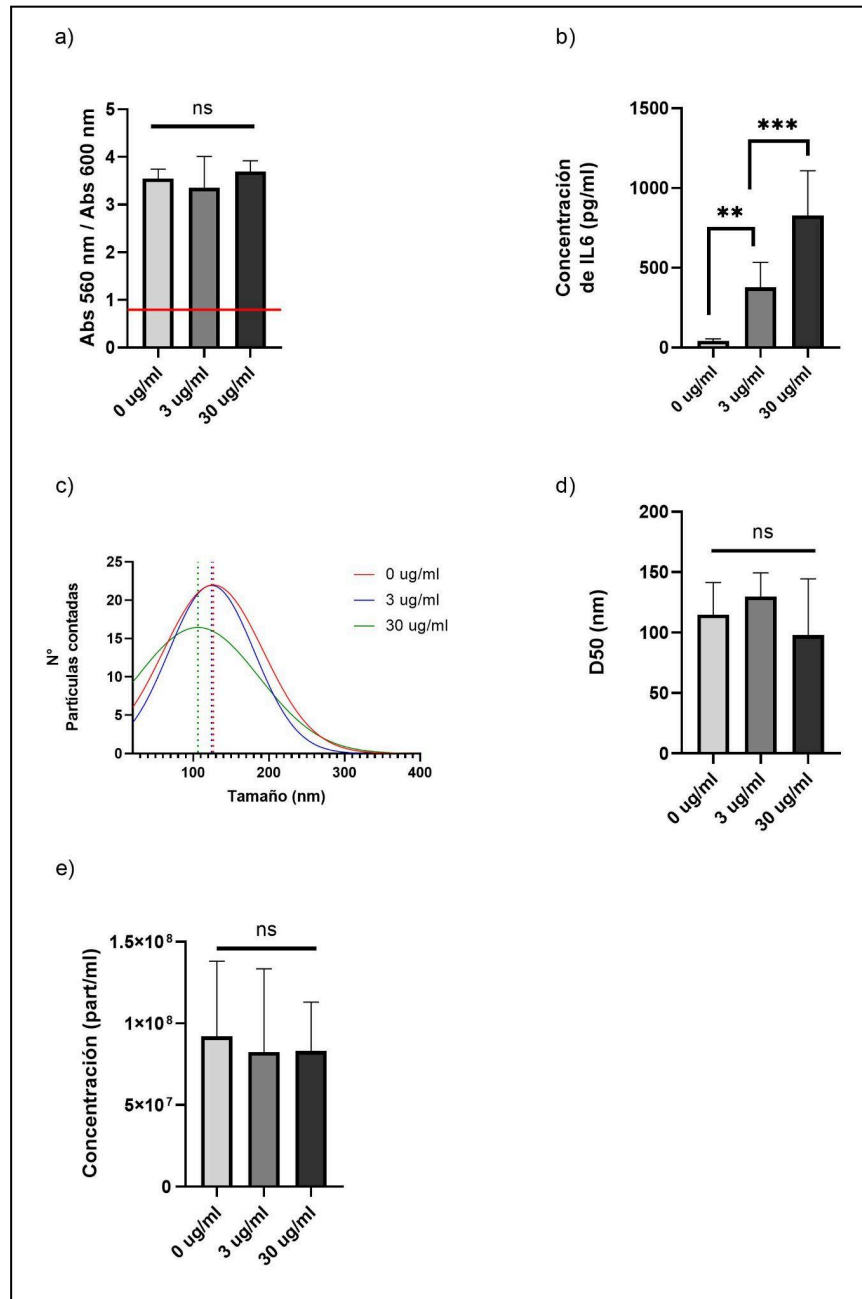
Debido a las dificultades observadas en el análisis y a la disponibilidad limitada de antígeno, los ensayos de estimulación con antígenos solubles de *T. gondii* se repitieron únicamente al tiempo de 48 h, incrementando además el número de réplicas.

Nuevamente se observó que la actividad metabólica se mantuvo sin cambios (**Figura 12a**) y que la concentración de IL-6 aumentó de manera dependiente de la concentración de estímulo (**Figura 12b**). Asimismo, el análisis por NTA corroboró la ausencia de cambios en el tamaño y en la concentración de partículas liberadas en las dos concentraciones de antígeno evaluadas (**Figuras 12 c, d, e**).



**Fig 11. Respuesta celular y perfil de nanopartículas liberadas por Swan-71 frente a diferentes concentraciones de antígenos solubles de *Toxoplasma gondii* a 24 y 48 horas.** Se sembraron 100.000 células/pocillos en placas de 12 pocillos, se incubaron por 24 h y 48 h en ausencia de SFB y presencia de TNF- $\alpha$  a dos concentraciones diferentes (3 ug/ml y 30 ug/ml). El grupo control fue tratado en las mismas condiciones en ausencia de estimulación (0 ug/ml). a) En todas las condiciones evaluadas se registró actividad metabólica por ensayo de reducción de la resazurina, la línea roja indica el registro del blanco (2 way ANOVA). b) Cuantificación de IL-6 en sobrenadantes mediante ELISA (2 way ANOVA). c) y d) Representación del análisis por NTA del perfil de nanopartículas liberadas a 24 y 48 h frente a las distintas concentraciones de antígenos solubles de *T. gondii*. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (las líneas punteadas indican la media), en un rango de 20 a 300 nm. e) Tamaño (D50) de las nanopartículas evaluadas por NTA (2 way ANOVA). f) Concentración de nanopartículas evaluadas por NTA (2 way ANOVA), se registran diferencias entre la concentración de partículas liberadas de forma basal entre los tiempos evaluados (t-test).

Se muestra el promedio de 4 réplicas biológicas para ensayos de resazurina y ELISA. En los análisis por NTA se consideró al menos 1 réplica biológica para ensayos a 24 h y al menos 3 para ensayos a 48 h (las muestras basales en ambos tiempos contaron con 4 réplicas biológicas). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos.



**Fig 12. Respuesta celular y perfil de nanopartículas liberadas por Swan-71 frente a diferentes concentraciones de antígenos solubles de *Toxoplasma gondii* a 48 horas.** Se sembraron 100.000 células/pocillos en placas de 12 pocillos, se incubaron por 48 h en ausencia de SFB y presencia de antígenos solubles de *T. gondii* dos concentraciones diferentes (3 ug/ml y 30 ug/ml). El grupo control fue tratado en las mismas condiciones en ausencia de estimulación (0 ug/ml). a) En todas las condiciones evaluadas se registró actividad metabólica por ensayo de reducción de la resazurina (la franja roja indica el registro del blanco), sin diferencias entre los grupos (ANOVA). b) Cuantificación de IL-6 en sobrenadantes mediante

ELISA (ANOVA). c) Representación del análisis por NTA del perfil de nanopartículas liberadas a 48 h post-estímulo con antígenos solubles de *T. gondii*. Los datos se ajustaron a una distribución gaussiana (las líneas punteadas indican la media), en un rango de 20 a 400 nm. d) Tamaño (D50) de las nanopartículas evaluadas por NTA frente a distintas concentraciones de estímulo (ANOVA). e) Concentración de nanopartículas evaluadas por NTA frente a distintas concentraciones de estímulo (ANOVA). Se muestra el promedio de por lo menos cinco réplicas biológicas para cada condición. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos.

## DISCUSIÓN

El trofoblasto juega un papel fundamental en la modulación del sistema inmune materno, regulando diferentes adaptaciones inmunológicas, locales y sistémicas, que son necesarias para el desarrollo del embarazo. Entre estas se encuentra la liberación de vesículas extracelulares, las cuales han probado ser un mecanismo de regulación relevante durante la gestación, estableciendo y fomentando la comunicación entre las diversas poblaciones celulares involucradas en este proceso (10,11). Sin embargo, aunque existen trabajos que abordan el rol de estos componentes en el desarrollo del embarazo y establecimiento fisiológico de la tolerancia inmunológica (2,12,17–19), son pocos los estudios que investiguen su función y liberación durante la patología, especialmente durante la infección. Particularmente, hoy en día, no existen trabajos que estudien el rol de las vesículas extracelulares del trofoblasto ante la infección o contacto con *Toxoplasma gondii*, un patógeno de alta prevalencia perteneciente al grupo TORCH que puede generar múltiples consecuencias durante el embarazo.

En este contexto, en el presente trabajo se comenzaron estudios del perfil de VEs producidas por una línea celular trofoblástica de primer trimestre (Swan-71), en respuesta a estímulos inflamatorios de distinta naturaleza: TNF-alfa y antígenos solubles de *T. gondii*. Como primera etapa, se establecieron las condiciones experimentales y de medida para el estudio de las VEs liberadas por esta línea celular mediante rastreo de nanopartículas (NTA). Posteriormente, se caracterizaron el perfil de liberación basal de VEs de Swan-71, en respuesta a TNF- $\alpha$  como modelo de estímulo proinflamatorio general y antígenos de *T. gondii* como modelo de estímulo infeccioso.

El análisis mediante NTA para la caracterización de VEs, constituye una herramienta ampliamente establecida en este campo de estudio (1,4,47). La primera etapa de este trabajo requirió la estandarización de parámetros de adquisición específicos para el tipo y concentración de las muestras obtenidas, dado que la precisión de la técnica depende del número de eventos registrados y de la estabilidad del rastreo de partículas (45). La optimización realizada permitió reducir el número de videos registrados de 50 a 25 sin comprometer la calidad de la medición, representando una mejora metodológica significativa. Las pruebas iniciales con VEs derivadas de SFB sugirieron que incluso 15 videos podían ser suficientes, dada la alta concentración de partículas presentes en estas muestras (46). En cambio, las muestras de VEs derivadas de Swan-71 presentaron concentraciones de partículas menores, lo que justificó la necesidad de conservar 25 videos para alcanzar el umbral mínimo de detección del equipo (45). Así mismo, la determinación de un tiempo de estabilización de 3 segundos posterior a la agitación de la muestra resultó crítica para evitar desplazamientos residuales que interfirieran con la estimación de tamaño de las partículas. Esta observación subraya la necesidad de considerar cuidadosamente las condiciones de adquisición, dado que incluso variaciones mínimas pueden introducir sesgos en las mediciones.

La comparación con mediciones obtenidas mediante otro sistema de NTA (ZetaView) permitió validar los registros obtenidos en el equipo disponible en nuestro país. Las variaciones detectadas en los tamaños medios registradas entre ambos equipos se atribuyen principalmente a las diferencias en la configuración óptica (triple iluminación láser en ViewSizer 3000 frente a un único láser en ZetaView), que condicionan el rango de tamaños detectables (5,48). Aun así, los valores obtenidos fueron consistentes con los esperados para VEs, respaldando el procedimiento empleado.

Las pruebas iniciales confirmaron la alta carga de nanopartículas presentes en el SFB dentro del rango de tamaño correspondiente a las VEs, reforzando la necesidad de trabajar en condiciones libres de suero para asegurar el origen exclusivamente trofoblástico de las partículas analizadas. No obstante, dado que el SFB aporta componentes esenciales para la adhesión, proliferación y mantenimiento del cultivo celular (49), su eliminación requirió el monitoreo del estado y viabilidad de las células durante el ensayo. Para ello se optimizaron los ensayos de MTT y de reducción de la resazurina, ampliamente utilizados como



indicadores de viabilidad celular (42,43). El ensayo de reducción de resazurina se seleccionó para las etapas posteriores por su sensibilidad y simplicidad operativa. Los resultados confirmaron que las células Swan-71 pueden mantenerse viables en ausencia de SFB; aunque la actividad metabólica disminuyó respecto al cultivo suplementado. Por otro lado, el aumento progresivo registrado en la actividad metabólica en relación al tiempo de cultivo indicó que las células conservaron su capacidad proliferativa (43). La confirmación del estado metabólico del cultivo es particularmente relevante, ya que distintos tipos de estrés (incluida la privación de suero) pueden modificar biogénesis y liberación de VEs (50–52). Asegurar que las células se mantienen activas y no comprometidas permite interpretar el perfil de VEs como representativo del estado basal de la línea Swan-71.

Finalmente, la comparación de superficies de cultivo nos permitió establecer condiciones eficientes para la obtención de VEs, compatibles con futuros ensayos de estimulación. Aunque las botellas T75 rindieron altas concentraciones de partículas, su uso no resultó operativo para estudios con diversas condiciones experimentales. El escalado a placas de 12 pocillos permitió trabajar con volúmenes más acotados proporcionando muestras de VEs dentro del rango óptimo de medición, y facilitó la realización de réplicas biológicas. La evaluación de diferentes densidades celulares de sembrado mostró producción de VEs comparable entre condiciones, posiblemente debido a la inhibición por contacto de las densidades más elevadas (53). En este contexto, se optó por la densidad intermedia de 100.000 células por pocillo, que permitió mantener el cultivo en fase de crecimiento evitando la sobreconfluencia.

En conjunto, las condiciones optimizadas (cultivo en placas de 12 pocillos, con una densidad de sembrado de 100.000 células por pocillo, incubando 24-48 h en condiciones libres de SFB) y los parámetros de adquisición estandarizados para NTA nos brindan condiciones de cultivo reproducibles, para evaluar el perfil de VEs, garantizando la viabilidad celular y evitando la incorporación de vesículas exógenas al sistema.

El establecimiento de condiciones experimentales claras para la obtención y análisis de VEs, es esencial para asegurar la reproducibilidad e interpretación adecuada de los resultados, especialmente considerando que distintos métodos de enriquecimiento y caracterización introducen sesgos particulares (1,51). En este trabajo, se empleó para el enriquecimiento de

la muestra en VEs la ultracentrifugación diferencial, una estrategia ampliamente utilizada y estandarizada que facilita la comparabilidad entre laboratorios, aunque presenta la desventaja de co-aislar nanopartículas no vesiculares (como agregados proteicos) de tamaño similar, lo que puede afectar la pureza de la fracción obtenida (1,51). Para minimizar la presencia de componentes no vesiculares, se realizaron centrifugaciones previas a menor velocidad, aceptando en que en estas se pierden VEs de mayor tamaño (150 a 1000 nm). En concordancia con la literatura reportada, las velocidades de ultracentrifugación utilizadas (100.000 - 200.000 g) favorecen el enriquecimiento en vesículas pequeñas (40 a 150 nm) (54,55). La decisión metodológica de priorizar la obtención de una fracción más pura, en lugar de maximizar la diversidad de poblaciones vesiculares, fue consistente con las recomendaciones de la ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) (1) y con la técnica de caracterización utilizada. Dado que el NTA no permite distinguir entre VEs y partículas no vesiculares, esta estrategia disminuyó la sobreestimación en los resultados. Para garantizar mayor pureza, se podrían incluir en estudios futuros un lavado adicional del pellet (55,56) y/o una purificación de la fracción vesicular por gradiente de densidad, teniendo en cuenta la menor densidad de las VEs respecto a partículas no vesiculares (54).

Las VEs liberadas basalmente por Swan-71 presentaron un diámetro medio de  $107 \pm 15$  nm, lo cual es consistente con los tamaños reportados de VEs aisladas por ultracentrifugación diferencial en trabajos previos con diferentes líneas celulares trofoblásticas (16,44,57,58).

En estudios con las líneas JEG-3 y HTR-8/Svneo, Salomon et al. (2014) si bien describen una disminución progresiva del tamaño de las VEs frente a diferentes pasos de enriquecimiento (primeras rondas de centrifugación, ultracentrifugación y purificación por gradiente de sacarosa), estas variaciones se mantienen en el rango de las VEs pequeñas (aprox. 180, 120 y 80 nm con cada paso respectivamente) (57). Esto respalda la elección metodológica tomada en este trabajo, ya que sugiere que el perfil vesicular obtenido tras la ultracentrifugación constituye una representación adecuada de la población de VEs trofoblásticas.

Además, el valor registrado coincide con los reportes previos específicos para Swan-71, donde Atay et al. (2011) describen vesículas de 95-118 nm por TEM y un tamaño mayor por DLS (44), dado que esta técnica tiende a sobreestimar el diámetro en comparación con un análisis por NTA (59,60).

La caracterización por NTA del perfil vesicular reportado para otros modelos trofoblásticos es también concordante con nuestros resultados. Nacka-Aleksic et al. (2025), reportó un tamaño medio de 167,9 nm para la fracción obtenida tras ultracentrifugación para la línea celular trofoblástica de primer trimestre HTR8/SVneo (58); mientras que Ouyang et al. (2016), registró tamaños medios de 200 nm para fracciones obtenidas a 12.000 g, y de 80-90 nm para fracciones enriquecidas por ultracentrifugación y purificadas mediante gradiente de densidad para cultivos trofoblásticos primarios (16).

Por otro lado, como era esperable, en ausencia de estímulos que modifiquen las rutas de biogénesis vesicular, el tamaño de las partículas no varió entre 24 y 48 h de incubación, mientras que el aumento en la concentración a las 48 h sugiere una acumulación progresiva en el sobrenadante, acorde a la liberación constitutiva de VEs por células trofoblásticas viables (16,61).

En conjunto, estos resultados permiten establecer por primera vez un perfil basal de las VEs liberadas por Swan-71 caracterizado mediante NTA. La concordancia entre los tamaños observados, la literatura previa y los rangos esperados para fracciones enriquecidas por ultracentrifugación respalda la calidad del protocolo empleado y sugiere que la población aislada representa adecuadamente la secreción vesicular constitutiva de esta línea celular. Cabe destacar que este es el primer estudio en caracterizar VEs trofoblásticas utilizando el sistema ViewSizer 3000, lo que aporta información metodológica relevante para futuros trabajos. Sin embargo, dado que el análisis por NTA no distingue vesículas de partículas no vesiculares, será necesario complementar estos hallazgos con técnicas específicas (cómo microscopía electrónica de transmisión y caracterización proteica con marcadores específicos de VEs), para confirmar la identidad vesicular, evaluar la pureza de la fracción obtenida y profundizar en la comprensión de la heterogeneidad vesicular.

El perfil y la composición de las VEs refleja estrechamente el estado fisiológico de la célula que las libera (3). En el contexto del trofoblasto, numerosos estudios han demostrado que condiciones inflamatorias o patológicas durante la gestación modifican tanto la cantidad como el contenido de VEs placentarias (24–29,33,34). Sobre esta base, y una vez caracterizada la liberación basal de VEs por Swan-71, se evaluó si este perfil, podría alterarse

frente a estímulos inflamatorios de distinta naturaleza: la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  representativa de ambientes inflamatorios, y antígenos solubles de *T. gondii*, como aproximación inicial a un estímulo infeccioso relevante en la gestación.

La estimulación con TNF- $\alpha$  produjo una disminución moderada en la actividad metabólica, indicando que estas condiciones no comprometen su viabilidad. Este comportamiento contrasta con lo reportado por Straszewski-Chávez et al. (2009), quienes observaron reducciones más pronunciadas de la actividad metabólica y aumento de apoptosis bajo condiciones similares de estímulo (40). En concordancia con estudios previos del grupo (62), los resultados del presente trabajo sugieren que bajo las condiciones experimentales ensayadas, TNF- $\alpha$  induce respuesta controlada que permite analizar su impacto sobre la secreción vesicular sin comprometer la integridad del cultivo.

A pesar del papel atribuido a ambientes inflamatorios en la modulación de la liberación de VEs en embarazos patológicos (24,25,29), la estimulación con TNF- $\alpha$  no produjo cambios significativos en el tamaño ni en la concentración de VEs liberadas. Esta estabilidad del perfil de liberación de VEs de Swan-71, sugiere que la sola presencia de TNF- $\alpha$  no es suficiente para modificar la liberación constitutiva de VEs, lo que podría indicar que las alteraciones observadas *in vivo* en embarazos con complicaciones surgen de interacciones más complejas en el microambiente inflamatorio.

Para explorar un estímulo de origen infeccioso sin introducir VEs exógenas, se emplearon antígenos solubles de *T. gondii* (32,39). Bajo estas condiciones, la actividad metabólica se mantuvo sin cambios, mientras que la liberación de IL-6 aumentó en forma dosis-dependiente, en concordancia con la respuesta proinflamatoria descrita en modelos trofoblásticos (63–65). Esta evidencia confirma que los estímulos derivados de *T. gondii* fueron capaces de activar las células sin afectar su viabilidad. Sin embargo, al igual que con TNF- $\alpha$ , la liberación vesicular no mostró modificaciones en el tamaño ni concentración, incluso al aumentar el número de réplicas y estandarizar el análisis a 48 h. Esto indica que, aunque los antígenos solubles desencadenan una activación inmunológica clara, no son suficientes para modular la liberación basal de VEs por Swan-71, tanto en número como en tamaño. Es posible que interacciones directas o la infección activa, condiciones capaces de

modificar la biogénesis vesicular en otros modelos (23,32,66), sean necesarias para generar cambios cuantitativos detectables en esta línea trofoblástica.

En conjunto, los estímulos evaluados indujeron respuestas celulares detectables sin alterar la concentración ni el tamaño de las VEs liberadas por Swan-71. Sin embargo, la ausencia de cambios cuantitativos no excluye la posibilidad de variaciones cualitativas en su contenido molecular o en su función biológica, como ha sido reportado en otros contextos inflamatorios (24–29,33,34). En esta línea, futuras aproximaciones deberían dirigir los esfuerzos hacia la caracterización molecular detallada de las VEs post-estímulo (analizando su contenido proteico, de ARNs y marcadores de superficie), así como a la evaluación funcional sobre poblaciones celulares relevantes del ambiente decidual. Esto permitirá establecer si los estímulos evaluados modulan la comunicación intercelular mediada por VEs, aun en ausencia de cambios en sus parámetros físico-cuantitativos.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En suma, este trabajo permitió establecer en nuestro laboratorio una primera aproximación metodológica reproducible para el estudio de VEs derivadas de la línea trofoblástica Swan-71. La estandarización de las condiciones de cultivo, las estrategias de enriquecimiento vesicular y los parámetros de análisis por NTA constituyen un aporte concreto para el estudio de VEs en modelos trofoblásticos de primer trimestre, y posibilitaron registrar, por primera vez, un perfil basal de liberación vesicular de células Swan-71 caracterizado en el sistema ViewSizer 3000.

Los resultados obtenidos muestran que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la secreción vesicular de Swan-71 se mantiene estable frente a estímulos inflamatorios de distinta naturaleza. Aunque tanto TNF- $\alpha$ , como los antígenos solubles de *T. gondii* indujeron respuestas celulares claras, no se observaron modificaciones cuantitativas en la concentración ni en el tamaño de las VEs liberadas. Esto sugiere que al menos en este

modelo y bajo las condiciones ensayadas, la biogénesis y secreción vesicular del trofoblasto muestra una notable estabilidad.

Sin embargo, la ausencia de cambios físico-cuantitativos, no descarta la posibilidad de cambios cualitativos en las VEs liberadas no evaluados en este trabajo, tales como su composición molecular y su capacidad para modular la comunicación celular. En este sentido estudios futuros, que incorporen la caracterización molecular detallada, confirmación estructural mediante microscopía y ensayos funcionales sobre células maternas permitirán evaluar de manera integral el efecto de los estímulos inflamatorios en la modulación de la comunicación mediada por VEs en la interfaz materno-fetal.

En conjunto este trabajo constituye un punto de partida para la investigación del papel de las VEs trofoblásticas durante la inflamación y la infección, y aporta bases metodológicas y conceptuales para estudios orientados a comprender su contribución en contextos fisiológicos y patológicos del embarazo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. febrero de 2024;13(2):e12404.
2. Morelli AE, Sadovsky Y. Extracellular vesicles and immune response during pregnancy: A balancing act\*. *Immunol Rev*. julio de 2022;308(1):105-22.
3. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2018;19(4):213-28.
4. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. diciembre de 2011;7(6):780-8.
5. Comfort N, Cai K, Bloomquist TR, Strait MD, Ferrante AW, Baccarelli AA. Nanoparticle Tracking Analysis for the Quantification and Size Determination of Extracellular Vesicles. *J Vis Exp JoVE*. 28 de marzo de 2021;(169).
6. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of

Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci.* 29 de mayo de 2017;18(6):1153.

7. Saveyn H, De Baets B, Thas O, Hole P, Smith J, Van Der Meeren P. Accurate particle size distribution determination by nanoparticle tracking analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation. *J Colloid Interface Sci.* diciembre de 2010;352(2):593-600.
8. Ghaebi M, Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Jadidi-Niaragh F, Ahmadi M, et al. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed Pharmacother.* abril de 2017;88:61-73.
9. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol.* 4 de enero de 2019;4(31):eaat6114.
10. Nakahara A, Nair S, Ormazabal V, Elfeky O, Garvey CE, Longo S, et al. Circulating Placental Extracellular Vesicles and Their Potential Roles During Pregnancy. *Ochsner J.* 2020;20(4):439-45.
11. Peterson LS, Stelzer IA, Tsai AS, Ghaemi MS, Han X, Ando K, et al. Multiomic immune clockworks of pregnancy. *Semin Immunopathol.* agosto de 2020;42(4):397-412.
12. O'Neil EV, Burns GW, Spencer TE. Extracellular vesicles: Novel regulators of conceptus-uterine interactions? *Theriogenology.* julio de 2020;150:106-12.
13. Radu CM, Campello E, Spiezia L, Dhima S, Visentin S, Gavasso S, et al. Origin and levels of circulating microparticles in normal pregnancy: A longitudinal observation in healthy women. *Scand J Clin Lab Invest.* 18 de agosto de 2015;75(6):487-95.
14. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med.* diciembre de 2014;12(1):204.
15. Orozco AF, Jorgez CJ, Ramos-Perez WD, Popek EJ, Yu X, Kozinetz CA, et al. Placental Release of Distinct DNA-associated Micro-particles into Maternal Circulation: Reflective of Gestation Time and Preeclampsia. *Placenta.* octubre de 2009;30(10):891-7.
16. Ouyang Y, Bayer A, Chu T, Tyurin VA, Kagan VE, Morelli AE, et al. Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity. *Placenta.* noviembre de 2016;47:86-95.
17. Nardi FDS, Michelon TF, Neumann J, Manvailer LFS, Wagner B, Horn PA, et al. High levels of circulating extracellular vesicles with altered expression and function during pregnancy. *Immunobiology.* julio de 2016;221(7):753-60.
18. Frängsmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *MHR Basic Sci Reprod Med.* 1 de enero de 2005;11(1):35-41.

19. Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific Isolation of Placenta-Derived Exosomes from the Circulation of Pregnant Women and Their Immunoregulatory Consequences<sup>1</sup>. *Am J Reprod Immunol*. noviembre de 2006;56(5-6):345-55.
20. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, et al. A Gestational Profile of Placental Exosomes in Maternal Plasma and Their Effects on Endothelial Cell Migration. Oudejans C, editor. *PLoS ONE*. 6 de junio de 2014;9(6):e98667.
21. Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, et al. Human Placenta Expresses and Secretes NKG2D Ligands via Exosomes that Down-Modulate the Cognate Receptor Expression: Evidence for Immunosuppressive Function. *J Immunol*. 1 de julio de 2009;183(1):340-51.
22. Holder BS, Tower CL, Forbes K, Mulla MJ, Aplin JD, Abrahams VM. Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology*. junio de 2012;136(2):184-91.
23. Jiang D, Wu S, Xu L, Xie G, Li D, Peng H. Anti-infection roles of miR-155-5p packaged in exosomes secreted by dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors*. 6 de enero de 2022;15(1):3.
24. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, et al. Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 de septiembre de 2017;102(9):3182-94.
25. Salomon C, Scholz-Romero K, Sarker S, Sweeney E, Kobayashi M, Correa P, et al. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. *Diabetes*. 1 de marzo de 2016;65(3):598-609.
26. Li L, Li X, Zhu Y, Li L, Wu Y, Ying J, et al. Human Trophoblast Cell-Derived Extracellular Vesicles Facilitate Preeclampsia by Transmitting miR-1273d, miR-4492, and miR-4417 to Target HLA-G. *Reprod Sci*. septiembre de 2022;29(9):2685-96.
27. Liu X, Fei H, Yang C, Wang J, Zhu X, Yang A, et al. Trophoblast-Derived Extracellular Vesicles Promote Preeclampsia by Regulating Macrophage Polarization. *Hypertension*. octubre de 2022;79(10):2274-87.
28. Gebara N, Correia Y, Wang K, Bussolati B. Angiogenic Properties of Placenta-Derived Extracellular Vesicles in Normal Pregnancy and in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 20 de mayo de 2021;22(10):5402.
29. Coenen CS, Hidalgo TN, Lynn T, Jones DM, Salmon JE, Chamley LW, et al. Antiphospholipid-exposed trophoblast-derived extracellular vesicles express elevated levels of TLR7/8-activating microRNAs and induce endometrial endothelial activation, in part, through TLR7. *J Reprod Immunol*. agosto de 2024;164:104255.
30. Creisher PS, Klein SL. Pathogenesis of viral infections during pregnancy. Fang FC, editor. *Clin Microbiol Rev*. 13 de junio de 2024;37(2):e00073-23.



31. Faral-Tello P, Greif G, Romero S, Cabrera A, Oviedo C, González T, et al. Trypanosoma cruzi Isolates Naturally Adapted to Congenital Transmission Display a Unique Strategy of Transplacental Passage. Sereno D, editor. Microbiol Spectr. 13 de abril de 2023;11(2):e02504-22.
32. Gómez-Chávez F, Murrieta-Coxca JM, Caballero-Ortega H, Morales-Prieto DM, Markert UR. Host-pathogen interactions mediated by extracellular vesicles in Toxoplasma gondii infection during pregnancy. J Reprod Immunol. agosto de 2023;158:103957.
33. Bergamelli M, Martin H, Bénard M, Ausseil J, Mansuy JM, Hurbain I, et al. Human Cytomegalovirus Infection Changes the Pattern of Surface Markers of Small Extracellular Vesicles Isolated From First Trimester Placental Long-Term Histocultures. Front Cell Dev Biol. 10 de septiembre de 2021;9:689122.
34. Kaletka J, Lee KH, Altman J, Kanada M, Hardy JW. Listeria monocytogenes Infection Alters the Content and Function of Extracellular Vesicles Produced by Trophoblast Stem Cells. Freitag NE, editor. Infect Immun. 20 de octubre de 2022;90(10):e00347-22.
35. Megli CJ, Coyne CB. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. Nat Rev Microbiol. febrero de 2022;20(2):67-82.
36. Kaminski VDL, Ellwanger JH, Chies JAB. Extracellular vesicles in host-pathogen interactions and immune regulation — exosomes as emerging actors in the immunological theater of pregnancy. Heliyon. agosto de 2019;5(8):e02355.
37. Valentin-Decuadro A, Tana-Hernandez LR, Faral-Tello P, Fresia P, Guirado M, Rodriguez Rey M, et al. Toxoplasma gondii seroprevalence, seroconversion rates and genetic variability in humans from Uruguay. Parasitology. 23 de junio de 2025;1-11.
38. Bojar I, Szymańska J. Environmental exposure of pregnant women to infection with Toxoplasma gondii--state of the art. Ann Agric Environ Med AAEM. 2010;17(2):209-14.
39. Li Y, Liu Y, Xiu F, Wang J, Cong H, He S, et al. Characterization of exosomes derived from Toxoplasma gondii and their functions in modulating immune responses. Int J Nanomedicine. enero de 2018;Volume 13:467-77.
40. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, et al. The Isolation and Characterization of a Novel Telomerase Immortalized First Trimester Trophoblast Cell Line, Swan 71. Placenta. noviembre de 2009;30(11):939-48.
41. Lau YL, Lee WC, Gudimella R, Zhang G, Ching XT, Razali R, et al. Deciphering the Draft Genome of Toxoplasma gondii RH Strain. Grigg ME, editor. PLOS ONE. 29 de junio de 2016;11(6):e0157901.
42. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Int J Mol Sci. 26 de noviembre de 2021;22(23):12827.
43. Lavogina D, Lust H, Tahk MJ, Laasfeld T, Vellama H, Nasirova N, et al. Revisiting the

- Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors*. 25 de marzo de 2022;12(4):196.
44. Atay S, Gercel-Taylor C, Kesimer M, Taylor DD. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Exp Cell Res*. mayo de 2011;317(8):1192-202.
  45. HORIBA Scientific. ViewSizer® 3000 User Guide. 2019.
  46. Kornilov R, Puhka M, Mannerström B, Hiidenmaa H, Peltoniemi H, Siljander P, et al. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles*. diciembre de 2018;7(1):1422674.
  47. Soo CY, Song Y, Zheng Y, Campbell EC, Riches AC, Gunn-Moore F, et al. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*. junio de 2012;136(2):192-7.
  48. Comfort N, Bloomquist TR, Shephard AP, Petty CR, Cunningham A, Hauptman M, et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles in saliva of children with asthma. *Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids* [Internet]. 2021 [citado 23 de octubre de 2025]; Disponible en: <https://www.oaepublish.com/articles/evcna.2020.09>
  49. Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhason BV, Venkatachalam S, Mohan M, et al. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon*. agosto de 2021;7(8):e07686.
  50. Wang Y, Lou P, Xie Y, Liu S, Li L, Wang C, et al. Nutrient availability regulates the secretion and function of immune cell-derived extracellular vesicles through metabolic rewiring. *Sci Adv*. 16 de febrero de 2024;10(7):eadj1290.
  51. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. diciembre de 2018;7(1):1535750.
  52. Abramowicz A, Widłak P, Pietrowska M. Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review. *Proteomes*. 23 de mayo de 2019;7(2):23.
  53. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. Seventh edition. Capes-Davis A, Gregory C, Przyborski S, editores. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2016.
  54. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. abril de 2019;177(2):428-445.e18.
  55. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* [Internet]. marzo de 2006 [citado 31 de octubre de 2025];30(1). Disponible en:

<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb0322s30>

56. Lane RE, Korbie D, Trau M, Hill MM. Purification Protocols for Extracellular Vesicles. En: Kuo WP, Jia S, editores. Extracellular Vesicles [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [citado 31 de octubre de 2025]. p. 111-30. (Methods in Molecular Biology; vol. 1660). Disponible en: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_10](https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7253-1_10)
57. Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, et al. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. Front Pharmacol [Internet]. 11 de agosto de 2014 [citado 1 de noviembre de 2025];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00175/abstract>
58. Nacka-Aleksić M, Pirković A, Vilotić A, Kosanović M, Dekanski D, Legner J, et al. Trophoblast Extracellular Vesicles as Modulators of Keratinocyte Stress Response and Senescence. Life. 5 de junio de 2025;15(6):918.
59. Parot J, Mehn D, Jankevics H, Markova N, Carboni M, Olaisen C, et al. Quality assessment of LNP-RNA therapeutics with orthogonal analytical techniques. J Controlled Release. marzo de 2024;367:385-401.
60. Amaro-Gahete J, Benítez A, Otero R, Esquivel D, Jiménez-Sanchidrián C, Morales J, et al. A Comparative Study of Particle Size Distribution of Graphene Nanosheets Synthesized by an Ultrasound-Assisted Method. Nanomaterials. 26 de enero de 2019;9(2):152.
61. Taylor SK, Houshdaran S, Robinson JF, Gormley MJ, Kwan EY, Kapidzic M, et al. Cytotrophoblast extracellular vesicles enhance decidual cell secretion of immune modulators via TNF-alpha. Development. 1 de enero de 2020;dev.187013.
62. Arbildi P, Rodríguez-Camejo C, Perelmuter K, Bollati-Fogolín M, Sónora C, Hernández A. Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells. Am J Reprod Immunol. junio de 2022;87(6):e13534.
63. Anton L, Brown AG, Parry S, Elovitz MA. Lipopolysaccharide induces cytokine production and decreases extravillous trophoblast invasion through a mitogen-activated protein kinase-mediated pathway: possible mechanisms of first trimester placental dysfunction. Hum Reprod. 1 de enero de 2012;27(1):61-72.
64. Kazemi NY, Fedyshyn B, Yelsa I, Fedyshyn Y, Ruano R, Markovic SN, et al. Increased cell-free fetal DNA release after apoptosis and sterile inflammation in human trophoblast cells. Am J Reprod Immunol. noviembre de 2021;86(5):e13483.
65. Fernández AG, Ferrero MC, Hielpos MS, Fossati CA, Baldi PC. Proinflammatory Response of Human Trophoblastic Cells to Brucella abortus Infection and upon Interactions with Infected Phagocytes1. Biol Reprod [Internet]. 1 de febrero de 2016 [citado 2 de noviembre de 2025];94(2). Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.115.131706>

66. Tabaie EZ, Gao Z, Kachour N, Ulu A, Gomez S, Figueroa ZA, et al. Toxoplasma gondii infection of neurons alters the production and content of extracellular vesicles directing astrocyte phenotype and contributing to the loss of GLT-1 in the infected brain. Denkers EY, editor. PLOS Pathog. 16 de junio de 2025;21(6):e1012733.