



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**ROL DE LAS VESICULAS EXTRACELULARES
PEQUEÑAS EN LA COMUNICACIÓN MATERNO-
FETAL DURANTE LA GESTACIÓN**

POR MICHELLE ANAÍS CORDONIER TELLO

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesora Patrocinante y Guía: Valeska Ormazábal V.
Profesor Co-Guía: Felipe Zúñiga A.
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

21 de Octubre 2022
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS.....	7
1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 Embarazo.....	12
2.1.1 Contexto	12
2.2 Placenta.....	13
2.2.1 Definición.....	13
2.2.2 Formación y estructura de la placenta.....	13
2.2.3 Función.....	16
2.3 Comunicación materno-fetal	16
2.3.1 Definición.....	16
2.3.2 Transporte metabolitos y nutrientes	17
2.3.3 Transporte hormonas	19
2.3.4 Transporte gases.....	21
2.4 Vesículas extracelulares	22
2.4.1 Definición.....	22
2.4.2 Clasificación	22
2.4.3 Biogénesis.....	25
2.5 Propuesta de investigación.....	28
2.6 Problema	29
2.7 Pregunta de Investigación	29
2.8 Hipótesis.....	30
2.9 Objetivo General.....	30
2.10 Objetivos Específicos	30
3. METODO.....	31
3.1 Bases de datos y palabras clave	31

3.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	32
3.2.1 Criterios de inclusión	32
3.2.2 Criterios de Exclusión.....	32
3.3 Elección de artículos científicos según los criterios de inclusión y exclusión escogidos.....	33
3.4 Organización de los artículos seleccionados.....	34
3.4.1 Almacenamiento y registro	34
3.4.2 Organización de los datos	34
3.5 Análisis de los resultados	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Búsqueda Bibliográfica	36
OBJETIVO 1: EVALUAR LA CONTRIBUCIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUEÑAS EN LA PROGRESIÓN GESTACIONAL.....	39
4.2 Vesículas extracelulares contribuyen al proceso de implantación.....	41
4.2.1 Cómo el contenido de las vesículas extracelulares contribuye al proceso de implantación.....	46
4.3 Identificación y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de origen placentario en circulación materna.	53
4.3.1 Vesículas de origen placentario en circulación materna.....	56
OBJETIVO 2: RELACIONAR EL ROL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES CON LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE EL EMBARAZO.	72
4.4 Rol de las vesículas extracelulares pequeñas en la modulación de la respuesta inmune durante el embarazo.	72
4.4.1 Modulación de la respuesta inmune por vesículas extracelulares durante el embarazo.	73
OBJETIVO 3: ANALIZAR EL EFECTO QUE PUEDEN TENER LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA REGULACIÓN METABÓLICA EN EL EMBARAZO.....	81

4.5 Modulación del metabolismo celular por vesículas extracelulares durante el embarazo.....	81
5. DISCUSION	86
6. CONCLUSION	89
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación y características de las vesículas extracelulares	27
Tabla 2. Número de artículos obtenidos por palabra clave en las bases de datos Pubmed y Google Scholar.	36
Tabla 3: Resultado de búsqueda en bases de datos, criterio de años 2011 a 2021.....	37
Tabla 4: Artículos seleccionados para la revisión bibliográfica según criterios de inclusión y exclusión utilizados.	38
Tabla 5: Descripción general de los estudios relacionados a la evaluación de la contribución de las vesículas extracelulares pequeñas en la progresión gestacional.....	40
Tabla 6: Descripción general de los estudios enfocados en el rol de las vesículas extracelulares en la modulación de la respuesta inmune durante el embarazo.	74
Tabla 7: Descripción general de estudio enfocado en el rol de las vesículas extracelulares en el metabolismo de la glucosa.....	82
Tabla 8: Efecto de exo-AT en genes involucrados en glucosa y metabolismo de glicógeno en placenta humana.	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Representación esquemática de la placenta humana.....	15
Figura 2 : Representación esquemática de la placa basal placentaria	15
Figura 3: Comunicación materno-fetal depende de adaptaciones maternas, placentarias y fetales..	17
Figura 4: Clasificación y mecanismos de ingreso de las vesículas extracelulares según su tamaño	23
Figura 5: Almacenamiento y registro de la información bibliográfica en software EndNote X9.....	34
Figura 6: Organización de la información bibliográfica en Microsoft Excel.	35
Figura 7: Trofoblastos incubados con medio sin suero, suplementado sin (Serum-free médium) o con MVs aislado de células madre embrionarias.	44
Figura 8: Eensayo de cicatrización de heridas en células trofoblásticas incubadas con medio sin suero suplementadas sin (Serum-free médium) o con MVs (ES cell MVs) o 1% de suero.	44
Figura 9: Esquematzación de la comunicación entre células ES y trofoblastos, y como esto promueve finalmente la implantación del embrión.....	45
Figura 10: Funciones de los exosomas derivados del endometrio durante la implantación del embrión	46
Figura 11: Perfil proteómico de exosomas derivados de células ECC1 tratados con hormonas.	47
Figura 12: Captación in vitro y efectos funcionales de exosomas derivados de ECC1 en células trofoblásticas	49
Figura 13: Efecto funcional de exosomas derivados de ECC1 en células trofoblásticas.....	50

Figura 14: Análisis de red de proteínas SDE identificadas por IonTrap MS utilizando el software MetaCore.....	52
Figura 15: Vesículas placentarias marcadas con el anticuerpo NDOG2 conjugado con puntos cuánticos y analizadas en NanoSight NS500 en modos light scatter y fluorescencia.....	55
Figura 16: Análisis de vesículas placentarias por citometría de flujo	56
Figura 17: Exosomas aislados por inmunosorción utilizando anticuerpos contra epítomos externos de D3, CD19, CD56, CD83 y fosfatasa alcalina de tipo placentario (PLAP).....	57
Figura 18: Western blot representativo para marcadores enriquecidos en exosomas: CD63, CD9 y CD81.	59
Figura 19: Concentración de exosomas en plasma y número de exosomas durante el embarazo	59
Figura 20: Concentración de PLAP exosomal durante el embarazo normal....	60
Figura 21: Sedimento de exosomas enriquecidos cargados y analizados por Western Blot para PLAP y CD63 en exosomas del plasma materno en el primer, segundo y tercer trimestre del embarazo.....	61
Figura 22: Cambios en NE y exosomas placentarios específicos en la circulación materna durante el embarazo	62
Figura 23: Proporción de exosoma placentario específico y NE, durante los tres trimestre del embarazo	63
Figura 24: Subtipos de vesículas extracelulares liberados desde la placenta hacia la circulación materna.	64
Figura 25: Efecto de la tensión de oxígeno en la liberación de exosomas desde citotrofoblastos.....	65

Figura 26: Efecto de exosomas obtenidos desde citotrofbastos bajo distintas tensiones de oxígeno.....	66
Figura 27: Diagrama de Venn representa la distribución de proteínas comunes y únicas identificadas por nanospray LC-MS/MS (ABSciex 5600) en exosomas liberados de células trofoblásticas expuestas a distintas tensiones de oxígeno.	67
Figura 28: Concentración de exosomas en preeclampsia temprana y tardía ..	68
Figura 29: PLAP exosomal en embarazos normotensivos y preeclampsia.....	68
Figura 30: Efecto de la concentración de glucosa y la tensión de oxígeno en la liberación de exosomas	70
Figura 31: Perfil de exosomas en embarazos normales y DMG	71
Figura 32: Análisis por Western Blot de exosomas obtenidos de trofoblastos placentarios durante primer trimestre	76
Figura 33: Análisis por Western Blot de densidad de sedimentación y microscopía de electrones de exosomas aislados desde trofoblastos placentarios durante el primer trimestre.....	76
Figura 34: Microscopía inmunoeléctronica de exosomas placentarios	78
Figura 35: Exosomas placentarios que contienen FasL y TRAIL desencadenan la apoptosis de las células T Jurkat	78
Figura 36: Cuantificación por qRT-PCR de la inducción de transcripción de genes de citoquinas en macrófagos humanos por exosomas derivados de células Sw.71 (SDE)	79
Figura 37: Diagrama de flujo del proceso de aislamiento y enriquecimiento de exosomas	83
Figura 38: Comparación en el efecto de exosomas derivados de AT en metabolismo de la glucosa en placenta	84

1. RESUMEN

Durante el embarazo la madre pasa por diversos cambios fisiológicos necesarios para permitir el desarrollo fetal y una exitosa gestación. Esto implica la existencia de una coordinada comunicación entre la madre y el feto. Al respecto se ha demostrado que la placenta tiene un papel relevante, actuando como una barrera que regula el paso de los nutrientes, hormonas y moléculas regulatorias entre la madre y el feto, y por consiguiente mediando la comunicación materna-fetal. No obstante, la comunicación materno fetal no puede ser vista solo como un intercambio de nutrientes entre la madre y el feto, sino como una red de intercambio de información que regula en forma específica la función de los tejidos maternos y fetales y que responde a cambios en el medio ambiente.

Un sistema de comunicación celular recientemente descrito, son las vesículas extracelulares (VE). Las VE, corresponden a pequeñas estructuras derivadas de membranas celulares, que pueden regular la función de las células en forma específica y a distancia. Las VE pueden contener en su interior proteínas, hormonas y material genético. Se clasifican por su tamaño y/o origen y reflejan el estado funcional y metabólico de la célula de origen. Los exosomas son un tipo de VEs, que se pueden encontrar en fluidos biológicos, como el plasma, la leche materna y la orina. Se ha propuesto que las VE podrían cumplir una función relevante en la comunicación materno fetal.

El presente trabajo se centró en realizar una revisión bibliográfica y presentar evidencia actualizada sobre el rol de las VE en la comunicación materno-fetal. Como objetivo general, se planteó evaluar el rol de las vesículas extracelulares durante la gestación en el flujo bidireccional de la comunicación materno-fetal.

En la revisión bibliográfica se utilizó las bases de datos Google Académico y PubMed, abordando los temas comunicación materno-fetal y VE.

Los resultados obtenidos indican que las VE específicamente los exosomas, son relevantes para un óptimo embarazo, participando en etapas como la implantación y desarrollo embrionario. Así mismo, se ha demostrado la presencia de exosomas de origen placentario en el plasma materno. Los que aumentan en concentración a medida que se incrementa las semanas gestacionales. Sugiriendo que desempeñan un rol relevante durante la gestación. Los datos presentados, señalan que los exosomas cumplirían un rol inmunomodulador, evitando el rechazo inmune inducido por el feto. A través del transporte de citoquinas anti y proinflamatorias y de ligandos que regulan apoptosis de células inmune.

Si bien la evidencia obtenida no es directa, los resultados obtenidos permiten sugerir que los exosomas placentarios podrían regular la función metabólica de las células blanco y que el contenido de éstos varía dependiendo de las condiciones en las que éstos son secretados.

Los datos, permiten concluir que los exosomas, contribuyen en la comunicación materno-fetal, participando en la modulación de la respuesta inmune y que tendrían un posible rol en el control metabólico

No obstante, quedan muchos desafíos pendientes, en el conocimiento del rol de los exosomas en el embarazo y patologías propias de éste. Tales como: ¿Cuál es el contenido de los exosomas en condiciones patológicas y fisiológicas? ¿A qué responde el incremento de exosomas; es una respuesta compensatoria de tipo beneficiosa o promueve el avance patológico?

Ésta y muchas otras preguntas, permanecen aún en vías de desarrollo, siendo hasta ahora una línea de investigación emergente.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Embarazo

2.1.1 Contexto

El embarazo corresponde a un período de relativa plasticidad metabólica, durante el cual, ocurren una serie de cambios fisiológicos que son esenciales para controlar y mantener las adaptaciones metabólicas e inmunológicas maternas, que permitan favorecer el desarrollo fetal [44]. Estos cambios, involucran a diferentes sistemas ya sea; cardiovascular, renal, respiratorio, inmunológico, entre otros [11,53].

Las adaptaciones metabólicas son esenciales durante el embarazo, ya que permiten asegurar el crecimiento y desarrollo adecuado del feto, proporcionando a éste la energía necesaria durante la gestación y posterior al parto [69].

Se ha demostrado, que el embarazo puede ser la etapa más sensible desde el punto de vista nutricional en el ciclo de vida, lo que también significa que las intervenciones nutricionales durante el embarazo pueden impactar en la salud materna, fetal e infantil. Por otra parte, el embarazo es una situación única en la que la madre y el feto hemialogénico conviven pacíficamente [9].

Numerosos mecanismos fetales como también maternos funcionan en conjunto para proteger al feto del reconocimiento y el rechazo inmunológico. Estos antecedentes suponen que existe una estrecha comunicación y coordinación entre la madre y el feto para permitir una convivencia inmunológica y nutricional armónica durante el desarrollo [54].

La comunicación materna-fetal se ha explicado como un proceso en el cual ocurre la secreción de factores, moléculas y metabolitos, los cuales se intercambian entre la madre y el feto y cuya migración e intercambio es

dependiente de las necesidades del feto y del estado fisiopatológico de la madre [9].

Durante el embarazo, el órgano que cumple un rol de vital importancia durante todo el periodo de gestación y que media procesos importantes en la comunicación materno-fetal es la placenta. La placenta interviene en el apoyo hormonal, nutricional y de oxígeno del feto, al mismo tiempo desempeña un importante papel inmunomodulador [54].

2.2 Placenta

2.2.1 Definición

La placenta humana es un órgano único y transitorio que se desarrolla con la implantación del blastocisto en la pared del útero. La placenta humana es un órgano con forma de disco hemocorial el cual se encuentra altamente especializado y es el principal responsable del desarrollo exitoso de la gestación. Es responsable de la transferencia de nutrientes, como también del soporte y protección del feto. Por lo tanto, de manera global la placenta cumple la función de propiciar un ambiente adecuado para el éxito gestacional [9,14].

2.2.2 Formación y estructura de la placenta

El primer evento de diferenciación del linaje celular que es claramente identificable en el desarrollo del embrión corresponde a la generación de la mórula y posteriormente del blastocisto. El blastocisto posee una masa celular interna y otra externa, siendo ésta última el trofoectodermo (TE). Este se encuentra conformado por los trofoblastos, células encargadas de entregar nutrientes al embrión y que darán paso a todos los sublinajes trofoblásticos presentes en la placenta [5,20].

Durante las primeras 2 semanas se genera la adhesión de la región polar del TE a las paredes de la decidua, dando paso a la formación de la placenta como tal. Luego, este TE se diferencia en dos linajes celulares: citotrofbastos mononucleados primitivos y sincitiotrofbastos multinucleados primitivos [25,32].

Durante los días 15 a 32 existen diversos cambios que se encuentran relacionados al desarrollo de redes vasculares. Primeramente, los trofbastos inducen la diferenciación de células endoteliales, iniciando el desarrollo de la red vascular y formando los primeros vasos sanguíneos fetales. Esto coincide con la aparición de las células de Hofbauer, quienes tendrían un rol primordial en el apoyo temprano de la vasculogénesis [8].

Posteriormente, se tiene la presencia de 3 estructuras trofbásticas maduras: citotrofbastos (CTB), sincitiotrofbastos (STB) y trofbastos extravelosos (EVT). Estos últimos son capaces de invadir y remodelar el tejido materno (EVT intersticial), y además remodelar la arteria espiral uterina (EVT endovascular) [14,20,30]. Luego, las células endoteliales se conectan unas con otras y se elongan para así generar vasos ramificados, conectándose a la circulación primitiva fetal vía cordón umbilical a partir del día 32 [32]. Asimismo, se evidencia el crecimiento de las vellosidades coriónicas. En estas se encuentran las células trofbásticas que cumplen el rol de secretar factores hormonales y factores endocrinos, generando un soporte para la salud tanto de la madre como del feto. (Figura 1) [27].

Las puntas de las vellosidades se adhieren a la pared uterina formando la placa basal y envían CTBs, ocasionando una invasión de estos que atraviesan la pared uterina. Una vez iniciada esta invasión, los CTBs interactúan con las estructuras maternas para así generar el anclaje de la placenta y establecer el flujo sanguíneo hacia ella (Figura 2) [39].

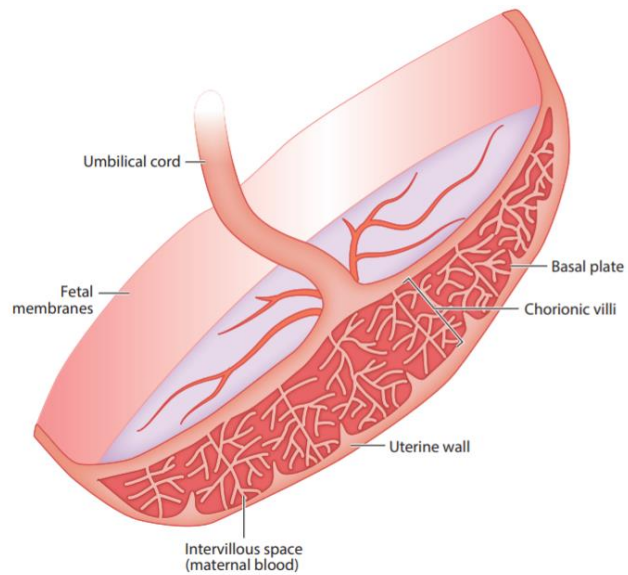


Figura 1 : Representación esquemática de la placenta humana. Maltepe *et al.*

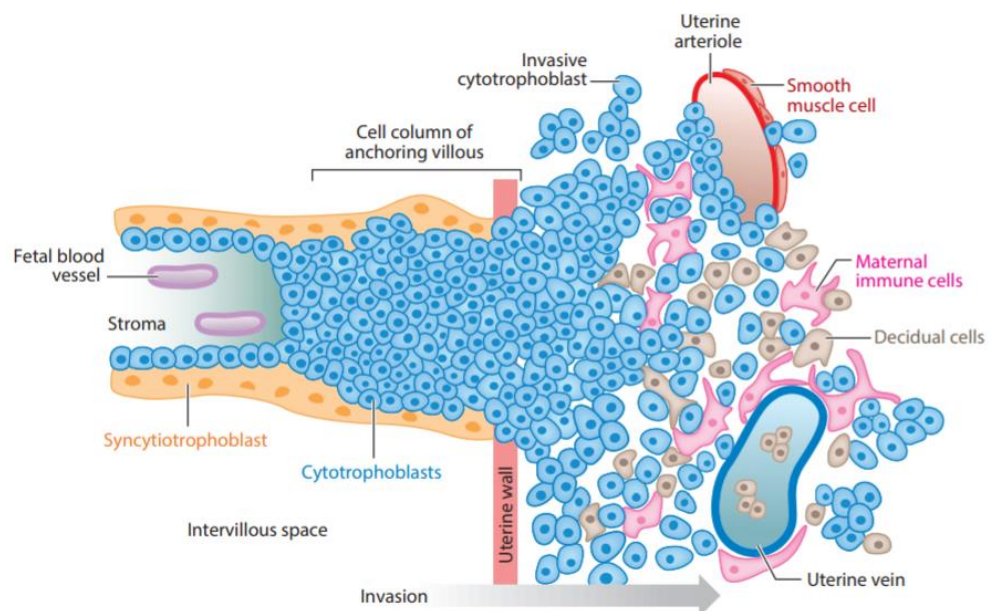


Figura 2 : Representación esquemática de la placa basal placentaria. Maltepe *et al.*

Durante la formación de la placenta es necesario que las diversas estructuras y capas pertenecientes a ella se desarrollen de manera óptima. Sumado a esto, es importante que exista la especialización de los linajes celulares presentes en este órgano. Una correcta formación de la estructura placentaria y de sus componentes celulares son fundamentales en el embarazo, ya que esto permitirá que el intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto sea el ideal, fortaleciendo la comunicación materno-fetal.

2.2.3 Función

Como la placenta cumple un rol en el cual debe estar en un constante comunicación con el feto, se desprende el concepto de comunicación materno-fetal. Durante todo el embarazo, la placenta proporciona nutrición, intercambio de gases, eliminación de desechos, pero también es una fuente de células madre hematopoyéticas y apoyo endocrino e inmunológico para el feto en desarrollo. Así como, el punto de intercambio molecular entre la madre y el feto. En este sentido, se ha considerado, a la placenta, como el órgano esencial en la comunicación materno fetal [54].

2.3 Comunicación materno-fetal

2.3.1 Definición

La comunicación materno-fetal, corresponde a un intercambio bidireccional entre la madre y el feto, del estado nutricional y de la demanda metabólica.

Durante la comunicación materno fetal, se debe tener en consideración la importancia de un balance saludable e ideal entre la madre y el feto, ya que la primera es la fuente inmunológica, nutricional y hormonal del segundo.

En este fenómeno, los metabolitos, moléculas endocrinas, células circulantes y factores secretados juegan un papel fundamental.

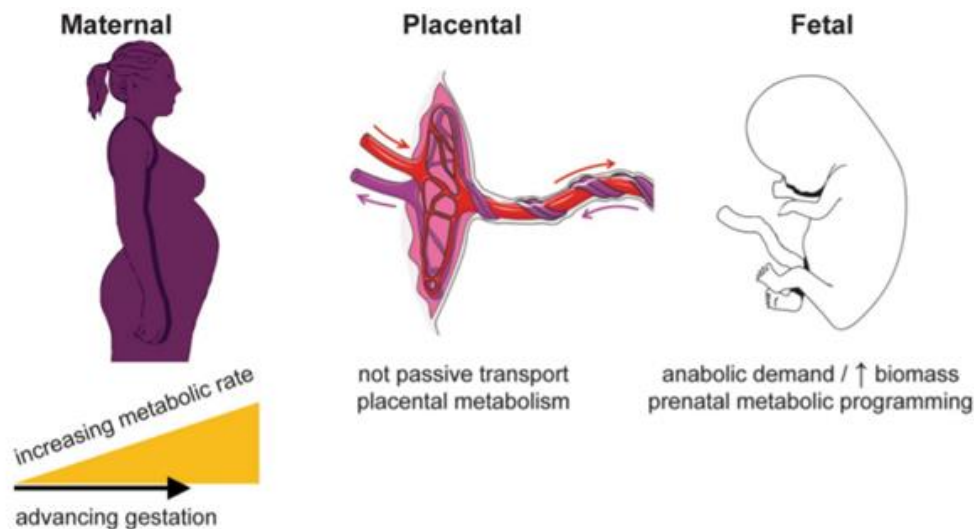


Figura 3: Comunicación materno-fetal depende de adaptaciones maternas, placentarias y fetales. Bowman *et al.*

La comunicación materno-fetal se sustenta en las adaptaciones maternas y fetales que fortalecen el intercambio entre ambos (Figura 3) [14]. Siendo la placenta, el puente que mantiene a la madre y al feto en constante comunicación, facilitando el desarrollo de un embarazo exitoso [9].

Considerando que la placenta cumple un rol en el intercambio de nutrientes, es lógico concluir que es necesario establecer un sistema de transporte recíproco conducente a favorecer la comunicación materno-fetal.

2.3.2 Transporte metabolitos y nutrientes

Desde el punto de vista nutricional, la habilidad de la placenta para transportar sustratos para el crecimiento fetal se ve influenciado por factores como lo son la abundancia, actividad y localización de transportadores en las membranas placentarias. En el caso del transporte de nutrientes como por ejemplo la glucosa,

éste corresponde a una fuente de energía primordial en el crecimiento feto placentario, presentando una alta demanda. Sobre todo, considerando que una mínima contribución a los requerimientos de glucosa del feto proviene de la gluconeogénesis fetal. Por lo tanto, es importante el desarrollo de un sistema rápido de transferencia de glucosa materna hacia el feto, siendo los protagonistas en esto, los transportadores de la familia GLUT. En el tejido placentario se han informado varias isoformas de GLUT, pero el que se ha descrito que posee más relevancia en la placenta corresponde a GLUT1. El transportador GLUT1, es el único que ha sido descrito como una proteína funcional a corto plazo en el STB, viéndose altamente expresado en su membrana basal y microvellosa [78,80].

También es importante destacar el transporte de otros nutrientes como lo son los ácidos grasos. Los lípidos cumplen un rol importante como fuente de energía, pero, además, como precursores de moléculas bioactivas y de componentes estructurales de las células [80]. En la placenta se han descrito dos lipasas claves en la liberación de ácidos grasos desde las lipoproteínas circulantes maternas: lipoproteinlipasa (LPL) y la lipasa endotelial. La LPL tiene gran actividad lipasa en triglicéridos, induciendo la liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFA) permitiendo su paso desde la circulación materna hacia la placenta. La lipasa endotelial corresponde a una fosfolipasa con muy pequeña actividad triacilglicerol lipasa. Esta fosfolipasa es la encargada de producir lisofosfolípidos a partir de fosfolípidos presentes en la circulación materna, permitiendo la liberación de NEFA y su paso a la placenta [21,36]. Se han descrito numerosas proteínas de membrana expresadas en trofoblastos que ayudarían en este transporte, destacándose la p-FABPpm, ya que es la única que sería exclusiva del tejido placentario [36].

Finalmente, también es relevante mencionar el transporte de aminoácidos. En este contexto, las concentraciones de aminoácidos fetales generalmente son más altas que las maternas, siendo esto un reflejo de un transporte activo a través

de la placenta [36]. El transporte de aminoácidos cumple un rol esencial ya que estos son necesarios para el crecimiento fetal, por lo que existen varios transportadores de aminoácidos presentes en la placenta, los cuales incluyen transportadores de aminoácidos neutros, catiónicos y aniónicos [80].

Dentro de los transportadores de aminoácidos neutros, nos encontramos con los sistemas A y L, el primero estando encargado de facilitar la captación de aminoácidos no esenciales como la alanina, glicina y serina. El sistema A, se encuentra en la membrana basal y en la membrana plasmática microvellosa orientada hacia la madre. El sistema L corresponde a un transportador sodio independiente de aminoácidos neutros, cambiando aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales con cadenas aromáticas como leucina o fenilalanina [35].

Respecto a los transportadores catiónicos o CAT, éstos como su nombre lo menciona, es el principal encargado del transporte de aminoácidos catiónicos en la membrana plasmática microvellosa orientada hacia la madre. Por otra parte, los transportadores catiónicos o sistema X_{AG} son capaces de transportar glutamato/aspartato de manera sodio dependiente y puede ser inhibido por D-aspartato [80].

2.3.3 Transporte hormonas

La placenta es un órgano endocrino altamente activo durante la gestación, secretando una variedad de hormonas con efectos fisiológicos en la madre. La prolactina-hormona del crecimiento (PRL-GH) corresponde a una de las principales familias de hormonas secretadas por la placenta durante la gestación. La familia está conformado por prolactina, lactógenos placentarios, proliferinas, proteínas relacionadas a proliferinas y la hormona del crecimiento. Los miembros

del PRL-GH serían capaces de promover cambios en el metabolismo de la glucosa materna y sobre el funcionamiento de la glándula mamaria, siendo importante para apoyar el crecimiento fetal durante el embarazo y la lactancia [49].

Otro grupo de hormonas importantes en la gestación corresponde a las hormonas esteroidales, específicamente; estrógeno y progesterona. Los roles del estrógeno durante la gestación pueden ser mediados a través de la activación de los receptores ER α y ER β . El estrógeno inicialmente es producido por el cuerpo lúteo, pero luego la placenta comienza a sintetizar esta hormona. Los niveles de estrógeno maternos se mantienen constantemente elevados durante todo el embarazo, llegando a su *peak* al término del embarazo [14]. La forma más abundante de estrógeno corresponde al estradiol, el cual durante la gestación promueve la implantación del embrión, la angiogénesis y vasodilatación, indicando que posee un rol en la regulación del flujo sanguíneo uteroplacentario. Sumado a esto, el estradiol también es capaz de aumentar la contracción de las células miométriales humanas, sugiriendo su participación en el inicio de la labor de parto [49]. La progesterona por su parte es una hormona crucial para el mantenimiento gestacional, siendo sintetizado principalmente a partir de colesterol materno a través de una reacción de dos pasos, la cual se lleva a cabo en la mitocondria del sincitiotrofoblasto. Dentro de sus funciones es importante mencionar la participación en los cambios metabólicos, promoviendo la hiperfagia, almacenamiento de grasas y resistencia a la insulina [14].

Finalmente, dentro de las muchas otras hormonas involucradas en este proceso, resulta casi imposible no mencionar la gonadotropina coriónica humana (hCG). La hCG durante la gestación es secretada por los trofoblastos en los primeros estadios, y se ha planteado que ésta corresponde a la primera hormona placentaria en actuar sobre la madre. Así mismo, en el comienzo del embarazo

la hCG mantiene el cuerpo lúteo para así mantener la producción de hormonas esteroideas hasta que la actividad de la unidad feto placentaria esteroidogénica pueda compensarse por sí sola [50].

2.3.4 Transporte gases

El oxígeno y el dióxido de carbono son transportados por difusión. El oxígeno juega un rol primordial en el desarrollo y funcionalidad de la placenta, por lo que esta molécula se difunde desde la circulación materna a la fetal a través de una capa epitelial placentaria que consume oxígeno. El intercambio gaseoso en la placenta ocurre a través de las capas celulares entre la circulación uterina y fetal. El intercambio gaseoso, se establece una vez que los lechos vasculares se encuentren maduros para permitir un suministro adecuado a través del paso de las dos circulaciones. A largo plazo, esto conduce a una reducción de la oxigenación materna [22,80]. Si bien, en el contexto del embarazo, el intercambio de nutrientes, hormonas y metabolitos, son cruciales en la mantención de la comunicación materno-fetal, este fenómeno no explica en su totalidad la comunicación armónica y coordinada entre la madre y el feto. Por otro lado, en el último tiempo se han descrito un nuevo sistema de comunicación a distancia célula-específica, capaz de promover fenómenos de regulación y modulación de la función celular. Este sistema de comunicación incorpora la utilización de partículas o moléculas que permiten la comunicación célula-célula. De esta manera se ha introducido el concepto de las vesículas extracelulares, como un medio de comunicación célula específico y que podría responder a la coordinada e intrincada red de comunicación materno-fetal [27].

2.4 Vesículas extracelulares

2.4.1 Definición

Las vesículas extracelulares (VE) son definidas como una población heterogénea de vesículas de membranas derivadas de células, de un tamaño en el orden de los nanómetros. Las VE son liberadas por las células y son capaces de empaquetar dentro de ellas biomoléculas como DNA, RNA, proteínas, etc., permitiendo así que éstas sean menos susceptibles a la degradación y transportándolas a las células blanco específicas [15,34,57,76].

Se ha propuesto que el contenido de las VE es dependiente del estado fisiopatológicos de las células que las secretan y median la comunicación a distancia de forma específica. También, se ha sugerido que el contenido de las vesículas puede modular el comportamiento de las células blanco. Por lo tanto, las VE corresponderían a un mecanismo por el cual, las células interactúan entre sí. Pero además una forma de influir y modular el comportamiento celular a través del intercambio de material e información [70].

2.4.2 Clasificación

La clasificación de las VE ha sido un tema controversial y que aún no se encuentra definido con exactitud. Diversos autores concuerdan que, dependiendo del tamaño, origen y mecanismo de formación, estas vesículas pueden categorizarse y distinguirse unas de otras (Tabla 1). En la actualidad, las principales formas de VE que se mencionan constantemente en literatura (Figura 4) y que se describirán en la presente revisión corresponden a; las microvesículas, cuerpos apoptóticos, oncosomas y exosomas.

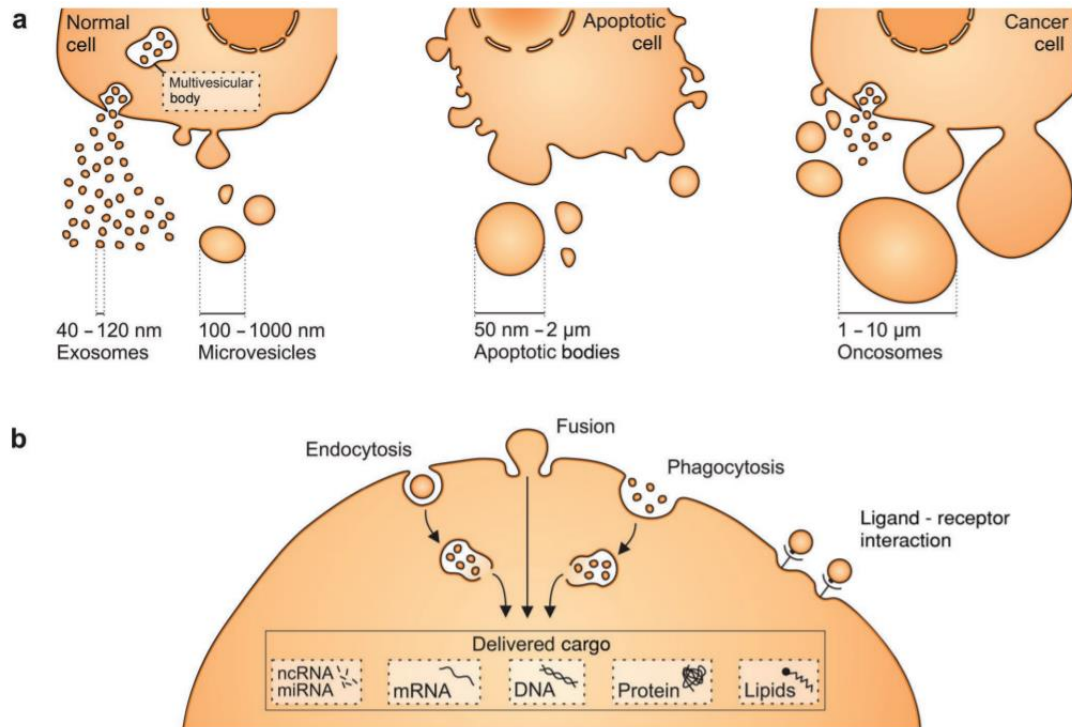


Figura 4: (a) Clasificación de las vesículas extracelulares según su tamaño. (b) Mecanismos de ingreso de las vesículas extracelulares y tipo de contenido transportado. Zaborowski *et al.*

A. Microvesículas

Las microvesículas, referidas también como micropartículas o ectosomas, se definen como vesículas heterogéneas formadas desde la superficie de numerosos tipos celulares a partir de la membrana plasmática de éstas, estando presente en diversos fluidos biológicos [55,64,71]. Tienen la capacidad de encapsular y transportar contenido como proteínas, miRNA, mRNA y ADN. Estas vesículas se caracterizan por poseer un tamaño aproximado entre 100-1000 nm [77].

B. Cuerpos apoptóticos

La apoptosis corresponde a un mecanismo de muerte celular programada, el cual puede ocurrir en diferentes tipos celulares. Este proceso posee relevancia ya que constituye a un mecanismo de homeostasis celular, permitiendo así la presencia de una población celular normal en el organismo [6]. Cuando ocurre la muerte celular por apoptosis, la célula liberará unas vesículas denominadas cuerpos apoptóticos, los cuales son únicos y propios al ser sometidos a esta muerte celular programada. Marcando una diferencia con otras vesículas extracelulares como lo son las microvesículas o exosomas [1,72]. Los cuerpos apoptóticos se caracterizan por ser vesículas con un tamaño aproximado entre 50nm-2um, siendo más grandes en comparación a las microvesículas y exosomas [77]. En cuanto a su contenido, al ser vesículas generadas durante la apoptosis en donde la célula libera sus componentes presentes al interior de ella y, por lo tanto, el contenido de cada cuerpo apoptótico puede ser variado [26].

C. Oncosomas

Los oncosomas son característicos de un evento o mecanismo particular, diferenciándolo así de otras vesículas extracelulares. Este evento en particular corresponde al cáncer, por lo que son las células cancerosas las que son capaces de generar y liberar a la superficie este tipo particular de vesículas [13]. Los oncosomas o vesículas extracelulares oncogénicas se caracterizan principalmente por ser de un tamaño atípico en comparación a otras VE, el cual fluctúa entre 1-10 um [77]. Es por esto último, que en la literatura también se mencionan como “oncosomas grandes”. Su contenido consta de moléculas bioactivas, como lo son factores de señalización implicados en el metabolismo celular, procesamiento mRNA y crecimiento. Además, contienen metaloproteinasas que pueden digerir la matriz extracelular. [40].

D. Exosomas

Dentro de la clasificación de las vesículas extracelulares, los exosomas corresponden a las más pequeñas reportadas actualmente, con un tamaño que varía en un rango de 40-120nm [77]. Estos se forman desde el interior de endosomas y son liberados al ambiente extracelular. Es posible encontrar exosomas en fluidos corporales, tales como plasma, leche materna, líquido seminal y orina entre otros [62]. Respecto al contenido, los exosomas son capaces de transportar diversas enzimas, mRNA, miRNA y también algunos lípidos como el colesterol, ceramidas, esfingomielinea, entre otros [74]. El contenido de los exosomas varía de célula a célula y es dependiente del estado en la cual se encuentre, es decir fisiológico o patológico [31].

2.4.3 Biogénesis

Los mecanismos involucrados en la biogénesis de las microvesículas aún no se encuentran bien definidos y en la actualidad siguen siendo investigados. No obstante, se ha sugerido que se originan mediante la salida directa al espacio extracelular de las vesículas desde la membrana plasmática de la célula. Este mecanismo requiere de numerosas modificaciones moleculares en la membrana plasmática, en sus componentes proteicos y lipídicos, sumado a variaciones en las concentraciones de Ca^{2+} [73]. En ese contexto, se ha señalado que el factor 6 de ADP-ribosilación (ARF6) juega un rol importante en la biogénesis de las microvesículas a través de la activación de fosfolipasa D (PLD) [1]. PLD induce la migración a la membrana de la quinasa de señal regulada extracelular (ERK), cuyo objetivo es fosforilar y activar a la quinasa de cadena ligera (MLCK), señal que finalmente promueve la liberación de las microvesículas [40].

En el caso de los cuerpos apoptóticos, es importante recordar que en el proceso de apoptosis se encuentran involucrados diversas vías de señalización celular,

generadas por división del ADN, cascadas proteolíticas y otros estímulos variados. La apoptosis transcurre por diversos estadios, siendo primero la condensación de la cromatina, división del núcleo, formación de vesículas en la membrana, culminando finalmente en la formación de los cuerpos apoptóticos [6,51]. Se ha reportado que la activación de caspasa-8 y -9 estarían involucradas en el inicio de la apoptosis, existiendo la posibilidad de seguir una de las dos principales vías: una extrínseca o de muerte vía receptor, así como también una intrínseca o mitocondrial [6].

La biogénesis de los oncosomas es una área no tan ampliamente explorada, por lo que la información con respecto a esto es muy reducida. Sin embargo, se postula que los mecanismos pueden variar según el tipo celular de origen y la estimulación que reciban. No obstante, se estima que la superfamilia Ras GTPasas, serían mediadores claves en la formación de los oncosomas [13]. En este mismo contexto, se ha reportado que la proteína RhoA activada promueve la contracción actina-miosina requerida por los oncosomas para su formación [37].

Los exosomas son generados inicialmente como vesículas intraluminales (ILVs) al interior del lumen de los endosomas, mientras éstos se encuentran en proceso de maduración a endosomas multivesiculares (MVEs) [73]. En este mecanismo se destaca la presencia de los complejos de clasificación endosómica necesarios para transporte (ESCRT), el cual consiste en un complejo de 4 proteínas (ESCRT-0, -I, -II, -III) en conjunto con proteínas accesorias (Alix, VPS4 y VTA-1) [38]. Específicamente, los complejo ESCRT-0 y ESCRT-I se encargan de agrupar clusters transmembrana ubiquitinados en microdominios de la membrana limítrofe de los MVEs y reclutan vía complejo ESCRT-II a los sub-complejos ESCRT-III, siendo estos últimos los encargados de llevar a cabo la fisión de estos microdominios [73].

Independiente del origen, las VE por su contenido y su capacidad de interaccionar en forma específica con células blanco a distancia, cumplen un papel clave en la comunicación celular. Se ha demostrado que las VE pueden regular funciones de las células blancas tales como inmunomodulación, regular proliferación celular, migración celular, transporte de nutrientes y el metabolismo celular . En este sentido, es posible sugerir que las VE pueden tener un papel importante en las adaptaciones fisiológicas propias del embarazo, como también en la comunicación materno-fetal.

Tabla 1: Clasificación y características de las vesículas extracelulares

Clasificación	Tamaño	Origen	Contenido	Referencias
Exosomas	40-120nm	Membrana plasmática endosomas	Enzimas, mRNA, miRNA, lípidos.	[19,64,72,77]
Microvesículas	100-1000nm	Superficie celular; membrana plasmática	Proteínas, miRNA, mRNA, ADN	[24,55,64,77]
Cuerpos apoptóticos	50nm-2um	Superficie celular; membrana plasmática	Fracciones nucleares, organelos celulares	[26,64,72,77]
Oncosomas	1-10um	Superficie celular; membrana plasmática	DNA, mRNA, factores de señalización	[13,40,77]

2.5 Propuesta de investigación

El establecimiento del embarazo en humanos requiere una comunicación recíproca continua entre el feto y la madre. La evidencia emergente apoya firmemente el principio de que los defectos en la comunicación materno-fetal son factores causantes del fracaso del embarazo y de las complicaciones de éste. Una mayor comprensión de la biología de la comunicación materno-fetal es crucial para comprender como ocurre la coordinación entre la madre y el feto, lo cual podrá contribuir en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de los problemas de fertilidad y del embarazo.

Tradicionalmente, la comunicación intercelular ha incluido tres mecanismos; i) señalización dependiente del contacto celular a través de moléculas de señalización unidas a la membrana (receptores) o uniones gap, ii) señalización paracrina de corto alcance a través de moléculas solubles secretadas, como citocinas y quimiocinas, iii) y señalización endocrina de largo alcance mediada por hormonas. Sin embargo, estos tres sistemas de comunicación carecen de un alto grado de especificidad y por sobre todo no logran explicar la compleja y organizada comunicación materno-fetal.

Estudios recientes han descrito un nuevo sistema de comunicación celular a distancia mediado por VE. Las VE son liberadas por las células al ambiente extracelular y pueden servir como vehículos para la transferencia de proteínas, lípidos y ARN. Las VE pueden actuar de forma local (autocrina y paracrina) y remota.

En el último tiempo se ha establecido el rol de las VE en comunicación celular y modulación del comportamiento a distancia de las células blanco. Por otra parte, los sistemas clásicos de comunicación celular no han logrado explicar en su totalidad la intrincada y fina regulación de la comunicación materno-fetal. Por

consiguiente, es posible proponer que las VE liberadas específicamente por la placenta podrían estar realizando una función en comunicación materno fetal, desempeñando funciones moduladoras del metabolismo, regulando el transporte de nutrientes o ejerciendo un rol inmunomodulador, durante todo el proceso gestacional. En conclusión, las VE podrían estar promoviendo la comunicación materno-fetal.

Considerando que:

1. Las VE son liberados por una amplia gama de tipos celulares.
2. Las VE y su contenido pueden desempeñar un papel clave en numerosos aspectos de la biología, incluidos proliferación celular, migración, inmunomodulación y regulación metabólica, entre otras funciones.
3. La detección de VE en los biofluidos reproductivos apunta a posibles roles para ellos en la comunicación intercelular necesaria para y después de la concepción.

En el presente trabajo nos propusimos realizar una revisión bibliográfica, centrada en dilucidar y presentar evidencia actualizada sobre el rol de las VE en la comunicación materno-fetal.

2.6 Problema

El transporte de nutrientes y los mecanismos clásicos de comunicación celular no dan cuenta de todas las interacciones que se producen en la comunicación materno-fetal. Por tanto, se hace necesario analizar y discutir sobre el rol que tienen otros mecanismos de comunicación celular, como las VE, y su impacto en la comunicación materno-fetal.

2.7 Pregunta de Investigación

¿Cuál es el rol de las vesículas extracelulares pequeñas en la comunicación materno-fetal?

2.8 Hipótesis

Las vesículas extracelulares pequeñas contribuyen a la comunicación materno-fetal durante la gestación.

2.9 Objetivo General

Evaluar el rol de las vesículas extracelulares pequeñas durante la gestación en el flujo bidireccional de la comunicación materno-fetal.

2.10 Objetivos Específicos

1. Evaluar la contribución de las vesículas extracelulares pequeñas en la progresión gestacional.
2. Relacionar el rol de las vesículas extracelulares con la modulación de la respuesta inmune durante el embarazo.
3. Analizar el efecto que pueden tener las vesículas extracelulares en la regulación metabólica en el embarazo.

3. METODO

3.1 Bases de datos y palabras clave

En la presente revisión bibliográfica se utilizó como base de datos los motores de búsqueda PubMed y Google académico, en los cuales se realizó la indagación del material científico, tanto de reviews como de artículos en idioma inglés.

Con el fin de definir el dominio de la investigación, se utilizarán palabras claves, las cuales corresponden a términos específicos del tema principal de la revisión. Las palabras clave designadas para la búsqueda y que sustentan el marco teórico del problema son:

- Embarazo
- Vesículas extracelulares
- Placenta
- Comunicación materno-fetal
- Placenta y comunicación materno-fetal
- Placenta y embarazo
- Comunicación materno-fetal en embarazo

Para dar respuesta a la pregunta de investigación y a los objetivos planteados se utilizaron las siguientes palabras claves:

- Vesículas extracelulares en placenta
- Vesículas extracelulares y comunicación materno-fetal
- Vesículas extracelulares en embarazo
- Vesículas extracelulares en placenta y comunicación materno-fetal

Además, para añadir o eliminar términos de búsqueda en el formulario se utilizaron los operadores lógicos booleanos como AND para combinar, OR para

sumar y NOT para excluir, de este modo se permite relacionar de forma lógica los conceptos. En base a esto último, se realizó la búsqueda utilizando una combinatoria de las palabras claves en los motores de búsqueda mencionados previamente.

3.2 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión y exclusión corresponden a una parte muy importante de la revisión, ya que permitieron focalizar la investigación. Además, fueron parte de los primeros filtros aplicados en las bases de datos seleccionadas.

3.2.1 Criterios de inclusión

Dentro de los criterios de inclusión que se utilizaron:

- a) Idioma: inglés
- b) Tipo de publicación: artículos originales y revisiones
- c) Rango de años para los artículos científicos publicados: entre los años 2011-2021, es decir, un rango de publicación de los últimos 10 años.
- d) El artículo debía contener en el título las palabras claves identificadas en la sección anterior.
- e) Se seleccionaron artículos que contengan información sobre embarazos fisiológicos y con patologías propias del embarazo.
- f) Los artículos seleccionados se centraron en responder al objetivo general planteado para la presente revisión.

3.2.2 Criterios de Exclusión

Dentro de los criterios de exclusión se consideraron:

- a) Artículos científicos que no se encuentren disponibles de manera pública y requirieran de algún medio de pago para acceder a ellos.
- b) Artículos que contengan opiniones de expertos.

- c) Artículos derivados de resúmenes de libros de congresos.
- d) Artículos que contengan reportes de casos únicos.
- e) Estudios realizados en especies distintas a la humana.

3.3 Elección de artículos científicos según los criterios de inclusión y exclusión escogidos

Considerando la metodología antes señalada, la aplicación de ésta se llevó a cabo bajo un esquema de etapas. Las cuales se describen a continuación:

a) Etapa 1: título y resumen

Se revisó si el artículo incluyen las palabras claves elegidas y si cumple o no con el objetivo del trabajo.

b) Etapa 2: Cuerpo del artículo

Una vez aplicada la etapa 1, se procedió a la etapa 2. En esta etapa se analizó el cuerpo del artículo para determinar si cumple o no con el objetivo del trabajo, valorando la calidad del trabajo.

En el caso de lectura y selección de reviews, se procedió a la selección de artículos citados en cada uno de ellos para así obtener material bibliográfico con aplicación de métodos clínicos y experimentales. Con esta estrategia se logró un análisis críticos de los artículos citados en los reviews.

c) Etapa 3: organización de los artículos y selección de data.

En esta etapa, los artículos seleccionados fueron organizados, de acuerdo con la descripción del siguiente apartado:

3.4 Organización de los artículos seleccionados

3.4.1 Almacenamiento y registro

Con el objetivo de mantener los artículos escogidos organizados de manera sistemática, se utilizó el programa EndNote X9 (Figura 5). EndNote X9 se utilizó para almacenar y tener un registro de todos los artículos de utilidad encontrados y seleccionados para ser incluidos en la revisión.

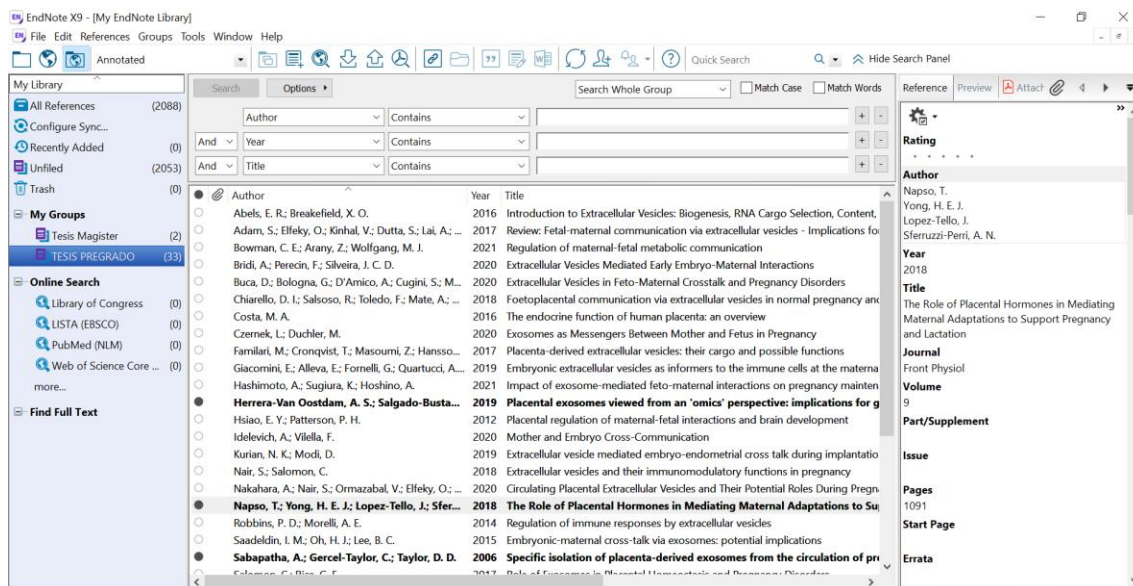


Figura 5: Almacenamiento y registro de la información bibliográfica en software EndNote X9.

3.4.2 Organización de los datos

Se generó un archivo en Microsoft Excel en el cual se tabuló la información recolectada para cada subtema de la revisión, almacenando el número de artículos para cada uno (Figura 6). Sumado a esto último, se construyó una tabla en la cual se incluyó: el título del artículo, el objetivo de éste y el tipo de artículo.

Esta estrategia permitió mantener toda la información ordenada y como también facilitó el manejo de la información.

	TITULO	OBJETIVO	TIPO
1	Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy	función EVs en inmunomodulación durante el embarazo, con especial atención a los exosomas derivados de la placenta.	Review
2	Circulating Placental Extracellular Vesicles and Their Potential Roles During Pregnancy	rol EVs en comunicación materno-fetal durante el embarazo	Review
3	Extracellular Vesicles in Feto-Maternal Crosstalk and Pregnancy Disorders	Rol EVs en comunicación materno fetal humana en embarazo normal y preeclampsia	Review
4	Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface	Potencial rol EVs liberadas por el embrión en primeras semanas embarazo en células inmunes maternas	Review
5	Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders	efecto modulatorio materno sobre secreción y contenido de EVs derivados de la placenta, y cómo puede conducir a complicaciones de los embarazos, con especial énfasis en los exosomas	Review
6	Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy	tráfico vesicular extracelular implicado en el éxito del embarazo	Review
7	Placenta derived extracellular vesicles: their cargo and possible functions	efectos comunes para la derivación y transporte de vesículas extracelulares de microambiente de desarrollo de la placenta, incluidas proteínas, ARN y lípidos y sus posibles funciones	Review
8	Placental Extracellular Vesicles and Feto-Maternal Communication	cargas de EVs placentarias y los efectos conocidos de dichas vesículas en las células/sistemas maternos, especialmente los de los sistemas inmunológico y vascular materno	Review
9	Embryo-maternal cross talk via exosomes: potential implications	EVs como un lenguaje de comunicación que facilita el diálogo cruzado embrionario-materno	Review
10	Impact of exosome-mediated feto-maternal interactions on pregnancy maintenance and development of obstetric complications	funciones que pueden desempeñar los exosomas durante la implantación del embrión, modulando las respuestas inmunitarias durante el embarazo y el inicio del trabajo de parto	Review
11	Exosomes as Messengers between Mother and Fetus in Pregnancy	exosomas derivados de la placenta en la circulación materna durante el embarazo e importancia para un embarazo saludable	Review
12	Fetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia	rol de los EVs en la comunicación feto-materna humana en el embarazo normal y la preeclampsia	Review
13	Extracellular Vesicles Mediated Early Embryo-Maternal Interactions	rol de las EVs que modulan las interacciones embrionarias-maternas durante el embarazo temprano.	Review
14	Fetal-maternal communication via extracellular vesicles - implications for complications of pregnancies	rol de las EVs durante la comunicación materno-fetal durante la gestación con especial énfasis en los exosomas	Review
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			

Figura 6: Organización de la información bibliográfica en Microsoft Excel.

3.5 Análisis de los resultados

Se seleccionaron artículos que presentaron datos experimentales y se describían los hallazgos más importantes que éstos presentaron y que permitieron sustentar la hipótesis planteada, para así dar respuesta a la pregunta de investigación y el objetivo general de la presente revisión. La data seleccionada se agrupó inicialmente en las siguientes categorías:

- Vesículas extracelulares en embarazo
- Rol de las vesículas extracelulares en la comunicación materno-fetal

4. RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se dividirán en tres capítulos:

1. Resultados asociados a la búsqueda Bibliográfica
2. Resultados sobre la identificación y caracterización de Vesículas extracelulares de origen placentario.
3. Resultados centrados en el rol de las vesículas extracelulares en la comunicación materno fetal.

4.1 Búsqueda Bibliográfica

En base a la metodología previamente descrita, a continuación se describen y tabulan los resultados de la búsqueda bibliográfica realizada a través de las bases de datos Google Académico y PubMed.

Como inicio de la búsqueda bibliográfica, se utilizaron las palabras clave mencionadas en el capítulo 3.1. En la Tabla 2, se señalan los resultados obtenidos en cada una de las bases de datos consultadas.

Tabla 2. Número de artículos obtenidos por palabra clave en las bases de datos Pubmed y Google Scholar.

Palabras Clave	 	
	Resultados	
Extracellular Vesicles (EVs)	1.530.000	27.974
Fetal-maternal communication	487.000	1.718
Pregnancy	2.570.000	1.066.989
Placenta	1.200.000	108.899
Placenta + Fetal-maternal communication	67.000	395
Placenta +Pregnancy	710.000	91.587

Tabla 2. Continuación

Palabras Clave	Resultados	
Fetal-maternal communication + Pregnancy	4.770	48
Pregnancy EVs	52.300	714
Placental EVs	42.600	446
EVs + Fetal-maternal communication	26.500	85
Placental EVs + Fetal-maternal communication	17.400	62

Para reducir el número de artículos en cada palabra clave, se aplicó el primer criterio de inclusión que corresponde a artículos científicos publicados entre los años 2011 a 2021. Por consiguiente, el compendio de datos se redujo drásticamente y los resultados fueron tabulados como se señala a continuación (Tabla 3):

Tabla 3: Resultado de búsqueda en bases de datos, criterio de años 2011 a 2021.

Palabras Clave	Resultados	
Extracellular Vesicles (EVs)	301.000	23.328
Fetal-maternal communication	24.700	1.108
Pregnancy	1.060.000	334.920
Placenta	219.000	34.861
Placenta + Fetal-maternal communication	17.700	261
Placenta + Pregnancy	66.700	30.118
Fetal-maternal communication + Pregnancy	2.530	30
Pregnancy EVs	17.900	643
Placental EVs	18.100	394
EVs + Fetal-maternal communication	17.400	85
Placental EVs + Fetal-maternal communication	12.600	62

Luego se procedió a la lectura de los títulos de los artículos arrojados por las bases de datos. Seleccionando para posterior lectura extensiva, los que contengan las palabras clave y que se encuentren relacionados con el tema de la revisión.

Una vez designados los artículos, se procedió a la lectura del *abstract* de cada uno, esto con el fin de determinar si la publicación tenía relación con el tema principal de la revisión. Para ello, durante la lectura se tuvo en cuenta los criterios de exclusión mencionados previamente en la metodología.

A partir de esto, se seleccionó una cierta cantidad de artículos que fueron utilizados como compendio de datos para la presente revisión bibliográfica. Los cuales se clasificaron según tema. El resultado final de la búsqueda bibliográfica se tabuló de la siguiente manera (Tabla 4). Un porcentaje de 39% de los resultados de la búsqueda se utilizaron para contextualizar el tema del trabajo y sustentar el marco teórico que da origen a la pregunta de Investigación.

Tabla 4: Artículos seleccionados para la revisión bibliográfica según criterios de inclusión y exclusión utilizados.

Tema	Nro. Artículos seleccionados
Embarazo	7
Placenta	6
Comunicación materno-fetal	7
Vesículas extracelulares (VEs)	28
Evaluación de la contribución de VEs pequeñas en la progresión gestacional	18
Relación rol VEs con la modulación de la respuesta inmune durante el embarazo	10
Análisis efecto VEs en regulación metabólica en el embarazo	4
Total utilizado en la revisión	80

OBJETIVO 1: EVALUAR LA CONTRIBUCIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUEÑAS EN LA PROGRESIÓN GESTACIONAL.

La comunicación intercelular es crítica para el crecimiento y desarrollo de los organismos teniendo un papel importante en mediar procesos fisiológicos y patológicos [7]. La señalización cruzada entre células, a través de factores solubles y ligados a la membrana es fundamental para informar diversas decisiones celulares, incluidas las decisiones para activar el ciclo celular o la apoptosis, migrar o diferenciarse. Cuando las células no interactúan adecuadamente o decodifican incorrectamente los mensajes, se producen enfermedades.

Por largo tiempo, la comunicación celular se describió como la señalización mediada por factores proteicos secretados tales como; hormonas, citoquinas y quimioquinas, las que pueden actuar de manera paracrina, juxtacrina y autocrina. Para comprender el papel de cada célula dentro de la comunidad local y sistémica, se deben identificar los mecanismos de comunicación celular, conocer la direccionalidad, magnitud de la interacción y relevancia biológica en el control de la homeostasis celular. Por lo tanto, la identificación y cuantificación de las vías de señalización intercelular se ha convertido en un análisis común, realizado en diversas áreas tendientes a dilucidar como se regula y modula la función del organismo en distintos contexto de salud y enfermedad. Es así, como el embarazo es un ambiente relevante para estudiar la comunicación interacción madre-feto.

Recientemente, se ha descrito a las vesículas extracelulares como una vía de comunicación celular, que abre una vía interesante para explicar fenómenos de comunicación célula-célula que no han sido resueltos por las clásicas vías de comunicación celular [46] y que pueden tener un papel importante en el inicio, desarrollo y progresión del embarazo.

A continuación, se expondrán diversos estudios enfocados en evaluar la contribución de las vesículas extracelulares pequeñas en la progresión gestacional (Tabla 5).

Tabla 5: Descripción general de los estudios relacionados a la evaluación de la contribución de las vesículas extracelulares pequeñas en la progresión gestacional

Objetivo del estudio	Tipo de muestra	Técnica utilizada para la purificación de las vesículas	Técnica Utilizada Para cuantificación o caracterización	Marcador para identificar origen placentario	Referencia
MVs derivadas de células ES aumentan la migración de trofoblastos	Células ES y línea celular trofoblástica HTR8/SVneo	Ultrafiltración	Microscopia de fluorescencia	N/I	[17]
Realizar análisis proteómicos de exosomas endometriales en fase proliferativa y receptiva	ECC1, una línea de células epiteliales de adenocarcinoma endometrial humano	Ultracentrifugación	SDS-PAGE/SYPRO Ruby densitometría de tinción de proteínas	TSG101 Alix	[23]
Caracterización morfológica y proteómica de estos exosomas de línea celular de trofoblastos	Células trofoblásticas humanas Swan71	ultrafiltración y ultracentrifugación	Análisis bionfornático	CD81 CD9 CD63 HSP70 HSP60 HSP90 Alix	[3]
Determinar tamaño y concentración de vesículas placentarias	Solución obtenida después de perfusión de placenta inmediatamente post parto	Ultracentrifugación	NTA Citometría de Flujo	NDOG2 (marcador de proteína PLAP)	[18]
Evaluar efecto inmunomodulador de exosomas placentarios	Muestra de sangre de punción venosa en mujeres embarazadas (28-30 semanas de gestación) y no embarazadas	Cromatografía de exclusión por tamaño y ultracentrifugación	N/I	PLAP	[58]
Determinar el perfil de exosomas en plasma materno y su bioactividad	Muestra de plasma de mujeres embarazadas en primer, segundo y tercer trimestre.	Ultracentrifugación	NTA	PLAP	[63]

Tabla 5. (Continuación)

Objetivo del estudio	Tipo de muestra	Técnica utilizada para la purificación de las vesículas	Técnica Utilizada Para cuantificación o caracterización	Marcador para identificar origen placentario	Referencia
Establecer el efecto de la tensión de oxígeno en la liberación y bioactividad de los exosomas derivados de citotrofbastos (CT) en la invasión y proliferación de trofbastos extravellosos.	Células de citotrofbasto (CT), obtenidas desde placentas de primer trimestre derivadas de interrupción legal del embarazo. Células HTR-8/SVneo	Ultracentrifugación	NTA	PLAP	[59]
Evaluar el perfil de exosomas placentarios en plasma de mujeres embarazadas con preeclampsia (PE)	Plasma de mujeres con embarazo menor a 33 semanas y mayor a 34 semana. Plasma de mujeres con PE temprana y tardía	Ultracentrifugación	NTA	PLAP	[52]
Evaluar el efecto de glucosa extracelular en la liberación de exosomas	Trofoblastos aislados de primer trimestre de interrupción legal del embarazo.	Ultracentrifugación	NTA	PLAP	[56]
Comparar el perfil de edad gestacional de exosomas placentarios en plasma materno de GDM con embarazos normales	Muestras de plasma de mujeres embarazadas durante primer, segundo y tercer trimestre.	Ultracentrifugación	NTA	PLAP	[61]

PLAP: fosfatasa alcalina de tipo placentario

N/I: No informado

NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas

4.2 Vesículas extracelulares contribuyen al proceso de implantación.

Un embarazo exitoso va a depender principalmente de una implantación normal y de un desarrollo correcto de la placenta. En este sentido, es importante recordar que el útero debe pasar por un proceso de diferenciación, destacándose la

reacción decidual que se genera en el endometrio para así permitir la posterior implantación del blastocisto. En el organismo existen diversos mecanismos de comunicación intercelular los cuales contribuyen a procesos fisiológicos que se llevan a cabo desde el inicio del embarazo como lo son la proliferación celular, implantación, embriogénesis y otros [41,75].

Durante los últimos años diversos estudios se han enfocado en investigar las funciones de las vesículas extracelulares en el transcurso del periodo gestacional. Específicamente, si estas se encuentran involucradas de alguna manera en el proceso de implantación. La implantación embrionaria es un proceso complejo que involucra la estrecha comunicación e interacción entre el ambiente uterino materno y el embrión en estadio de blastocisto

Un blastocisto se compone de dos tipos distintos de células: la masa celular interna (ICM), que forma el embrión, y el trofotodermo, que rodea el ICM y eventualmente forma la placenta. La capa de trofotodermo es responsable de unir inicialmente el blastocisto al revestimiento uterino, momento en el que el trofotodermo, ahora denominado trofoblasto, migra e invade el útero para implantar el embrión (es decir, la implantación). Luego, los trofoblastos proliferan ampliamente y continúan migrando e invadiendo el útero para crear la placenta, que lleva nutrientes al embrión en crecimiento. Estos primeros eventos de desarrollo son fundamentales para el establecimiento de un embarazo exitoso, y los errores que ocurren durante la implantación pueden tener consecuencias nefastas [17].

Desrochers *et al.* [17] examinó cómo las células madre embrionarias (ES), que se derivan del ICM, participan en la comunicación intercelular dentro del contexto biológico del embrión en etapa de blastocisto y su implantación en el útero. Usando un enfoque *in vitro* que las células ES liberan MV, que pueden activar vías de señalización en los trofoblastos, lo que conduce a una mayor migración. Para responder si las células ES tienen influencia sobre los trofoblastos, se utilizó

la línea celular HTR8/Svneo la que fue cultivada en medio libre de suero, como también en paralelo se desarrolló un cultivo de la misma línea celular crecida en presencia de microvesículas (MVs) derivadas ES. En esas condiciones se examinó si los MV generados por las células ES estimulaban los trofoblastos para formar bordes de ataque (*leading edges*), un sello distintivo de la migración de células polarizadas. Los trofoblastos colocados en medio sin suero, que carecían o se complementaban con MV derivados de células ES durante 1 h, se tiñeron para detectar actina filamentosa (actina F) y Rac1, dos proteínas que se localizan en los bordes de ataque de las células migratorias. Casi el 35% de los trofoblastos tratados con MV derivadas de células ES mostraron bordes de ataque bien definidos, lo que representa un aumento de más del doble en comparación con las células control no tratadas (Figura 7). La capacidad de los MV de células ES para inducir a los trofoblastos a formar bordes de ataque estuvo acompañada de una migración mejorada medida en ensayos de cicatrización de heridas, que fue comparable a la estimulación obtenida con suero (Figura 8).

Los resultados obtenidos en trofoblastos tratados con las MVs dan cuenta que estos son capaces de adquirir un fenotipo migratorio. Esto además es comparable con la estimulación obtenida con 1% suero, la cual es utilizada para confirmar que el efecto observado es causado por una migración celular.

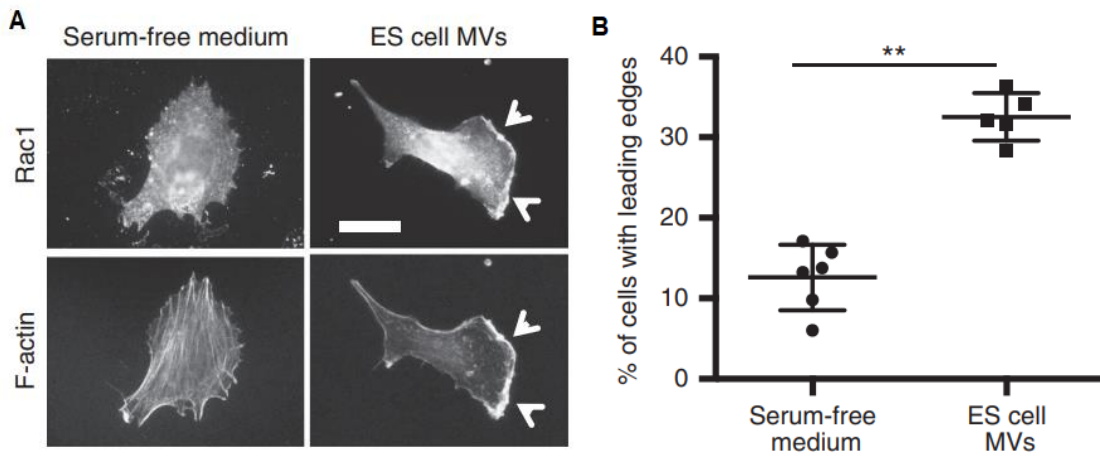


Figura 7: (A) Trofoblastos incubados con medio sin suero, suplementado sin (Serum-free médium) o con MVs aislado de células madre embrionarias. **(B)** Porcentaje de células en A que presentan *leading edges*. Desrochers et al.

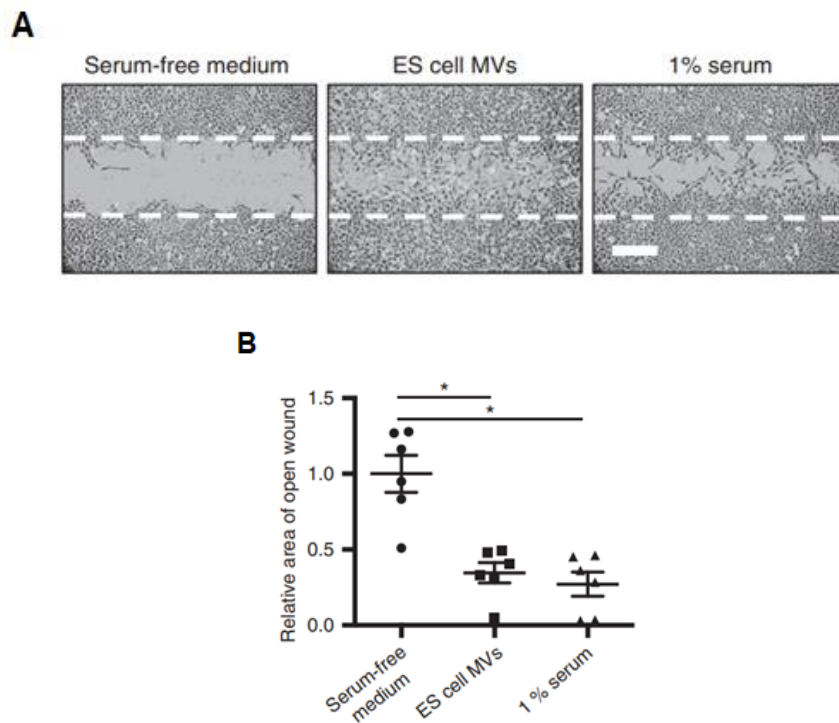


Figura 8: (A) Imágenes ensayo de cicatrización de heridas en células trofoblásticas incubadas con medio sin suero suplementadas sin (Serum-free

médium) o con MVs (ES cell MVs) o 1% de suero. **(B)** Los ensayos en C fueron cuantificados y graficados según el área relativa de la herida abierta. Desrochers *et al.*

Los autores mostramos que las células ES generan y secretan VE capaces de generar señales activadoras en los trofoblastos que contribuirían de manera positiva a generar un aumento en la migración de éstos. Afectando uno de los pasos más tempranos e importantes del embarazo, la implantación (Figura 9). Los autores, además, mostraron que la inyección de MV de células ES en blastocistos mejora sus tasas de implantación después de que los embriones se transfieren a los úteros de ratones hembra (Datos no mostrados en la revisión dado que es un estudio en animales). Hasta donde sabemos, los hallazgos informados aquí brindan las primeras demostraciones de que el embrión puede enviar señales que promueven directamente la migración del trofoblasto e influyen en el proceso de implantación

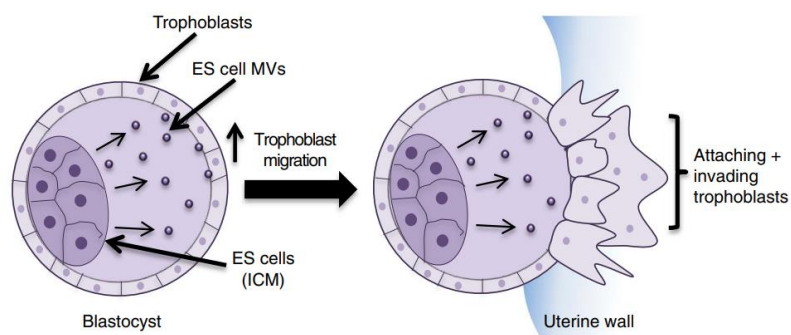


Figura 9: Esquematización de la comunicación entre células ES y trofoblastos, y como esto promueve finalmente la implantación del embrión. Desrochers *et al.*

4.2.1 Cómo el contenido de las vesículas extracelulares contribuye al proceso de implantación.

La comunicación sincrónica entre el embrión en desarrollo y el endometrio receptivo es crucial para la implantación del embrión. Por tanto, se requiere una interacción sinérgica entre el endometrio y el blastocisto, tanto inmediatamente antes como durante la implantación. El endometrio es un tejido dinámico que sufre una remodelación y diferenciación cíclica a lo largo de la vida reproductiva de la mujer. Cada ciclo menstrual consta de 2 fases; una fase proliferativa (no receptiva) y una secretora (receptiva), reguladas por las hormonas esteroides estrógeno (E) y progesterona (P), respectivamente. Este fenómeno implica la regulación celular y molecular de la comunicación célula-célula, la cual va a inducir adaptaciones que implican la remodelación del citoesqueleto/matriz extracelular (MEC), las respuestas de adhesión y la expresión de muchos factores de crecimiento, citocinas y sus mediadores (Figura 10) [23]. Es importante destacar que, en términos del microambiente preimplantacional, se han identificado proteínas secretadas de origen epitelial endometrial, y lo que es más importante, tienen funciones definidas en la interacción embrión-materno.

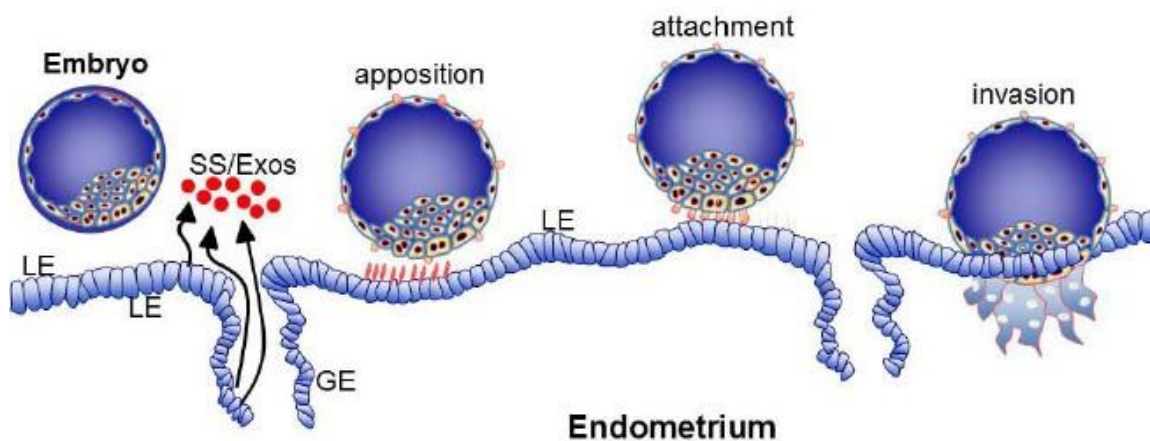
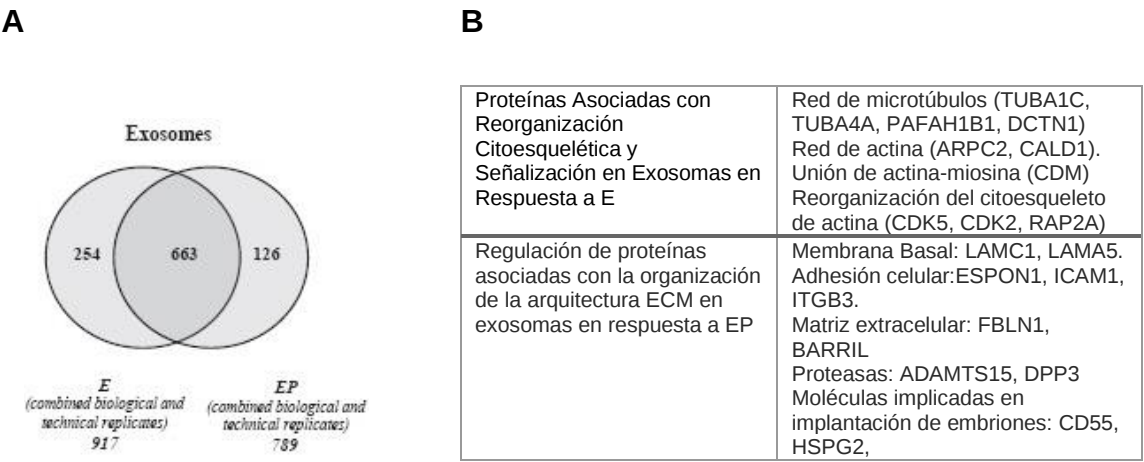


Figura 10: Funciones de los exosomas derivados del endometrio durante la implantación del embrión. Greening *et al.*

Recientemente, se han identificado exosomas en el líquido folicular de los folículos ováricos, donde se ha demostrado que contienen diversos microARN (miARN), lo que sugiere un papel en la mediación de la comunicación celular en el microambiente local. En este sentido, se investigó el rol de los exosomas en la regulación de las interacciones endometrio-embrión en todo el microambiente uterino.

Estudios proteómicos realizados en exosomas derivados del epitelio endometrial purificados (Exos) influenciados por las hormonas del ciclo menstrual estrógeno (E; fase proliferativa) y estrógeno más progesterona (EP; fase receptiva) [23], muestran que en la fase receptiva, los exosomas recolectados se encuentran enriquecidos de forma única con 254 y 126 proteínas, en la fase proliferativa. Es importante destacar que la carga de proteína EP-Exos se relacionó con cambios fundamentales en la implantación: adhesión, migración, invasión y remodelación de la matriz extracelular (Figura 11)



E: Estrógeno; P: Progesterona

Figura 11: Perfil proteómico de exosomas derivados de células ECC1 tratados con hormonas. **(A)** Diagrama de Venn bidireccional del perfil proteómico de

exosomas tratados con E y EP. **(B)** Tabla resumen del perfil diferencial de proteínas tratadas con E y con EP. Greening *et al.*

La actividad funcional de los exosomas derivados del endometrio se investigó utilizando E-Exos y EP-Exos marcados con fluorescencia, los que se agregaron a las células trofoblásticas HTR8 y se controlaron mediante imágenes de células vivas. El registro en tiempo real mostró la acumulación de exosomas durante un período de 4 h con un aumento significativo en la intensidad de la fluorescencia observada en las células trofoblásticas HTR8 expuestas a EP-Exos y E-Exos en comparación con el control (Figura 12 A y B).

Para investigar si los exosomas transportan carga funcionalmente activa, se examinó la capacidad adhesiva de las células HTR8 en ausencia o presencia de E-Exos y EP-Exos. La adhesión fue monitoreada por el sistema xCELLigence y mostró que EP-Exos indujo un aumento muy rápido (en 1 h) en la capacidad adhesiva de las células HTR8, alcanzando un máximo a las 1,5 h y luego manteniéndose hasta las 4 h (punto final experimental). Este aumento de la adhesión fue significativamente mayor después de la absorción de EP-Exos ($P < 0,001$) en comparación con E-Exos (Figura 12 C)

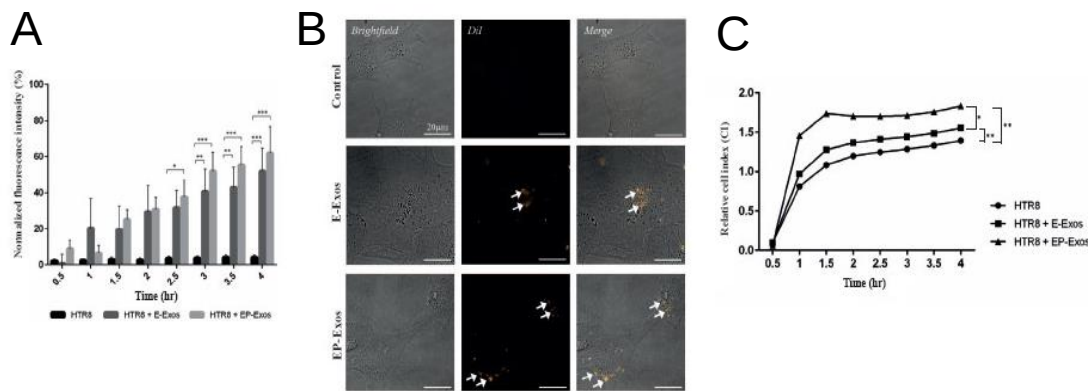


Figura 12: Captación in vitro y efectos funcionales de exosomas derivados de ECC1 en células trofoblásticas. (A) Acumulación de la intensidad de fluorescencia de E-Exos y EP-Exos marcados con Dil en células receptoras de trofoblastos HTR8 humanos durante 4 h de grabación en vivo. (B) Imágenes microscópicas de HTR8 en ausencia (panel superior) y presencia de exosomas (paneles medio e inferior). Puntas de flecha: exosomas marcados con Dil dentro de células HTR8. (C) ensayo de adhesión celular en trofoblastos humanos en presencia y ausencia de E-Exos y EP-Exos. Greening *et al.*

Los resultados mostrados hasta ahora indican que las células de endometrio son capaces de secretar exosomas cuyo contenido es diferente dependiendo el estímulo que reciben las células. Estos exosomas serían capaces de modular la función de los trofoblastos, dependiendo del contenido de los exosomas.

Con el fin de poder determinar la posible vía que lleva a la respuesta de adhesión en las células trofoblásticas con exosomas, este grupo de investigación se propuso analizar ciertos marcadores de adhesión, siendo estos la kinasa de adhesión focal (FAK), FAK fosforilada (Tyr³⁹⁷), fibronectina y EpCAM.

De esta manera, fueron capaces de demostrar que las células expuestas a los exosomas presentaron un aumento significativo en los niveles de FAK, FAK-Tyr³⁹⁷ y fibronectina. Además, EP-Exos generó un mayor incremento en la expresión de FAK y FAK-Tyr³⁹⁷ en comparación a E-Exos ($P < 0.01$) (Figura 13).

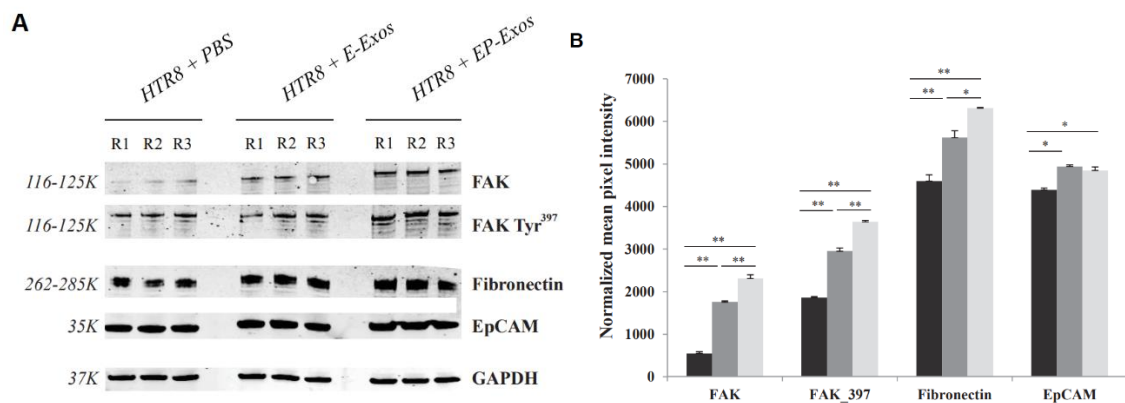


Figura 13: Efecto funcional de exosomas derivados de ECC1 en células trofoblásticas. **(A)** Western blots de proteínas blanco downstream (FAK, FAK fosforilado, fibronectina y EpCAM) en células HTR8 después de 4h cultivadas con (50 ug/mL) o sin E-/E-Exos. **(B)** Análisis densiométrico de Western blot normalizados en (A). Data presentada como intensidad relativa (media $\pm$ SEM, n=3 replicado biológico) para cada punto de tiempo y proteína target; *P<0.05, **P<0.01 considerados significativos. Greening *et al.*

Así, este estudio demuestra que la presencia de exosomas derivados de endometrio en fase receptiva en el contexto de la peri-implantación puede alterar el comportamiento del trofoblasto de tal manera de favorecer la respuesta adhesiva funcional necesaria para la implantación.

Considerando la función del trofoblastos en el embarazo, un grupo de investigación liderado por Atay [3], decidió investigar la composición proteica de las vesículas liberadas por los trofoblastos para definir las posibles actividades biológicas asociadas con ellas y las vías moleculares moduladas por estas vesículas.

Para determinar la composición proteica de exosomas derivados de la línea celular de trofoblastos Sw71. Los exosomas se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo libre de células usando nuevamente un protocolo de

purificación de tres pasos, comenzando con ultrafiltración de los medios acondicionados, flotación en gradientes de densidad de sacarosa y ultracentrifugación.

En general, se identificaron un total de 282 proteínas totales: 232 de ellas representaban proteínas definidas y 50 proteínas constituían proteínas no caracterizadas y/o hipotéticas.

La mayoría de las proteínas de exosomas derivados de células Sw71 derivan del citosol (45,3%), asociadas a la membrana (33,9 %) y del espacio extracelular (12%). En cuanto a los principales procesos biológicos, se identificaron proteínas involucradas en el metabolismo (38%), el desarrollo (24%) y la respuesta al estímulo (21%), la adhesión (8,8%), la respuesta inmunitaria (7,8%), la reproducción (5%), locomoción (5%), crecimiento (1,3%) y muerte celular (1,3%).

Las 232 proteínas asociadas a exosomas identificadas se clasificaron utilizando las subclases de ontología génica (GO). Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 14.

Las tres redes más significativas definidas por el software MetaCore fueron representadas por la red 1-respuesta inmune/fagosoma en presentación de antígeno, red 2-citoesqueleto/regulación del reordenamiento del citoesqueleto, y la red de 3 células/adhesión a matriz celular mediada por integrina.

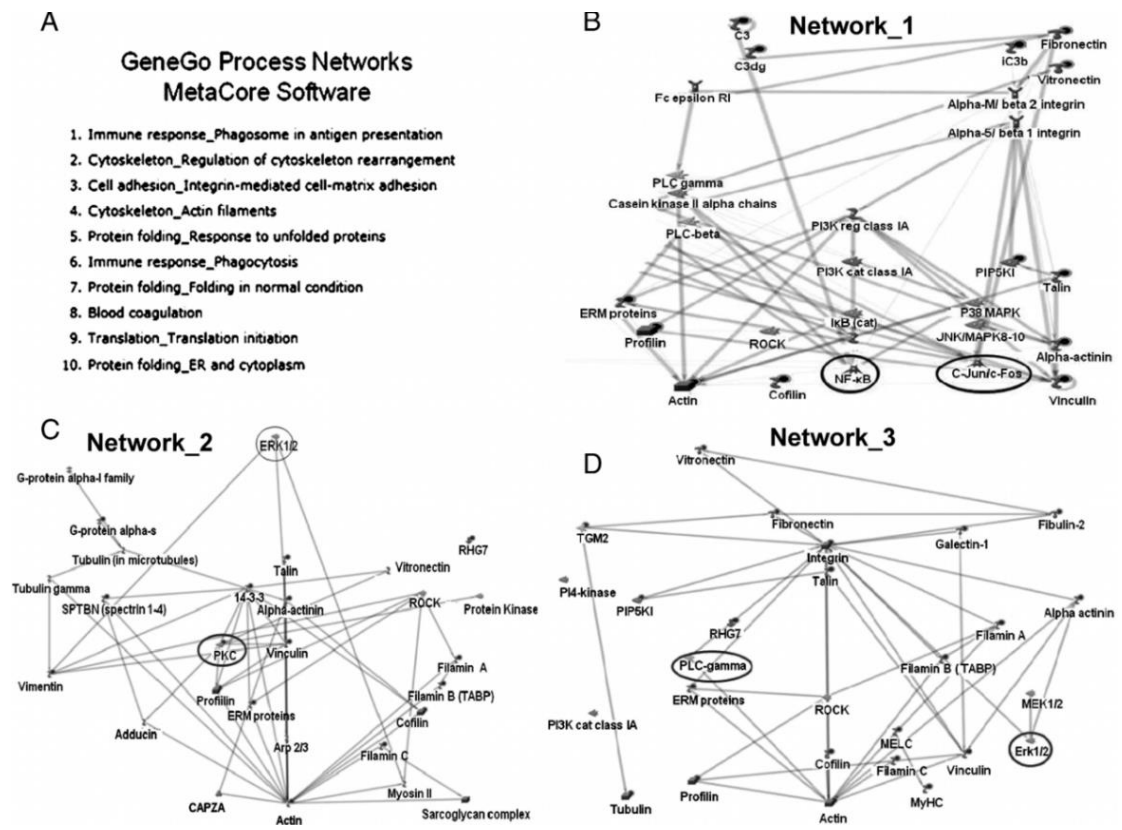


Figura 14: Análisis de red de proteínas SDE identificadas por IonTrap MS utilizando el software MetaCore. **(A)** Redes de procesos GeneGo definidas por MetaCore. Lista de las diez redes biológicas mejor puntuadas significativamente. Las proteínas derivadas experimentalmente de IonTrap están representadas por círculos negros oscuros. Solo la interacción directa proteína-proteína se representa aquí como líneas continuas. **(B)** Red 1: Respuesta Inmune_Fagosoma en presentación de antígeno. **(C)** Red 2: Citoesqueleto_Regulación del reordenamiento del citoesqueleto. **(D)** Red 3: Adhesión celular_Adhesión de matriz celular mediada por integrinas. Tenga en cuenta que todas las vías activan NFkB/PI3Kinase y MAPKinase intracelulares. Atay *et al.*

Los resultados hasta ahora presentados indican que durante el embarazo y otros procesos, las células utilizan vesículas extracelulares como una vía de comunicación. Además, el mensaje contenido en las vesículas cambia dependiente del ambiente en el que éste inmersa las células que originan las vesículas.

Hasta ahora, los resultados mostrados indican que los exosomas modulan el proceso de implantación a través de regular la proliferación e invasión de células durante la gestación. Además, los resultados permiten suponer que su papel puede también estar asociado a un rol inmunomodulador y de regulador metabólico.

4.3 Identificación y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de origen placentario en circulación materna.

Las microvesículas y nanovesículas celulares (exosomas) contribuyen a la comunicación celular y están involucradas en muchos procesos biológicos todos centrados en la señalización celular. A través de: (i) transportar diversas proteínas de membrana y citosólicas, así como mensajeros y microARN ; (ii) pueden afectar la fisiología de sus células diana de varias formas, desde inducir la señalización intracelular tras la unión a los receptores, hasta conferir nuevas propiedades tras la adquisición de nuevos receptores, enzimas o material genético por fusión o endocitosis; (iii) Participando en procesos fisiológicos, como también estar involucradas en procesos fisiopatológicos. Evidencia emergente, sugiere que los exosomas pueden transferirse durante el embarazo desde la placenta al feto, como también desde la placenta hacia circulación sistémica materna [65].

Como se mencionó con anterioridad en el capítulo 2.4, se ha reportado que las vesículas extracelulares estarían presentes en la mayoría de los fluidos biológicos como lo son la sangre, saliva, leche, líquido amniótico y órganos como la placenta [76]. Dado la importancia de las VE, éstas tienen un gran potencial como biomarcadores no invasivos para evaluar la salud materna y fetal.

Las vesículas extracelulares median las comunicaciones feto-maternas y participan en muchas actividades fisiológicas importantes durante el embarazo, incluida la implantación embrionaria, la inmunomodulación, la remodelación de las arterias espirales, las adaptaciones metabólicas y el parto. Algunas de ellas se abordarán en el próximo capítulo de esta revisión.

Hace un par de años atrás, una de las dificultades de la investigación de las microvesículas estaba restringida por los métodos experimentales. Se utilizaba microscopia electrónica, para determinar su presencia o western blot para determinar la abundancia de marcadores, no obstante, estas herramientas no entregan información acerca del número o tamaño de éstas.

Se postulaba que la placenta libera microvesículas y nanovesículas hacia la sangre materna durante el embarazo como parte del recambio normal de la superficie placentaria. Sin embargo, las vesículas recuperadas del plasma derivan de muchos tipos de células diferentes, incluidas plaquetas, células endoteliales, leucocitos y glóbulos rojos, lo que complica su análisis.

Dragovic *et al.* [18] realizaron los primeros estudios utilizando análisis de tracking de nanopartículas (NTA) para medir el tamaño y la concentración de microvesículas y nanovesículas en muestras biológicas de origen placentario. Para reducir la interferencia de vesículas derivadas de células diferentes a la placenta, en este trabajo se obtuvieron vesículas extracelulares a través de la

perfusión placentaria, inmediatamente después del parto. Las muestras se obtuvieron de mujeres que cursaron un embarazo saludable y que fueron sometidas a una cesárea. Para confirmar el origen placentario de las vesículas obtenidas, se utilizó el anticuerpo NDOG2 dirigido contra la fosfatasa alcalina placentaria, el cual es un marcador clásico de placenta. Como control se utilizó un anticuerpo de tipo IgG1.

Los resultados del análisis por NTA de dispersión de luz y fluorescencia para vesículas etiquetadas con NDOG2 y control IgG 1, muestran distribuciones de tamaño de las vesículas con picos en la región de 100 nm y 180 nm (rango de 50 a 600 nm), ya sea que se mida en modo de dispersión de luz o de fluorescencia. Las pequeñas diferencias entre los tamaños de los picos en los modos de dispersión de luz y fluorescencia se encontraban dentro del nivel de variabilidad observado para esta técnica (Figura 15). Un análisis complementario de las vesículas por citometría de flujo muestra que un 93,5 % de las vesículas obtenidas son NDOG2 positivas, confirmando su origen placentario (Figura 16)

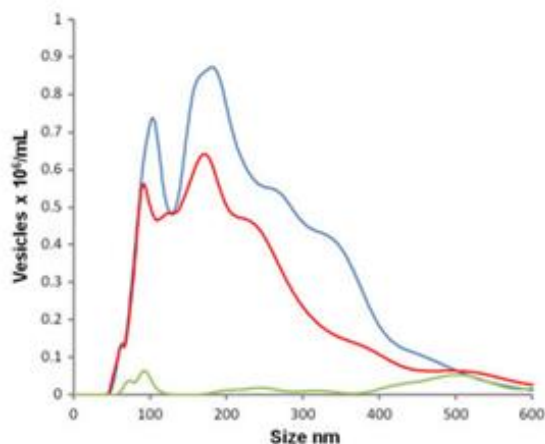


Figura 15: Vesículas placentarias marcadas con el anticuerpo NDOG2 conjugado con puntos cuánticos y analizadas en NanoSight NS500 en modos light scatter (línea azul) y fluorescencia (línea roja). La línea verde muestra

vesículas placentarias marcadas con anticuerpo de control de isotipo de punto cuántico IgG1 de ratón analizado en modo de fluorescencia. Dragovic *et al.*

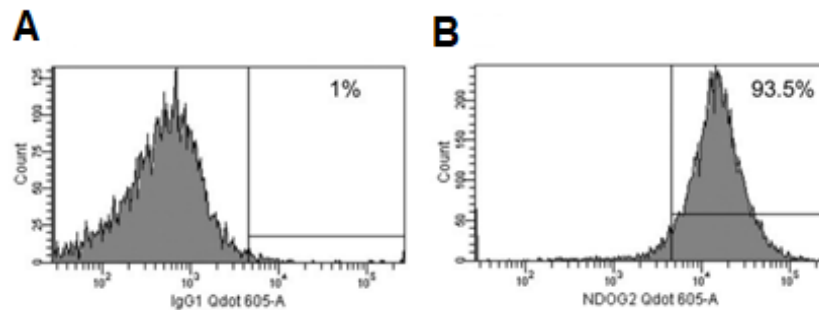


Figura 16: Análisis de vesículas placentarias por citometría de flujo. (A) Vesículas placentarias marcadas con anticuerpo de control de isotipo IgG1 de ratón conjugado con puntos cuánticos. (B) Vesículas placentarias marcadas con anticuerpo NDOG2 específico para vesículas placentarias conjugadas con puntos cuánticos. Dragovic *et al.*

Estos resultados validan datos anteriores de literatura en los que se proponía que la placenta era capaz de secretar vesículas extracelulares. Por otra parte, estos resultados entregan una herramienta adicional a los estudios descriptivos y cualitativos de las VE, ya que permite la posibilidad de realizar estudios cuantitativos de las vesículas extracelulares en distintos contextos biológicos.

4.3.1 Vesículas de origen placentario en circulación materna

Considerando el rol de las VE en comunicación celular, una de las preguntas a resolver es cuál es el destino de las VE liberadas por la placenta, es decir su función es modular la función celular en el entorno cercano o bien salen del ambiente gestacional a la circulación sistémica materna y/o fetal. En este sentido el grupo de investigación de D. D Taylor [58] identificó la presencia de exosomas

placentarios en circulación sistémica de mujeres embarazadas, no así en mujeres no embarazadas. Esta identificación se realizó a través de la selección desde exosomas plasmáticos totales, aquellos provenientes de placenta a través de la unión a PLAP acoplados a microesferas de agarosa (Figura 17).

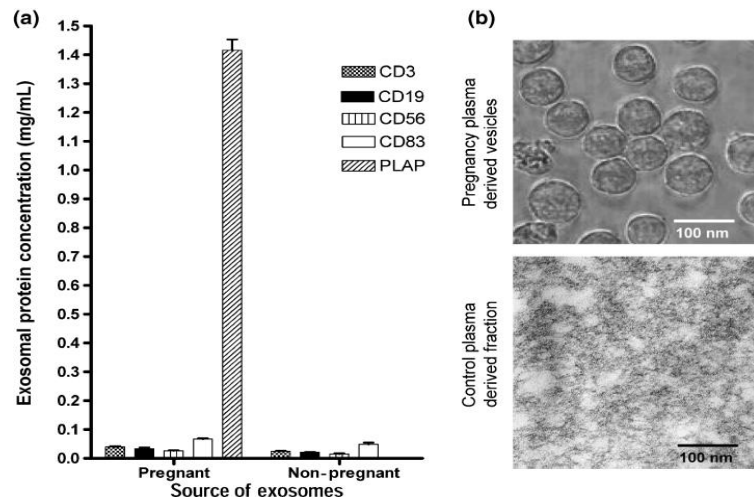


Figura 17: Exosomas aislados por inmunosorción utilizando anticuerpos contra epítomos externos de D3, CD19, CD56, CD83 y fosfatasa alcalina de tipo placentario (PLAP). (a) Concentración de proteínas exosomales. (b) Micrografías electrónicas de exosomas placentarios aislados y la fracción autóloga del control no embarazada. D.D Taylor *et al.*

Una vez establecida la presencia de exosomas en circulación sistémica materna la pregunta a resolver es: ¿la cantidad de exosomas de origen placentario varía de acuerdo con las etapas del embarazo?

4.3.1.1 Variación del número de vesículas durante las etapas gestacionales.

Un estudio realizado por Salomon *et al.* [63] se centró en analizar las concentraciones de exosomas derivados de placenta, presente en circulación

sistémica. Para ello, se realizó el seguimiento durante el primer, segundo y el tercer trimestre de embarazo, considerando además como control mujeres no embarazadas.

El primer trimestre se consideró a las semana 6-12 de gestación, el segundo trimestre a las semana 22-24 de gestación) y tercer trimestre (semana 32-38 de gestación).

Los exosomas de plasma materno aislados por centrifugación diferencial y en gradiente de densidad de sacarosa se caracterizaron por una densidad de flotación de 1,126 a 1,187 g/ml (fracciones 5 a 8), la presencia de CD63, CD81 y CD9 según lo evaluado por Western blot (Figura 18). Además, se determinó un tamaño de partículas de ~100 nm de diámetro cuando se obtienen imágenes por microscopía electrónica (dato no mostrado).

Los resultados indican que la concentración de proteína exosomal en plasma de mujeres no embarazadas ($n = 9$) promedió $0,03 \pm 0,01$ mg de proteína/ml y fue significativamente más baja que la observada en el plasma de mujeres durante el primer trimestre ($0,61 \pm 0,14$ mg de proteína/ml, $n = 20$, $p < 0,001$, prueba t de Student). Además, las concentraciones de proteína exosomal en plasma aumentaron significativamente durante el avance del embarazo y promediaron 0.94 ± 0.41 y 1.40 ± 0.11 mg/ml en el segundo y tercer trimestre respectivamente (Figura 19 A).

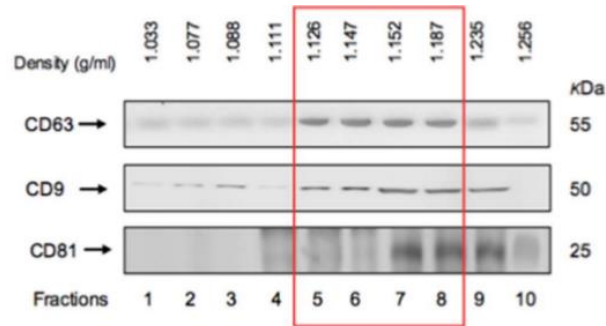


Figura 18: Western blot representativo para marcadores enriquecidos en exosomas: CD63, CD9 y CD81. Densidad del exosoma representado como un cuadrado rojo. Salomon *et al.*

El número de exosomas (NE) y la concentración de PLAP exosomal se cuantificó en muestras seriadas de plasma materno obtenidas durante el primer, segundo y tercer trimestre. En mujeres embarazadas, el NE aumentó significativamente (ANOVA, $p < 0,001$) con la progresión del embarazo (Figura 19 B).

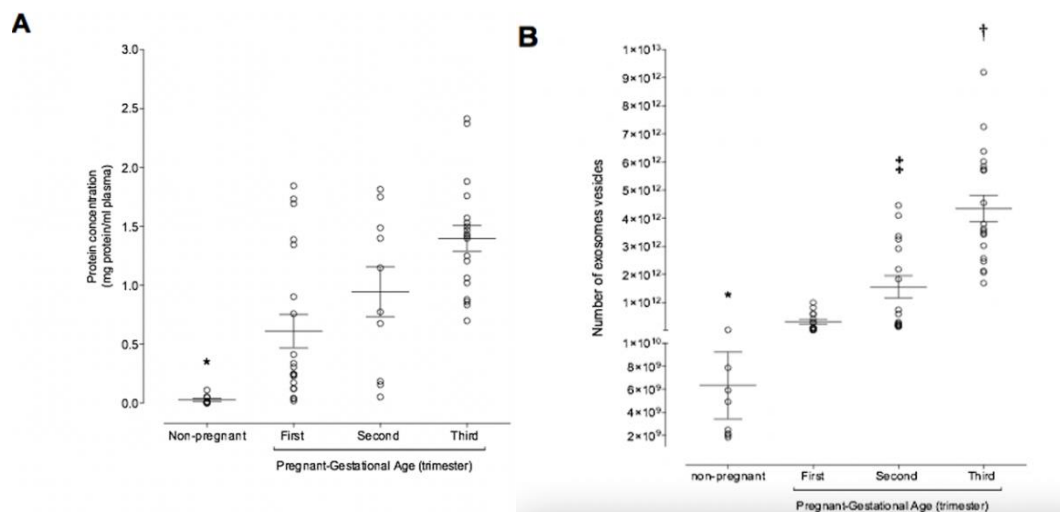


Figura 19: (A) Concentración de exosomas en plasma presentada como mg de proteína exosomal por ml de plasma y (B) Número de exosomas durante el embarazo. Salomon *et al.*

La concentración de exosomas derivados de la placenta en el plasma materno (como lo indica el PLAP exosomal) aumentó con la edad gestacional: primer trimestre $99,8 \pm 5,3$ pg/ml; segundo trimestre 397 ± 23 ; y tercer trimestre 731 ± 35 pg/ml (Figura 20) . PLAP exosomal inmunorreactivo no fue detectable en plasma de mujeres no embarazadas (datos no mostrados).

Se observaron resultados similares en la abundancia de proteína PLAP exosomal (Western Blot) durante el embarazo (Figura 21).

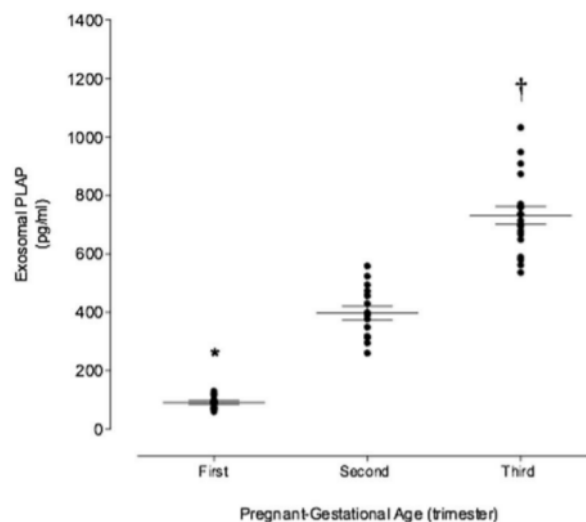


Figura 20: Concentración de PLAP exosomal durante el embarazo normal. Salomon *et al.*

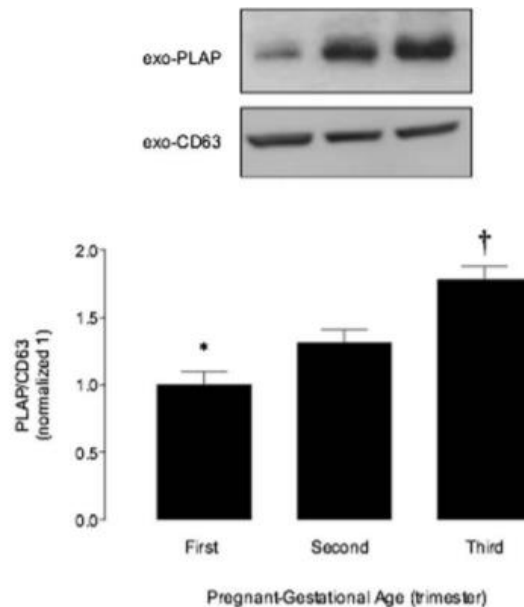


Figura 21: Panel superior: Sedimento de exosomas enriquecidos cargados y analizados por Western Blot para PLAP y CD63 en exosomas (combinación fracciones 5 a 8) del plasma materno en el primer, segundo y tercer trimestre del embarazo. Panel inferior: densitometrías de relación PLAP/CD63 de los datos en la parte superior normalizado a 1 (primer trimestre). Salomon *et al.*

Para estimar los cambios en la contribución relativa de los exosomas placentarios al total de exosomas presentes en el plasma materno, se determinó el contenido de PLAP por exosoma (proporción PLAP). Tanto la concentración de PLAP exosomal (pg/ml de plasma) como el número total de exosomas/ml de plasma (NE/ml de plasma) aumentaron durante el embarazo (Figura 22). La proporción de PLAP en plasma fue constante durante el primer y segundo trimestre pero disminuyó 4 veces durante el tercer trimestre (Figura 23) .

Estos datos pueden representar una disminución en la liberación de exosomas PLAP^{+ve} de la placenta, una mayor liberación de exosomas de fuentes no

placentarias o una combinación de ambos. Los datos aquí obtenidos no permiten discriminar entre estos posibles escenarios.

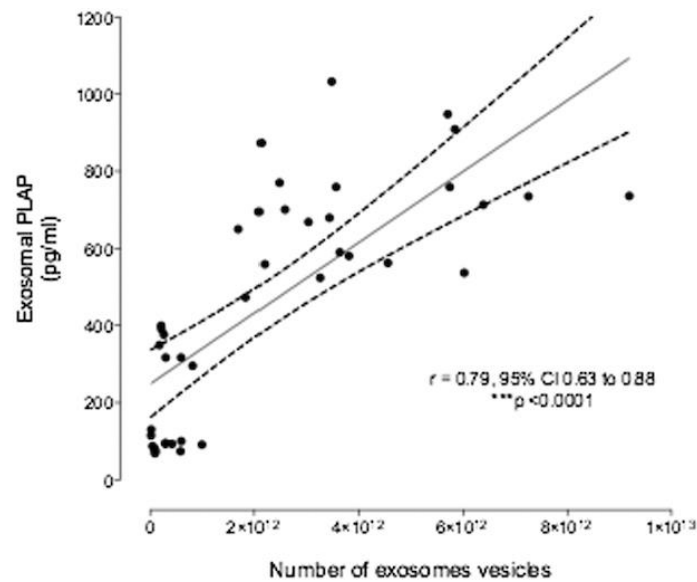


Figura 22: Cambios en NE y exosomas placentarios específicos en la circulación materna durante el embarazo. Salomon *et al.*

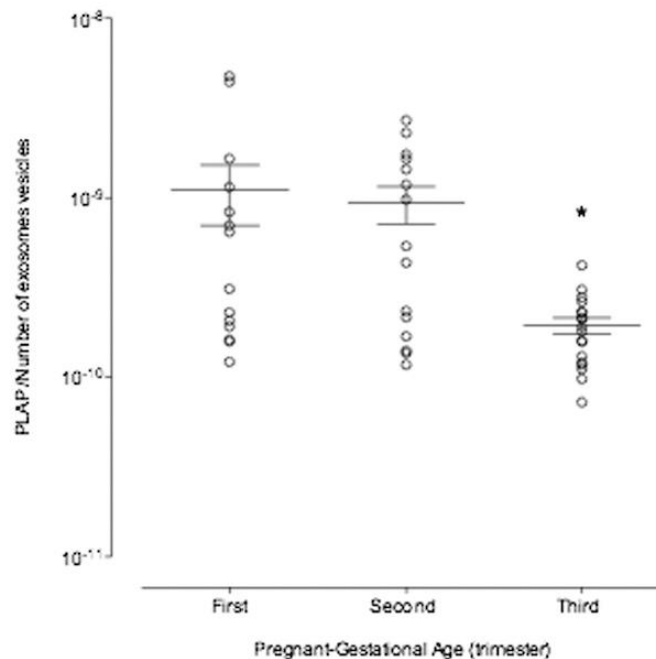


Figura 23: Proporción de exosoma placentario específico y NE, durante los tres trimestre del embarazo. Salomon *et al.*

Los datos obtenidos en este estudio establecen que el embarazo está asociado con un aumento dramático en la cantidad de exosomas que circulan en la sangre materna. La concentración de proteína exosomal en el plasma del primer trimestre fue 50 veces mayor que la observada en mujeres no embarazadas. Además, se determinó que los exosomas presentes en el plasma materno pueden tener un origen materno y/o fetal (placentario), considerando que PLAP es un marcador de sincitiotrofoblasto (Figura 24).

Si bien en este trabajo, se demostró el perfil de cambio en el número de exosomas placentarios durante el embarazo. Los datos obtenidos no permiten identificar como este perfil diferencial cumple una función en la regulación de la función celular durante el embarazo.

Los autores concluyen que en condiciones fisiológicas una pequeña cantidad de estas VEs, principalmente exosomas, se liberan desde la placenta hacia la circulación materna. De esta manera, se permitiría la comunicación entre tejido feto-placentario y materno con un intercambio de información relevante [10,48].

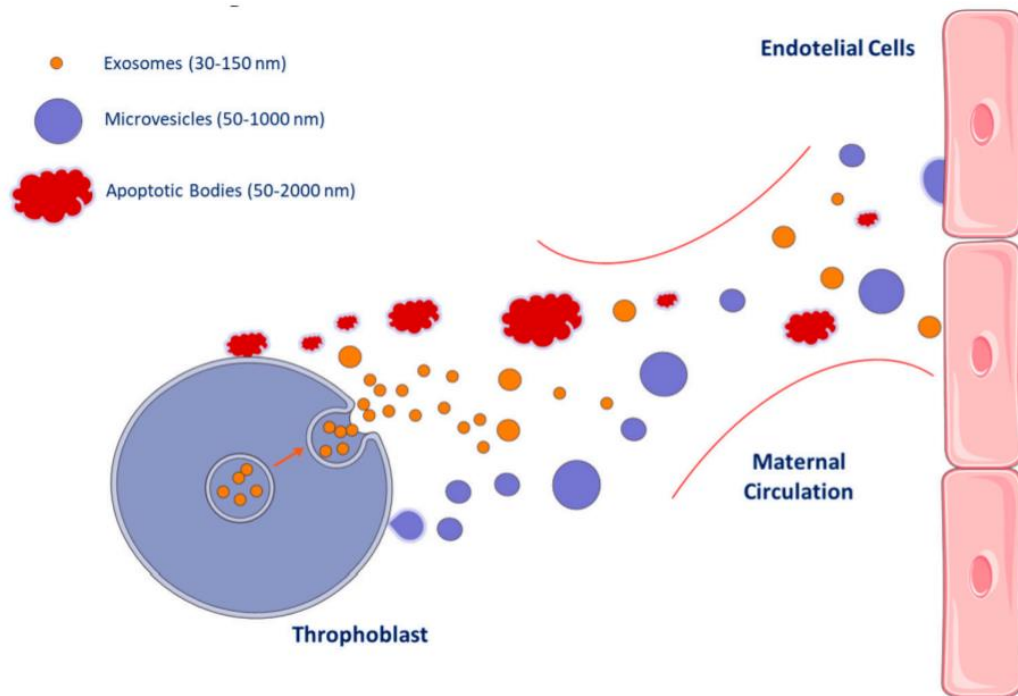


Figura 24: Subtipos de vesículas extracelulares liberados desde la placenta hacia la circulación materna. Buca *et al.*

4.3.1.2 Efectos de los cambios en la concentración de oxígeno y glucosa en la generación de vesículas extracelulares durante el embarazo

Efecto de tensión de Oxígeno en la generación de exosomas de origen placentario.

La placentación es un proceso sensible al oxígeno. Los eventos que ocurren desde el momento de la implantación hasta la perfusión materna de la placenta están influenciados y dirigidos por las tensiones de oxígeno específicas del sitio. En el momento de la implantación del embrión, la tensión de oxígeno intrauterino es de ~3 %, mientras que la tensión de oxígeno de la decidua y el miometrio es de ~8–12 %. Se cree que este gradiente de oxígeno permanente promueve y dirige la invasión de células trofoblásticas extravelosas (EVT) hacia la decidua y

el miometrio, donde se acoplan y remodelan las arteriolas espirales maternas [59]. La perturbación de las tensiones de oxígeno intrauterino puede comprometer el desarrollo normal de la placenta. Los mecanismos moleculares por los cuales la tensión de oxígeno regula la función EVT y la comunicación célula a célula con los tejidos maternos aún no se han dilucidado por completo.

En este contexto, Salomon *et al.* [59] demostró que la cantidad de exosomas liberados desde citotrofoblastos, obtenidos desde placentas de primer trimestre derivadas de interrupción legal del embarazo, se encuentra aumentada a medida que se disminuye la tensión de oxígeno (Figura 25).

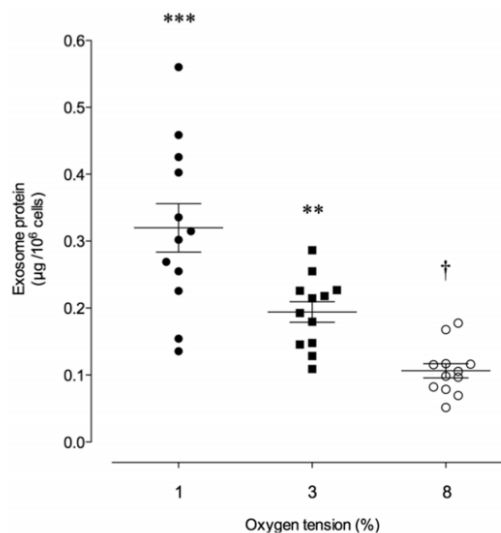


Figura 25: Efecto de la tensión de oxígeno en la liberación de exosomas desde citotrofoblastos. Salomon *et al.*

En este mismo sentido, se demostró que en condiciones de bajas tensiones de oxígeno (*es decir*, 1% de O₂), los exosomas derivados de citotrofoblastos promueven la invasión y proliferación de EVT (Figura 26).

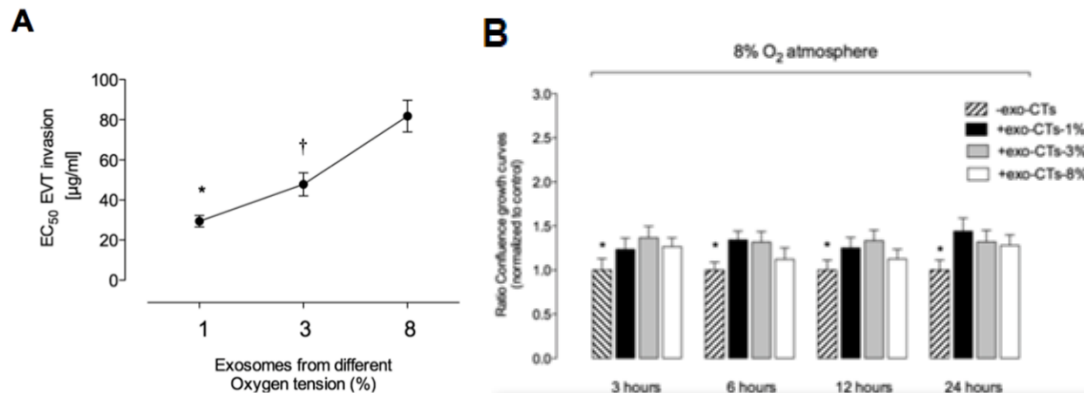


Figura 26: Efecto de exosomas obtenidos desde citotrofblastos bajo distintas tensiones de oxígeno en (A) la capacidad de invasión y (B) proliferación de células HTR-8/SVneo. Salomon *et al.*

El análisis proteómico de los exosomas obtenido desde citotrofblastos bajo diferentes gradientes de oxígeno identificó cambios dependientes del oxígeno en el contenido de proteína (Figura 27). La relevancia biológica de las proteínas de expresión diferencial se analizó utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Las proteínas exosómicas aisladas de Citotrofblastos expuestas a diferentes tensiones de oxígeno se asociaron con el movimiento y la morfología celular, el tráfico de células inmunitarias y el ensamblaje y la organización celular de acuerdo con el análisis IPA

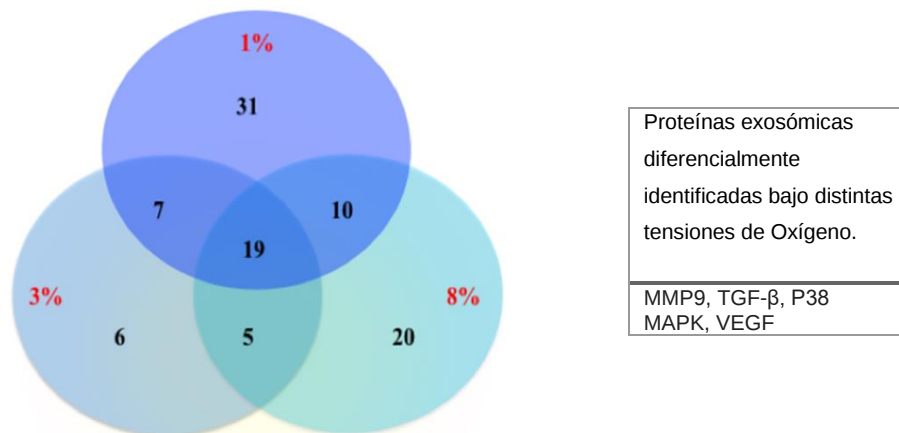


Figura 27: Diagrama de Venn representa la distribución de proteínas comunes y únicas identificadas por nanospray LC-MS/MS (ABSciex 5600) en exosomas liberados de células trofoblásticas expuestas al 1 %, 3 % y 8 % de tensión de oxígeno. Salomon *et al.*

En resumen, la liberación de exosomas del cultivo primario de células citotrofoblásticas depende de la tensión de oxígeno. Los exosomas derivados de Citotrofoblastos aumentan la invasión y proliferación de células EVT de una manera dependiente de la concentración de oxígeno. El contenido de proteína exosomal se altera en respuesta a la tensión de oxígeno, con la mejora de las señales involucradas en la invasión y migración celular. Los autores proponen que la liberación de exosomas derivados de Citotrofoblastos en condiciones hipóxicas dentro de la placenta puede ser una respuesta adaptativa para promover la proliferación e invasión de células trofoblásticas extravellosas.

Concordante con estos hallazgos, un estudio realizado por Pillay *et al.* [52] evaluó el perfil de exosomas placentarios en plasma de mujeres embarazadas con preeclampsia, patología asociada a cambios en la oxigenación en los tejidos fetoplacentarios.

Los resultados obtenidos (Figura 28 y 29) muestran que existe una diferencia significativa entre la cantidad de exosomas presentes en embarazos normotensivos y en preeclampsia, siendo mayor en este último tanto de manera temprana como tardía. Solo en el caso de análisis de PLAP exosomal, los embarazos con preeclampsia tardía presentaron una menor concentración en comparación con los demás grupos de estudio. Estos resultados apoyan la hipótesis centrada que la secreción de exosomas y el perfil de éste será afectados con las condiciones ambientales a las que la madre este sometida durante el embarazo.

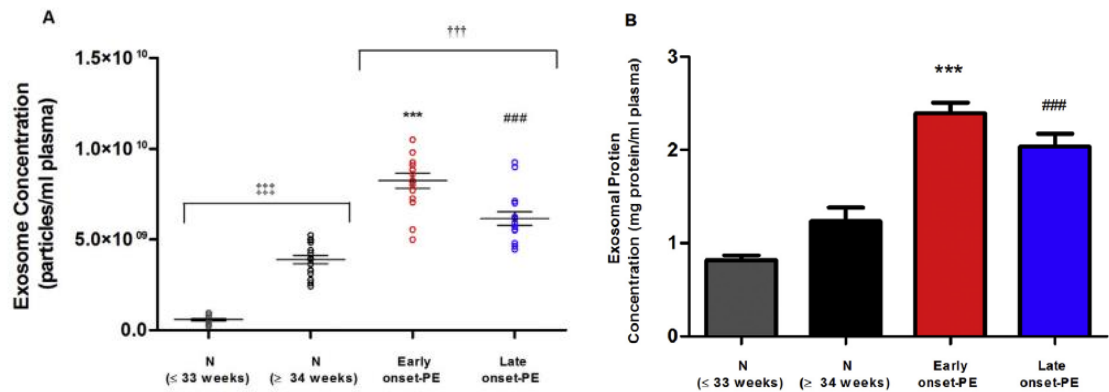


Figura 28: Concentración de exosomas en preeclampsia temprana y tardía. (a) Concentración de exosomas presentes en plasma para cada grupo de estudio. (b) Concentración de proteínas exosomales en plasma para cada grupo de estudio. Pillay *et al.*

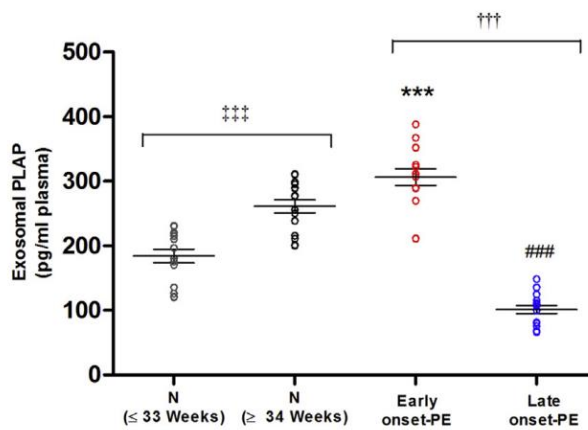


Figura 29: PLAP exosomal en embarazos normotensivos y preeclampsia. Pillay *et al.*

Efecto de la concentración de glucosa en la generación de exosomas de origen placentario.

Durante un embarazo saludable es normal que se desarrolle resistencia a la insulina, ya que esto corresponde a una adaptación fisiológica de la madre de tal manera de asegurar un suministro de nutrientes para el crecimiento del feto [29,66]. Cuando la liberación de insulina no es capaz de compensar esta resistencia a la insulina se desarrolla diabetes mellitus gestacional (DMG) [60].

La DMG se define como una intolerancia a la glucosa que se desarrolla durante el segundo y tercer trimestre del embarazo [12]. Asimismo, la DMG se caracteriza por un nivel de glicemia en ayuno ≥ 92 mg/mL, es decir, por presentar una hiperglicemia [29]. Considerando que los niveles de glucosa puede ser un factor que condiciona la secreción de vesículas extracelulares, y teniendo de base el efecto de niveles de oxígeno en la generación de vesículas, Rice *et al.* evaluó como los niveles de Oxígeno y de glucosa afectaban la generación de vesículas extracelulares [56] en trofoblastos aislados del primer trimestre de embarazo.

En la figura 30, se presenta el efecto de la concentración de glucosa (D-glucosa 5 mM y 25 mM) sobre la liberación de exosomas de las células trofoblásticas del primer trimestre bajo diferentes tensiones de oxígeno. La liberación de exosomas se correlacionó directamente con la concentración de glucosa ($P < 0,001$) e inversamente relacionada con la tensión de oxígeno ($P < 0,001$).

Con este resultado, Rice *et al.* demostró que la concentración de glucosa afecta la liberación de exosomas, de tal manera que a mayor concentración de glucosa mayor liberación de exosomas.

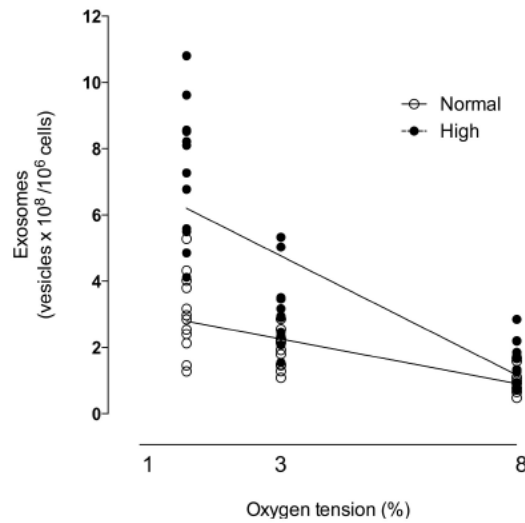


Figura 30: Efecto de la concentración de glucosa y la tensión de oxígeno en la liberación de exosomas. Rice *et al.*

Para valorar si el efecto de alta glucosa es sostenido en el tiempo durante el embarazo, Salomon *et al.* [61] realizó el seguimiento de la cantidad de exosomas liberados a circulación sistémica materna durante los tres trimestres de embarazo, en embarazadas normoglicémicas y con hiperglicemia a causa de diabetes gestacional.

Los resultados indican que el número de exosomas presentes en el plasma materno obtenido de embarazos normales y con DMG promedió $1,34 \times 10^{12} \pm 2,75 \times 10^{11}$ y $2,89 \times 10^{12} \pm 5,33 \times 10^{11}$ vesículas/mL de plasma, respectivamente (Figura 31 A). La concentración de exosomas aumentó progresivamente a lo largo de la gestación tanto en pacientes normoglicémicas como en DMG (Figura 31 B)

Para determinar el número de exosomas de origen placentario en el plasma materno, se cuantificó la concentración de PLAP exosomal. La concentración de PLAP exosomal fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en plasma obtenido de DMG que en embarazos normales y promedió 276 ± 33 y 191 ± 18 , respectivamente (Figura 31 C y D). En DMG, el número de exosomas de origen

placentario (como lo indica PLAP ELISA) aumentó más con la edad gestacional comparado con un embarazo normoglicémico.

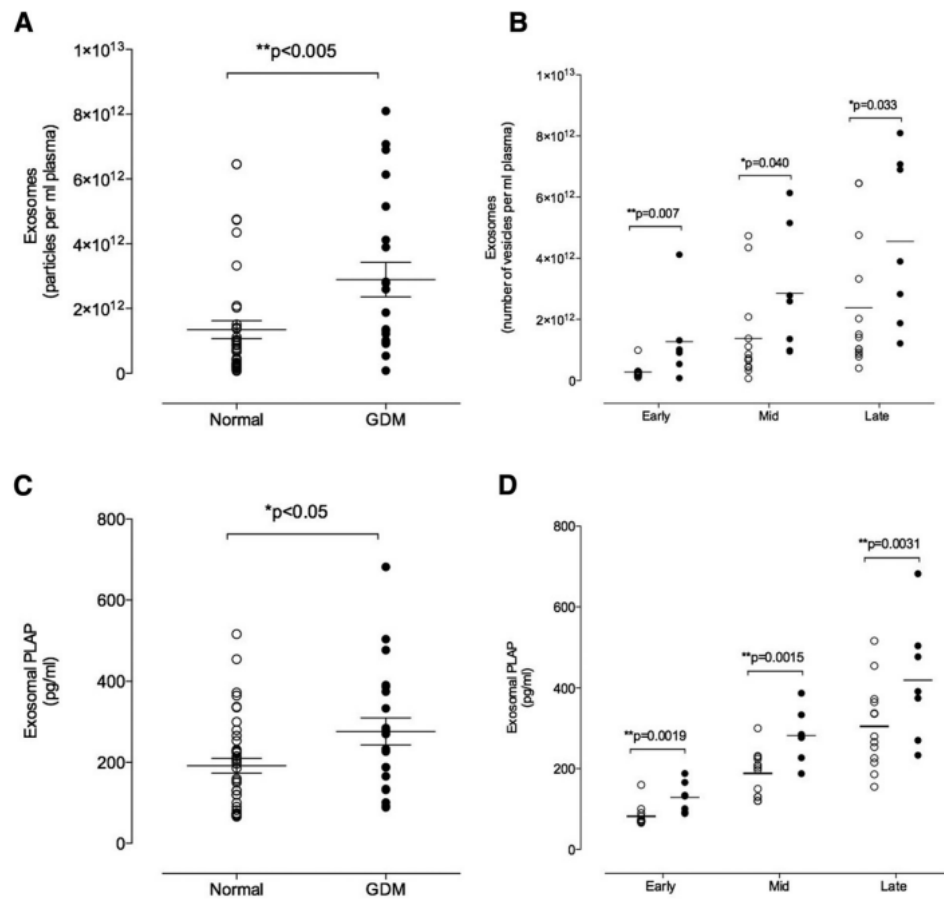


Figura 31: Perfil de exosomas en embarazos normales y DMG. Salomon *et al.*

OBJETIVO 2: RELACIONAR EL ROL DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES CON LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE EL EMBARAZO.

4.4 Rol de las vesículas extracelulares pequeñas en la modulación de la respuesta inmune durante el embarazo.

El embarazo es una situación única de inmunomodulación en la que el sistema inmunitario materno protege al feto del rechazo alógeno y mantiene la inmunovigilancia. La mantención de una respuesta inmune controlada, que permita el desarrollo del embarazo implica la existencia y mantención de una comunicación constante entre la madre y el feto.

Existen antecedentes que señalan la existencia de comunicación entre el embrión y el sistema inmune materno. Esta afirmación surge por datos de laboratorio que indicaban que los linfocitos de mujeres producen una proteína inmunomoduladora conocida como factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF), capaz de estimular la secreción de IL-10, IL-3 e IL-4 en células CD4+ y CD8+. Estos datos indican que PIBF afecta el equilibrio Th1/Th2 y contribuye a la disminución de las respuestas mediadas por células durante el embarazo [68]. Por otro lado, otros reportes indican que linfocitos humanos expuestos a medios de cultivo de óvulos fertilizados, pero no con líquido folicular, resulta en un aumento de la expresión de ARNm de IL-10 por parte de los linfocitos [16].

Estos datos sugieren que las señales derivadas del embrión o de la placenta pueden influir en la respuesta inmune materna y otros fenómenos de regulación que ocurren durante el desarrollo gestacional. Sin embargo, el mecanismo de transporte de señales no se ha investigado a fondo. Pudiendo las vesículas extracelulares estar involucradas en este proceso de comunicación, debido a que

éstas pueden transportar moléculas que potencialmente pueden modular la respuesta inmune y el desarrollo de la progresión del embarazo.

4.4.1 Modulación de la respuesta inmune por vesículas extracelulares durante el embarazo.

La inmuno tolerancia desarrollada por el feto es un distintivo del desarrollo de un embarazo saludable. Se ha reportado, que durante los diferentes estadios del embarazo se van desarrollando sincrónicas adaptaciones inmunológicas concordante con una estrecha comunicación materno fetal.

Las células trofoblásticas son una de pocas células del cuerpo humano que están desprovistas de subconjuntos específicos de antígenos leucocitarios humanos (HLA), lo cual ayuda a promover la inmunotolerancia de la madre al aloinjerto fetal. El sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto carecen de moléculas de MHC de clase I y II. Mientras que los trofoblastos extravellosos (EVTs) carecen de HLA-A, HLA-B y del MHC de clase II, pero expresan las moléculas MHC de clase I; HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G [2].

Este repertorio único de antígenos HLA en las células trofoblásticas regula el reconocimiento por parte del sistema inmune innato y por las células T. Además, la ausencia de moléculas HLA-A y HLA-B restringe la presentación de antígenos fetales a las células inmunitarias maternas. La expresión de HLA-C, HLA-E, HLA-G y HLA-F por parte de los EVT's, las que interactúan con ligando específicos de las células *Natural Killer* (NK), permite inhibir su función citotóxica [42,43].

La compleja coordinación inmune durante, los tres trimestres del desarrollo gestacional plantean un desafío en la interacción bidireccional entre la madre y el feto. Bajo este contexto las vesículas extracelulares, en particular los exosomas, podrían cumplir un rol regulatorio en la mantención de la tolerancia inmune durante todos los estadios del embarazo [10]. En otras palabras, los

exosomas tendrían una función inmunomoduladora, siendo esto clave para un embarazo exitoso.

Diversos estudios se han enfocado en dilucidar de qué manera los exosomas placentarios son capaces de ejercer dicha función inmunomoduladora (Tabla 6). Principalmente, se ha propuesto que estos estarían involucrados en generar efectos inmunosupresivos, permitiendo así una ventaja inmunológica durante el desarrollo del feto.

Tabla 6: Descripción general de los estudios enfocados en el rol de las vesículas extracelulares en la modulación de la respuesta inmune durante el embarazo.

Objetivo del estudio	Tipo de muestra	Técnica utilizada para la purificación de las vesículas	Técnica Utilizada Para cuantificación o caracterización	Marcador	Referencia
Evaluar si exosomas secretados desde placenta de embarazo de primer trimestre son capaces de transportar HLA-G	Placenta de embarazos de primer trimestre	Ultracentrifugación	Western blot Microscopia de electrones	CD63	[33]
Evaluar expresión de FasL y TRAIL en placentas de embarazo temprano, y su asociación con exosomas	Placenta de embarazos tempranos y células T Jurkat	Ultracentrifugación	Microscopia inmunoelectrónica Annexin V:PE Apoptosis Detection Kit I	CD63 PLAP	[67]
Exosomas derivados de trofoblastos son capaces de inducir migración de monocitos y con ello aumentar la secreción de citoquinas	Células trofoblásticas humanas Swan71	Ultracentrifugación	RT-qPCR (análisis citoquinas)	N/I	[4]

NGT: tolerancia normal a la glucosa

En este sentido, un estudio de Kshirsagar *et al.* [33] investigó la posibilidad de que HLA-G, un grupo de moléculas inmunosupresoras expresadas principalmente en placenta, serían secretados vía exosomas durante el embarazo.

Para ello, utilizaron muestras placentarias obtenidas durante el primer trimestre en embarazos sin complicaciones después de una cesárea. Luego, para el aislamiento y cultivo de trofoblastos se diseccionó 40-80g de tejido vellosos placentario y fueron sometidos a purificación. Además, se realizaron cultivos de explantes a partir de vellosidades flotantes disecadas libre de corión y decidua en piezas de 30-50 mg y lavadas con PBS.

Posterior al cultivo, se realizó la obtención de exosomas a partir de la recolección de sobrenadantes de cada cultivo. Los sobrenadantes fueron limpiados mediante centrifugación secuencial, descartando los sedimentos obtenidos en cada centrifugación respectivamente. Los sobrenadantes obtenidos fueron ultracentrifugados, permitiendo así la sedimentación de vesículas pequeñas, incluyendo exosomas. Finalmente, los sedimentos obtenidos fueron lavados y resuspendidos en PBS.

Primeramente, los autores analizaron la presencia y densidad de HLA-G en exosomas placentarios de 6 muestras de pellet de los cultivos de explantes a través de Western Blot. Como resultado de esto, Kshirsagar *et al.* observaron la presencia de esta molécula en muestras obtenidas durante el primer trimestre, específicamente de las semanas 7,8 y 10 de gestación. (Figura 32).

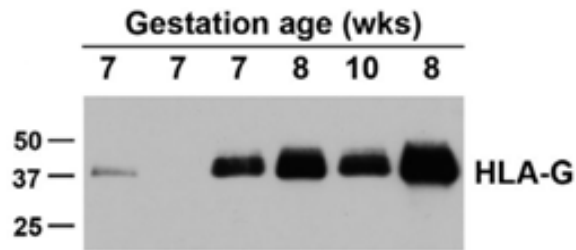


Figura 32: Análisis por Western Blot de exosomas obtenidos de trofoblastos placentarios durante primer trimestre. Kshirsagar *et al.*

Sumado a ello, el análisis de densidad reveló que el valor obtenido para HLA-G corresponde a la misma densidad que presenta el marcador de exosomas CD63 (Figura 33).

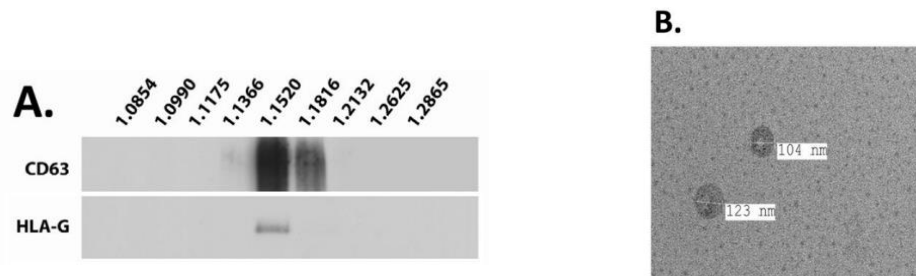


Figura 33: (A) Análisis por Western Blot de densidad de sedimentación. **(B)** Microscopía de electrones de exosomas aislados desde trofoblastos placentarios durante el primer trimestre. Kshirsagar *et al.*

El resultado obtenido es compatible con el hecho que el HLA-G se encuentra presente en los exosomas. Además, la presencia de HLA-G en exosomas durante el primer trimestre podría dar cuenta de un rol en procesos de modulación inmune materna, influenciando así tanto la inmunidad innata como la adaptativa.

Stenqvist *et al.* [67] demostraron a través de muestras de placenta de primer trimestre, que los exosomas obtenidos transportaban: (i) FasL, una proteína

transmembrana (parte de la familia TNF) que al unirse a su receptor induce apoptosis; (ii) TRAIL, un ligando inductor de apoptosis

Las muestras de placentas de primer trimestre fueron donadas por mujeres con embarazos fisiológicos, quienes se sometieron a una interrupción electiva del embarazo (8-14 semanas de gestación).

Los explantes de placenta recién obtenidas fueron procesadas de manera inmediata. Una vez cultivadas en un periodo de 24 horas, el sobrenadante se recolectó y se utilizó para el aislamiento de exosomas. El sobrenadante previamente descrito se limpió a través de centrifugaciones secuenciales, obteniendo al final de este proceso un sedimento con los exosomas. Este sedimento luego fue lavado y resuspendido en PBS.

Con el fin de determinar la presencia de FasL y TRAIL, en exosomas placentarios, se realizó una microscopia inmuno-electrónica (IEM), utilizando contraste negativo para ilustrar la morfología de estas vesículas, CD63 para la confirmación de la presencia de exosomas y PLAP para confirmar su origen placentario.

Los autores observaron y confirmaron que las vesículas extracelulares correspondían a exosomas de origen placentario. Además, observaron la presencia de FasL y TRAIL en la superficie de los exosomas, comprobando así su expresión como proteínas de membrana en dichas vesículas. Sumado a esto, se realizó una doble IEM para verificar la presencia de ambas proteínas en exosomas. Sin embargo, Stenqvist *et al.* observaron que ambas proteínas son expresadas en diferentes exosomas, planteando que posiblemente provienen de células placentarias de diferente origen. (Figura 34)

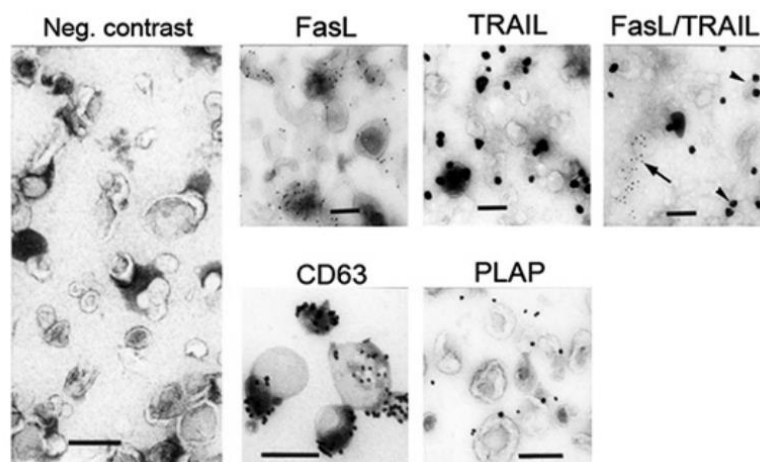


Figura 34: Microscopía inmunoelectrónica de exosomas placentarios. Stenqvist *et al.*

En base a este último resultado, los autores posteriormente estudian el efecto de los exosomas placentarios que expresan FasL y TRAIL sobre células T Jurkat, un modelo de linfocitos T (Figura 35).

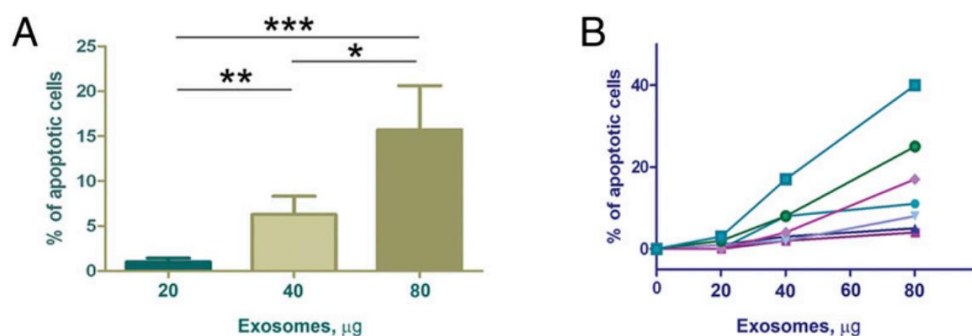


Figura 35: Exosomas placentarios que contienen FasL y TRAIL desencadenan la apoptosis de las células T Jurkat. **(A)** Porcentaje promedio de apoptosis en células T Jurkat inducido por diferentes concentraciones de exosomas placentarios. **(B)** Inducción de la apoptosis por diferentes concentraciones de exosomas en 7 muestras de embarazo normal temprano. Stenqvist *et al.*

De esta manera, Stenqvist et al. llegaron a la conclusión que los exosomas placentarios que expresaban FasL y TRAIL tenían la capacidad de inducir apoptosis en células T Jurkat. Asimismo, este efecto pro-apoptótico in vitro es dependiente de la dosis, es decir, un aumento de exosomas placentarios genera un aumento de células apoptóticas. Contribuyendo a la protección del feto de las células inmunes maternas.

Para evaluar el efecto de los exosomas de origen placentario en la modulación de la secreción de citoquinas y la diferenciación de monocitos a macrófagos, un grupo de investigación liderado por Atay [4] aisló exosomas a partir de células Swan71, que corresponden a una línea celular de trofoblastos del primer trimestre. A través de qRT-PCR se analizaron los efectos de dichos exosomas en la expresión de citoquinas anti y proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-10, TGF- β , e IL-6) (Figura 36).

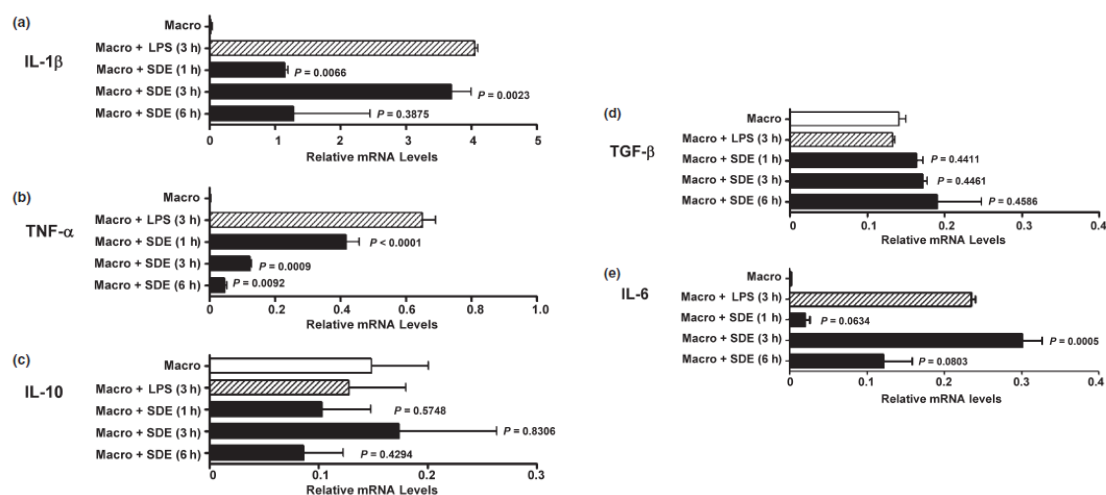


Figura 36: Cuantificación por qRT-PCR de la inducción de transcripción de genes de citoquinas en macrófagos humanos por exosomas derivados de células Sw.71

(SDE). Los gráficos señalan los niveles relativos de mRNA de **(a)** IL-1 β , **(b)** TNF- α , **(c)** IL-10, **(d)** TGF- β , **(e)** IL-6. Atay *et al.*

Estos resultados indican que los exosomas derivados de las células Sw.71 fueron capaces de inducir la transcripción de genes de citoquinas, principalmente pro-inflamatorias. Esto último sería indicativo de que los exosomas derivados de trofoblastos son capaces de afectar el perfil inflamatorio en monocitos y su posterior diferenciación a macrófagos.

Frente a estos resultados, los autores proponen la hipótesis que este aumento del perfil pro-inflamatorio, al generar un aumento en el reclutamiento de monocitos y macrófagos, favorecería un ambiente angiogénico, ayudando así al proceso de implantación.

OBJETIVO 3: ANALIZAR EL EFECTO QUE PUEDEN TENER LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN LA REGULACIÓN METABÓLICA EN EL EMBARAZO.

4.5 Modulación del metabolismo celular por vesículas extracelulares durante el embarazo.

Durante el embarazo, el metabolismo materno debe adaptarse y pasar por una serie de cambios, de tal manera de asegurar el suministro de todos los nutrientes y metabolitos necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo del feto [48]. Asimismo, será necesario que exista un equilibrio entre el metabolismo materno y las demandas nutricionales del feto, apoyándose del transporte placentario para ello [45]. Para que exista una homeostasis metabólica y esta pueda ser constante durante el periodo gestacional las diversas interacciones entre los distintos tipos de tejidos y los diversos mecanismos de comunicación célula-célula serán primordial en este proceso [47].

Tal como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, las VEs corresponderían a un mecanismo de comunicación célula-célula, a través del cual dependiendo de su contenido pueden generar diversos efectos en las células blanco respectivas. Debido a esta característica es que se ha propuesto durante este último tiempo que las VEs se encontrarían involucradas en el proceso de homeostasis metabólica materna-fetal [79]. Sin embargo, es reducida la información que existe con respecto a este rol metabólico de las VEs dentro del contexto de un embarazo fisiológico.

Durante el embarazo se destaca la aparición de resistencia a la insulina (RI) fisiológica, la cual a medida que se avanza hacia el tercer trimestre disminuye de manera gradual. Paralelamente, los primeros meses de embarazo se destacan

por ser anabólicos, causando un aumento en las reservas de grasas, triglicéridos y glicógeno. Mientras que los últimos meses, se convierte en un proceso catabólico, liderado por el transporte de glucosa y ácidos grasos desde la madre hacia el feto para así cumplir con las demandas metabólicas de éste [47,66].

A continuación, se expone un estudio (Tabla 7) el cual se ha centrado en estudiar si las VEs poseen un rol dentro del metabolismo de glucosa, proceso metabólico fundamental para un desarrollo apropiado del feto.

Tabla 7: Descripción general de estudio enfocado en el rol de las vesículas extracelulares en el metabolismo de la glucosa.

Objetivo del estudio	Tipo de muestra	Técnica utilizada para la purificación de las vesículas	Técnica Utilizada Para cuantificación o caracterización	Marcador	Referencia
Exosomas derivados de tejido adiposo poseen ciertos genes que influyen en el metabolismo de glucosa en la placenta	Tejido adiposo de mujeres con embarazo NGT	Ultracentrifugación	Human Glucose Metabolism RT2 Profiler PCR array.	TSG101 CD63	[28]

NGT: Tolerancia normal a la glucosa

Un estudio liderado por Jayabalan *et al.* [28] se centró en investigar el rol de los exosomas en la expresión de genes relacionados al metabolismo de la glucosa. A partir de tejido adiposo (AT) omental obtenido a los 10 minutos posterior al parto por cesárea en embarazadas con tolerancia normal a la glucosa (NGT). Los investigadores analizaron cuál es la influencia de exosomas del tejido adiposo en la función metabólica *in vitro* en células Bewo, un modelo celular de placenta.

Estos tejidos adiposos fueron lavados con PBS y se mantuvieron en cultivo por 24 horas para el aislamiento de exosomas, desde el medio de cultivo por ultracentrifugación (Figura 37).

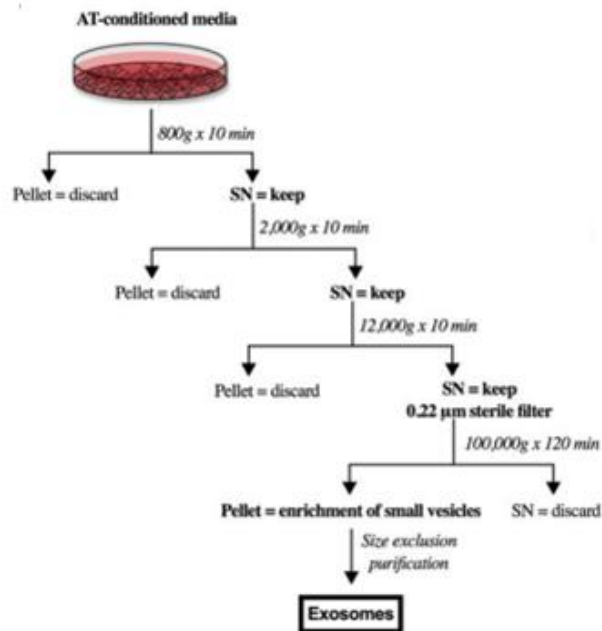


Figura 37: Diagrama de flujo del proceso de aislamiento y enriquecimiento de exosomas. Jayabalan *et al.*

Para determinar el efecto de los exosomas de tejido adiposo (exo-NGT) en la expresión de enzimas de metabolismo de la glucosa, las células Bewo se incubaron por 24 horas con los exosomas. El perfil de expresión de genes involucrados en la regulación y vías enzimáticas de la glucosa y metabolismo del glicógeno fueron cuantificados. Los resultados obtenidos del PCR fueron sometidos a un análisis bioinformático, en que comparó el perfil de expresión de enzimas de las células tratadas con exo-NTG respecto al control (Control vs NGT) (Figura 38). El análisis bioinformático demostró que existen 6 genes regulados al alza (up-regulated) en las células placentarias sometidas exo-NGT.

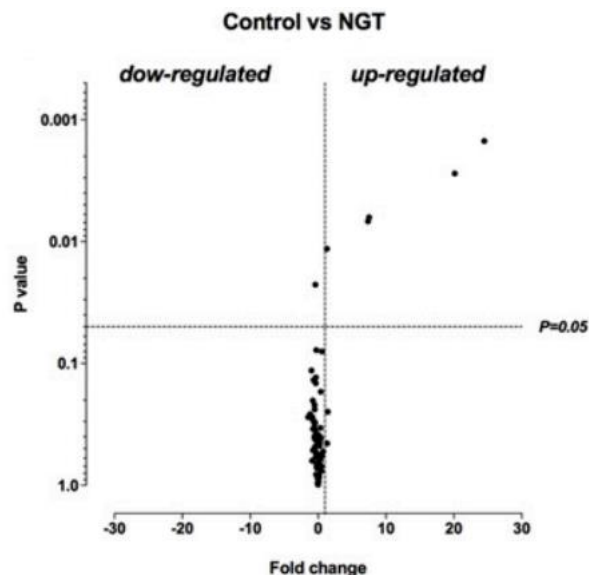


Figura 38: Comparación en el efecto de exosomas derivados de AT en metabolismo de la glucosa en placenta. Gráfico corresponde a un Volcano plot de la diferencia de expresión de genes entre el control vs exo-NGT. Jayabalan *et al.*

Específicamente, estos 6 genes que se encontraron regulados al alza (Tabla 7) se encuentran asociados a la glicólisis (HK3 y TPI1), gluconeogénesis (PCK1 y G6PC), producción de glicógeno (UGP2) y degradación (PYGM).

Tabla 8: Efecto de exo-AT en genes involucrados en glucosa y metabolismo de glicógeno en placenta humana. Jayabalan *et al.*

Gene	baseMean	log2-Fold Change	lfcSE	P Value	Adjusted P Value
Control vs exo-NGT					
Glycolysis					
TPI1	11.2546	20.1308	1.7319	0.0028	0.0774
HK3	17.6428	7.3544	2.2881	0.0068	0.1143
ENO1	1.2820	-0.4040	2.0833	0.0226	0.2709
Glyconeogenesis					
PCK1	0.8605	37.5191	2.5676	0.0000	0.0015
G6PC	9.0744	24.4912	1.5772	0.0015	0.0629
Glycogen synthesis					
UGP2	3.1553	1.2895	2.2055	0.0115	0.1604
Glycogen degradation					
PYGM	17.5615	7.5171	2.2803	0.0063	0.1143

Estos resultados sugieren primero que los exosomas, provenientes de tejido adiposo de mujeres embarazadas con NGT, generan cambios en las células placentarias, específicamente, en la expresión de genes que se encuentran relacionados con el metabolismo de la glucosa.

Sumado a esto último, los investigadores también sugieren que estos cambios en la expresión de genes causados por los exosomas podría ser un reflejo de las adaptaciones que deben realizar las células placentarias con el fin de cumplir con la transferencia de glucosa hacia el feto y el uso de glucosa en la placenta durante el embarazo.

5. DISCUSION

Las vesículas extracelulares se han vuelto un tema de investigación que ha tomado prevalencia en los últimos años. Si bien es un área en la cual aún falta mucho por descubrir y dilucidar, es esto mismo lo que genera un gran interés en ellas.

En el contexto del embarazo y la comunicación materno-fetal, a través de esta revisión es posible dar cuenta que las vesículas extracelulares sí cumplirían un rol en dicha comunicación. El aumento constante en la concentración de exosomas durante el embarazo permite suponer que desempeñan algún rol relevante durante la gestación. Específicamente, un rol primordial que llevarían a cabo corresponde a uno del tipo inmunomodulador, ya que tal como se detalló los exosomas placentarios serían capaces de transportar ciertos ligandos relacionados con la apoptosis y de esta manera activar este proceso. De esta manera, se puede contribuir a una protección fetoplacentaria de las células inmune maternas activadas.

Sumado a esto último, también se demostró que los exosomas son capaces de inducir la liberación de citoquinas anti y proinflamatorias. Esto significa que los exosomas serían capaces de interaccionar con las células inmunes durante el periodo de gestación y así llevar a cabo una parte de la comunicación materno-fetal.

Durante el presente trabajo también se señaló que los exosomas pueden desempeñar un rol a nivel metabólico durante el embarazo. Asimismo, el estudio en cuestión permitió demostrar que los exosomas provenientes de tejido adiposo serían capaces de alterar la expresión de genes asociados al metabolismo de glucosa en células placentarias. Este hallazgo toma aún más importancia si lo extrapolamos en patologías propias del embarazo como por ejemplo la diabetes

mellitus gestacional (DMG), en la cual se ha visto que existe un aumento significativo en la concentración de exosomas en comparación a embarazos fisiológicos. Si sumamos la alta cantidad de exosomas y la capacidad de estas de inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias en conjunto con las características clásicas de una DMG (hiperglicemia, resistencia a la insulina, obesidad) podemos suponer que existe una potenciación en los metabolismos de glucosa, además un aumento de citoquinas proinflamatorias.

En base a lo anterior, las vesículas extracelulares y específicamente los exosomas podrían ser de utilidad como un biomarcador para diagnosticar tempranamente patologías del embarazo. La implementación de exosomas como una herramienta de diagnóstico temprano sería un gran avance tanto en el área de investigación como en la clínica, ya que las patologías del embarazo como la preeclampsia y la diabetes mellitus gestacional cursan muy silentes al inicio de un embarazo, por lo que cuando se realiza el diagnóstico, están en un punto irreversible, siendo un peligro tanto para la madre como para el feto.

Durante el proceso de búsqueda bibliográfica para sustentar la hipótesis planteada de la presente revisión, es relevante mencionar tanto los puntos fuertes como débiles de la búsqueda. En primer lugar, nosotros creemos que, en base a todo lo investigado y señalado durante en el presente trabajo, las vesículas extracelulares pequeñas o exosomas cumplirían un rol importante durante la gestación, ya que son capaces de inducir y generar cambios tanto a niveles inmunológicos como metabólicos, así como también son capaces de contribuir en el desarrollo gestacional, destacándose su aporte en el proceso de implantación.

Sin embargo, también creemos relevante mencionar que si bien la información recabada y presentada en este trabajo permite responder los objetivos que nos planteamos, estos resultados no abarcan en su totalidad lo que corresponde por definición como comunicación materno-fetal.

Los resultados experimentales presentados fueron llevados a cabo principalmente a partir de la extracción de muestras de placenta, para posteriormente hacer experimentos in vitro, estudiar la cantidad de exosomas presentes en ellos, verificar el origen placentario de estos, etc. Pero ninguno de estos evalúa al mismo tiempo los cambios que se generan tanto a nivel fetal como materno, solo se encuentran enfocados en placenta.

Esto es totalmente comprensible, debido tanto a la bioética que se debe tener en este tipo de estudios como también a lo difícil que es simular o generar esta comunicación bidireccional que ocurre durante la gestación. También no descartamos que, debido al criterio de exclusión de estudios realizados en especies distintas a la humana, es posible que existan muchos más estudios enfocados en obtener nuevos resultados respecto a la comunicación madre-feto.

En base a todo esto, nosotros creemos que si bien los experimentos presentados puede que no reflejen lo realmente complejo que es la comunicación materno-fetal, todos estos resultados corresponden a hallazgos muy importantes y que permiten acercarnos cada vez más a dilucidar esta comunicación.

Actualmente, aún existe mucho por abarcar y descubrir en el área de las vesículas extracelulares pequeñas, pero gracias a los estudios recabados en esta revisión y muchos más que se encuentran publicados, se podrá avanzar y dilucidar otras funciones que puedan presentar estas vesículas en un contexto fisiológico y patológico. Si bien la mayoría de los estudios actuales se centran en evaluar el rol inmunomodulador de las vesículas extracelulares en embarazo, aún queda mucho por descubrir con respecto a estas vesículas, sobre todo su relación y posibles funciones dentro del metabolismo celular durante el embarazo.

6. CONCLUSION

El embarazo es un proceso altamente complejo, en el cual es necesario una continua comunicación celular y así conseguir un éxito gestacional. Asimismo, la comunicación materno-fetal debe ser óptima para así asegurar el flujo bidireccional de esta y el correcto transporte de metabolitos y nutrientes.

En este sentido, las vesículas extracelulares representan un mecanismo de comunicación entre la madre y el feto durante el periodo gestacional. Es por ello que tanto el origen de estas como su contenido se han convertido en un gran área de investigación.

La data obtenida y revisada en el presente trabajo establece que las vesículas extracelulares, específicamente los exosomas, son relevantes para un óptimo embarazo. Los exosomas se encuentran en un constante aumento durante todo el periodo gestacional. Además, estos llevarían a cabo un rol inmunomodulador, ya que serían capaces de interactuar con las células inmunes maternas y así brindar protección fetoplacentaria.

Esta revisión permitió dilucidar que las vesículas extracelulares poseen un rol principalmente inmunomodulador. Sin embargo, y tal como se expuso en el último capítulo, también se verían involucradas en el metabolismo celular, específicamente el metabolismo de glucosa en la placenta.

La presente tesis abarcó diversas aristas de las vesículas extracelulares pequeñas, pero probablemente estas poseen otras funciones y características que aún no han sido descubiertas. Es necesario seguir avanzando en esta área y realizar investigaciones más extensivas para así entender en profundidad la relevancia fisiológica y también patológica de las vesículas extracelulares durante el proceso gestacional.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akers, J.C., et al., *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. J Neurooncol, 2013. **113**(1): p. 1-11.
2. Apps, R., et al., *Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies*. Immunology, 2009. **127**(1): p. 26-39.
3. Atay, S., et al., *Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells*. Exp Cell Res, 2011. **317**(8): p. 1192-202.
4. Atay, S., et al., *Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation*. Am J Reprod Immunol, 2011. **65**(1): p. 65-77.
5. Baines, K.J. and S.J. Renaud, *Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **145**: p. 39-88.
6. Battistelli, M. and E. Falcieri, *Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication*. Biology (Basel), 2020. **9**(1).
7. Bloemendal, S. and U. Kuck, *Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review*. Naturwissenschaften, 2013. **100**(1): p. 3-19.
8. Boss, A.L., L.W. Chamley, and J.L. James, *Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made?* Hum Reprod Update, 2018. **24**(6): p. 750-760.

9. Bowman, C.E., Z. Arany, and M.J. Wolfgang, *Regulation of maternal-fetal metabolic communication*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(4): p. 1455-1486.
10. Buca, D., et al., *Extracellular Vesicles in Feto-Maternal Crosstalk and Pregnancy Disorders*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
11. Chang, J. and D. Streitman, *Physiologic adaptations to pregnancy*. Neurol Clin, 2012. **30**(3): p. 781-9.
12. Chiefari, E., et al., *Gestational diabetes mellitus: an updated overview*. J Endocrinol Invest, 2017. **40**(9): p. 899-909.
13. Ciardiello, C., et al., *Large extracellular vesicles: Size matters in tumor progression*. Cytokine Growth Factor Rev, 2020. **51**: p. 69-74.
14. Costa, M.A., *The endocrine function of human placenta: an overview*. Reprod Biomed Online, 2016. **32**(1): p. 14-43.
15. Czernek, L. and M. Duchler, *Exosomes as Messengers Between Mother and Fetus in Pregnancy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(12).
16. Daya, S. and D.A. Clark, *Immunosuppressive factor (or factors) produced by human embryos in vitro*. N Engl J Med, 1986. **315**(24): p. 1551-2.
17. Desrochers, L.M., et al., *Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11958.
18. Dragovic, R.A., et al., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine, 2011. **7**(6): p. 780-8.
19. Familiar, M., et al., *Placenta-derived extracellular vesicles: their cargo and possible functions*. Reprod Fertil Dev, 2017. **29**(3): p. 433-447.
20. Gamage, T.K., L.W. Chamley, and J.L. James, *Stem cell insights into human trophoblast lineage differentiation*. Hum Reprod Update, 2016. **23**(1): p. 77-103.
21. Gil-Sanchez, A., B. Koletzko, and E. Larque, *Current understanding of placental fatty acid transport*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(3): p. 265-72.

22. Gill, J.S., et al., *Modeling oxygen transport in human placental terminal villi*. J Theor Biol, 2011. **291**: p. 33-41.
23. Greening, D.W., et al., *Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions*. Biol Reprod, 2016. **94**(2): p. 38.
24. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
25. Haram, K., et al., *Early development of the human placenta and pregnancy complications*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2020. **33**(20): p. 3538-3545.
26. Hauser, P., S. Wang, and V.V. Didenko, *Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles*. Methods Mol Biol, 2017. **1554**: p. 193-200.
27. Hsiao, E.Y. and P.H. Patterson, *Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(10): p. 1317-26.
28. Jayabalan, N., et al., *Adipose Tissue Exosomal Proteomic Profile Reveals a Role on Placenta Glucose Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2019. **104**(5): p. 1735-1752.
29. Jayabalan, N., et al., *Cross Talk between Adipose Tissue and Placenta in Obese and Gestational Diabetes Mellitus Pregnancies via Exosomes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 239.
30. Ji, L., et al., *Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(5): p. 981-1023.
31. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*. Science, 2020. **367**(6478).
32. Knofler, M., et al., *Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(18): p. 3479-3496.

33. Kshirsagar, S.K., et al., *Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes*. Placenta, 2012. **33**(12): p. 982-90.
34. Kurian, N.K. and D. Modi, *Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy*. J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(2): p. 189-198.
35. Lager, S. and T.L. Powell, *Regulation of nutrient transport across the placenta*. J Pregnancy, 2012. **2012**: p. 179827.
36. Larque, E., M. Ruiz-Palacios, and B. Koletzko, *Placental regulation of fetal nutrient supply*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. **16**(3): p. 292-7.
37. Li, B., et al., *RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells*. Oncogene, 2012. **31**(45): p. 4740-9.
38. Maas, S.L.N., X.O. Breakefield, and A.M. Weaver, *Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(3): p. 172-188.
39. Maltepe, E. and S.J. Fisher, *Placenta: the forgotten organ*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2015. **31**: p. 523-52.
40. Minciocchi, V.R., M.R. Freeman, and D. Di Vizio, *Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **40**: p. 41-51.
41. Mishra, A., et al., *Extracellular vesicles in embryo implantation and disorders of the endometrium*. Am J Reprod Immunol, 2021. **85**(2): p. e13360.
42. Moffett-King, A., *Natural killer cells and pregnancy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 656-63.
43. Mor, G. and I. Cardenas, *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 425-33.

44. Moyce, B.L. and V.W. Dolinsky, *Maternal beta-Cell Adaptations in Pregnancy and Placental Signalling: Implications for Gestational Diabetes*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
45. Nair, S., et al., *Human placental exosomes in gestational diabetes mellitus carry a specific set of miRNAs associated with skeletal muscle insulin sensitivity*. Clin Sci (Lond), 2018. **132**(22): p. 2451-2467.
46. Nair, S. and C. Salomon, *Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy*. Semin Immunopathol, 2018. **40**(5): p. 425-437.
47. Nair, S. and C. Salomon, *Extracellular vesicles as critical mediators of maternal-fetal communication during pregnancy and their potential role in maternal metabolism*. Placenta, 2020. **98**: p. 60-68.
48. Nakahara, A., et al., *Circulating Placental Extracellular Vesicles and Their Potential Roles During Pregnancy*. Ochsner J, 2020. **20**(4): p. 439-445.
49. Napso, T., et al., *The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1091.
50. Ogueh, O., et al., *A longitudinal study of the control of renal and uterine hemodynamic changes of pregnancy*. Hypertens Pregnancy, 2011. **30**(3): p. 243-59.
51. Petrovčíková, E., Vičíková, K., & Leksa, V., *Extracellular vesicles—biogenesis, composition, function, uptake and therapeutic applications*. . Biologia, 2018. **73**(4): p. 437-448.
52. Pillay, P., et al., *Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies*. Placenta, 2016. **46**: p. 18-25.
53. Plows, J.F., et al., *The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).

54. PrabhuDas, M., et al., *Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 328-34.
55. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
56. Rice, G.E., et al., *The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(10): p. E1280-8.
57. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 195-208.
58. Sabapatha, A., C. Gercel-Taylor, and D.D. Taylor, *Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences*. Am J Reprod Immunol, 2006. **56**(5-6): p. 345-55.
59. Salomon, C., et al., *Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79636.
60. Salomon, C. and G.E. Rice, *Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **145**: p. 163-179.
61. Salomon, C., et al., *Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation*. Diabetes, 2016. **65**(3): p. 598-609.
62. Salomon, C., Sobrevia, L., Ashman, K., E., S., D., M., & E., G. , *The Role of Placental Exosomes in Gestational Diabetes Mellitus*. Gestational Diabetes - Causes, Diagnosis and Treatment., 2013.
63. Salomon, C., et al., *A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98667.
64. Sedgwick, A.E. and C. D'Souza-Schorey, *The biology of extracellular microvesicles*. Traffic, 2018. **19**(5): p. 319-327.

65. Sheller-Miller, S., et al., *Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2019. **221**(5): p. 502 e1-502 e12.
66. Sonagra, A.D., et al., *Normal pregnancy- a state of insulin resistance*. J Clin Diagn Res, 2014. **8**(11): p. CC01-3.
67. Stenqvist, A.C., et al., *Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus*. J Immunol, 2013. **191**(11): p. 5515-23.
68. Szekeres-Bartho, J. and T.G. Wegmann, *A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance*. J Reprod Immunol, 1996. **31**(1-2): p. 81-95.
69. Tan, E.K. and E.L. Tan, *Alterations in physiology and anatomy during pregnancy*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2013. **27**(6): p. 791-802.
70. Tetta, C., et al., *Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication*. Endocrine, 2013. **44**(1): p. 11-9.
71. Tricarico, C., J. Clancy, and C. D'Souza-Schorey, *Biology and biogenesis of shed microvesicles*. Small GTPases, 2017. **8**(4): p. 220-232.
72. van der Pol, E., et al., *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 676-705.
73. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(4): p. 213-228.
74. Wei, H., et al., *Regulation of exosome production and cargo sorting*. Int J Biol Sci, 2021. **17**(1): p. 163-177.
75. Yang, C., G. Song, and W. Lim, *Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders*. Reproduction, 2019. **158**(5): p. R189-R196.

76. Yuana, Y., A. Sturk, and R. Nieuwland, *Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions*. Blood Rev, 2013. **27**(1): p. 31-9.
77. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study*. Bioscience, 2015. **65**(8): p. 783-797.
78. Zeng, Z., F. Liu, and S. Li, *Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review*. Ann Nutr Metab, 2017. **70**(1): p. 59-65.
79. Zhang, J., et al., *Extracellular vesicles in normal pregnancy and pregnancy-related diseases*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(8): p. 4377-4388.
80. Zhang, S., et al., *Placental adaptations in growth restriction*. Nutrients, 2015. **7**(1): p. 360-89.