



*UGR* | Universidad  
de **Granada**



**Presencia en exovesículas y su papel en la  
enfermedad de Chagas de las regiones N- y C-  
terminal de las proteínas MASPs de  
*Trypanosoma cruzi*.**

Isabel María Díaz Lozano

**Tesis Doctoral**

Granada, 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Isabel María Díaz Lozano  
ISBN: 978-84-9163-081-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44617>







La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Investigación “Bioquímica y Parasitología Molecular CTS183” perteneciente al Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada.

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido presentados en:

-3rd International Symposium of GEIVEX “Therapeutic applications of extracellular vesicles”. San Sebastián, Spain. 2016.

-13 th International Congress of Parasitology (ICOPA). México D.C., México. 2014.

- II Workshop Jóvenes Biotecnólogos. Granada, Spain. 2014.

-XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal. Gran Canarias, Spain. 2013.

-Joint Congress of the French Society of Parasitology and the Spanish Society of Parasitology. Dijon Burgundy, France. 2013.

-I Workshop de Jóvenes Biotecnólogos. Granada, Spain. 2013.

-1st GEIVEX Symposium Extracellular Vesicles, “Implications and Opportunities in Biomedicine”. Segovia, Spain. 2012.

Y publicados o en vías de publicación en las siguientes revistas:

- De Pablos, L.M., Díaz Lozano, I.M., Jercic M.I., Quinzada, M., Giménez, M.J., Calabuig, E., Espino, A.M., Schijman, A.G., Zulantay, I., Apt, W., Osuna, A. (2016). The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific Reports*. 8; 6:27293.
- Díaz Lozano, I.M., De Pablos, L.M., Longhi, S.A., Zago, M.P., Schijman, A.G. and Osuna, A. (2016). Immune complexes in

chronic Chagas disease patients are formed by Exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Scientific Reports* (submitted).

*“Me enseñaron que el camino  
del progreso no es ni rápido  
ni fácil”*

*Marie Curie (1867-1934)*



*A mis abuelos, porque seguís  
en mi memoria, y sé que  
estaríais muy orgullosos de  
mí.*

*A vosotros, mis padres, por  
todo.*



# Agradecimientos

Comienzo este espacio agradeciendo a todos y cada uno de aquellos que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, agradecer a mi director Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y, no sólo por eso, sino por haber confiado en mis posibilidades para llevarlo a cabo sin dejar en ningún momento que dudase de ello. Por supuesto de igual manera agradecerle a mi co-director Luis Miguel De Pablos Torró por toda su ayuda tanto en mi formación previa al doctorado como durante la realización del mismo, resolviendo mis múltiples dudas y apoyando hasta el final este proyecto.

También querría destacar mi agradecimiento a la doctora Susana Vílchez Tornero por haberme ayudado tanto en temas experimentales como documentales siendo siempre una persona de referencia a quien acudir.

Gracias a la Fundación Ramón Areces y al proyecto de investigación “Exosomas: nuevos comunicadores intercelulares y su aplicabilidad como agentes terapéuticos en enfermedades parasitarias desatendidas”, así como al proyecto desarrollado dentro del marco de colaboración investigadora europea ERANET-LAC “Research in Prevention of Congenital Chagas disease: Parasitological, placental and immunological markers”, y a la Red de Excelencia en Investigación e Innovación de Exovesículas (REDIEX) del Ministerio de Economía y Competitividad de España que han aportado la financiación para la realización de dicha tesis doctoral.

Gracias especialmente al Dr. Alejandro G. Shijman del Instituto INGEBI-CONICET (Argentina) por su colaboración y aportación de muestras de sueros de pacientes crónicos de Chagas para la realización

de los experimentos presentados en esta tesis doctoral, y al Dr. José Luis Ramírez de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) (Venezuela) por haberme permitido participar en su investigación culminándola con la publicación de un artículo científico así como su disposición en todo momento.

Esta tesis doctoral opta a la mención internacional gracias a la estancia realizada en la Université Claude Bernad (Lyon, Francia), en el Laboratorié de Parasitologie et Micologie Medicale. Por ello quiero agradecerle a la Prof. Samira Azzouz Maache por haberme aceptado en su laboratorio y acogido como si fuera su familia. Mi estancia en Lyon a pesar de todas las dificultades la recuerdo con un enorme cariño, cariño que recibí por parte de ella y de Régine, Néstor, Uruguaycito, Philip y Hanna, que fueron una familia para mí, muchas gracias. Nunca olvidaré las charlas durante la comida y el posterior café hablando de fútbol donde no hacía falta hablar el mismo idioma, o las risas con Régine por el “café olé” y con Néstor ensañándome francés todos los días, o las charlas en español con Uruguaycito que enfadaban a Madame Petavy. De nuevo gracias.

Esto se hace extenso. No puedo olvidarme de tanta gente que ha pasado por el “lab” siendo sólo algunos los que han dejado huella como Gloria, Alfonso y Juanfran que tantos buenos ratos compartimos en los comienzos. Ni por supuesto me puedo olvidar de mi Tania María y mi Merxis jajaja. Gracias por todos estos años de amistad, de soportar mis paranoias, mi mal genio, etc, y de esas tardes-noches de cervezas olvidando las penas. Por tantos momentos inolvidables que cuando seamos viajes recordaremos. Se que seguiremos siendo “Las Tres Marias” para siempre. ¡Os quiero petúnidas! Y especialmente a Mercedes por ser en este último año mi compañera de fatigas, escribiendo codo con codo y dándome de comer tantas veces, sin ti esto no hubiese sido igual.

Que decir de mis “Amiguitos”. Empezamos esto hace 13 años, que se dicen pronto, presentándonos con nuestros nombres completos, nuestras ciudades de origen, cada uno de su padre y de su madre, pero que al final hemos formado una gran familia. Sois mi familia. Y la familia fue aumetado y se hizo más rica, más rica en gente verdadera, que sabes que van a estar ahí cuando lo necesites. Gracias por haberme dejado formar parte de esta familia y no sentirme lejos de la mía propia. Amiguitos serán “forever” estemos donde estemos.

Bueno, no te creas que me olvidabe de ti. Mi hermana, Isa Civantos. Que decirte si lo sabes todo. No hace falta que te diga que has sido muy importante para mí todos estos años y que me has apoyado siempre en mis más difíciles momentos. Y sé que estaremos ahí la una para la otra siempre. Esta tesis también es tuya.

Y sin ser menos importantes, sino todo lo contrario, por último pero los primeros en todo, gracias a mi familia. A mis padres, Isabel y Ricardo, porque verdaderamente sin vosotros, sin vuestro esfuerzo y sacrificio, esta tesis no sería posible. Vosotros habéis sido mi apoyo en todo, no sólo en lo económico, sino en lo fundamental que es el cariño y el amor que me tenéis y que yo os tengo. No hay palabras para agradecéroslo. Sólo espero seguir siendo la hija que os merecéis. A mis hermanos y cuñadas, Óscar, Jesús, Trini y Gema, por apoyarme en todo y darme lo que más quiero, mis sobrinos, que llegaron durante esta etapa de mi vida para llenarla de felicidad. Os quiero mucho aunque no os lo diga. A toda mi familia, que desde la distancia también me ha apoyado y ha sabido valorar mi sacrificio.

A todos vosotros, sin más. Gracias.



## ÍNDICE

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introducción.....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1      | Enfermedad de Chagas: Epidemiología.....  | 3         |
| 1.2      | Manifestaciones clínicas.....   | 8         |
| 1.3      | Diagnóstico .....   | 10        |
| 1.4      | <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 14        |
| 1.4.1    | Ciclo de vida .....   | 14        |
| 1.4.2    | Características generales.....  | 16        |
| 1.4.3    | Organización estructural .....  | 19        |
| 1.4.4    | Invasión celular por <i>T. cruzi</i> .....  | 24        |
| 1.4.4.1  | Mecanismos de entrada .....   | 24        |
| 1.4.4.2  | Proteínas implicadas durante la invasión y vías de<br>señalización .....  | 30        |
| 1.4.4.3  | Proteínas secretadas durante la invasión .....  | 38        |
| 1.4.5    | Mucin-associated surface protein (MASP) .....   | 41        |
| 1.5      | Exovesículas.....   | 48        |
| 1.5.1    | Biogénesis de Exosomas: Vía endocítica y secreción .....  | 49        |
| 1.5.2    | Composición molecular y funciones .....   | 55        |
| 1.5.3    | EVs en enfermedades infecciosas parasitarias.....   | 59        |
| 1.5.4    | Exovesículas secretadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 63        |
| 1.6      | Respuesta inmune y evasión mediada por <i>T. cruzi</i> .....  | 65        |
| <b>2</b> | <b>Objetivos</b>  | <b>79</b> |
| <b>3</b> | <b>Materiales y Métodos</b>   | <b>83</b> |
| 3.1      | Parásitos .....   | 83        |
| 3.2      | Metacicloogénesis <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i> .....  | 83        |
| 3.3      | Obtención de las formas amastigotas y tripomastigotas<br>sanguíneas de <i>T. cruzi</i> a partir de cultivos celulares ..... | 84        |
| 3.3.1    | Cultivo de células Vero .....   | 84        |
| 3.3.2    | Infección del cultivo celular.....  | 85        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.3 Purificación y mantenimiento de tripomastigotes y amastigotes derivados de cultivo celular infectado .....                  | 85        |
| <b>3.4. Purificación de EVs .....</b>   | <b>86</b> |
| 3.4.1 Preparación de medios de cultivo con SBF libre de EVs .....   | 86        |
| 3.4.2 Aislamiento y purificación de EVs .....   | 87        |
| <b>3.5. Identificación de EVs .....</b>   | <b>89</b> |
| 3.5.1. Microscopía electrónica de Barrido .....   | 90        |
| 3.5.2 Microscopía electrónica de transmisión .....  | 90        |
| 3.5.3 Dynamic Ligth Scatering.....  | 92        |
| <b>3.6 Medida de la secreción de EVs en diferentes condiciones de cultivo mediante marcaje con precursores radioactivos .....</b> | <b>93</b> |
| 3.6.1 Liberación de EVs vs tiempo de cultivo .....  | 93        |
| 3.6.2 Liberación de EVs en condiciones de estrés de térmico.....  | 93        |
| 3.6.2.1 Liberación de EVs a diferentes temperaturas .....   | 93        |
| 3.6.2.2 Liberación de EVs en condiciones de deprivación de Glucosa <sup>94</sup>  |           |
| 3.6.2.3 Inhibición de la liberación de EVs mediante a través de agentes inhibidores del citoesqueleto.....                        | 95        |
| 3.6.2.4 Liberación de EVs durante la Fase S del ciclo celular .....   | 95        |
| 3.6.3 Determinación del marcaje radioactivo mediante la técnica de centelleo líquido. ....  | 96        |
| <b>3.7 Identificación de proteínas específicas de <i>T. cruzi</i>.....</b>  | <b>97</b> |
| 3.7.1 Inmunocitoquímica.....  | 97        |
| 3.7.2 Western Blot: De la preparación de muestras al blotting. ....   | 98        |
| 3.7.2.1 Obtención de proteínas totales y EVs de <i>T. cruzi</i> .....   | 98        |
| 3.7.2.2 Cuantificación de proteínas. ....   | 99        |
| 3.7.2.3 Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida. ....                                   | 102       |
| 3.7.2.4 Visualización de proteínas mediante tinción del gel de poliacrilamida.....  | 103       |
| 3.7.2.5 Western Blot. ....  | 104       |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>3.8</b>  | <b>Diseño y síntesis de péptidos sintéticos.....</b>  | <b>105</b> |
| 3.8.1       | <b>Extracción de ARN y PCR.....</b>   | 106        |
| 3.8.2       | <b>Electroforesis de ADN en gel de Agarosa.....</b>   | 107        |
| 3.8.3       | <b>Purificación de ADN amplificado de gel de Agarosa.....</b>   | 108        |
| 3.8.4       | <b>Técnicas de clonación .....</b>  | 108        |
| 3.8.4.1     | <b>Reacción de ligación.....</b>  | 108        |
| 3.8.4.2     | <b>Preparación de células bacterianas competentes.....</b>  | 110        |
| 3.8.4.3     | <b>Transformación en células bacterianas competentes .....</b>  | 111        |
| 3.8.4.4     | <b>Selección de bacterias transformantes .....</b>  | 111        |
| 3.8.4.5     | <b>Aislamiento de ADN plasmídico .....</b>  | 112        |
| 3.8.4.6     | <b>Secuenciación de ADN.....</b>  | 113        |
| 3.8.5       | <b>Análisis Bioinformático y síntesis de péptidos sintéticos....</b>  | 113        |
| <b>3.9</b>  | <b>Obtención de anticuerpos policlonales.....</b>   | <b>114</b> |
| 3.9.1       | <b>Acoplamiento del péptido sintético a una proteína Carrier .</b>  | 114        |
| 3.9.2       | <b>Fijación de EVs con Glutaraldehído .....</b>   | 116        |
| 3.9.3       | <b>Procedimiento de inmunización y obtención del suero .....</b>  | 116        |
| 3.9.4       | <b>Determinación de la capacidad antigénica de los péptidos, proteínas y EVs ensayadas y sus especificidades mediante técnica ELISA .....</b> | 118        |
| 3.9.5       | <b>Disociación de Inmunocomplejos (ICs). .....</b>  | 120        |
| 3.9.6       | <b>Detección de EVs por ELISA.....</b>  | 121        |
| 3.9.7       | <b>Detección de Inmunocomplejos “Inmunoglobulinas-EVs” mediante ELISA.....</b>  | 122        |
| <b>3.10</b> | <b>Inhibición de la lisis mediada por Complemento. ....</b>   | <b>123</b> |
| 3.10.1      | <b>Marcaje de las formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> con el isótopo Cr<sup>51</sup> .....</b>  | 123        |
| 3.10.2      | <b>Ensayo in vitro de la protección a la lisis mediada por el complemento.....</b>  | 125        |
| <b>3.11</b> | <b>Análisis Estadístico.....</b>  | <b>126</b> |
| <b>3.12</b> | <b>Soluciones y medios.....</b>   | <b>126</b> |
| <b>4</b>    | <b>Resultados</b>   | <b>135</b> |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>4.1</b> | <b>Identificación de EVs secretadas por <i>T. cruzi</i> cepa PAN4 .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Estudios para la evaluación de las condiciones óptimas de cultivo en la liberación de EVs por <i>T. cruzi</i> cepa PAN4.....</b>        | <b>141</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Expresión de proteínas específicas de <i>T. cruzi</i> en los distintos estadios y en EVs secretadas.....</b>                            | <b>148</b> |
| 4.3.1      | <b>Expresión de las proteínas MASP mediante la identificación del extremo N- y C-terminal conservados .....</b>                            | <b>148</b> |
| 4.3.2      | <b>Inmuno localización de las proteínas MASPs mediante microscopía láser confocal.....</b>   | <b>159</b> |
| 4.3.3      | <b>Inmunocitoquímica de los extremos conservados de las proteínas MASP en EVs secretadas por <i>T. cruzi</i>. .....</b>                    | <b>166</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Respuesta humoral del péptido PS y de la región C-terminal de las proteínas MASP de <i>T. cruzi</i>.....</b>                            | <b>169</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Determinación de la presencia de EVs y del péptido PS MASP en inmunocomplejos.....</b>  | <b>175</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Ensayo de inhibición de la lisis por el Complemento del péptido PS, la región C-terminal MASP y de las EVs de <i>T. cruzi</i> .....</b> | <b>181</b> |
| <b>5</b>   | <b>Discusión</b>   | <b>187</b> |
| <b>6</b>   | <b>Conclusiones</b>  | <b>209</b> |
| <b>6</b>   | <b>Conclusions</b>   | <b>213</b> |
| <b>7</b>   | <b>Bibliografía</b>  | <b>217</b> |

## Resumen

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* es endémica del continente americano, donde se transmite por la presencia de insectos triatomíneos.

Debido a los movimientos migratorios a países no endémicos, la enfermedad se ha expandido de manera global. Ésta se divide en dos fases, una fase aguda y otra crónica donde se desarrollan cardiopatologías, patologías digestivas (mega síndromes) o en la mayoría de los casos cursando como asintomática.

La capacidad de evadir el sistema inmune del parásito está mediada por su localización intracelular y por la existencia de mecanismos para eludir e inmunomodular la respuesta humoral del hospedador. La variabilidad de los diferentes componentes de la superficie del parásito, así como los componentes del secretoma, tanto proteínas solubles como las secretadas por la vía no clásica y transportadas en EVs, están involucradas en la manipulación de la respuesta inmune asociada.

En la presente Tesis, se procedió al estudio de la secreción de las EVs por parte del parásito y de la presencia en dichas vesículas de Mucin Associated Surface Proteins (MASPs), una familia multigénica de proteínas específicas de *T. cruzi*. Dicha presencia se ha demostrado mediante inmunocitoquímica, western blot e inmunofluorescencia de los extremos MASP N- y C-terminal conservados en dichas EVs. La demostración de la presencia de estas regiones en EVs, implicaría la presencia de proteínas MASP inmaduras y de errores “teóricos” de procesamiento antes de ser secretadas por parte del parásito.

Mediante el análisis de la respuesta humoral de estos componentes de las proteínas MASP secretados en EVs se ha demostrado que existe una respuesta inmune en el suero de pacientes crónicos clasificados según las diferentes patologías Chagásicas, lo que implica la presencia

activa de secreción, bien por las células parasitadas o por parte de los parásitos extracelulares presentes en los fluidos biológicos de estos pacientes.

La detección e inmunogenicidad de dichas regiones de las proteínas MASP presentes en las EVs sugiere un papel durante la enfermedad actuando como antígenos capaces de atraer hacia ellos la respuesta humoral del hospedador y evitando así la respuesta dirigida directamente hacia el parásito. Esta respuesta conlleva la formación de inmunocomplejos en dichos sueros formados por EVs que transportan las proteínas MASP inmaduras y anticuerpos.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que las EVs (y las regiones N- y C-terminales de las proteínas MASP en ellas contenidas) deben jugar un papel importante en la biología y evasión inmunológica de *Trypanosoma cruzi*.

## **Abstract**

Chagas disease or American tripanosomiasis, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is endemic in the America continent, where it is transmitted by the presence of triatomine insects.

Due to the migration to non-endemic countries, the disease has spread globally. The disease is divided into two phases, an acute phase and a chronic phase where cardiomyopathy and digestive pathologies (mega syndromes) are developed or follow an asymptomatic course.

The ability of the parasite to evade the immune system is mediated by its intracellular localization and the existence of mechanisms to evade and immunomodulate the humoral response of the host. The variability of the different components of on the parasite's surface and its secretome components, including soluble proteins secreted by a non-classical pathway and transported in EVs, are involved in the manipulation of the associated immune response.

In this thesis, we proceeded to study the secretion of EVs by the parasite and the presence in these vesicles of Mucin Associated Surface Proteins (MASPs), a multigenic family of proteins specific to *T. cruzi*. This presence has been demonstrated by immunocytochemistry, western blot and immunofluorescence of the conserved N- and C-terminal MASP regions in these EVs. The demonstration of the presence of these regions in EVs imply the presence of immature proteins MASPs and "theoretical" a processing error before being secreted by the parasite.

Through the analysis of the humoral response of these components of MASP proteins secreted in EVs, the presence of an immune response in the serum of chronic patients classified according to the different chagasic pathologies has been demonstrated, implying the active presence of secretion, either by the parasitized cells or by the extracellular parasites present in biological fluids of these patients.

The detection and immunogenicity of such regions of MASP proteins present in EVs suggests a role in the disease tacting as antigens able to attract the humoral response of the host towards them, thus avoiding the response directed to the parasite. This response leads to the formation of immune complexes in such sera formed by EVs carrying immature MASP proteins and antibodies.

The results obtained in this thesis show that EVs (and N- and C-terminal MASP protein regions therein contained) should play an important role in biology and immune evasion of *Trypanosoma cruzi*.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

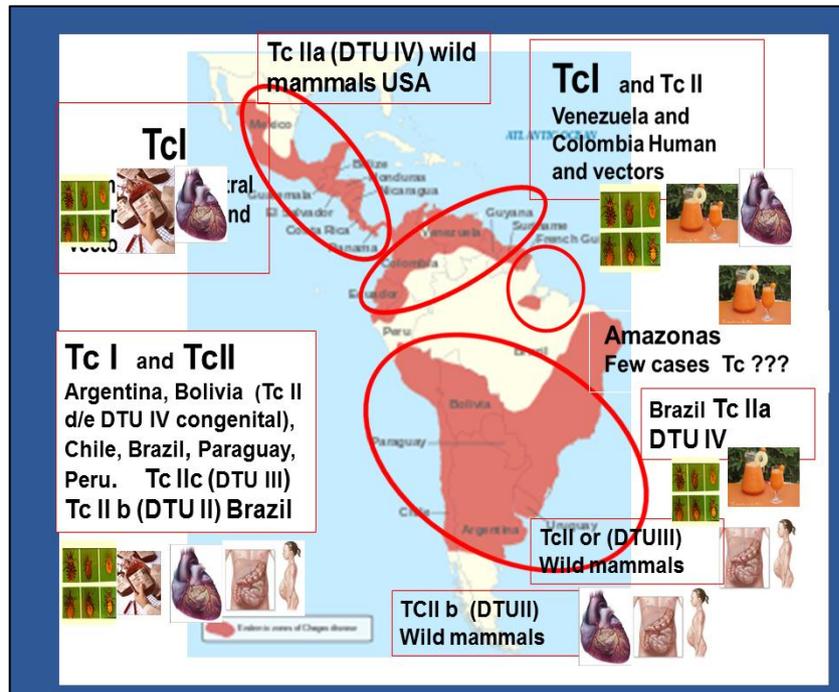


## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 **ENFERMEDAD DE CHAGAS: EPIDEMIOLOGÍA**

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana está causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, y es endémica del continente americano, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile en un total de 22 países. Se estima que alrededor de 8 a 10 millones de personas están infectadas en Latino América y 75 a 90 millones de personas están expuestas a la infección [1].

La distribución selvática de la enfermedad está ligada a su asociación con los insectos vectores pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemíptera y Reduviidae). Las principales especies de triatominos transmisores de la enfermedad son *Triatoma dimidiata* (México, América Central y norte de Sur América), *Triatoma infestans* (Sur América), *Rodnius prolixus* (América central y norte de Sur América) y *Pastrongylus megistus* (Figura 1.1).

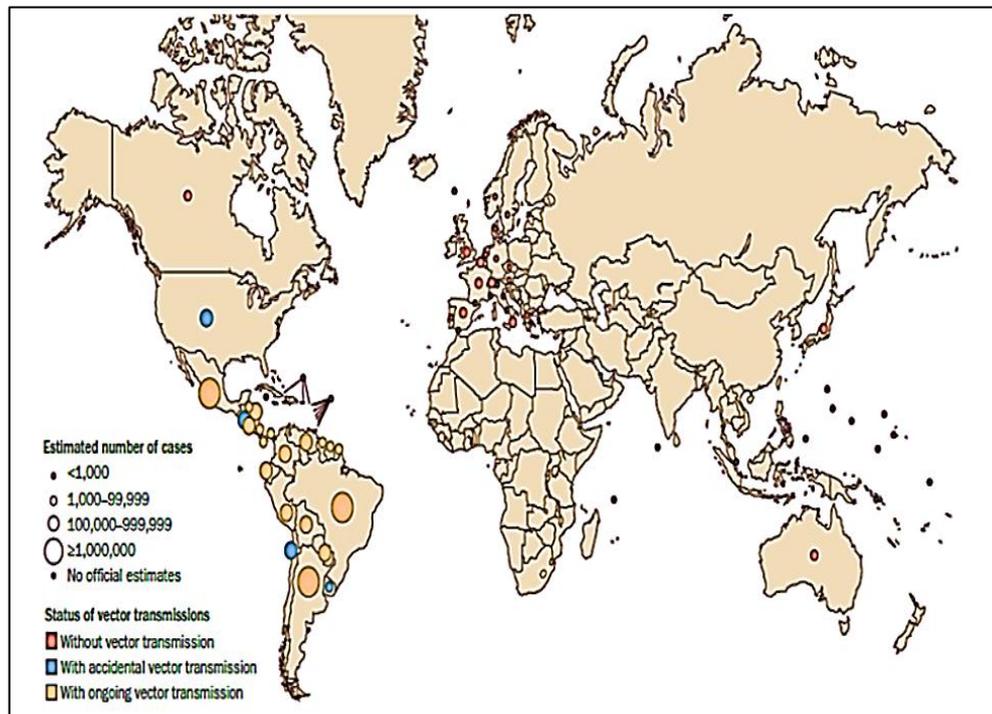


**Figura 1.1.** Distribución geográfica de las distintas cepas de *T. cruzi* y del tipo de sintomatología provocada por la Enfermedad de Chagas por área.

El mal de Chagas tiene alta prevalencia en América Central y del Sur, en particular en las áreas rurales y más pobres, donde aproximadamente 15 millones de personas están enfermas y las muertes provocadas por año superan a cualquier enfermedad transmitida por parásitos (incluyendo la malaria), estimándose en 28 millones el número de personas en riesgo de contagio [2].

Como consecuencia de las migraciones en los últimos años, se han detectado casos de enfermedad de Chagas en países no endémicos, principalmente Estados Unidos y Europa (Figura 1.2) [3], siendo España uno de los destinos preferentes de esta migración y donde existen alrededor de unos 60.000 casos reportados [4]. Los niveles de la enfermedad en la población emigrante varían en función de su procedencia, siendo las personas de origen boliviano, ecuatoriano, argentino, colombiano y paraguayo, las que mayores niveles de parasitación muestran.

Desde hace varias décadas el control vectorial llevado a cabo de forma sistemática en los países del cono sur han sido especialmente eficaces, sobre todo en Chile y Uruguay, por lo que la prevalencia de la enfermedad en estos países ha disminuido [5].



**Figura 1.2.** Distribución global de individuos infectados por *T. cruzi*, estimación del número de casos y relación con la forma de transmisión [6].

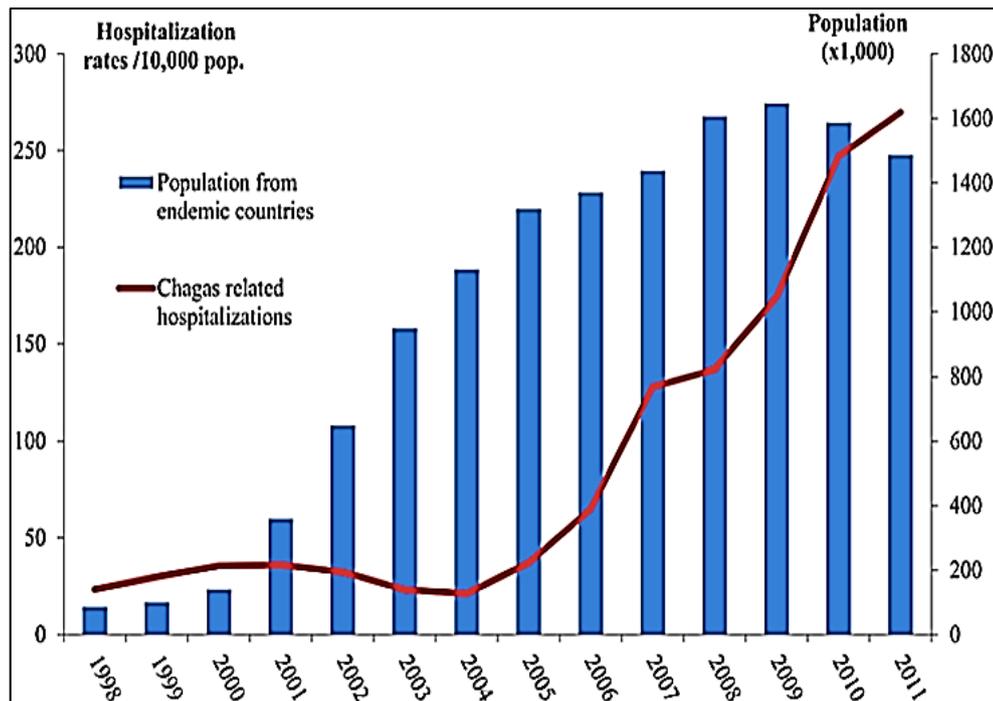
El interés del estudio de la prevalencia de Chagas se debe al incremento de la población latinoamericana en España en los últimos 14 años (2001-2015), debido a la situación socioeconómica de estos países, así como por la accesibilidad del país de destino. En 2006, la PAHO publica el número estimado de inmigrantes infectados en España, con un total de 47.738 inmigrantes de los cuáles el 6.75 % (la mayoría de los infectados) eran bolivianos, seguido de los argentinos con un 4.13 % (Figura 1.3)[4, 7].

## Introducción

| Country of origin | Estimated number of immigrants | Estimated <i>T. cruzi</i> prevalence | Estimated number of infected immigrants |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| Argentina         | 287,760                        | 4.13%                                | 11,882                                  |
| Bolivia           | 238,605                        | 6.75% (15%) <sup>a</sup>             | 16,106 (35,791) <sup>a</sup>            |
| Brazil            | 140,942                        | 1.02%                                | 1,436                                   |
| Chile             | 66,270                         | 0.99%                                | 653                                     |
| Colombia          | 326,459                        | 0.96%                                | 3,121                                   |
| Costa Rica        | 2,864                          | 0.53%                                | 15                                      |
| Ecuador           | 451,072                        | 1.74%                                | 7,844                                   |
| El Salvador       | 7,064                          | 3.37%                                | 238                                     |
| Guatemala         | 5,821                          | 1.98%                                | 115                                     |
| Honduras          | 23,512                         | 3.05%                                | 718                                     |
| México            | 42,413                         | 1.03%                                | 436                                     |
| Nicaragua         | 10,027                         | 1.14%                                | 114                                     |
| Panama            | 4,214                          | 0.01%                                | 0                                       |
| Paraguay          | 68,234                         | 2.54%                                | 1,735                                   |
| Peru              | 160,603                        | 0.69%                                | 1,102                                   |
| Uruguay           | 86,601                         | 0.66%                                | 568                                     |
| Venezuela         | 142,709                        | 1.16%                                | 1,654                                   |
| Total             |                                |                                      | 47,738 (67,423) <sup>a</sup>            |

**Figura 1.3.** Estimación del número de inmigrantes infectados en España según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) [4].

En los subsecuentes 2 a 3 años, la inmigración en España aumentó y el número de bolivianos infectados por *T. cruzi* duplicó su número, pasando de un 6 a un 15 %, con un total de 35.791 inmigrantes [4]. Además de esto, cabe destacar el alto número de mujeres diagnosticadas positivas para Chagas según los datos de los hospitales, 73.97 % frente al 26.03 % de hombres, siendo destacable que se encuentran en edades comprendidas de entre 16 a 45 años, cuyo riesgo de transmisión congénita está presente ya que la gran mayoría pueden no presentar síntomas o encontrarse en una fase indeterminada de la enfermedad [8].



**Figura 1.4.** Relación entre el aumento de inmigrantes de países endémicos para Chagas y el número de hospitalizados por la enfermedad en España en el periodo comprendido entre 1998 y 2011[8].

El riesgo de contraer la enfermedad en los países no endémicos reside en las transfusiones de sangre y donaciones de órganos por parte de esta población, por lo que en España se implantó el Real Decreto Ley 1088/2005 que rechaza como donantes de sangre a personas con historial clínico para la enfermedad de Chagas [9, 10], centrándose en la transmisión congénita de la enfermedad ya que supone la mayor causa de persistencia de la enfermedad en la población humana en dichas áreas [11-13]. En España, un estudio realizado sobre 1.350 mujeres embarazadas residentes en Barcelona, demostró una prevalencia de la enfermedad del 3.4 %, donde el 27.7 % de las mujeres eran Bolivianas, con un rango de transmisión del 7.3 % [14]. En los países no endémicos, el Chagas congénito puede pasar desapercibido por la ausencia de síntomas en madres portadoras y su descendencia, dando lugar a individuos adultos en fase crónica de la misma. Por éste motivo es muy importante un diagnóstico temprano de la enfermedad,

## Introducción

dado que el tratamiento en niños resulta en casi un 100 % de curación [15, 16].

Los gastos derivados del tratamiento médico más la pérdida de horas trabajadas han sido evaluados recientemente por Lee et al (2013)[17], mostrando datos que están por encima de enfermedades más reconocidas por la sanidad de los países del primer mundo como las infecciones por rotavirus (~2.000 millones \$) o en cáncer cervical (7.000 millones de \$), mientras que el Chagas a nivel global supera estas cifras llegando a los 9000 millones de \$.

Por tanto, los mecanismos de transmisión de la enfermedad se pueden diferenciar claramente entre aquellos que ocurren en las zonas endémicas: la vía vectorial (triatominos); transfusiones sanguíneas por falta de control de donantes en estos países; vía congénita (transplacentaria o canal del parto) y de forma oral (ingesta de alimentos contaminados)[18]. Y aquellos que pueden ocurrir en zonas no endémicas: trasplantes de órganos, la manipulación de animales infectados o accidentes de laboratorio [19].

### 1.2 **MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La enfermedad de Chagas presenta una fase inicial o fase aguda en la que la parasitemia es detectable mediante visualización directa la sangre y generalmente cursa de forma asintomática. En otras ocasiones, los síntomas se hacen visibles como en el caso del signo de Romaña o Chagoma cuando la picadura ocurre alrededor del ojo. Además de esto pueden presentarse síntomas como fiebre, edemas, linfadenopatías, hepatoesplenomegalía, seguido de vómitos, diarrea, anorexia e incluso miocarditis o meningoencefalitis en casos severos. En esta fase, la muerte ocurre entre el 5 y 10 % de los casos sintomáticos con las complicaciones médicas más graves antes mencionados [20].

Tras esto, la enfermedad cursa de forma asintomática entrando en fase crónica, donde los niveles de parasitemia son muy bajos. Entre el 40 al 50-90 % de las personas infectadas se mantienen en esta fase asintomática dependiendo del área geográfica a la que pertenezcan llegando incluso a permanecer en este estado durante toda su vida (forma indeterminada de la enfermedad) [21]. A pesar de esto, los pacientes asintomáticos presentan reactividad en los test inmunológicos desarrollados frente a Chagas, por xenodiagnóstico e incluso por PCR [21]. Estas personas pueden actuar como reservorio conservando el ciclo biológico del parásito en las zonas endémicas.

Pero no en todos los casos la fase crónica cursa de una manera asintomática e indeterminada sino que se presentan complicaciones que discurren hacia afecciones cardíacas o del sistema digestivo.

La cardiopatía en la enfermedad de Chagas es la afección más importante que puede desarrollarse durante la fase crónica debido a su frecuencia y severidad. Normalmente, aparecen entre los 10 y 30 años después de la fase aguda y típicamente se caracteriza por arritmias, insuficiencias cardíacas, fenómenos tromboembólicos (FTE) e incluso muerte súbita [22]. Todo esto está provocado por un proceso de inflamación focal con células linfo-mononucleares que provocan una destrucción progresiva de las fibras musculares cardíacas con la consecuente fibrosis que afecta a todo el miocardio. Aunque en la fase aguda también pueden aparecer afecciones cardíacas, éstas distan mucho de las afecciones cardíacas de la fase crónica y sólo comparten el proceso inflamatorio generalizado del miocardio [23].

Por otro lado, en la forma crónica digestiva, las principales manifestaciones clínicas se deben a la disperistalsis del esófago y del colon debido a la destrucción del plexo mientérico provocando los mega síndromes conocidos como megacolon y megaesófago [24].

## Introducción

Cuando la enfermedad cursa en una mujer embarazada, ésta puede ocasionar abortos previos al parto, partos prematuros e incluso lesiones en los órganos del feto. Aunque la mayoría de recién nacidos no presentan síntomas, algunos pueden presentar síntomas no específicos e incluso pueden estar asociados a otras infecciones como toxoplasmosis o infecciones por cytomegalovirus [25]. Por otro lado, también existen casos de infecciones en personas inmunodeprimidas donde *T. cruzi* no encuentra oposición por parte del sistema inmune del hospedador y aparece alta parasitemia en sangre y en el sistema nervioso central así como una miocarditis difusa y meningoencefalitis [24].

### 1.3 **DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas puede ser directo o indirecto. El diagnóstico directo está indicado para la fase aguda de la enfermedad [26] y consiste en la detección del parásito por observación bajo microscopía óptica de sangre no coagulada del enfermo, normalmente en la fase aguda, cuando hay parasitemia en sangre. Otro método directo es el xenodiagnóstico y visualización de parásitos en heces de chinches no infectadas tras succionar la sangre del paciente, o mediante técnicas moleculares de detección de DNA del parásito presente en la sangre de los pacientes mediante PCR [27], e incluso combinando ambas técnicas [6].

Aunque la detección de DNA del parásito en la sangre de pacientes con Chagas mediante PCR tiene una sensibilidad de entre el 50 al 90% y una alta especificidad, puede presentar mayor heterogeneidad de resultados con respecto a los test serológicos [28], sin embargo, la técnica PCR puede ser útil en casos de sospecha de Chagas congénito o en caso de posible reactivación de la enfermedad en inmunodeprimidos [16, 29].

Por otra parte, los test serológicos se basan en la detección de anticuerpos frente al parásito y suelen realizarse para el diagnóstico de la enfermedad en la fase crónica donde la respuesta inmunológica frente al parásito es alta y, por lo tanto, la presencia de anticuerpos (IgGs) específicos al parásito. La técnica de diagnóstico serológico en laboratorio más utilizada es la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). El antígeno a usar varía desde extractos crudos del parásito a proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos en test comerciales, probados con una alta especificidad y sensibilidad para *T. cruzi* [30-32] con respecto a la técnica de PCR, que muestra variabilidad de resultados positivos durante la fase crónica [26]. Esta técnica es la más recomendada para el diagnóstico de la enfermedad [33, 34] y al menos se necesitan dos test positivos para confirmar a un paciente como positivo. Cuando esto no ocurre es necesario realizar un tercer test para confirmar o refutar el diagnóstico, o incluso repitiendo la toma de muestras.

Además de la ELISA, existen otras pruebas serológicas también eficientes que se describen a continuación:

- **IHA:** Hemaglutinación indirecta, basada en la reacción de los glóbulos rojos sensibilizados con *T. cruzi* que entran en contacto con anticuerpos específicos para el parásito produciéndose aglutinación cuando la reacción es positiva.
- **Inmunofluorescencia Indirecta:** Permite la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en cualquier tipo de muestra biológica. Como antígeno se usan directamente los parásitos fijados y expuestos al suero del paciente produciéndose una reacción antígeno-anticuerpo que se detecta mediante un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente que permite su observación por microscopía de fluorescencia.

## Introducción

Un diagnóstico adecuado es clave para la aplicación del tratamiento adecuado. Un ejemplo de la combinación de técnicas para el diagnóstico de casos sospechosos de infección aguda, congénita y crónica de *T. cruzi* es la técnica denominada TESA-blot (trypomastigote excretion-secretion antigens), basada en un inmunoblotting con antígenos excretados y secretados por tripomastigotes pertenecientes a cuatro cepas diferentes de *T. cruzi* (Y, CL-Brener, José-IMT y BS-IMT)[35]. Esta técnica presenta una alta especificidad y sensibilidad en casos sospechosos de Chagas agudo y/o congénito, y para casos crónicos que muestran baja reactividad con las técnicas de diagnóstico convencionales. Además, este test posee una ausencia de reacciones cruzadas para leishmaniosis o infecciones con *T. rangeli*.

A pesar de esto, esta técnica tiene una limitación en cuanto al número de muestras que se pueden analizar, es por ello por lo que se combinó con la técnica ELISA, TESA-ELISA, utilizando un polipéptido de 150 a 170 kDa excretad/secretado por tripomastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi* [36] y diferentes biotemas (Y tipo I, WSL y 12SF para tipo II, y colombiana para tipo III), que previamente habían sido reconocidos por el 100 % de los pacientes crónicos ensayados. La técnica TESA-ELISA permitió el análisis de un mayor número de muestras y aumentó la especificidad al 96.4 %, además de presentar alta reactividad de IgGs de sueros de pacientes con Chagas independientemente de la fase en la que se encontrasen.

Las técnicas de detección serológica se pueden combinar incluso con otras técnicas más novedosas como es la técnica de ELISA en array [37], denominada Multi-cruzi, donde se ensayan un total de 12 antígenos (confirmados previamente como positivos por ELISA convencional) añadidos en placas de 96 pocillos usando el sistema “sciFLEXARRAYER printing System”, permitiendo convertir cada pocillo en una microplaca con los 12 antígenos probados. Cada uno de los

antígenos detectados por el test Multi-cruzi podría reflejar el nivel de parasitemia del paciente y servir para el seguimiento de la eliminación del parásito a lo largo de tiempo.

El avance en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas es un factor clave para poder realizar un correcto tratamiento de la enfermedad.

El uso de antígenos recombinantes para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas también ha sido ensayado con resultados muy favorables, aumentando la sensibilidad y la especificidad de esta técnica. Principalmente se trata del uso de proteínas específicas del parásito potencialmente susceptibles de ser un buen antígeno siendo sintetizados como antígenos recombinantes. Entre ellas se encuentran proteínas de superficie que el parásito usa para evadir la acción del sistema inmune del hospedador, como es el caso de la glicoproteína proteína gp160, específica de la superficie de los tripomastigotes, capaz de inhibir la activación del complemento y la lisis del parásito, sintetizada como proteína recombinante para ensayarla mediante ELISA [38].

Otro ejemplo de Elisa basadas en antígenos recombinantes es el uso de la proteína TSSA-II ensayada para el diagnóstico de Chagas en perros y humanos como herramientas en estudios epidemiológicos [39] u otros más conocidos como SAPA (Shed Acute Phase Antigen) usados en ELISA (SAPA-ELISA) comparándolo con un homogenado de parásitos (H-ELISA), obteniéndose una sensibilidad y especificidad del 100 % probados en sueros de perros infectados [40]. Recientemente, se tiende a una nueva estrategia en el diagnóstico serológico a fin de evitar resultados discrepantes debido a veces a la diversidad genética de *T. cruzi* pudiendo variar la respuesta a un mismo antígeno dependiendo de su DTU [41]. Esta estrategia se basaría en la combinación de más de un antígeno recombinante y la quimioluminiscencia denominándose como

## Introducción

“Architect Chagas”. Este nuevo test es un ensayo automatizado basado en el uso de cuatro proteínas recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF que en conjunto e hibridadas representan catorce regiones antigénicas recombinantes. Este test resultó tener un 100 % de sensibilidad aunque presentó falsos positivos debido a reacciones cruzadas con *Leishmania spp.*, pero dicha sensibilidad permitió disminuir el número de pruebas de diagnóstico a sólo uno permitiendo clasificar como negativos a los sueros sin necesidad de una segunda prueba, reduciéndose así el costo del diagnóstico de la enfermedad [42].

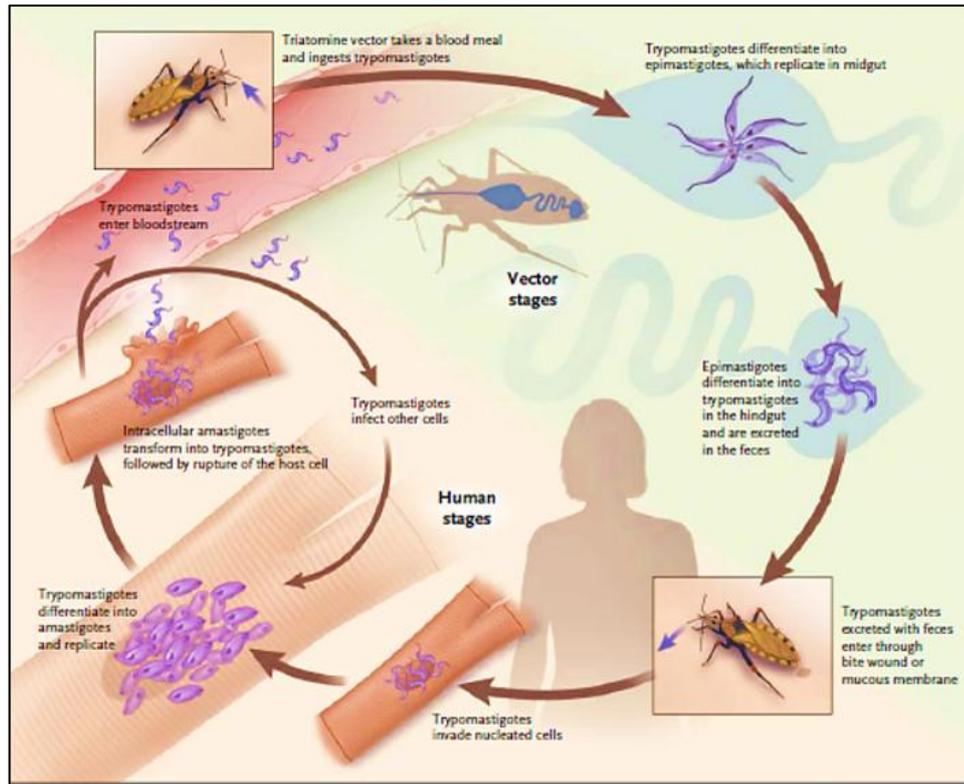
### 1.4 **TRYPANOSOMA CRUZI**

#### 1.4.1 **CICLO DE VIDA**

*T. cruzi* es un protozoo flagelado con un complejo ciclo de vida desarrollado en dos ambientes diferentes, uno el ambiente proporcionado por el insecto vector triatomino y otro el ambiente del hospedador mamífero. Durante el ciclo de vida se desarrollan los procesos de diferenciación que dan lugar a sus cuatro formas principales denominadas epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos desarrollados en el inserto vector y, amastigotes y tripomastigotes sanguíneos, desarrollados en el hospedador mamífero.

En la sangre periférica del hospedador mamífero se pueden encontrar dos formas tripomastigotas diferentes descritas como “slender” o “broad” presentándose, por tanto, una población pleomórfica de este estadio en la sangre de un mismo hospedador mamífero. Cuando la chinche se alimenta de la sangre de un mamífero infectado toma una muestra de esta población pleomórfica de tripomastigotes sanguíneos [43] que van a pasar al intestino medio del insecto vector. Aquí van a diferenciarse en epimastigotes que se multiplican por un proceso de división binaria, pasando por el tracto digestivo de la chinche donde un porcentaje de la población de epimastigotes se van a

transformar en tripomastigotes metacíclicos por un proceso denominado Metaciclogénesis, para posteriormente ser eliminados por las heces [43, 44]. Los tripomastigotes metacíclicos entran a través de la picadura provocada por la chinche invadiendo la membrana mucosa e infectando a múltiples tipos de células nucleadas.



**Figura 1.5.** Ciclo de vida de *T. cruzi* [26].

En el citoplasma de estas células, los tripomastigotes son envueltos por una vacuola parasitófora, formada por la membrana plasmática de la célula hospedadora y la de lisosomas que se fusionan y disminuyen el pH en su interior provocando la diferenciación a la forma intracelular denominada Amastigote. Este Amastigote se va a replicar por división binaria tras 12 h después de la infección hasta un periodo de 72 h [45]. Una vez divididos dentro de la vacuola parasitófora se van a diferenciar en tripomastigotes sanguíneos, los cuáles van a salir al exterior al romper la célula hospedadora, llegando de esta manera hasta

## Introducción

el torrente sanguíneo pudiendo así invadir de nuevo nuevas células e iniciar un nuevo ciclo de replicación. De esta forma, los tripomastigotes en sangre periférica estarán disponibles para el vector cuando se alimente del hospedador mamífero nuevamente, cerrándose así el ciclo.

### 1.4.2 **CARACTERÍSTICAS GENERALES**

*T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino Protista

Filo Sarcomastigophora

Clase Zoomastigophora

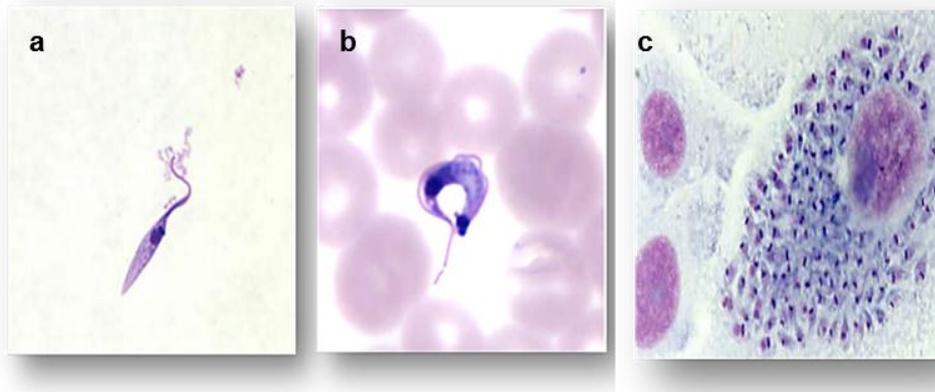
Orden Kinetoplastida

Familia Trypanosomatidae

Género Trypanosoma

Especie *Trypanosoma cruzi*

Una de las características definitoria de los miembros del Orden Kinetoplastida es la presencia de una estructura celular denominada kinetoplasto. Según la posición en la que se encuentre en el citoplasma del parásito, es fácilmente distinguible en cada una de las formas del parásito (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Imágenes de tinción de Giemsa de las tres formas principales de *T. cruzi* [46]. **a.** Epimastigote, **b.** Tripomastigote, **c.** Amastigotes.

**a. Epimastigote:** forma alargada de 10 a 35  $\mu\text{m}$  de longitud con el kinetoplasto ligeramente desplazado a un extremo del cuerpo del parásito y en la zona anterior al núcleo. El flagelo emerge desde la zona media del parásito formando una pequeña membrana ondulante por lo que tiene menor movilidad que los tripomastigotes. Se replican por división binaria al igual que los amastigotes.

**b. Tripomastigote:** se caracteriza por presentar el kinetoplasto en el extremo posterior del parásito alejado del núcleo centrado, con una longitud comprendida entre las 12 y 30  $\mu\text{m}$ , presentan un flagelo ondulado que sale del cuerpo basal y que se expande por toda la longitud del parásito emergiendo libre por el extremo anterior confiriéndole una gran movilidad. No tiene capacidad de replicación.

**c. Amastigote:** forma intracelular del parásito con un diámetro de entre 3 a 5  $\mu\text{m}$  con forma esférica y capacidad de replicación. Presenta el kinetoplasto cerca del núcleo y conservan el cuerpo basal y la base del flagelo.

Los criterios de diferenciación de las distintas formas no sólo se basan en la posición del kinetoplasto sino también en la zona donde emerge el flagelo desde la bolsa flagelar. Además de estas tres formas o

## Introducción

estadios, existen formas intermedias desarrolladas durante el proceso de diferenciación de un estadio a otro.

La forma esferomastigote es la transición que sufre el amastigote para diferenciarse a epimastigote, el cual se hace más esférico y el flagelo empieza a ser visible. El cuerpo celular y el flagelo de los esferomastigotes se alargan según aumenta la densidad celular dando lugar a la clásica forma de epimastigote [43]. Los esferomastigotes también se obtienen de tripomastigotes aislados de cultivos de tejido infectado tras ser incubados 18 h a 37 °C en medio libre de células [47].

Entre los tripomastigotes también existe una variación de forma dentro de su población pudiéndose distinguir entre tripomastigotes “slender” (alargados), “broad”(ancho), procediendo los tripomastigotes “slender” de tripomastigotes “broad” o viceversa [48].

Además de estas formas intermedias o del pleomorfismo de las poblaciones de tripomastigotes, *T. cruzi* sufre un proceso de diferenciación en el tracto digestivo del insecto vector denominado como Metaciclogénesis, donde el parásito se transforma desde epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos. Son muchos los factores que afectan a la Metaciclogénesis y al crecimiento del parásito como es el caso de la ausencia de carbohidratos en el medio, concretamente glucosa y fructosa, que provoca un incremento en el porcentaje de formas metacíclicas en el cultivo y una disminución del crecimiento de las formas epimastigotas de forma significativa [49]. La adición de NaCl al medio en ausencia de monosacáridos también incrementa la formación de formas metacíclicas [49-51].

Otros factores que pueden afectar al crecimiento de *T. cruzi* es la presencia o ausencia de ciertos aminoácidos, en este caso la ausencia de serina, arginina, glutamina y asparagina provocan bajas tasas de crecimiento en los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* [52].

### 1.4.3 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL

La organización ultra estructural de *T. cruzi* (Figura 1.7) ha sido estudiada de modo intensivo por multitud de técnicas de microscopía, como la microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y más recientemente microscopía por fuerza atómica [53-56]. Teniendo en cuenta la propia biología del parásito, el estudio de la estructura del mismo debe comenzar por su superficie, aquella que está en contacto con la célula hospedadora.

La superficie de *T. cruzi* está formada por una membrana plasmática típica constituida por una bicapa lipídica, la cual rodea al cuerpo celular y se adentra formando la bolsa flagelar rodeando el axonema del flagelo. Por debajo de la membrana plasmática se encuentra una extensa red de microtúbulos subpeliculares, ausentes en la región del bolsa flagelar, que se encuentran en contacto unos con otros, con la membrana plasmática y con el retículo endoplasmático respectivamente, a través de estructuras filamentosas [57].

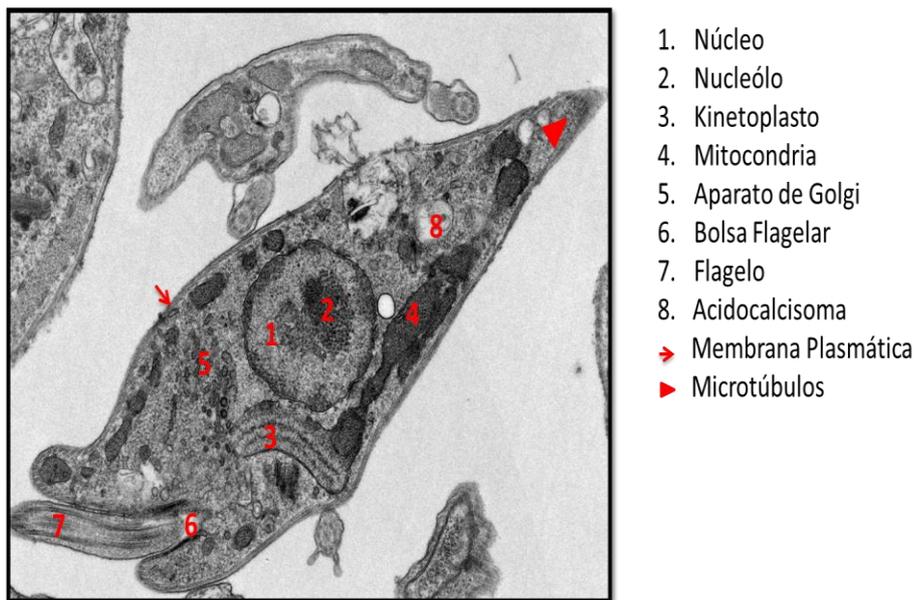
La membrana plasmática está compuesta por una cara extracelular, la cual está constituida principalmente por el Glicocálix. Éste está formado por un conjunto de glicoproteínas, glicolípidos y lipopéptidos expuestos hacia el medio extracelular y embebidos en él. Entre ellos se encuentran las mucinas, *trans*-sialidasas, las proteínas de superficie MASP y la familia de proteínas gp85 entre otras [55], además de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol) y en pequeña cantidad esfingomiélin, fosfatidilserina, cardiolipina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol fosfato y fosfatidilinositol bifosfato, muy importantes para la transducción de señales en *T. cruzi* [58].

Mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica (SEM) de alta resolución se identificó una estructura en la superficie de los

## Introducción

epimastigotes llamada Citostoma [59]. El citostoma corresponde a una invaginación de la membrana plasmática en la zona cercana a la bolsa flagelar donde los microtúbulos adyacentes penetran profundamente en la célula llegando hasta el núcleo. La función del Citostoma es la de captar macromoléculas del medio a través de un proceso de endocitosis típica constituyendo el 85 % de la vía endocítica del parásito [53].

La membrana plasmática de *T. cruzi* difiere entre las distintas formas del ciclo de vida del parásito, por ejemplo, en los tripomastigotes parece ser más rugosa que la de los epimastigotes, en parte pudiendo deberse a una mayor densidad de proteínas expuestas en su superficie, sin embargo, los epimastigotes tendrían mayor rugosidad en su membrana en el área que limita el citostoma que en la que cubre todo el cuerpo celular y el flagelo [55].



**Figura 1.7.** Micrografía electrónica de transmisión de la ultra estructura de un epimastigote de *T. cruzi* realizada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

Por otra parte, el parásito presente un citoplasma en el que aparecen diferentes orgánulos, algunos de ellos únicos de los kinetoplástidos, como se muestra en la Figura 1.7 y que se explican a continuación.

- 1. Núcleo:** Formado por una membrana porosa típica que envuelve al material genético del protozoo formado por cromatina condensada dispersa por el nucleoplasma. El tamaño del núcleo puede variar según el estadio del parásito [53].
- 2. Kinetoplasto:** Orgánulo típico del orden kinetoplastida formado por DNA mitocondrial extra nuclear condensado, también llamado k-DNA, dentro del área definida de la mitocondria y con forma de varilla cercano a la base del flagelo. El ADN-k representa alrededor del 30 % del DNA total de la célula y se organiza en maxi y minicírculos y su organización varía de acuerdo con el estado de desarrollo del protozoo [55]. El ADN del kinetoplasto está constituido por aproximadamente 5.000 a 20.000 minicírculos cuyo tamaño varía desde 0.5 a 2.5 kb dependiendo de la especie de kinetoplástidos y 50 copias de maxi círculos por red de entre 20 a 40 kb [58]. El ADN-k sintetiza para ARNs guías encargados de modificar los transcritos de los maxi círculos por un proceso de edición del RNA. Los maxi círculos son homólogos al ADN mitocondrial estructural y funcionalmente de los eucariotas superiores, codificando ARN ribosómicos y subunidades del complejo respiratorio [53].
- 3. La Bolsa flagelar** es una estructura formada por una depresión de la región anterior de la célula de donde emerge el flagelo. Está cercana al kinetoplasto y participa en las actividades endo y exocíticas del parásito[60].

- 4.** El **flagelo** emerge del bolsa flagelar y del cuerpo basal y está presente en todas las formas del ciclo de vida del parásito, incluido en los amastigotes donde es más corto. Está formado por 9 pares de microtúbulos dispuestos en círculo y en cuyo interior hay dos microtúbulos centrales inmersos en una matriz citoplasmática y rodeados por la membrana plasmática en toda su extensión formando una estructura denominada cuerpo paraflagelar (PFR). El PFR está constituido por una matriz de filamentos unidos al axonema y está formado por un gran número de proteínas, principalmente por PFR-1 y PFR-2 altamente antigénicas [53]. El flagelo emerge lateralmente y forma una membrana ondulante en la superficie del parásito.
- 5. Aparato de Golgi, retículo endoplasmático y cuerpos multivesiculares:** Son similares al de los mamíferos y están formados por un sistema de vesículas que brotan de las cisternas del aparato de Golgi y migran hacia la bolsa del flagelo junto con cisternas del retículo endoplasmático en contacto con el núcleo. Estos dos orgánulos componen la vía secretora de *T. cruzi* junto con los cuerpos multivesiculares (MVB). Estos forman parte de la vía endocítica de la célula para la degradación de las proteínas internalizadas desde la superficie celular o dirigidas desde la cara trans del aparato de Golgi, participando en la vía secretora liberando su contenido mediante fusión con la membrana plasmática [61].
- 6. Reservosoma:** Se trata de orgánulos con un importante papel en el ciclo de vida de *T. cruzi*. Las moléculas incorporadas por los endosomas son enviadas a unas estructuras especiales denominadas Reservosomas, localizados en la región posterior del parásito[62]. Estos orgánulos podrían intervenir en la regulación de la expresión génica eventualmente secuestrando o almacenando

ARN-m. Además de esto, también se han encontrado proteínas ribosomales en dichos reservosomas [63]. También estarían encargados de acumular macromoléculas para su degradación a través de enzimas hidrolasas lisosomales como la Cruzipaína, la principal proteasa sintetizada por *T. cruzi* [55]. Los reservosomas se encuentran en las formas epimastigotes y van consumiéndose durante el proceso de Metaciclologénesis.[64].

- 7. Glicosomas:** Son estructuras esféricas o alargadas rodeadas por una membrana homogénea. Su nombre se debe a la presencia en su interior de numerosas enzimas glicolíticas y por su semejanza con otros orgánulos encontrados en células de mamíferos. Se les consideran los peroxisomas de los tripanosomátidos debido a que en algunas especies también se han encontrado catalasas en su interior [58].
- 8. Acidocalcisoma:** Es un orgánulo vacuolar capaz de transportar protones y calcio. Contienen calcio, fósforo, sodio, potasio y zinc para su almacenamiento además de derivados del fósforo y participan en la homeostasis del pH y en la osmoregulación [65].
- 9. Vacuola contráctil:** Orgánulo que junto con el acidocalcisoma está implicado en la regulación de iones y osmolitos mediante la acumulación de agua en su interior (osmoregulación). En condiciones de estrés hipoósmotico la vacuola contráctil actúa mediante un mecanismo de regulación de disminución del volumen celular suponiendo hasta un 50 % de la regulación en la disminución del volumen. Este mecanismo está presente en amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes y suele completarse rápidamente, siendo esencial en todos los estadios [66].

#### 1.4.4 **INVASIÓN CELULAR POR *T. CRUZI***

##### 1.4.4.1 **MECANISMOS DE ENTRADA**

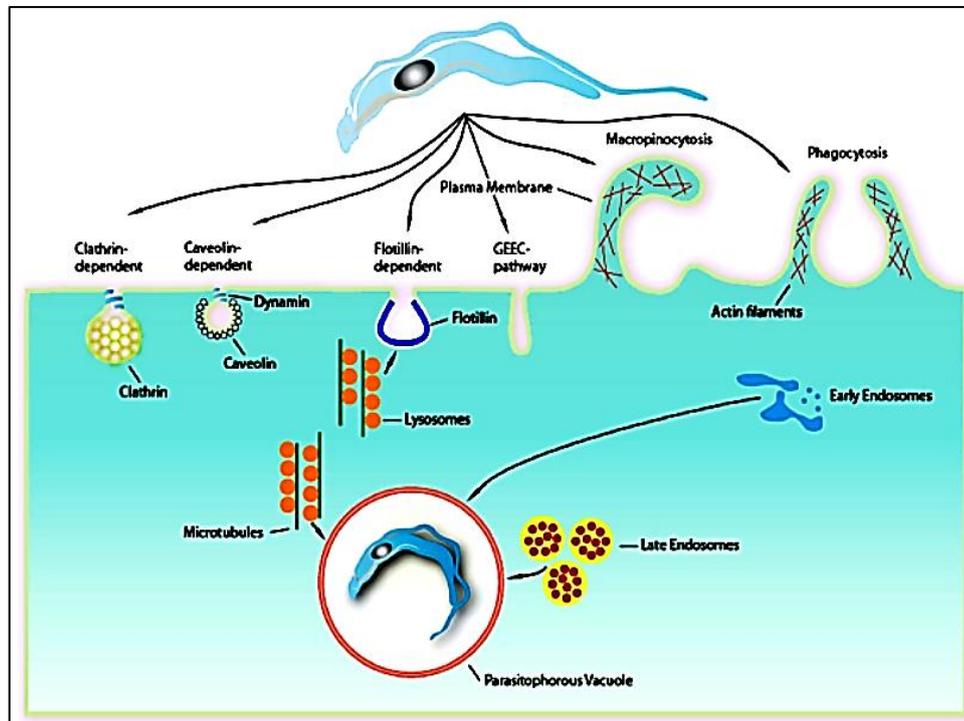
*T. cruzi* es capaz de invadir tanto células fagocíticas como no fagocíticas por un proceso de interiorización en el que participa tanto el parásito como la célula a invadir y cuyo mecanismo de entrada ha sido ampliamente estudiado [51, 67-73].

El proceso por el cual el parásito entra en la célula se divide en tres pasos: adhesión, reconocimiento y entrada. La adhesión del parásito a la célula y, como consecuencia de ello, el reconocimiento mutuo, se lleva a cabo mediante la participación de moléculas presentes tanto en la superficie del tripomastigote como en la de la célula hospedadora, en una asociación ligando-receptor, que provoca en ambos una serie de eventos que aumentan el  $Ca^{2+}$  intracelular por movimientos desde los depósitos intracelulares del retículo endoplasmático y de la mitocondria [51, 68, 74-76]. Esto provoca la disrupción dependiente de  $Ca^{2+}$  de los filamentos de actina del citoesqueleto de la célula, provocando el reclutamiento de los lisosomas en la cercanía del sitio de contacto del parásito, con su posterior fusión con la membrana plasmática.

Debido al alto número de proteínas implicadas en este proceso y de cascada de señales que intervienen, se ha demostrado que la célula hospedadora debe estar en la fase S del ciclo celular para que ocurra con éxito la invasión dado que es en ella donde va a expresarse en mayor nivel las moléculas necesarias para el reconocimiento y entrada del parásito así como un adecuado potencial de membrana [77].

Este mecanismo endocítico dependiente de lisosomas constituye el modelo clásico de entrada del parásito en la célula [67, 78, 79] más estudiado aunque además de este mecanismo existen otras formas por las que el parásito puede entrar en ella como serían la endocitosis

mediada por Clatrina, endocitosis dependiente de Caveolina, endocitosis mediada por motivos rafts de membrana y macropinocitosis [80] (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Diferentes mecanismos de Endocitosis involucrados en la entrada de *Trypanosoma cruzi* en células de mamíferos que conllevan a la formación de la vacuola parasitófora (VP)[80].

El proceso de entrada del parásito depende del tipo de célula que vaya a infectar, distinguiéndose entre células fagocíticas (macrófagos, células dendríticas, y otras células mieloides) y no fagocíticas. Las células fagocíticas recubren a *T. cruzi* formando una estructura similar a un embudo con proyecciones bilaterales de la membrana plasmática para así internalizarlo en el citoplasma, formándose una larga y gran protrusión que envuelve totalmente el cuerpo del parásito iniciándose el proceso de fagocitosis [80, 81]. La adhesión del tripomastigote con la célula fagocítica provoca en ella la activación de proteínas tirosina quinasa seguido del reclutamiento de la PI-3 quinasa culminando con la polimerización de los microfilamentos de actina y la extensión de los

pseudópodos. Los amastigotes también tienen la capacidad de provocar su fagocitosis y de infectar tanto a células fagocíticas como a células no fagocíticas, siendo esto diferente dependiendo de la cepa de *T. cruzi* a la que pertenezca [71, 82, 83], llevando a pensar que este parásito es capaz de infectar células por otras vías independientes de la fagocitosis. Estas vías de endocitosis alternativas son las siguientes:

**1. Rafts de membrana: Endocitosis dependiente de Caveolina o Flotilina:** La caveola es una estructura endocítica dinámica formada por invaginación de la membrana plasmática con forma de matraz u omega con un diámetro de 50-100 nm, presentes de forma abundante en la membrana plasmática de muchas células [84]. Se encuentra constituida principalmente por la proteína Caveolina-1 así como de dominios de membrana ricos en colesterol, glicoesfingolípidos y proteínas unidas a lípidos de membrana [85], confiriéndole esto además de su función en los procesos de endocitosis funciones en la señalización celular, regulación del metabolismo lipídico y en la percepción de la tensión de la superficie celular [86].

Por otra parte, los dominios rafts son microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en moléculas de colesterol y esfingolípidos al que se le asocian numerosas proteínas principalmente proteínas de unión a GPI, proteínas trans-membrana y proteínas tirosinas quinasas entre otras [87], y se encuentran presentes en estado de fase lipídica ordenada de la membrana celular. Las principales proteínas asociadas a los rafts de membrana son la Flotilina-1 y Flotilina-2 con cierta homología con la proteína caveolina, de ahí la asociación de ésta con el ordenamiento lipídico anteriormente mencionado. Los dominios formados por las caveolas difieren de los dominios rafts porque los primeros son esféricos y los segundos tienen forma aplanada, pero ambos comparten su composición lipídica y su participación en los procesos de endocitosis [88].

La participación en la entrada de *T. cruzi* a través de estos dominios rafts de membrana ha sido demostrada mediante el tratamiento de las células Vero, Hela o macrófagos murinos con metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), un heptasacárido cíclico que se une al colesterol y lo elimina de las membranas, cuya acción provoca una inhibición de la internalización del parásito del 80 % [89]. El tratamiento de las células con toxina colérica (subunidad  $\beta$ ), la cual se une a GM1 (Gangliósido GM1, principal marcador de los dominios rafts), también reduce el porcentaje de infección de las células [89].

Además, se ha demostrado que la depleción de colesterol en cardiomiocitos también reduce la entrada por *T. cruzi* en un 50 % debido a que cambia la distribución de los lisosomas en la célula concentrándose más en el núcleo cuando se tratan con M $\beta$ CD y, por tanto, se reduce la movilización de los lisosomas hacia la superficie celular inhibiéndose la fusión de los lisosomas con la membrana y, por consiguiente, la formación de la vacuola parasitófora [90].

**2. Endocitosis mediada por Clatrina (EMC):** las vesículas recubiertas por Clatrina se forman durante la endocitosis mediada por receptor y durante la biogénesis de la red del aparato de Golgi debido a su fusión con los endosomas tempranos, donde la carga que transporta se clasifica para su degradación o para reciclar la membrana plasmática [80]. Existe una gran diversidad de proteínas y de adaptadores implicados en la formación de la vesícula recubierta por Clatrina, alguno de ellos se conocen muy bien como son el receptor de tirosina quinasa, GPCRs, receptor de Transferrina, receptores LDL o toxina antrácica [91]. La participación de estas vesículas cubiertas de Clatrina en la invasión de las células mamíferas por *T. cruzi* se descubrió tras realizar estudios sobre la implicación del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLr) en dicho proceso mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia e inmunoblot mediante el análisis de la diferencia

## Introducción

en el porcentaje de invasión de células sin LDLr frente a las que lo conservaban [92]. Por lo tanto, esto hace pensar que el parásito también puede usar la endocitosis mediada por Clatrina como vía de entrada en la célula como se ha demostrado en otros patógenos como el virus Influenza A y *Listeria* [93].

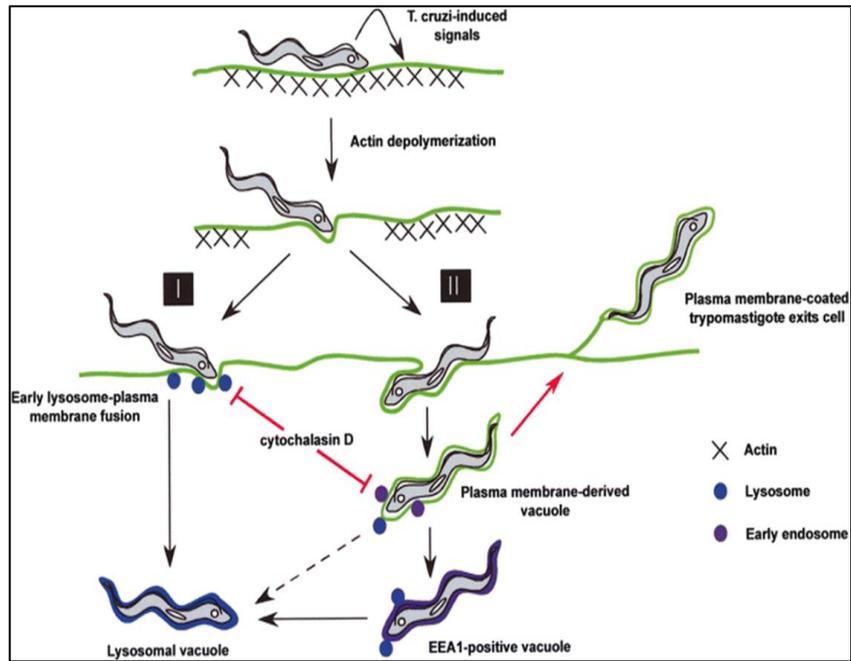
**3. Macropinocitosis:** El proceso de macropinocitosis se caracteriza por ser una forma de endocitosis regulada de moléculas no seleccionadas como moléculas solubles, nutrientes, antígenos y algunos patógenos como los virus. Para ello la membrana plasmática de la célula tiene que evaginarse formando una larga protusión hacia el exterior celular que envuelva a la molécula a fagocitar. Al igual que en la endocitosis mediada por caveolina, clatrina o rafts de membrana, en los procesos de macropinocitosis intervienen los receptores tirosina quinasa, de modo que su activación conlleva un cambio en la dinámica de los filamentos de actina permitiendo la formación de dicha evaginación en la zona donde se encuentran dichos receptores.

Las proteínas Ras GTPasas juegan un papel importante en la activación del proceso [94]. Como marcador de los procesos de macropinocitosis se ha usado Rabanquirina 5, un efector de la proteína Rab 5, que a diferencia de otros procesos de endocitosis participa en las vía de señalización tras la activación de los receptores de tirosina quinasa junto con otras moléculas que se describen en el apartado de señalización durante la invasión [94].

Como se ha nombrado anteriormente, *T. cruzi* es capaz de invadir tanto células fagocíticas como no fagocíticas demostrado mediante el tratamiento de las células con Amilorida (inhibidor de los cambios de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) y con Rotelina (inhibidor de proteínas quinasa C) que hace que se inhiba de forma intensa la internalización del parásito en la célula [81, 95]. El reclutamiento de proteínas fosforiladas, actina y

Rabanquirina 5 en el sitio de entrada y las características morfológicas dadas en dicho sitio soportan el proceso de macropinocitosis como otro proceso usado por *T. cruzi* para entrar en las células hospedadoras [81].

Tras el proceso de adhesión y reconocimiento del parásito por la célula hospedadora no fagocítica, la internalización del mismo se va a producir por la fusión de lisosomas que se movilizan hasta el punto de contacto mediante un proceso de despolimerización de los filamentos de actina, formándose una vacuola parasitófora de origen lisosomal donde queda contenido el tripomastigote [78]. La entrada dependiente de lisosomas requiere de la exocitosis de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y de la activación en la célula de PI3-quinasa (PI3K) [96], así como la asociación a los lisosomas de la proteína de membrana Lamp-1. Pero además de esta vía de entrada, existe otra vía independiente de lisosomas descubierta por *Woolsey et al.* [96], en la que interviene la vía endosomal de la célula por la fusión con la membrana plasmática de endosomas tempranos (EE), tras ser marcados por la proteína marcadora EEA1 después de 10 minutos de la infección [70] (Figura 1.9). El porcentaje de entrada de parásitos por una vía u otra es de un 50 % para la vía dependiente de lisosomas y un 20 % para la vía endolisosomal.



**Figura 1.9.** Modelos de invasión de *T. cruzi* en células no fagocíticas. I. Vía dependiente de lisosomas. II. Vía independiente de lisosomas [70].

El tratamiento de las células con Citocalasina D provoca que se inactive el mecanismo por el cual los filamentos de actina se van a despolimerizar y repolimerizar en el momento de entrada del parásito impidiendo la entrada de *T. cruzi* a través de la vía endolisosomal, favoreciendo la entrada por la vía independiente de lisosomas (vía I) [70, 97].

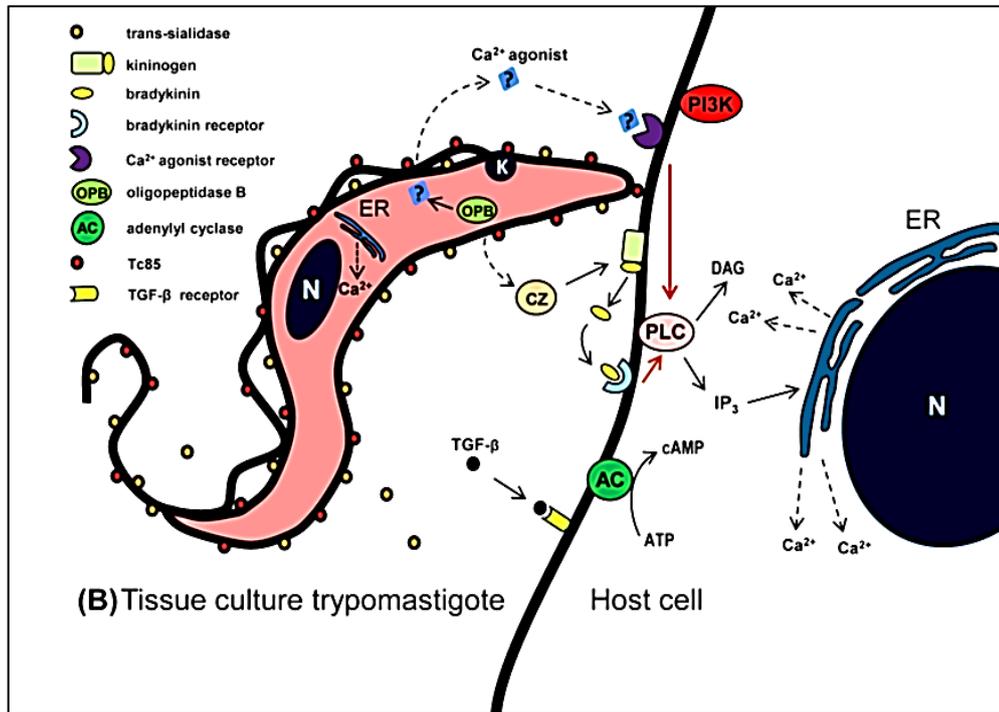
#### 1.4.4.2 **PROTEÍNAS IMPLICADAS DURANTE LA INVASIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN**

Existe un número alto de proteínas de superficie expresadas por *T. cruzi* durante el proceso de entrada en de la célula hospedadora principalmente glicoproteínas como son las *trans*-sialidasas (TS)(TS/SAPA,TC85, gp82,gp90, CRP), mucin-associated surface proteins (MASP), Cruzipaína, gp63, mucinas y proteínas ricas en serina, alanina y prolina (SAP) con un dominio de anclaje a la membrana plasmática GPI capaces de producir en la célula, mediante unión al

correspondiente receptor, una cascada de señales que conllevan a la infección de la misma [98]. Además, dicho proceso de reconocimiento y activación de señales difiere entre tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes derivado de cultivo celular. A continuación, se describen ambos casos:

### **I. Señalización inducida por TCT (Tripomastigote derivado de cultivo).**

La Cruzipaína (CZ), también denominada GP57/51 de *T. cruzi* es una glicoproteína con actividad cisteín-proteasa, aislada primeramente por Cazzulo et al (1990) [99] de la cepa Tulauen, con un sitio activo para cisteína en la posición 25 y otro para serina en la posición 24 descubierta en la cepa Y, cuya actividad abarca un amplio rango de pH (5-7.5)[100]. Está presente en todas las formas del parásito y en diferentes cepas y participa activamente en la internalización del tripomastigote y en su desarrollo intracelular [101]. Diversos estudios sobre la infección por *T. cruzi* en cardiomiocitos, células endoteliales de vasos de cordón umbilical humano o células que sobre expresan el receptor de Bradiquidina B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub> R) han demostrado que la Cruzipaína actúa uniéndose al cininógeno celular que se rompe generando moléculas de cinina de corto tiempo de vida, reconocidos por los receptores Bradiquidina B<sub>2</sub> presente en la superficie de la célula y provocando en la ella un influjo de Ca<sup>2+</sup> mediado por IP<sub>3</sub> [102, 103](Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Representación esquemática de algunas de las moléculas y vías de señalización que se activan durante la invasión por tripomastigotes derivados de cultivo celular de *T. cruzi* en células de mamífero no fagocíticas [104].

Las *Trans*-sialidasas (TS) presentes en la membrana celular de los tripomastigotes a través de dominios de anclaje GPI, son enzimas que transfieren  $\alpha$ -2,3-ácido siálico desde los glicoconjugados de la célula hospedadora uniéndolos a residuos  $\beta$ -galactosa de las mucinas del parásito, facilitando la invasión por sialización de un epítipo específico de los TCT, Ssp-3, el cual es reconocido por la célula diana [105]. El miembro más conocido dentro de la familia de las *trans*-sialidasas, con 1.430 genes que codifican proteínas de esta familia en *T. cruzi* y un peso molecular comprendido entre 60 y 200 kDa, es Tc85, una glicoproteína con capacidad de unión a laminina y un dominio FLY (VTVXNVFLYNR) conservado entre todos sus miembros. Este dominio FLY se une al receptor Citoqueratina 18 (CK18) presente en las células epiteliales LLC-MK<sub>2</sub>. Dicha unión provoca la desfosforilación y reorganización de

CK18 activando la vía de señalización ERK1/2 que permite un incremento de la internalización del TCT en dichas células [106].

La señalización de las TS a través de las células mamíferas incluyen la activación de la vía PI<sub>3</sub>K/Akt, proteína quisana activada por mitogeno (MAPK) o la vía extracelular regulada por quinasa (ERK), por unión al factor de crecimiento tumoral TrkA, un receptor de tirosina quinasa, que se autofosforila tras la unión con TS y activa la vía de señales PI<sub>3</sub>K/Akt dependiente de TrkA; lo que provoca la supervivencia de las células neuronales [107, 108]. Como se menciona anteriormente, los TCT también tienen la capacidad de adherirse a laminina, concretamente a laminina-1, junto con otros componentes de la matriz extracelular como la fibronectina [109], heparan sulfato [110] y Galectina-3 [111].

La adhesión a estos componentes de la matriz extracelular tiene lugar durante la circulación de los tripomastigotes por el torrente sanguíneo donde se adhieren a estos elementos presentes en el entorno conectivo extracelular, además de encontrarse en las uniones musculares y neuromusculares donde el parásito produce mayores lesiones, siendo esta unión muy importante durante esta etapa de la infección [112]. Como consecuencia de esto, las proteínas Rod paraflagelares y la  $\alpha$ -tubulina del tripomastigote se desfosforilan probablemente mediante la vía ERK1/2 de señalización, como ha sido demostrado recientemente [113].

Además de esto, las *trans*-sialidasas presentan un dominio en el extremo C-terminal constituido por 12 repeticiones en tándem formadas por una secuencia consenso (DSSAHGTPSTPV), denominada como SAPA (Shed Acute Phase antigen), anteriormente mencionada por su capacidad antigénica [114], jugando un papel muy importante en la entrada de los parásitos en las células mamíferas.

## Introducción

Por otro lado, en el citoplasma del TCT también se secreta un factor de estructura desconocida capaz de disparar la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula hospedadora mediado por IP-3 [115]; dicho factor es la consecuencia de la actividad de otra enzima citosólica del TCT, la Oligopeptidasa B (OPB), una serín hidrolasa perteneciente a la familia de las propil oligopeptidasas, que actúa en la maduración de péptidos biológicamente activos. La OPB activaría a un agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  que sería exportado y reconocido por un receptor de la célula diana, seguido de la activación de la Fosfolipasa C (PLC) y producción de  $\text{IP}_3$ , liberándose al citoplasma  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos del retículo endoplasmático. Esto se demostró mediante el uso de anticuerpos específicos frente a OPB y tripomastigotes deficientes de *opb*  $-/-$  [116, 117].

Otra molécula encontrada en la superficie de los TCT es la proteína TSSA (tripomastigote small surface antigen), una proteína “mucin-like” polimórfica, estudiada en un principio en las cepas CL Brener y Sylvio donde se observó que sólo en el caso de aquella que era expresada por la cepa CL Brener se producía la infección celular de manera dosis dependiente [118]. Su unión con la célula diana dispara la vía de señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  y que como consecuencia de ello, promueve todos aquellos eventos en dicha célula que permite la invasión por parte del parásito de forma exitosa.

La intervención del factor  $\text{TGF-}\beta$  en la señalización celular también ha sido probada. En células sensibles a  $\text{TGF-}\beta$ , células epiteliales sin el receptor para  $\text{TGF-}\beta$  I y II así como en células donde las vías de señalización están desactivadas debido a una sobre expresión de la quinasa dependiente de ciclina (cdK4) o por el oncogen *H-Ras* enfrentadas con TCT, se produce una mayor predisposición de las mismas a ser invadidas, sugiriendo esto que TCT de alguna manera transforma al factor  $\text{TGF-}\beta$  favoreciéndose la infección [119].

## II. Señalización inducida por TM.

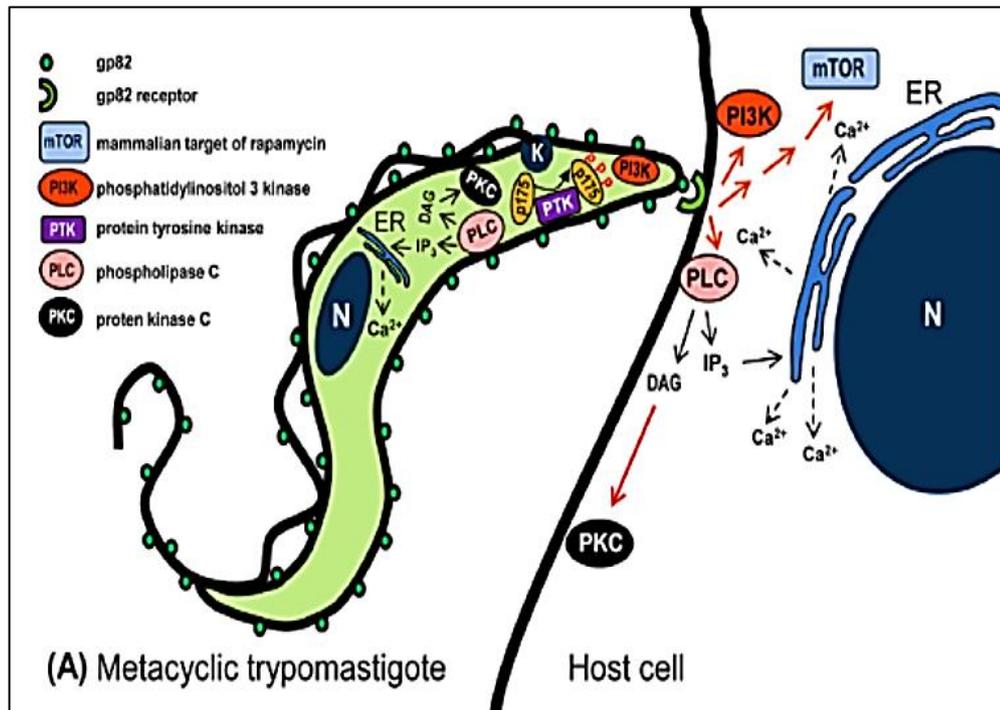
En el caso de los tripomastigotes metacíclicos (TM) las proteínas implicadas en la adhesión y subsecuente señalización en la célula hospedadora difieren a las encontradas en los TCT. Se trata de cuatro miembros de la superfamilia de proteínas gp85/*trans*-sialidasa, denominadas gp90, gp82, gp30 y gp35/50 expresadas en diferentes cepas siendo el éxito de invasión de la célula diana dependiente del tipo de proteína expresada en la superficie del TM [76].

Gp82 es la principal glicoproteína expresada en alto grado en las formas infectivas de la cepa CL Brener de *T. cruzi* y fue detectada en la superficie celular mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales Mab3F6 obtenidos tras la inmunización de ratones con formas metacíclicas intactas e inactivadas con calor [120]. Su secuencia génica fue descubierta en 1994 [121], caracterizada por presentar dos motivos altamente conservados denominados Asp (SxDxGxTW) y un motivo subterminal (VTVxNVFLYNR) característico de la superfamilia de proteínas *Trans*-sialidasas (TS). Además esta glicoproteína se encuentra altamente conservada en distintas cepas de *T. cruzi* procedentes de grupos genéticos divergentes, suponiendo un 90 % de identidad de la secuencia peptídica de todas ellas [122]. Todos los miembros de la superfamilia de proteínas TS presentan una secuencia altamente hidrofóbica en el extremo N-terminal (MSRRVF/TSVLLLLF/LV), correspondiente al péptido señal de la proteína encargado de dirigirla hacia el retículo endoplasmático. El análisis de estas secuencias en diferentes variantes de gp82 sugieren una expresión simultánea de diferentes moléculas en un mismo tripomastigote metacíclico conociendo su localización celular a través de dicho péptido señal [123].

En los TM, esta proteína está anclada a la membrana del parásito por su dominio GPI a lo largo de toda su superficie con lo que al producirse el contacto del parásito con los receptores de la célula

## Introducción

hospedadora se dispara la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en ambas direcciones a través de una cascada de señales que involucra la activación de Fosfolipasa C (PLC), la generación de Diacilglicerol (DAG) e Inositol-3,4,5-3P ( $\text{IP}_3$ ), que desencadenan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios de la célula y la estimulación de proteína quinasa C (PKC) como se muestra en la Figura 1.11[76].



**Figura 1.11.** Representación esquemática de la invasión mediada por tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* y las vías de señalización activadas por gp82 en una célula de mamífero no fagocítica (95).

Homólogo a la acción de gp82, otras dos proteínas quinasas (PK) activan la misma vía, como son la diana de la Rapamicina en mamíferos, mTOR, una serin/treonina quinasa conservada, y la quinasa lipídica Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), cuyo producto de la actividad de ambas es el fosfatidilinositol-3, 4, 5-3P encargado de iniciar la movilidad celular. La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por gp82 provoca la disrupción del citoesqueleto dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la movilización de lisosomas que culmina en exocitosis.

Además, se ha comprobado la participación de esta proteína en la infección por *T. cruzi* por vía oral mediante estudios *in vivo* en modelo de ratones, donde los tripomastigotes metacíclicos procedentes del insecto vector invaden el epitelio mucoso gástrico donde los parásitos se replican como amastigotes [124]. Por tanto, gp82 es crucial para el establecimiento de la infección por vía oral debido a su capacidad de unión con la mucina gástrica y de resistir la destrucción por acción de la pepsina, junto con la presencia de otras glicoproteínas como gp35/50, resistentes a proteasas, y que tras la actuación de la pepsina son capaces de conservar el dominio con afinidad por células de la mucosa gástrica [76].

Las mucinas gp35/50 se encuentran en la superficie de los TM pertenecientes a la cepas G y Tulauen de *T. cruzi*, pero a diferencia de gp82 la cascada de señales que generan en la célula hospedadora es insuficiente y, por ello, la capacidad de invasión de los TM está disminuida [76]. Las mucinas gp35/50 modulan la invasión mediante AMPc y los acidocalcisomas como la principal fuente de  $Ca^{2+}$  requerido para la internalización.

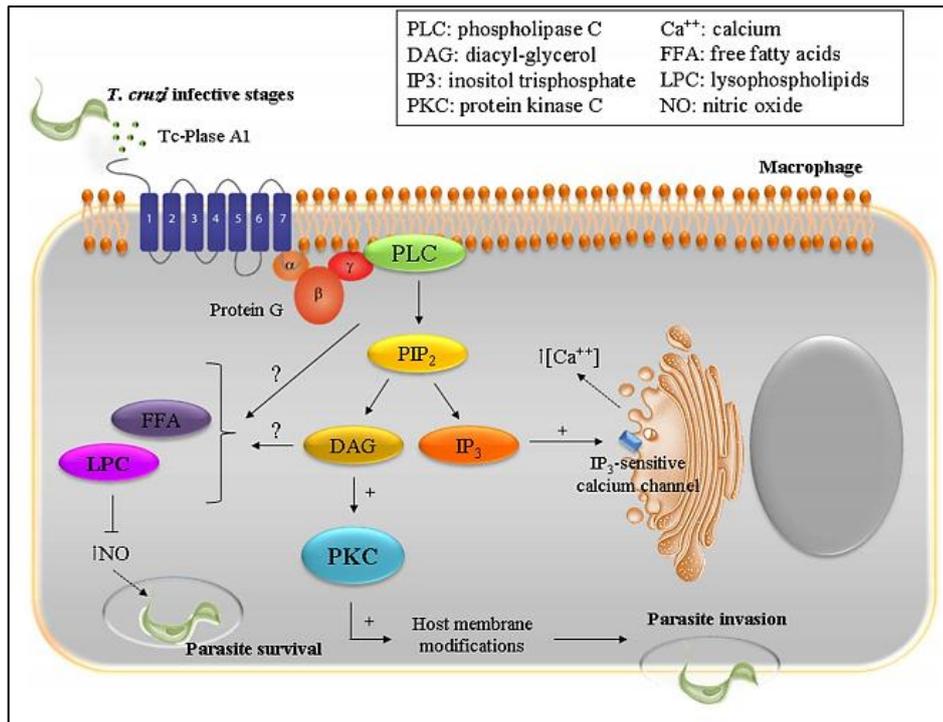
Por último, otra proteína encontrada en TM de *T. cruzi* es gp90, que actúa de manera inversa a gp82 y gp35/50, tratándose de un regulador negativo de la invasión ya que al unirse de manera receptor dependiente con la célula diana no dispara la señal mediada por  $Ca^{2+}$ , por lo que no se produce la movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular y la subsecuente facilitación de la invasión de la célula [104].

#### 1.4.4.3 **PROTEÍNAS SECRETADAS DURANTE LA INVASIÓN**

Además de las proteínas que forman parte de la superficie celular del parásito y que intervienen de forma activa en el proceso de invasión, son numerosas las proteínas que el parásito secreta al medio extracelular en el momento de la invasión. Dichas moléculas forman parte del secretoma de *T. cruzi* y se caracterizan por tener una región N-terminal correspondiente al péptido señal que los dirige hacia la vía clásica de secreción RE/Aparato de Golgi [98].

Muchas de estas proteínas han sido recientemente descubiertas como la Fosfolipasa A1, P21, MASP52 y TcSMP [125-128], las cuáles describimos a continuación.

La Fosfolipasa A1 de *T. cruzi* (TC-PLA1) pertenece al grupo de enzimas lipolíticas cuya función es la de hidrolizar fosfolípidos, jugando un papel muy importante en procesos biológicos como la generación de señalización lipídica relevantes para muchas el desarrollo de muchas enfermedades parasitarias como se ha demostrado en otros protozoos parásitos como *T. brucei* [129]. La Fosfolipasa A1 de *T. cruzi* es liberada al espacio extracelular, y presenta capacidad de unión a la membrana en amastigotes y TCT hasta tal punto de estar relacionadas con la respuesta inflamatoria que se da en los tejidos de los pacientes chagásicos por haber sido encontrada alrededor de los nidos de amastigotes. Mediante la generación de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos por autólisis, TC-PLA1 promueve sus efectos tóxicos sobre las células, pudiendo estar implicados en la patogenicidad por *T. cruzi* como demostraron Belaunzarán et al (2013) mediante el estudio de esta enzima en cepas letales y no letales y mediante la neutralización de la misma con anticuerpos que modulaban la invasión celular [125].



**Figura 1.12.** Actuación de la enzima PLA1 de *T. cruzi* secretada durante la invasión de la células hospedadora mamífera no fagocítica y la cascada de señales activada en la misma [98].

A nivel molecular, este cambio en la composición lipídica de la célula genera una respuesta en la misma mediante la generación de mensajeros lipídicos secundarios (DAG, FFA y PLC) que activan a PKC, con los siguientes eventos anteriormente mencionados que finalizan en la correcta ejecución de la infección de la célula, como se observa en la Figura 1.12.

Otra proteína también presente en los amastigotes de *T. cruzi* es P21. Dicha proteína tiene 21 kDa de peso molecular y fue clonada y caracterizada como proteína recombinante mediante el estudio de proteínas hipotéticas con alta probabilidad de ser secretadas y/o ancladas a la membrana en la base de datos del genoma del parásito [130]. Dicha proteína recombinante tiene la capacidad de adherirse a las células y promover la invasión por los amastigotes extracelulares. El hecho de que los amastigotes extracelulares que circulan por el torrente

## Introducción

sanguíneo durante la fase aguda y crónica sean capaces de invadir nuevos tejidos podría suponer una alternativa a la respuesta citotóxica del hospedador que produce la ruptura de las células infectadas permitiéndose la liberación de estos amastigotes totalmente viables. Los amastigotes tienen preferencia de entrada por la zona dorsal de las células a través de las microvellosidades de la superficie [82]. Estos estudios preliminares sirvieron para subsecuentes estudios en la invasión de macrófagos por parte del parásito, concluyéndose que esta proteína es capaz de regular de forma positiva la fagocitosis por macrófagos y alterar la señalización en la célula hospedadora. Concretamente, P21 se une al receptor de la citoquina CXCR4 y activa la polimerización de actina por un proceso dependiente de la vía de señalización activada por la fosfatidilinositol 3, 4, 5-quinasa [131]. Recientemente, P21 ha sido ensayada como nueva terapia de la cardiomiopatía provocada por la enfermedad de Chagas [132].

La comprensión de como el parásito es capaz de entrar en una célula evitando todos los mecanismos protectores de la misma, así como del hospedador, conduce hacia la concreción de nuevos estudios que avancen en dicha dirección. De esta manera, recientemente se ha descubierto una nueva familia de proteínas de superficie del parásito denominada TcSMP, la cual está altamente conservada entre los diferentes linajes de *T. cruzi* (9 secuencias en CL Brener, 3 en Sylvio X10/4, 2 en Dm28c y 5 en Marenkellei) así como genes ortólogos en otros tripanosomátidos. Se caracterizan por poseer una región N-terminal correspondiente al péptido señal de 25 aminoácidos de secuencia tras el primer codón de inicio que se repiten a lo largo de la misma y se encuentran en el mismo marco de lectura, característica que poseen otros genes de proteínas de superficie de *T. cruzi* como gp82 y gp90 [128]. Aunque se expresa en todas las formas del ciclo de vida de *T. cruzi*, su expresión se ve aumentada en epimastigotes, TM y TCT,

siendo menor en amastigotes, lo que la involucra en los procesos de invasión de la célula por parte del parásito, además de por estar presente en la superficie de las formas infectivas. Mediante la técnica de inmunofluorescencia usando una proteína recombinante TcSMP y un marcador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , se demostró la capacidad de dicha proteína de activar la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  y su intervención en la invasión de la célula diana por *T. cruzi* mediante la incubación de TcSMP recombinante con células Hela. No obstante esta activación fue moderada y como consecuencia, la movilización de lisosomas [128].

Esta familia de proteínas no se secreta al medio extracelular de forma libre, sino que parece ser que lo hace a través de vesículas extracelulares y no sería la única familia de proteínas liberadas de esta manera, como se desarrollará más adelante en los siguientes apartados [128].

Por último, otra familia de proteínas de superficie del parásito involucrada en los procesos de invasión es la familia de proteínas MASP. Las MASPs fueron descubiertas tras la secuenciación del genoma de *T. cruzi* y ocupa gran parte de la investigación en la presente tesis [127, 133].

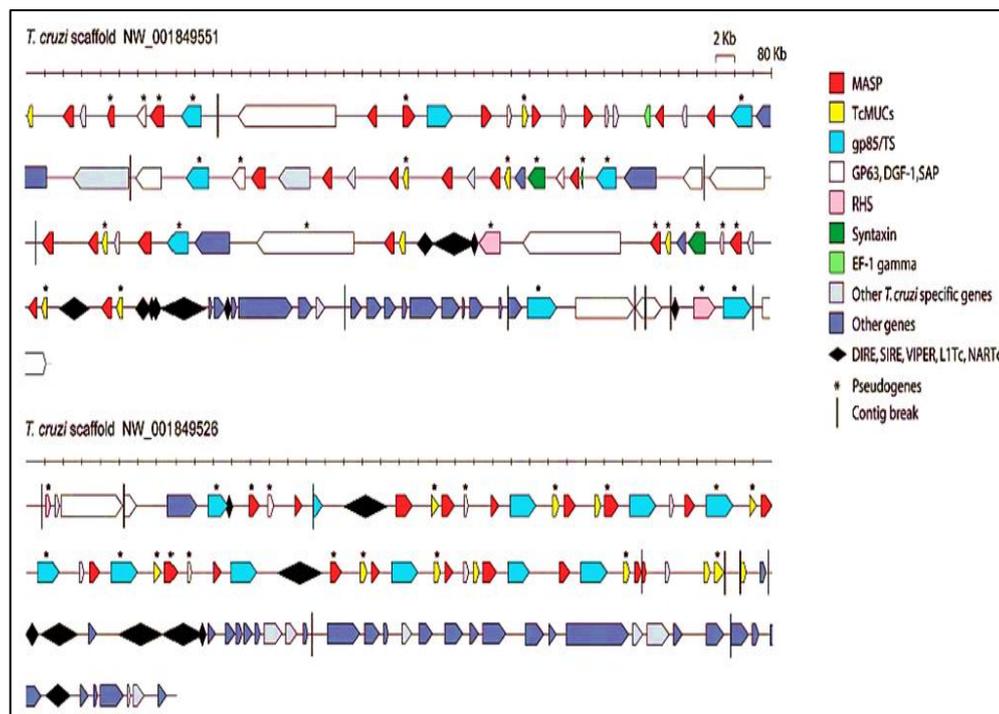
#### 1.4.5 MUCIN-ASSOCIATED SURFACE PROTEIN (MASP)

La superfamilia multigénica de proteínas de superficie MASP de *T. cruzi* fue descubierta tras la secuenciación completa del genoma del parásito junto con el de otros dos tripanosomátidos, *T. brucei* y *L. major*, en un proyecto conjunto denominado “Trityps” [134]. La cepa que se usó para dicha secuenciación fue CL-Brener, con un tamaño de genoma diploide total de 100 Mb, un total de 22.570 genes que codifican proteínas y 3.603 pseudogenes (16 % genoma). El genoma está constituido por ~50 % de secuencias repetidas, como retrotransposones y familias de superficie con una gran número de

## Introducción

genes como son las *trans*-sialidasas, mucinas, DGF-1, gp63s y la familia de proteínas MASP, específicas junto con las mucinas de *T. cruzi* sin presencia de genes ortólogos en los otros dos tripanosomátidos y que representan ~18 % de genes codificantes del genoma completo [134].

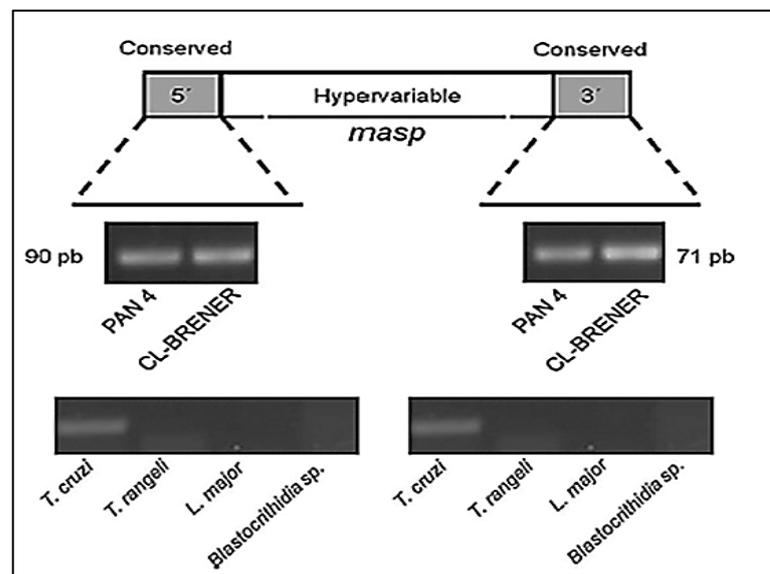
La familia multigénica *masp* presenta un total de 1.377 genes y 433 pseudogenes en la cepa Cl-Brener, organizados dentro de regiones específicas del genoma de *T. cruzi* que se encuentran fuera de la sintenia del genoma de los tres tripanosomátidos, formando clúster con otros genes de proteínas de superficie (TCMUCII, GP85/*trans*-sialidasas, gp63,SAPA Y DGF-1); y que se localizan “downstream” de las mucinas TCMUCII [135]. Entre este conjunto de genes de familias de proteínas de superficie del parásito, se intercalan elementos retrotransponibles como L1TC, NARTc, DIRE, VIPER, SIRE y RHS [134, 135](Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Organización genómica de la familia de genes *masp* [135].

Las regiones no transcritas de los genes *masp* o UTRs (Untranslated Regions) son regiones altamente conservadas, pudiendo ser sitios para la recombinación, encontrándose otro de los motivos dentro de la región hipervariable, sin que exista un lugar con una identidad de secuencia mínima para esta región [136].

A pesar de que la secuenciación del genoma de *T. cruzi* se realizó con la cepa CL Brener, se ha estudiado a nivel de la familia de genes *masp* la conservación de dichos genes y de su expresión en otra cepa de diferente linaje como es PAN4 clasificada como linaje TcIa,d, concretamente mediante el análisis de la expresión de los extremos 5' y 3' conservados [137]. Mediante el uso de cebadores que extienden de forma específica dichos extremos conservados, para ambas cepas se obtuvieron dos bandas de 90 pb (5') y 71 pb (3') demostrando que ambas regiones son iguales en longitud para las dos cepas ( Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Análisis de los extremos 5' y 3' conservados de los genes *masp*. Gel de Agarosa (2 %) con los productos amplificados de ambas regiones obtenidos de los ADNg de las cepas PAN4 Y CL Brener de *T. cruzi*, junto con otros kinetoplastidos analizados como control [137].

## Introducción

El análisis de la expresión de los genes *masps* mediante RT-qPCR de la región que codifica para el péptido señal (5') en ambas cepas, reveló que la expresión varía dentro de cada cepa y entre ellas, siendo en la cepa PAN4 la forma TCT la que mayor expresión del péptido señal presenta con respecto a las otras formas, y en la cepa CL Brener las formas amastigotes, mostrando un alto incremento en la expresión desde la forma TCT hasta alcanzar la máxima en la forma intracelular. En la cepa PAN4 la expresión es más estable, aunque la mayor expresión corresponden a la forma T [137].

Recientemente, esta diferencia de expresión de los genes *masp* entre cepas se ha ampliado hasta niveles de heterogeneidad transcripcional y fenotípica entre poblaciones clonales de *T. cruzi* [133]. El análisis de la expresión de una librería de 15 genes *masp* expresados por tres cepas diferentes de *T. cruzi* (CL Brener, PAN4 y Maracay) concluyó con la existencia de 10 miembros MASPs filogenéticamente cercanos incluidas las secuencias correspondientes a (pseudo)genes no teniéndose porqué expresar como proteínas o bien haciéndolo como proteínas truncadas. Al igual que el estudio de la expresión de los genes *masp* mediante el uso de cebadores para el extremo 5'-*masp* reveló que ambos son similares en las dos cepas de linajes filogenéticamente separados, este estudio se amplió a otra cepas como Dmc28, Sylvio X10/1 y Marenkellei mediante una librería de genes *masps* que engloba toda la región codificante, encontrándose ortólogos semejantes entre ellas, y correlacionándose la secuencia y la expresión de estos genes con el origen filogenético de las cepas. Este estudio de la heterogeneidad clonal de la expresión de la familia MASP reveló dicha heterogeneidad tanto en los niveles de expresión como en el número de transcriptos en los distintos clones analizados, aumentando esto aún más la capacidad y el potencial de esta familia en su variabilidad [133].

De los 1.377 genes *masp* identificados, 771 codifican proteínas con dos dominios altamente conservados, N- y C-terminal, que codifican para un péptido señal y un sitio de unión GPI de anclaje a la superficie del parásito. Entre estos dos dominios conservados se encuentra una región central altamente variable en secuencia y longitud (desde 146 a 645 aminoácidos) caracterizada por presentar una amplia variedad de motivos repetidos [135]. De estos motivos, los más comunes son las repeticiones de un solo residuo, en concreto para el ácido glutámico con un 27% de repetición en todos los motivos encontrados [135].

En cuanto a las modificaciones post-traduccionales y de proceso de maduración de una proteína como en el resto de organismos eucariotas, las proteínas de la familia MASP presentan un número altamente variable de modificaciones post-traduccionales con sitios para la O- y N-glicosilación y de fosforilación [135].

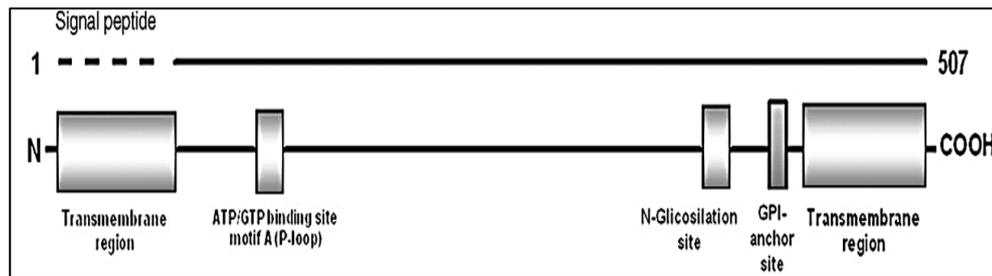
Los primeros ensayos de localización de las proteínas MASP revelaron su distribución por la superficie celular de los tripomastigotes así como su expresión en el proceso de infección, siendo mayor a partir de las 24 h post-infección y con un pico de intensidad a las 72 h, donde los amastigotes comienzan a diferenciarse a tripomastigotes [135, 137].

La implicación de estas proteínas en el mecanismo de invasión de *T. cruzi* en la célula hospedadora se puso de manifiesto con la identificación de un miembro de la familia MASP secretada en el medio de interacción parásito-célula por los tripomastigotes metacíclicos de la cepa CL Brener y denominada como MASP52. Esta proteína presenta un peso molecular de 52 kDa la cual corresponde con una MASP putativa con el número de acceso en EMBL XP\_820015.1[127].

La proteína MASP52 presentaba las mismas características proteicas que la mayoría de MASPs, es decir, un péptido señal correspondiente a la región N-terminal de la proteína con 25

## Introducción

aminoácidos de longitud (MAMMMTGRVLLVLCALCVLWSVAADG), un sitio de N-glicosilación (465-470) y un sitio de anclaje GPI en la región C-terminal desde el aminoácido 482 al 484, cuya secuencia empieza por DGS, con la particularidad de poseer un sitio de unión a ATP/GTP con un loop-P identificado como la región catalítica de la proteína en los aminoácidos 159 al 166 (AEEAAGKT)(Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Representación esquemática de los motivos estructurales de la proteína MASP52, según De Pablos *et al.* (2011) [127].

Esta proteína se localiza preferentemente en la superficie celular de los parásitos formando clústeres en las formas TCT y TM, y además tienden a encontrarse dentro de vacuolas en el bolsa flagelar y en la raíz del flagelo en las formas E y también las formas TCT.

Ensayos realizados con anticuerpos anti-MASP52, concretamente, frente a la región catalítica de la proteína, en presencia de cultivo de células y parásitos mostró un porcentaje de inhibición para la penetración del parásito del 78.9 % (dilución 1/50) y 74.48 % de adherencia de formas M a las células, demostrándose la participación de esta proteína en el proceso de invasión en la célula hospedadora no fagocítica [127].

Barthomoleu *et al.* (2009) demostraron la reactividad frente a proteínas que están presentes en el medio de cultivo de la forma T mediante el uso de anticuerpos específicos frente a MASP, apoyando por

tanto la idea de que algunos miembros de la familia MASP son liberados al medio.

Junto con la variabilidad de expresión y heterogeneidad fenotípica, el parásito dispone de un amplio repertorio de polipéptidos MASP que van a ser expuestos en la superficie del parásito así como secretados al medio aumentando la capacidad antigénica y la variabilidad de la misma. Esta variabilidad antigénica ocurre durante la fase aguda de la enfermedad y puede depender incluso del tipo de célula que vayan a infectar [138]. Esto se demostró mediante la infección de dos tipos de células epiteliales y en modelos murinos vivos con el objetivo de obtener tres poblaciones diferentes de tripomastigotes y analizar en cada una de ellas la expresión de genes MASP [138].

La variación de expresión de genes *masp* fue diferente entre las tres poblaciones con una mayor diferencia de expresión entre los tripomastigotes sanguíneos y los derivados de cultivos infectados y, los tripomastigotes sanguíneos obtenidos tras varios pasos en ratones infectados. Además, las proteínas se expresan durante la fase aguda exponiendo distintos epítomos que van a ser reconocidos por la mayor parte de las inmunoglobulinas IgG e IgM que se producen normalmente en esta fase inicial de la infección por *T. cruzi* [138].

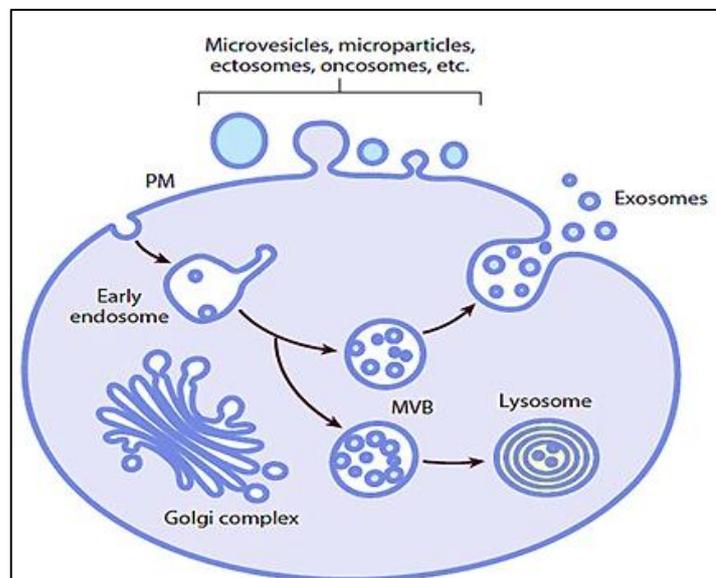
Por todo esto, la superfamilia de proteínas de superficie MASP ha sido diana para el estudio del proceso de invasión del parásito junto con otras proteínas de superficie anteriormente mencionadas. Esta variabilidad en la superficie celular constituye un bloque de herramientas de las que el parásito se arma para establecerse en el hospedador y evadir la respuesta inmune que éste dispara.

Un nuevo elemento descubierto y clave en los procesos de comunicación celular y en el establecimiento de muchas enfermedades, tanto de etiología infecciosa como metabólica o degenerativa, son las

Exovesículas (EVs) también descubiertas en *T. cruzi* y que se describen a continuación.

### 1.5 EXOVESÍCULAS

Las exovesículas o EVs son pequeñas vesículas de membrana que se clasifican en dos tipos, exosomas y microvesículas (MVs), dependiendo de su tamaño, biogénesis y composición. Los exosomas son unas vesículas con una bicapa lipídica cuyo diámetro varía entre 30 a 100 nm, de origen endocítico y que son liberadas al medio a través de la fusión del cuerpo multivesicular (MVB) con la membrana plasmática de la célula [139]. Por su parte, las MVs también referidas como micropartículas o Ectosomas, son más heterogéneas en cuanto a forma, pudiendo tener entre 0.1 y 1µm de diámetro y se liberan como consecuencia de la evaginación hacia el espacio extracelular de la membrana plasmática [140] (Figura 1.15). Las EVs no sólo difieren entre ellas en origen y tamaño, sino también en composición lipídica y proteica.



**Figura 1.15.** Representación esquemática de los diferentes tipos de vesículas de membrana liberadas por una célula eucariota [141].

Las EVs fueron descubiertas en 1980 como parte de un mecanismo celular de eliminación de moléculas de superficie en los reticulocitos en su proceso de maduración hacia eritrocitos. En este proceso, se producía la pérdida del receptor para Transferrina (Tfr), que en condiciones generales se encuentra en la superficie de la célula, encontrándose esta vez en el medio extracelular [142]. Tras este descubrimiento, han sido numerosos los estudios que han puesto de manifiesto la existencia de estas EVs habiéndose identificado en todos los fluidos biológicos desde sangre [143] hasta la saliva [144], orina[145] e incluso leche materna[146], semen[147] y en heces[148].

Dada la variedad de EVs que se pueden encontrar en estos fluidos biológicos, se hizo necesario definir conceptos y métodos de purificación de EVs para que toda la comunidad científica implicada en su investigación tuvieran unos protocolos estándares bien definidos. Esta propuesta se llevó a cabo en el Congreso Internacional de la Sociedad de Vesículas Extracelulares (ISEV) en 2012, concluyendo la existencia de tres grupos principales de vesículas basados en su tamaño: exosomas (40-100 nm), MVs (50-1.000 nm) y cuerpos apoptóticos (800-5.000nm)[149].

Entre las funciones que desarrollan estas EVs se encuentran la comunicación intercelular, la interacción patógeno-célula hospedadora y la modulación de la respuesta inmune frente a enfermedades infecciosas o enfermedades como el cáncer[150].

### **1.5.1 BIOGÉNESIS DE EXOSOMAS: VÍA ENDOCÍTICA Y SECRECIÓN**

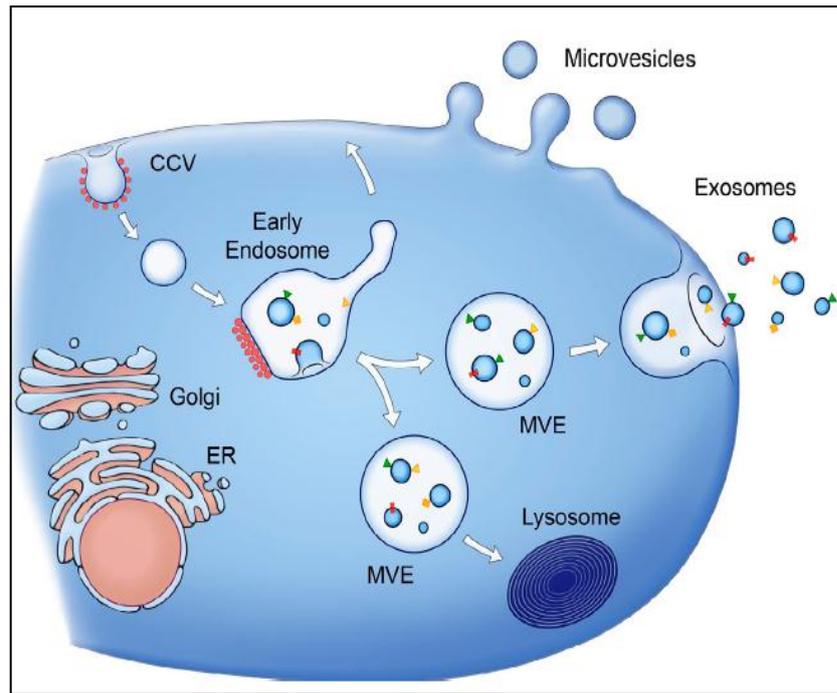
Se conoce como endocitosis o vía endocítica al proceso por el cual las células internalizan material extracelular, ligandos, proteínas de membrana y lípidos, a través de compartimentos de membrana altamente dinámicos. Este proceso de captación se encuentra

## Introducción

equilibrado por el proceso contrario, es decir, aquel que libera dichas macromoléculas a través de la membrana plasmática denominado Exocitosis [151].

El mecanismo de exocitosis está regulado en organismos multicelulares por vías de señalización. Dependiendo de los mecanismos que las células utilicen para liberar estas macromoléculas podemos distinguir entre: (a) exocitosis constitutiva (no activada por  $\text{Ca}^{2+}$ ) y (b) exocitosis regulada (activada por  $\text{Ca}^{2+}$ ). Mientras que la exocitosis regulada es un proceso más específico que ocurre en determinadas células, como las células neuronales para llevar a cabo la sinapsis, la exocitosis constitutiva ocurre en todas las células y sirve tanto para secretar componentes de la matriz extracelular como para incorporar nuevas proteínas sintetizadas a la membrana plasmática por fusión de vesículas transportadoras. Otro mecanismo de exocitosis es la fusión de cuerpos multivesiculares (MVBs) con la membrana plasmática y la subsecuente liberación de las proteínas que transportan. A las vesículas intraluminales (ILVs) que se han formado por la invaginación de la membrana limitante de los MVBs, y que tras la fusión del mismo son secretadas al espacio extracelular se les denominan Exosomas (Figura 1.16).

Los exosomas llevan con ellos gran cantidad de proteínas que se han incorporado a la membrana del mismo durante su formación, las cuales pueden ser comunes a todos los exosomas pero también pueden ser específicas según la célula de origen [139].



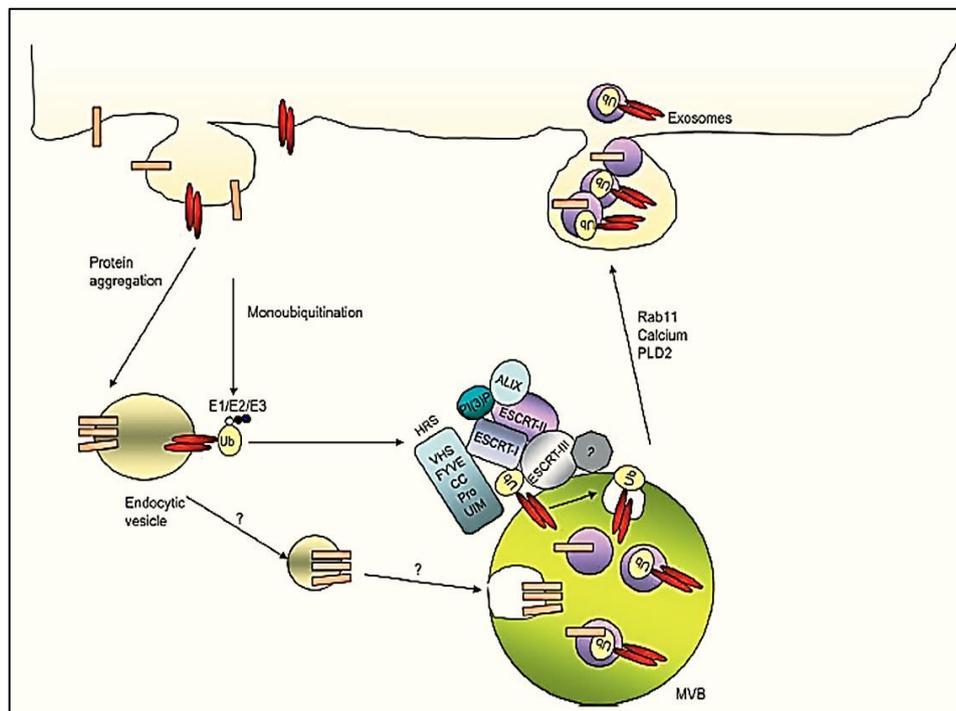
**Figura 1.16.** Representación de la liberación de exosomas y microvesículas por una célula (MVs)[140].

A su vez las MVs salen directamente de la membrana plasmática mediante su evaginación, mientras que los exosomas salen por la fusión de los MVBs con la membrana plasmática de la célula. Éstas últimas se forman por la invaginación de la membrana de los endosomas tempranos que van a madurar hacia endosomas tardíos formándose al final un cuerpo multivesicular temprano (MVEs) con ILVs en su lumen. Los cuerpos multivesiculares (MVBs) se dirigen hacia la membrana plasmática para fusionarse con ella y liberar los exosomas al exterior celular [152].

La composición proteica de los exosomas está directamente relacionada con el proceso de biogénesis de los MVBs. Este proceso de biogénesis comienza por un *sorting* de proteínas que puede ser dependiente del complejo transportador ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) o independiente de ESCRT [153-155]. El *sorting* de proteínas dependiente de ESCRT (ESCRT-O y ESCRT-1) se

## Introducción

produce por el reconocimiento de las proteínas previamente mono-ubiquitinizadas por el heterodímero Vps-27/HRS (substrato de tirosina quinasa regulado por HFG) y por el resto de proteínas del complejo ESCRT (I, II y III). Concretamente el factor regulador del sustrato de tirosina quinasa HRS, está asociado a su vez con STAM, Eps15 y Clatrina y se encarga de reclutar al elemento TGS101 o al elemento ALIX del complejo ESCRT-I el cual también es capaz de reconocer motivos ubiquitina (Figura 1.17) [139, 156].



**Figura 1.17.** Maquinaria molecular de la biogénesis de exosomas/vesículas extracelulares (EVs) mediante la vía endocítica de proteínas y la biogénesis de los MVBs en células eucariotas [150].

El elemento ESCRT-III forma una serie de filamentos que se encargan de provocar la invaginación de la membrana celular y, en consecuencia, la formación de vesículas intraluminales (ILVs). La mono-ubiquitinación o agregación de proteínas, provoca la señal para el tráfico de proteínas y lípidos en los MVBs. La maquinaria para el *sorting* de proteínas ubiquitinadas involucra al multi-dominio de proteínas

Vps27/HRS, que actúa como un puente entre las proteínas ubiquitinadas y la Clatrina de los endosomas. A partir de aquí, participa el complejo de proteínas ESCRT promoviendo la inclusión de estas en el MVB. Una vez completado el proceso, el complejo ESCRT se disocia de la membrana del MVB [150].

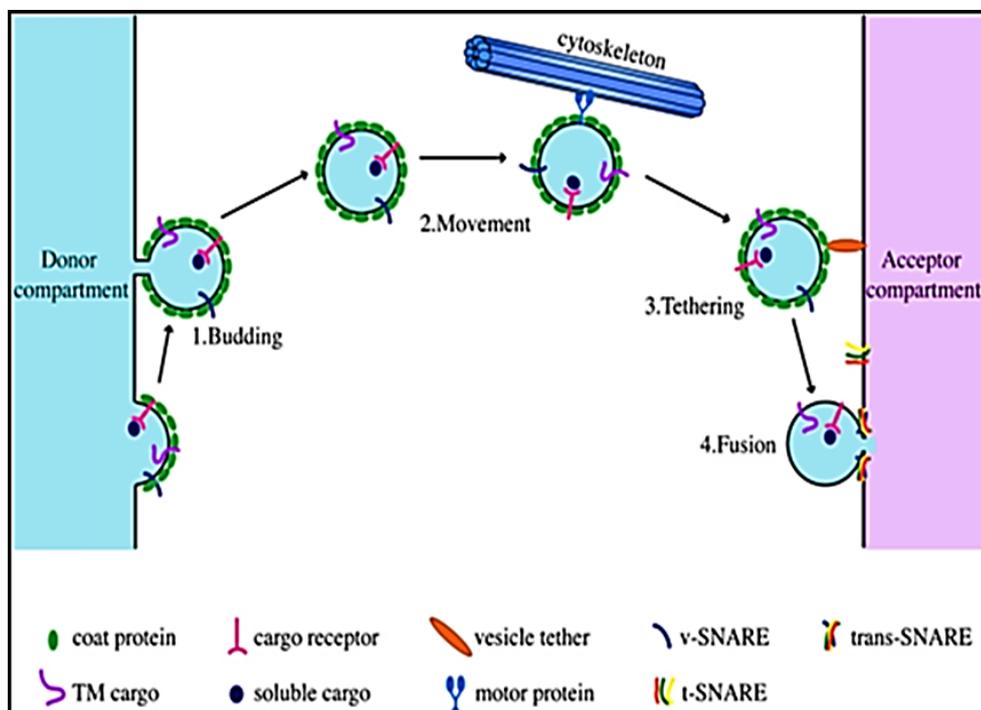
No todas las proteínas se van a ubiquitinar, por lo que existe un mecanismo pasivo para el *sorting* de proteínas en MVBs, en el que están involucrados los lipodominios rafts de membrana enriquecidos en colesterol o lípidos, o las tetraspaninas como se ha demostrado en diferentes tipos celulares de mamíferos y no en *T. cruzi* por carecer de ellas [157-159]. La presencia de proteínas como proteínas ancladas a GPI o flotilina, Estomatina o Lyn secuestradas en los exosomas reflejan la presencia en las membranas exosomales de dominios similares a rafts [157, 160-163].

Por otra parte, el mecanismo de secreción de los exosomas se produce por la fusión de los MVBs con la membrana plasmática de la célula. El transporte de vesículas es un mecanismo muy estudiado y se compondría de cuatro pasos importantes como se muestra en la Figura 1.18. En primer lugar se produce el *budding* o recubrimiento de las vesículas por proteínas que disparan la cascada de señales en el citoplasma a través de proteínas citosólicas con dominios transmembrana como podría ser el caso de las proteínas MASP de *T. cruzi*. Después de esto, las vesículas van a ser transportadas hacia su destino a través de los elementos del citoesqueleto (filamentos de actina), así como los motores moleculares asociados (kinesina, miosina y dineina).

El tercer paso es el anclaje, consistente en la interacción inicial entre la vesícula y su membrana diana. Esto está precedido por la unión del complejo SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors) así como la intervención de proteínas Rabs (pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras) jugando un

## Introducción

papel importante en la determinación de la especificidad del marcaje de las vesículas [164]. En exosomas se han identificado numerosas proteínas Rabs dependiendo de la célula de las que se originan como Rab 11 en líneas celulares de reticulocitos [165], Rab27 [166] y Rab35 [167]. Y por último, el cuarto paso de la secreción de vesículas sería la fusión. La fusión de la vesícula con la membrana diana se piensa que ocurre a través del complejo de proteínas SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors)[168] junto con el complejo SNAPs, aunque este mecanismo aún ha sido poco estudiado.



**Figura 1.18.** Mecanismo de transporte de exosomas a través del citoplasma en una célula eucariota[169].

El elemento SNARE está clasificado en dos categorías: SNARE vesicular (v-SNARE, proteínas asociadas a membranas vesiculares, VAMPs) localizado en la membrana donante y el complejo SNARE diana o t-SNARE, localizado en el compartimento aceptor [168, 169]. La unión

de ambos complejos entre membranas opuestas provoca la formación de un bucle de  $\alpha$ -hélices paralelas formadas por cuatro cadenas llamado complejo SNARE, con la subsecuente fusión de las membranas. VAMP7 se ha encontrado implicado en la exocitosis de los MVBs que liberan EVs [170].

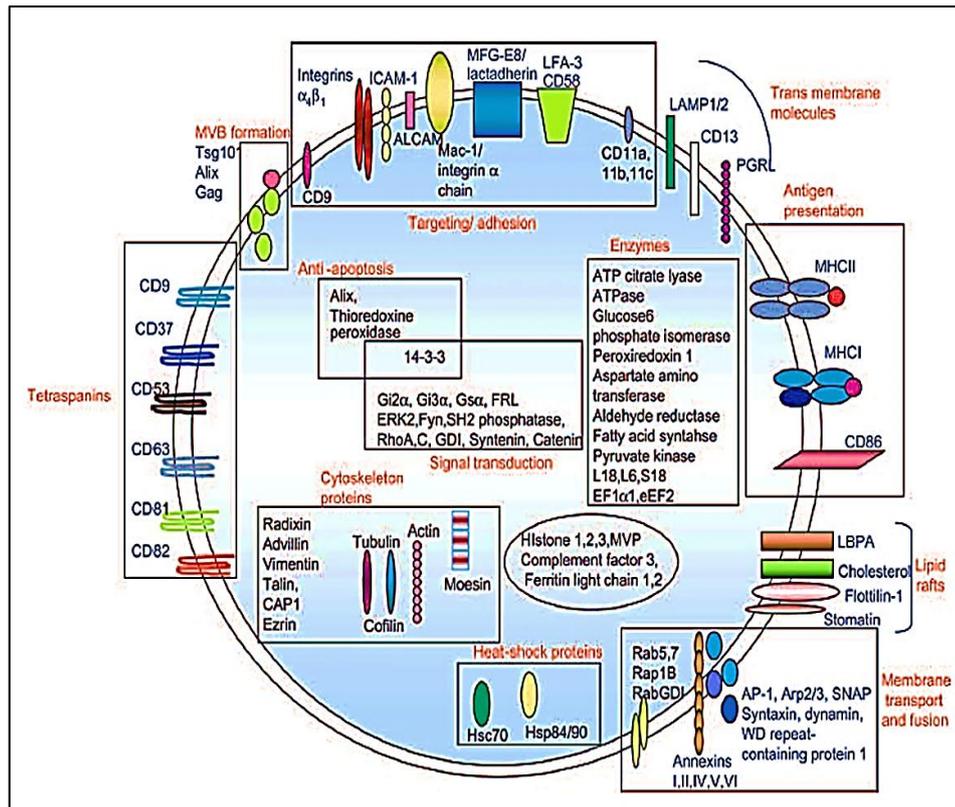
### 1.5.2 COMPOSICIÓN MOLECULAR Y FUNCIONES

El estudio de la composición proteica de las EVs ha sido llevado a cabo a través de distintas técnicas moleculares incluyendo western blotting, inmuno-ME, *sorting* de células estimuladas por fluorescencia y espectrometría de masas. Como la composición molecular de una EV va a depender de la célula de origen, incluida si esta es o no de mamífero, amplios estudios sobre dicha composición han dado como resultado la creación de una base de datos denominada Exocarta ([www.exocarta.org](http://www.exocarta.org)) [171], en la que se incorporan todos los resultados basados en la composición bioquímica de los exosomas de células de mamífero, y otra base de datos para EVs no mamíferas de todos los tamaños denominada Evpedia ([www.evopedia.info](http://www.evopedia.info)) [172]. En ambas bases de datos no sólo se encuentran las proteínas que componen las EVs, sino que también se incluyen ácidos nucleicos y lípidos así como los procedimientos usados para su purificación.

Las EVs van a diferir en su composición proteica dependiendo del tipo de célula de origen pero van a compartir un conjunto de proteínas entre todas ellas [173, 174]. Las primeras proteínas que formaran parte de las EVs van a ser aquellas relacionadas con su biogénesis, como por ejemplo, el complejo SNAREs, Rab GTPasas, Flotilina-1 (asociadas a rafts de membrana) o Anexinas (I, II, V y VI), e incluso aquellas relacionadas con la formación de los MVBs como ALIX y TGS101 [150], Clatrina [93] y chaperonas como Hsc70 y Hsp90 [173], las cuáles se encargan de cargar los péptidos dentro de los complejos mayores de histocompatibilidad MHC I y II [175]. Otro grupo importante de

## Introducción

proteínas son las proteínas pertenecientes a la familia de las Tetraspaninas, con más de 30 miembros, formadas por cuatro dominios trans-membrana. Entre ellas las que se encuentran en mayor proporción tras ser purificadas por inmunoprecipitación son CD63, CD81, CD9, CD82, CD53 y CD37. Algunos tipos de células presentan moléculas únicas en sus exosomas como es el caso de CD86 y MHCII y la molécula de adhesión intercelular ICAM-I presente en exosomas de células presentadoras de antígeno (DCs) una vez producida su activación [176, 177], revelando el origen endosomal de las exovesículas portadoras de estas proteínas. Otro tipo de proteínas encontradas en los exosomas son las proteínas enzimáticas como la Enolasa, Aldolasa, ATP citrato liasa, etc., proteínas encargadas en la transducción de señales (fosfatasa, Rho A, quinasas) y proteínas del citoesqueleto encargadas del transporte de estas vesículas como la Actina, la Tubulina, Miosina, Cofilina, Vimentina entre otras. También se han encontrado en las EVs histonas, proteínas ribosomales o del proteosoma, proteínas de adhesión como las integrinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), lactoadhesinas, junto a las tetraspaninas antes mencionadas, todas ellas resumidas en la Figura 1.19 [150].



**Figura 1.19.** Representación esquemática de la composición bioquímica de una EV canónica [150].

En cuanto a la composición lipídica, las EVs están constituidas por una bicapa lipídica similar a la de la membrana plasmática, pero se encuentran especialmente enriquecidas en ciertos lípidos asociados a rafts de membrana como el colesterol (principalmente en linfocitos B), ceramidas ( que participan en la diferenciación de exosomas desde lisosomas), esfingolípidos y fosfatidilglicéridos con largas cadenas de ácidos grasos saturados, así como fosfatidilserina que se expone hacia la cara citoplasmática de la membrana plasmática [157, 158, 161, 178].

Estudios sobre la diferencia en la composición lipídica de los exosomas en referencia a la célula de origen también han puesto de manifiesto un incremento de ciertos lípidos en la membrana lipídica de los exosomas como es el caso de los mastocitos y células dendríticas donde sus exosomas son ricos en esfingolípidos pero no así en

## Introducción

colesterol, con bajo porcentaje de fosfatidilcolina pero con mayor porcentaje de fosfatidiletanolamina que su célula de origen [158], además de presentar una dinámica lipídica que le permitiría un mayor movimiento entre las dos capas. Otros estudios sugieren todo lo contrario, es decir, que los exosomas presentarían una composición lipídica similar a la de la membrana de la célula de origen, como es el caso de los eritrocitos y sus exovesículas [179].

En cuanto al glicocálix de las EVs, no fue hasta el año 2011 donde Batista *et al.* (2011) describieron un patrón de glicosilación conservado en exosomas de células T, célula de melanoma y células de cáncer de colón y en exosomas presentes en leche humana [180]. Dicho patrón se caracteriza por ser altamente rico en N-glicanos complejos y en manosa,  $\alpha$ -2,6-ácido siálico y polilactosamina. Al igual que con la composición de proteínas y de lípidos, el glicocálix de las EVs puede reflejar su origen específico, pero eso no ocurre de tal manera, sino que éste parece ser que se especializa dependiendo del tipo de vesícula, de sus condiciones fisiológicas y de la diana a la que se dirija dicha EV [181]. En general, este glicocálix parece ser estar formado por una mezcla compleja de proteínas modificadas por N-ligandos (ligados a asparagina) y O-ligandos (unidos a serina o treonina) y una variedad de glicoesfingolípidos, potencialmente oligosacáridos (GSL). Las lectinas, con función de adhesión a carbohidratos han sido usadas mediante técnicas de citometría de flujo en el estudio de los carbohidratos presentes en las EVs [182].

El papel del glicoma de las EVs está directamente relacionado con la función que desempeñan como se demostró en ensayos de invasión tumoral mediante la incubación con EVs secretados por células de cáncer de mama (MCF-7) y de EVs secretadas por células epiteliales normales (hTERT-MV), las cuáles promovían dicha invasión y además presentaban un alto grado de glicosilación [183].

Por último, uno de los componentes más importantes con respecto a su función en la comunicación intercelular que transportan en su interior las EVs son los mARNs y miARN, encontrados en EVs de mastocitos de ratón y de humano [184]. La cantidad de ARN presente y que tipo de ARN transporta también va a depender del tipo de célula de origen. Los miARN son pequeños ARN no codificantes que se procesan post-transcripcionalmente en la célula hospedadora y se liberan de la célula hacia el espacio extracelular transportados en las EVs, encontrándose dichos miARN en EVs aisladas de suero y saliva. Estos miARN están involucrados en el silenciamiento post-transcripcional de los genes, y actuarían en la patogénesis de muchas enfermedades como es el caso de los miARN del virus Epstein Bar (EBV) secretados por la célula infectada, alterando la comunicación célula-célula [185], o del VIH [186], donde actúan inmuno-modulando la respuesta inmune.

El estudio de la composición molecular de las EVs potencia su uso para el diagnóstico de enfermedades humanas ya que como anteriormente se explica, dicha composición depende del tipo de célula de origen y de su estado fisiológico [187].

### 1.5.3 **EVs EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS PARASITARIAS**

Además de en enfermedades derivadas de un mal funcionamiento orgánico o carcinogénesis, las EVs también juegan un papel muy importante en las enfermedades producidas por agentes infecciosos. Se conoce la capacidad de las células de mamífero infectadas por patógenos, e incluso por priones, de liberar exosomas y de poseer la capacidad de inmunomodular la respuesta inmune en las parasitosis provocadas por parásitos nematodos y trematodos [188].

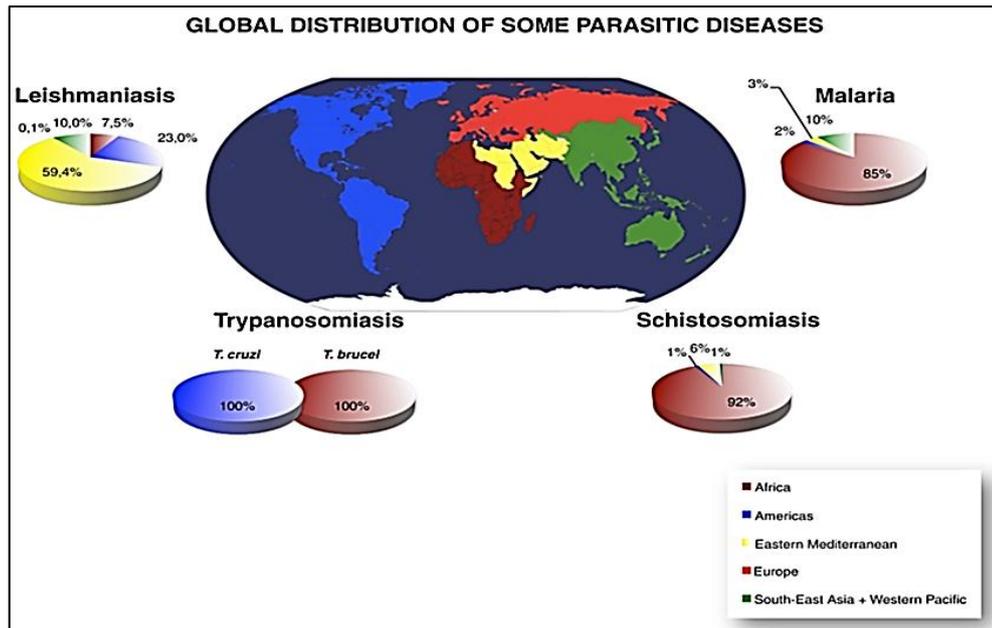
El virus VIH-1 ha desarrollado una estrategia mediada por exosomas capaz de manipular la maquinaria de la célula hospedadora mediante la transferencia de proteínas, ARN (miARN y ARNs) desde las

## Introducción

células infectadas hacia las no infectadas como se ha demostrado en macrófagos [189]. En concreto, este virus ha desarrollado una estrategia denominada “The Trojan horse hypothesis of HIV trans-infection”, en la que el virus entraría en las células dendríticas maduras y quedarían retenidos en los MVBs, donde seguirían el mismo proceso usado por los exosomas de las células dendríticas para la diseminación antigénica amplificando la presentación de antígenos durante el proceso de invasión [190].

En enfermedades producidas por bacterias patógenas también se conoce la liberación de EVs, en este caso denominadas OMVs, mediante las cuáles las bacterias Gram negativas son capaces de comunicarse con células procarioras y eucariotas, además de llevar consigo factores de virulencia que les sirven para la unión e invasión, producir citotoxicidad e inmunomodular la respuesta inmune [191, 192]. Un ejemplo de esto ocurre en *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* donde ambos van a infectar macrófagos que liberan exosomas que contienen antígenos procedentes de dichas bacterias y que son capaces de activar la respuesta inmune innata y adquirida en el hospedador [150, 193].

Dentro del tipo de enfermedades infecciosas con sintomatología, alguna de ellas muy graves , están las enfermedades infecciosas parasitarias [194] (Figura 1.20)



**Figura 1.20.** Representación geográfica de alguna de las enfermedades parasitarias más importantes según la organización mundial de la salud (OMS)[194].

El estudio de EVs liberadas por parte de estos parásitos en los últimos años ha revelado el papel que juegan en la infectividad y el consecuente desarrollo de la enfermedad que provocan dichos parásitos en su hospedador. Dentro de las enfermedades parasitarias, la más extendida en el mundo es la Malaria, producida por el protozoo parásito del género *Plasmodium* [195].

La presencia de EVs circulantes durante la invasión por *Plasmodium* ha sido revelada en estudios con personas infectadas por el parásito [196]. Estudios en ratones infectados con *P. yoelii*, forma no letal de la malaria y propia de roedores, donde los protozoos presentan tropismo por los reticulocitos, revelaron la existencia de exosomas que contienen proteínas tanto del parásito como del hospedador, y que actuaban en la modulación de la respuesta inmune [197]. Más recientemente, se ha demostrado el papel de estas EVs en la patogénesis de la enfermedad [198].

## Introducción

Entre los kinetoplástidos también se ha encontrado la liberación de EVs. Entre los más importantes se encuentra *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania spp.* El primero de ellos produce la enfermedad del sueño, endémica del continente africano, cuya estrategia de supervivencia se basa en la variación antigénica. La primera caracterización de los exosomas de *T. brucei* se llevó a cabo en el año 2001 [199]. Estudios posteriores sobre la caracterización proteica de estas vesículas demostró la gran variación antigénica existente en este parásito, también reproducida en sus EVs liberadas, con un total de 444 proteínas identificadas, entre las cuáles se encontraban 14 familias de proteasas las cuáles podrían jugar un papel muy importante en la evasión del sistema inmune [200].

Otro de los kinetoplástidos más extendidos a nivel mundial es *Leishmania spp.* [201]. Al conjunto de las principales afecciones que causa *Leishmania spp.* se denomina leishmaniosis, caracterizada por provocar ulceraciones cutáneas o mucocutaneas, así como afecciones viscerales. El tipo de patología que produce depende tanto del estado del hospedador como de la cepa y de la especie de la que el hospedador se infecte. Al igual que el resto de los kinetoplástidos, *Leishmania spp.* es un parásito obligatorio intracelular en su hospedador vertebrado, y cuyas formas intracelulares, también llamadas amastigotes, se encuentran en el interior de los macrófagos donde sobreviven. Frente a este ambiente hostil, el parásito secreta exosomas de entre 30-70 nm de tamaño, como se ha observado en dos cepas diferentes como *L. donovanni* y *L. mexicana*, incluyendo el estudio sobre las condiciones que afectan a dicha liberación como son la temperatura, o las condiciones de pH, donde los pH ácidos inhiben dicha secreción como demostraron Silverman *et al.* (2010) [202]. Una vez más, estudios realizados con macrófagos infectados por *Leishmania spp.* mostraron la liberación de exosomas con proteínas derivadas del parásito, como fue

el caso del descubrimiento de la proteína gp63, la principal metaloproteasa de superficie de *Leishmania spp.*, encontrada en exosomas liberados por macrófagos J774 infectados con el parásito [203]. El papel inmunomodulador de los exosomas secretados por *L. major* y *L. donovani* también ha sido estudiado, demostrándose la capacidad de inducir la producción de IL-8 por parte de los macrófagos, lo que provoca el reclutamiento de los neutrófilos en el lugar de la infección [204]. Recientemente, se ha detectado la presencia en las exovesículas secretadas por *L. major* de la subunidad TERT del enzima Telomerasa [205], la cual es capaz de aumentar su actividad en las mitocondrias y núcleo del parásito durante un proceso de estrés oxidativo al que se expusieron los promastigotes en presencia de distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La posible finalidad de este fenómeno quizás sea la de proteger el ADN mitocondrial y nuclear durante el proceso de activación del macrófago y la subsiguiente liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 1.5.4 **EXOVESÍCULAS SECRETADAS POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Las EVs de *T. cruzi* forman parte de su secretoma, junto con todas las proteínas que secretan al medio extracelular por otras vías. La primera evidencia de la secreción de vesículas derivadas de membrana por este protozoo parásito fue en 1979, donde da Silveira *et al.* [206] obtuvieron estas vesículas mediante estudios de M.E.T y criofractura de las formas epimastigotas, las cuáles parecían tener dos orígenes, observándose vesículas derivadas de la membrana plasmática y de la bolsa flagelar. Además de en epimastigotes, estas vesículas se encontraron en el medio de cultivo de las formas TCT, en un proceso dependiente de la temperatura e independiente de la presencia de proteínas o suero inmune en dicho medio, y que además aparecían en las diferentes cepas analizadas [207].

## Introducción

Recientemente, Bayer-Santos *et al.* [208] analizaron el proteoma de dos poblaciones diferentes de vesículas secretadas por epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, previamente transfectados con el gen de la proteína GFP (Green fluorescent protein).

A partir del cultivo de ambos en ausencia de SBF en el medio de cultivo y tras 6 h de incubación a 28 °C, obtuvieron por un proceso de ultra centrifugación diferencial, dos poblaciones de vesículas que fueron analizadas por 2D LC-MS/MS. Dichas vesículas, tanto de E como de TM tenían un tamaño comprendido entre 100 y 200 nm y provenían de MVBs encontrados en la cercanía de la bolsa flagelar junto con vesículas parecidas a exosomas en su interior, las cuáles presentaban un tamaño <100nm. Además en dichas vesículas, se detectaron proteínas de superficie del parásito mediante western blot, como son las proteínas gp82, gp35/50 y FCaBP (proteína flagelar de unión a calcio).

El análisis proteómico probó la presencia de aquellas proteínas que se encuentran en las EVs de las células de mamíferos así como proteínas chaperonas de choque térmico, proteínas implicadas en el transporte y fusión de membranas, transcripción y síntesis de proteínas, proteolíticas y peptidolíticas, de unión a ácidos nucleicos, etc. Además también se encontraron proteínas que intervienen en la interacción parásito-célula y señalización, con un porcentaje prácticamente igual tanto en E como en TM (3.2 y 3.8 % respectivamente, del total de proteínas encontradas). Entre ellas, la superfamilia de proteínas MASP, encontradas en este caso en epimastigotes [208].

En los organismos eucariotas y como también ocurre en los tripanosomátidos, las proteínas se secretan mediante la vía clásica de señalización por el péptido señal que se dirigen hacia el retículo endoplasmático y al aparato de Golgi, para ser eliminado y secretarse la

proteína sin dicho péptido. No obstante, también existen proteínas que no presentan dicho péptido señal, las cuáles son secretadas por la vía no clásica a través de los ectosomas y los exosomas [209], suponiendo éstas últimas la mayoría de las proteínas secretadas por *T. cruzi*, donde sólo el 9 % presenta dicho péptido señal [194, 210, 211].

La presencia de las principales proteínas pertenecientes a las grandes familias de proteínas de superficie del parásito que poseen un papel importante en el proceso de interacción e invasión de la célula hospedadora en las EVs, puso de manifiesto la participación de estas vesículas en dicho proceso de invasión. El miembro de la familia de las *trans*-sialidasas, Tc85, presente de forma mayoritaria en la superficie de los tripomastigotes, se encontró en EVs liberadas por tripomastigotes a través de la bolsa flagelar unidas a la membrana de la vesícula mediante anclaje por GPI [212]. Otras proteínas son liberadas en EVs secretadas a través de la membrana plasmática pueden no poseer el dominio GPI posiblemente por la acción de una Fosfolipasa C endógena, como puede ser el caso de la proteínas MASP52 liberada al medio de interacción parásito célula [127].

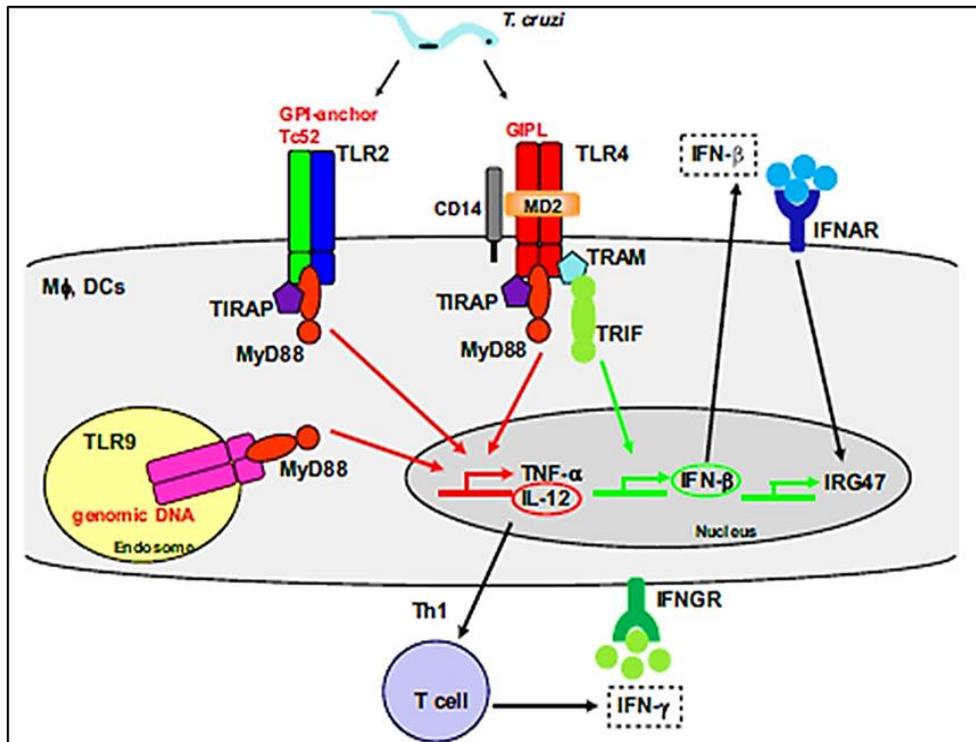
Los tripomastigotes y los amastigotes son capaces de secretar todas las proteínas que han sido descritas en los procesos de virulencia del parásito como es la interacción e invasión de la célula hospedadora, la evasión del sistema inmune y la patogénesis de la enfermedad de Chagas, siendo a su vez usadas como marcadores para el diagnóstico de la enfermedad [194].

## 1.6 RESPUESTA INMUNE Y EVASIÓN MEDIADA POR *T. CRUZI*

La enfermedad de Chagas, como anteriormente se mencionó, presenta dos fases, una fase aguda y una fase crónica. Durante la fase aguda se produce una fuerte inhibición del sistema inmune del hospedador tras el reconocimiento del parásito por parte de las células

## Introducción

de la inmunidad innata como son los linfocitos B y T (CD4<sup>+</sup> Th1 y CD8<sup>+</sup> T), células dendríticas, macrófagos, linfocitos NKT y de células NK que producen citoquinas pro-inflamatorias para contrarrestar la infección [213, 214]. La interacción de *T. cruzi* con los macrófagos y las células dendríticas se produce a través de los receptores Toll-like Receptors (TLRs), que actúan mediando el reconocimiento de determinadas moléculas en los patógenos denominadas como patrones moleculares de reconocimiento o PAMPs. En el caso de *T. cruzi*, la interacción se realiza mediante TLR2 [215], TLR4 y TLR9 a través de la unión de las mucinas unidas al GPI en la superficie del parásito o moléculas similares a mucinas en su forma sializada (Figura 1.21) [216].



**Figura 1.21.** Representación esquemática de la respuesta inmune dependiente de TLR activada por *T. cruzi* (218).

Este reconocimiento provoca la activación de la vía de señales por NF-κB, que conlleva a la producción de citoquinas pro-inflamatorias de la respuesta innata, como son la IL-12, IL-1, IL-10, TNF-α y NO (óxido

nitroso). La interacción de las mucinas del parásito con TLR2 provoca la secreción de IL-12 por parte del macrófago que regula la producción de IFN- $\gamma$  a través de la proliferación de células Th1 y NK [217]. A su vez, el IFN- $\gamma$  va a activar a los macrófagos de nuevo para producir especies reactivas de nitrógeno (NO) con actividad citotóxica y citoestática, suponiendo la primera barrera de control de la parasitemia [218]. Además de las proteínas de superficie ancladas a GPI, los tripomastigotes secretan otra tipo de proteínas capaces de activar a TLR2 tanto en células inmunes humanas como de murinos, denominada Tc52, que también induce de la misma forma la respuesta pro-inflamatoria por activación de los macrófagos [219].

La participación de TLR4 en dicha actividad pro-inflamatoria se debe al reconocimiento por su parte de glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), presentes en la superficie de *T. cruzi* [220], que activan las vías de señalización a través de CD14 con la subsecuente producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  que inmunomodula la respuesta frente al parásito [221]. Experimentos con ratones *knock-out* para TLR9 (*tlr9*<sup>-/-</sup>) infectados con *T. cruzi* mostraron una alta parasitemia en comparación con ratones *Wilde type* infectados, además de presentar bajas concentraciones de IL-12 e IFN- $\gamma$  [222], inmunodulando la respuesta en cooperación con TLR2 a través de MyD88, una proteína adaptadora de los TLRs para activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Además de la activación por el reconocimiento por TLRs, las mucinas presentes en la superficie del parásito provocan un efecto mitogénico en los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Este efecto se produce mediante la unión de residuos de ácido siálico unidos al esqueleto peptídico de las mucinas con receptores tipo lectina expuestos en dichos linfocitos, concretamente por el receptor CD3, provocando así el bloqueo de la progresión de la fase G1 celular y, por tanto, su capacidad de división [223, 224].

## Introducción

Otro factor con actividad mitogénica tanto en la interacción parásito-célula hospedadora como en la regulación de la secreción de IL-12, es la cascada de proteínas MAPK, que conlleva a la diferenciación de las células Th hacia Th1 [225] por la vía ERK1/2, liberando IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha/\beta$ . A su vez la vía ERK1/2 modula la producción de IL-10 [226] que induce la diferenciación de las células Th1 hacia Th2, modulando de la misma manera la respuesta mediante la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, exacerbadas en las reacciones alérgicas y presentes en la respuesta frente patógenos extracelulares [227]. Por lo tanto, IL-10 puede actuar como un inhibidor de la respuesta inflamatoria para prevenir el daño tisular.

El proceso de fagocitosis que inician los macrófagos es la primera respuesta del sistema inmune frente a una infección por un patógeno, en el que el reconocimiento del patógeno conlleva a la opsonización y actuación del sistema del complemento del hospedador, produciendo su lisis y muerte [228].

*T. cruzi*, junto con otros parásitos como *Leishmania spp.*, es capaz de evadir al sistema del complemento mediante glicoproteínas capaces de regular el complemento o CRP [229] por unión no covalente a los componentes del complemento C3b y C4b, inhibiendo el ensamblaje del componente C3 convertasa con actividad proteolítica. Otras glicoproteínas presentes en la superficie de las formas infectivas de *T. cruzi* son las trans-sialidasas que van a inactivar al complemento mediante la unión a sus extremos  $\beta$ -terminales de residuos de ácido siálico que van a ser transferidos desde los gliconjugados del hospedador, inhibiendo la vía alternativa del complemento de la misma manera que las proteínas CRP [230, 231].

Se ha demostrado la presencia en el suero de pacientes con Chagas de anticuerpos anti-Gal, IgGs con capacidad de unión a

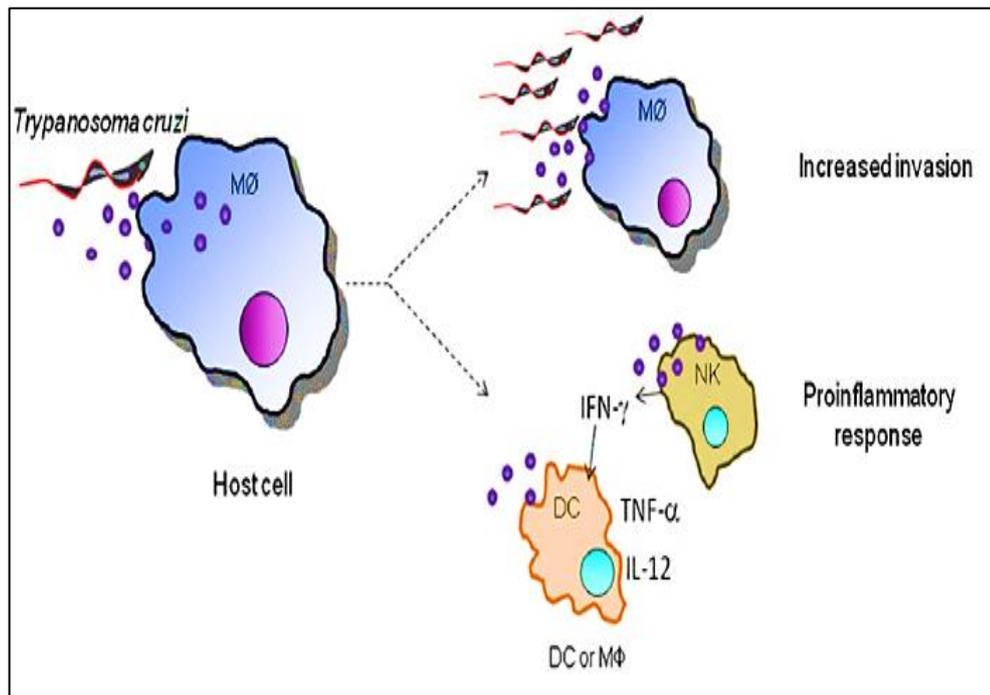
residuos de oligosacáridos Gal- $\alpha$ -1-3-Gal de los glicolípidos y glicoproteínas de los parásitos, formando inmunocomplejos de reconocimiento que activan la cascada de señales para la lisis mediada por el sistema del complemento [232]. A pesar de esto, dichas glicoproteínas presentes en las formas infectivas del parásito van a contrarrestar esta acción, en concreto se conoce que la glicoproteína gp160 se van a unir al componente del complemento C3b/C4b de la vía alternativa inhibiendo su actividad convertasa, responsable de la opsonización del parásito.

Otro elemento que actúa como inhibidor del complemento es la glicoproteína gp58/68, un receptor de fibrinógeno y colágeno en la superficie de *T. cruzi*, cuyo efecto inhibidor se debe a su interacción con el factor B con actividad hemolítica del complemento en lugar de con el componente C3b como en anteriores casos [233]. Por último, también es conocida la capacidad de inhibir la lisis mediada por el complemento de la proteína Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) mediante la interacción con C1q de la vía clásica del complemento mediante el uso de anticuerpos anti-F (ab')<sub>2</sub> frente a TcCRT que inhiben la unión del complejo proteína-C1q con la membrana de las células fagocíticas [230, 234].

En los últimos años, el estudio sobre el papel de las EVs en numerosas enfermedades tanto patógenas como no patógenas [150], así como el descubrimiento de la secreción de estas vesículas por parte de protozoos parásitos, ha llevado a evaluar su implicación en dichas enfermedades [194, 211]. En 2012, Cestari *et al.* (2012) [235] demostraron mediante ensayos *in vivo* (en células THP-1) e *in vitro* (en ratones infectados) la capacidad de los TM de aumentar hasta tres veces la cantidad de PMVs (vesículas derivadas de membrana plasmática) secretadas por parte de dichas células (sanguíneas y linfoides) durante la fase aguda de la enfermedad. Éstas intervenían en la inactivación de C3b por la vía clásica y de la vía de unión a Lectinas

## Introducción

(62 y 56 % respectivamente), frente al 37 % de la vía alternativa y, por lo tanto, evitaban la lisis del parásito por el complemento. Además, se vio que las moléculas de TNF- $\beta$  transportadas en las vesículas promovían la infección en ratones por parte de los parásitos debido al efecto inmunomodulador de dicha citoquina (Figura 1.22).



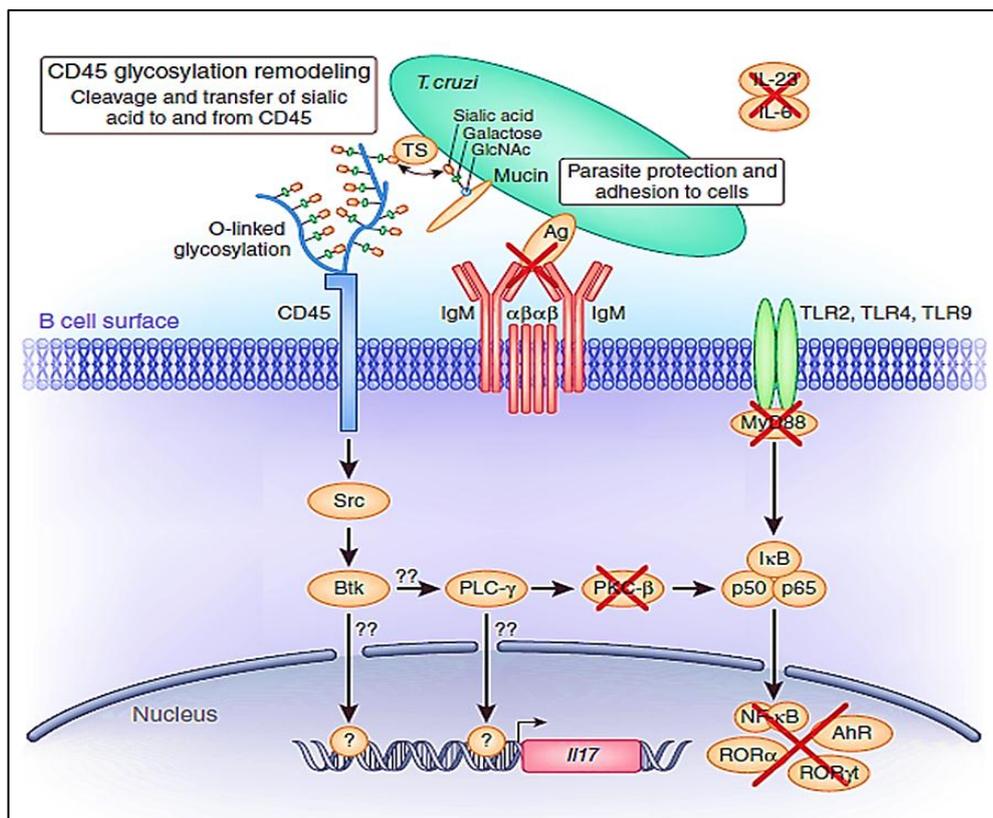
**Figura 1.22.** Papel de las EVs secretadas por *Trypanosoma cruzi* en la inmunomodulación y evasión de la respuesta por el hospedador [211].

La balanza entre el ataque del sistema inmune del hospedador y la capacidad inmunomoduladora del parásito converge hacia la progresión de la enfermedad hasta la fase crónica. Entre la fase aguda y la fase crónica existe una fase intermedia donde los niveles de parasitemia en sangre son bajos debido a la actuación de todas las células de la inmunidad innata que contrarrestan al parásito mediante su muerte.

Los macrófagos van a secretar IL-10 y TGF- $\beta$  que actúan inhibiendo la producción de IFN- $\gamma$  por parte del parásito confiriendo resistencia a la infección [214]. Además de la respuesta Th1 se ha

identificado otro tipo de respuesta en el hospedador infectado por *T. cruzi* mediada por la interleucina IL-17 [236]. Este tipo de respuesta se estudió en modelos *in vivo* de ratones deficientes de IL-17 frente a controles infectados con *T. cruzi*, mostrando los primeros fallos orgánicos y un aumento en sangre de marcadores del daño tisular [237].

Por tanto, la presencia de esta IL-17 es esencial para la muerte del parásito [236]. La expresión de IL-17 está asociada a una mejor función cardíaca en pacientes chagásicos con cardiopatías, sugiriéndola como un factor de protección frente al daño cardíaco [238]. Las células B de la zona marginal del bazo de ratones infectados son la principal fuente de IL-17, produciéndola mediante la vía independiente de ROR $\gamma$ t inducidas por las *trans*-sialidas de *T. cruzi* [239] (Figura 1.23).



**Figura 1.23.** Producción de IL-17 por células B activadas directamente por *T. cruzi* [240].

## Introducción

La síntesis de IL-17 por parte de las células B activadas no depende de ninguno de los activadores usuales para dicha respuesta en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> incluyendo la IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23, ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$  o Ahr, y tampoco depende de la señal generada por la presentación de un antígeno a los receptores de dichas células, ni de la señal policlonal a través de los TLR asociados a MyD88 como si ocurre en el caso de la producción de IL-12 por las células T y células linfoides innatas como consecuencia a una respuesta asociada a PAMPs [241]. En este caso, esta respuesta está asociada con las *trans*-sialidasas presentes en la superficie del parásito. Bermejo *et al.* (2013) [239] demostró que las *trans*-sialidasas presentes en la superficie de las formas infectivas tienen capacidad de disparar la producción de células B productoras de IL-17, de forma dosis dependiente, y en concreto, su dominio SAPA presente en el extremo N-terminal, implicado en la patogénesis de *T. cruzi* debido a su actividad enzimática, está implicado en dicha inducción en la producción de IL-17 como se demostró mediante el uso de una proteína natural con una mutación puntual (Tyr342His), la cual carecía de actividad enzimática así como mediante el uso de anticuerpos monoclonales con efectos neutralizantes frente a dicha región de las *trans*-sialidasas.

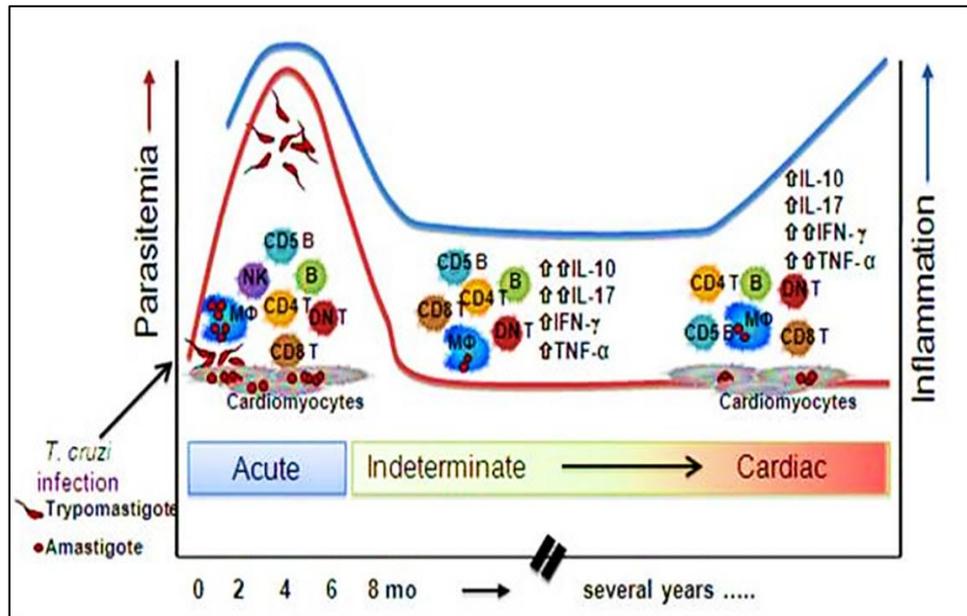
Además de este dominio y de su actividad, el receptor CD45 o Btk presente en la superficie de los linfocitos T y el cuál recibe el residuo de ácido siálico de la *trans*-sialidasa, también está implicado en la producción de IL-17 como se demostró mediante el uso de inhibidores específicos del mismo, los cuáles provocaban una disminución en los niveles de IL-17 en ensayos realizados sobre cultivos de células B co-incubadas con dichos inhibidores y tripomastigotes de *T. cruzi*, produciéndose una disminución de IL-17A y IL-17F. Por lo tanto, las *trans*-sialidasas de *T. cruzi* activarían al receptor CD45 mediante la

unión de residuos O-glicosilados provocando la cascada de señales para la transcripción del gen de *il17* dependiente de Scr y Btk [239].

A pesar de la protección frente a infecciones por determinados patógenos que proporcionan la activación de las células B productoras de IL-17, esta respuesta inmune también sería la responsable de provocar inmunopatologías asociadas a enfermedades crónicas inflamatorias [241, 242].

Una cardiopatía típica provocada por la enfermedad de Chagas se produce como consecuencia del escape de los parásitos al sistema inmune. Los tripomastigotes presentes en el torrente sanguíneo van a ser capaces de escapar a estos elementos de protección llegando hacia los tejidos cardiacos invadiendo los cardiomiocitos y estableciéndose en el corazón de forma crónica aunque investigaciones recientes también sugieren que *T. cruzi* accede a dicho tejido solo de manera eventual [243]. Durante la fase aguda, aparece un pico de parasitemia a los 14 días post-infección, y existe una respuesta elevada de anticuerpos frente al parásito como consecuencia de la respuesta policlonal de los linfocitos B activados, produciéndose en mayores niveles el isotipo IgG2a e incrementándose los niveles de IgM, IgG1, IgG3 e IgG2b [244].

Sin embargo, esta producción de anticuerpos, primeramente poco específicos frente a una gran variedad de antígenos vitales para el parásito, puede conllevar a reacciones cruzadas frente a los tejidos cardiacos durante la infección (mimetismo molecular) [245] (Figura 1.24).



**Figura 1.24.** Representación gráfica de la evolución de la respuesta inmune en el hospedador desde la fase aguda hasta la fase crónica en el caso de Chagas cardiaco [23].

La producción de auto anticuerpos por células B y T autoreactivas frente a miosina, actina y laminina presentes en el tejido cardiaco se produce durante la fase aguda de la enfermedad. Esto junto con la presencia de moléculas del parásito con homología a moléculas humanas, como por ejemplo, la proteína Calreticulina, conocida también por producir autoinmunidad en enfermedades como el Lupus eritematoso sistémico [246] o artritis reumatoide [247], podrían ser los responsables de la respuesta inflamatoria en las cardiopatías por Chagas [248] y de la persistencia del parasitismo a bajos niveles en las fibras cardiacas [249].

La enfermedad de Chagas no siempre discurre hacia una cardiopatía (20-30 %), sino que se pueden presentar pacientes infectados sin ningún tipo de afección (70 %) y otros con síndromes digestivos. En el caso de las patologías asociadas al tracto digestivo (10 %) [20], se deben al daño producido sobre los nervios del plexo

mientérico provocando descoordinación en los movimientos peristálticos, hipertrofia muscular y dilatación [250].

En los pacientes chagásicos con patologías digestivas existe un balance entre las citoquinas TNF- $\alpha$ /IL-10, con una mayor producción de IL-10 [251], TNF- $\alpha$  estimula la inflamación y la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa para producir NO, mientras que IL-10 realiza el proceso contrario junto con IL-4 capaz de inhibir la actividad microbicida de los macrófagos [214]. Los pacientes con patología indeterminada presentan los mismos niveles de citoquinas que los pacientes digestivos. Por tanto, la inmunosupresión del sistema inmune en la forma digestiva de la enfermedad de Chagas sería la responsable del daño del sistema nervioso mientérico.

Por todo esto, la respuesta inmune del hospedador y la capacidad de evasión de dicha respuesta dependerá del tipo de órgano que el parásito infecte, relacionándose esto último con el linaje al que pertenece el mismo como ha sido recientemente demostrado por Lewis *et al.* [252].



## 2. OBJETIVOS

---



## 2 OBJETIVOS

La presente tesis se ha enfocado en los siguientes objetivos:

1. Identificar las EVs secretadas por las diferentes formas biológicas de *Trypanosoma cruzi*.
2. Evaluar la capacidad de secreción de dichas EVs por parte de *T. cruzi* en diferentes condiciones fisiológicas.
3. Identificar la presencia de las proteínas pertenecientes a la superfamilia MASP, específica de *Trypanosoma cruzi* en dichas EVs, utilizando sus regiones constantes N- y C- terminal, correspondientes a proteínas MASP inmaduras para su caracterización.
4. Evaluar la respuesta humoral frente a las regiones MASP N- y C-terminal constantes en la secuencia de las proteínas MASP inmaduras en sueros de pacientes crónicos en función de su patología Chagásica.
5. Evaluar el papel que juegan dichas EVs y las proteínas inmaduras contenidas en ellas en la evasión de la respuesta humoral frente a las formas extracelulares de *T. cruzi*.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 PARÁSITOS

Para los experimentos realizados en la presente tesis se utilizó al protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, concretamente la cepa PAN4 y CL-Brener pertenecientes a las cepas TcI y TcVI respectivamente. La cepa PAN4 fue aislada previamente de la sangre de un paciente varón enfermo de Chagas residente en el Distrito de Arraiján, comunidad de Burunga (Panamá) en 2004 y donada a nuestro laboratorio en 2006 por la Dra. A. Ying de la Universidad de Panamá.

La fase epimastigote de *T. cruzi* fue cultivada en medio RPMI suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal Inactivado (SBFI) (v/v) a 28 °C de temperatura y agitación suave. Los cultivos se mantuvieron en fase logarítmica de crecimiento ( $1 \times 10^6$  parásitos/ml) haciéndose periódicamente resiembras para el mantenimiento de la cepa.

#### 3.2 METACICLOGÉNESIS IN VITRO DE *T. CRUZI*

Para la obtención de las formas tripomastigotas metacíclicas se procedió a la inducción de la diferenciación *in vitro* de las formas epimastigotas mediante la metodología descrita previamente por Osuna *et al.* (1979 y 1990) [50, 253]. Para ello, se partió de un cultivo de formas epimastigotas en fase logarítmica de crecimiento. El cultivo fue centrifugado a 500 x g durante 10 min para obtener un pellet compacto y eliminar el sobrenadante libre de parásitos. Se ajustó el número de epimastigotes mediante recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer, hasta obtenerse una concentración final de  $5 \times 10^4$  parásitos/ml. Posteriormente se realizó un lavado mediante centrifugación en las mismas condiciones anteriores del pellet en una solución de HANKS. Finalmente, el pellet fue llevado a un volumen de

## Materiales y Métodos

10 ml de medio Grace's modificado. Los cultivos fueron mantenidos durante 7 a 9 días en posición horizontal en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de volumen y sin agitación a 28 °C hasta observar una tasa de transformación del ~90 % mediante observación y recuento en cámara de Neubauer.

### **3.3 OBTENCIÓN DE LAS FORMAS AMASTIGOTAS Y TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS DE *T. CRUZI* A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES**

#### **3.3.1 Cultivo de células Vero**

Siguiendo el ciclo celular de *T. cruzi*, para la obtención de las formas intracelulares amastigotes, y las formas tripomastigotas sanguíneas por ruptura de las células infectadas, se procedió al uso de cultivo de células Vero. Dichas células fueron proporcionadas por el banco de líneas celulares del Centro de Instrumentación Científica (CIC), de la Universidad de Granada, con el código internacional para las células Vero de ATCC CCL-81.

El cultivo de las células VERO se realizó en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en cuya superficie crecen a modo de monocapa extendiéndose por todo el frasco. Las condiciones de cultivo son 37 °C de temperatura y 5 % de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (10 % de SBF1 (v/v)). El mantenimiento del cultivo se realizó mediante la tripsinización de las células por la adición de una solución de EDTA-Tripsina, previamente atemperado en un baño a 37 °C, y la incubación a 37 °C durante 10 min en la estufa de cultivo, para permitir la total separación de las células con la superficie del frasco y su disociación entre ellas. De esta manera, fueron centrifugadas a 500 x g durante 10 min para la eliminación del medio de la solución de EDTA-Tripsina sobrante y, tras un lavado con solución de HANKS, fueron sembradas de nuevo para obtener nuevos cultivos.

### 3.3.2 INFECCIÓN DEL CULTIVO CELULAR

Para la obtención de las formas amastigotes y tripomastigotes sanguíneos se procedió a la infección de las células Vero mediante la incubación con tripomastigotes metacíclicos. Previo a la infección del cultivo, se llevó a cabo la sincronización del ciclo celular del cultivo de células VERO. Para ello, se partió de un cultivo semi-confluyente de células a las que se le añadió medio DMEM (10 % de SBF1 (v/v)) e incubó con 25 mM de Timidina dejándolo en incubación durante al menos 9 h según el método descrito por Osuna *et al.* (1984) [77] para facilitar la infección.

Tras la sincronización, las células fueron lavadas tres veces con PBS y fueron puestas en contacto con los tripomastigotes metacíclicos previamente lavados y re-suspendidos en medio DMEM (sin SBF1) atemperado a 37 °C en baño. La relación parásito: célula fue de 10:1. Después de 12 h de incubación de las formas infectivas de *T. cruzi* con el cultivo de células VERO sincronizado, se procedió a retirar el medio con los parásitos extracelulares y el cultivo se lavó cuidadosamente tres veces con PBS y se le adicionó nuevamente medio DMEM (10 % SBF1 (v/v)).

Los cultivos se mantuvieron hasta un total de 7 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, haciendo un cambio de medio para evitar la muerte de las células por agotamiento de nutrientes y consecuente acidificación del mismo.

### 3.3.3 PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE TRIPOMASTIGOTES Y AMASTIGOTES DERIVADOS DE CULTIVO CELULAR INFECTADO

Tras la infección del cultivo de células VERO, se procedió a la purificación de las formas tripomastigotas sanguíneas (T) y amastigotas (A) liberadas al medio de cultivo como consecuencia de la ruptura de las

células infectadas, de acuerdo al método descrito por Osuna *et al.* (1986) [254], por centrifugación en gradiente de Percoll como describió Casstanys *et al.* (1984) [255]. Tras 96 h post-infección, las formas T fueron colectadas por centrifugación del medio a 300 x g durante 10 min. El pellet fue resuspendido en medio RPMI1640 hasta tres veces para obtener las formas T. El cultivo infectado se mantuvo un total de 8 días en medio DMEM suplementado con 10 % de SBFI. Tras esto, las formas A fueron colectadas y purificadas por centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll (1.100, 1.090, 1.080, and 1.070 g/ml).

Las formas T y A fueron mantenidas hasta 12 h en medio libre de células como se explica en el siguiente apartado.

### 3.4. PURIFICACIÓN DE EVS

#### 3.4.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO CON SBF LIBRE DE EVS

Con el fin de obtener EVs procedentes únicamente de todas las formas cultivables *in vitro* de *T. cruzi*, así como las liberadas por las células VERO, las cuáles son el objeto de estudio de esta tesis, se procedió a la eliminación total de EVs presentes en el SBF usado como suplemento en todos los medios de cultivo que fueron utilizados durante el desarrollo de la tesis. Para ello se siguió el siguiente método:

**1°.** Eliminación de restos celulares: Centrifugación del SBFI a baja revolución, 500 x g 10 min.

**2°.** Eliminación de orgánulos y/o cuerpos apoptóticos: Centrifugación del SBFI filtrado a 17000 x g 20 min. El sobrenadante obtenido fue filtrado por 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro.

**3°.** Eliminación de microvesículas (tamaño > 100nm): Ultra centrifugación del SBFi obtenido anteriormente a alta revolución (100000 x g 1 h).

**4°.** Eliminación de exovesículas (tamaño < 100 nm): Ultra centrifugación del SBFi resultante del paso tres a alta revolución y máxima duración. 100000 x g 18 h. El suero resultante libre de exovesículas (U-SBFi) se filtró finalmente por un filtro estéril de 0.22 µm de tamaño de poro y en condiciones de esterilidad.

Una vez eliminadas las exovesículas presentes en el SBF, éste fue usado para todos los experimentos posteriores.

#### 3.4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE EVs

Para la obtención de exovesículas secretadas por las distintas formas del parásito se procedió al ajuste del número de epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos y amastigotes para un total de  $1 \times 10^9$  parásitos/ml por cultivo. Los amastigotes y tripomastigotes sanguíneos fueron mantenidos en medio RPMI1640 y 25 mM Hepes suplementado con U-SBFi a un pH de 7.4 y 6.4 respectivamente.

En el caso de las formas epimastigotas (E), fueron centrifugados a 500 x g durante 10 min y posteriormente el pellet se lavó tres veces con PBS para eliminar restos del SBFi del medio. Finalmente, los parásitos fueron resuspendidos en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de U-SBFi.

En el caso de los tripomastigotes metacíclicos, se preparó medio Grace's modificado con U-SBFi al 10 % (v/v) que fue añadido a partir del momento en el que en el cultivo de transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos hubo un 80 % de tasa de transformación, tras retirar el medio de transformación suplementado con SBFi con exovesículas, mediante centrifugación a 300 x g 10 min de los

## Materiales y Métodos

parásitos, y posteriores lavados con solución de HANKS, y re-suspendidos en el nuevo medio Grace's modificado libre de exovesículas.

Los parásitos fueron mantenidos en sus respectivos medios durante un tiempo de 12 h como mínimo y un máximo de 72 h. Tras este tiempo se retiró el medio de secreción de exovesículas mediante centrifugación a 500 x g.

Por otro lado, para obtener las EVs secretadas en el momento de interacción parásito-célula, se procedió a la infección de un cultivo de células VERO como se describió en el apartado 3.3.2, usando como medio de cultivo medio DMEM sin SBFI. El medio de interacción (MI) fue recolectado tras 12 h de infección.

La viabilidad de los parásitos fue contrastada mediante observación al microscopio de los cultivos mediante tinción con azul tripán, permitiéndose sólo un 5 % de parásitos muertos.

Una vez obtenidos los medios que contienen las EVs secretadas de cada una de las formas del parásito, las exovesículas fueron purificadas según el método descrito por Lässer *et al.* ( 2012 ) [256] con algunas modificaciones realizadas tras la nueva estandarización del método publicado en 2013 por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) [257].

Los medios fueron centrifugados a 500 x g 15 min a 4°C. El sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 17000 x g durante 20 min a 4 °C para eliminar restos células, y posteriormente, fue filtrado mediante un filtro de tamaño de 0.2 µm (Sartorius) para eliminar partículas mayores de 200 nm. El sobrenadante filtrado se pasó a un nuevo tubo de centrífuga al que se le añadió inhibidores de

proteasas libre de EDTA (Roche). Tras esto se sometió a ultra-centrifugación a 100000 x g a 4 °C durante 1 h.

Este primer pellet contiene un primer grupo de exovesículas al que llamamos Ectosomas (ECs), y fue lavado con PBS al menos una vez para eliminar “impurezas” como complejos de proteínas agregadas, partículas de lipoproteínas y otros contaminantes.

Por otra parte, el sobrenadante de la primera ultra centrifugación a 100000 x g (S1) se sometió nuevamente a ultra-centrifugación a 100000 x g toda la noche. Este último pellet se lavó tres veces en PBS para finalmente obtener los exosomas.

Tanto los ectosomas como los exosomas fueron mantenidos en 50 µl de PBS con inhibidores de proteasas y 20 % de glicerol a -20 °C hasta su uso.

El proceso de ultra-centrifugado se llevó a cabo mediante el uso de una ultra centrífuga Avanti J-30I (Beckman Coulter) con el rotor JA-30.50 Ti y para los lavados para concentrar el pellet de Evs en tubos eppendorfs se usó la ultra centrífuga Sorwal WX80 y el rotor Fiberlite™ F50L-24 x 1.5 Fixed-Angle Rotor .

### **3.5. IDENTIFICACIÓN DE EVs**

Con el fin de verificar la existencia de EVs secretadas por *T. cruzi* cepa PAN4 se procedió a la observación de las mismas ya sea en la superficie del parásito como libres en el medio de cultivo o durante el proceso de infección de una célula.

Para ello se usó la técnica de microscopía de barrido y microscopía electrónica de transmisión como a continuación se explica.

### 3.5.1. **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

La técnica de microscopía electrónica de barrido permite la observación mediante imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra mediante la interacción electrón-materia.

Para la observación de las tres formas del parásito obtenidas como se describe anteriormente así como de células infectadas por las formas T del parásito, fueron fijadas sobre cubreobjetos de vidrio con solución de fijación durante 24 h a 4 °C. Tras esto, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación en una serie de diluciones de etanol/agua destilada al 10, 20, 30, etc., hasta 100 % de etanol con un segundo cambio de etanol absoluto. El secado de las muestras se realizó mediante punto crítico con CO<sub>2</sub>. Finalmente, las muestras se cubrieron con una fina capa de Carbono durante 3 min para ser finalmente observadas bajo el microscopio de barrido de alta resolución ZEISS Supra 40VP.

### 3.5.2 **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

La microscopía electrónica de transmisión permite la observación de la ultra estructura celular mediante cortes ultra finos. Para ello la muestra es fijada, deshidratada e incluida o no en una resina o bien de muestras líquidas previa fijación a un soporte o rejilla sobre la cual la muestra se fija y se contrasta. Para la observación de las EVs secretadas al medio por las formas tripomastigotas procedentes de cultivos celulares infectados se llevaron a cabo dos métodos diferentes de tratamiento de las muestras.

#### **A. Tinción Negativa**

La observación de las EVs (ectosomas y exosomas) se llevó a cabo mediante la técnica de tinción negativa. Las muestras a estudio estaban

constituidas por EVs (ectosomas y exosomas) aisladas y purificadas de cultivos de tripomastigotes derivados de cultivos celulares infectados.

Para ello se siguió el método de la gota:

1. Se puso una gota (5-20  $\mu$ l) de la muestra, sobre Parafilm.
2. Encima de la gota se colocó una rejilla de Níquel- Fomvar y se dejó incubar la muestra durante 30 min.
3. Posteriormente, la rejilla se pasó a una gota de agua bidestilada, y se realizó un total de 3 lavados.
4. Tras esto, la rejilla se puso en una gota de 50  $\mu$ l de agente de tinción y se dejó incubar durante 30-90 seg.
5. Finalmente, las rejillas se secaron en un papel de filtro por un lateral de la misma y se dejó secar completamente al aire.

### **B. Cortes Ultrafinos**

Para una observación más concreta de las EVs, tanto libres como en forma de cuerpos multivesiculares dentro de los parásitos, las muestras fueron fijadas durante 2 h a 4 °C con fijador. Posteriormente, se realizó un lavado con fijador, y otros tres lavados con PBS. Una vez lavadas las EVs y los parásitos, las muestras fueron deshidratadas en gradientes de etanol frío (-20 °C) (50, 70, 90 y 100 por dos veces) y se infiltraron en una mezcla de etanol puro con resina LR White mediante los siguientes pasos:

- Etanol 100 % más LR White (3:1) durante 4h a -20 °C.
- Etanol 100 % más LR White (1:1) durante 4h a -20 °C.
- Etanol 100 % más LR White (1:3) durante 4h a -20 °C.

## Materiales y Métodos

- LR White dos cambios durante 4h a -20 °C.

Tras esto, las muestras incluidas se polimerizaron en cápsulas de resina con luz ultravioleta durante 48 h a -20 °C y posteriormente a TA durante 24 h. Después del tallado de los bloques se procedió a la obtención de cortes ultra finos de 500 a 700Å de espesor en ultramicrotomo S o R (Leica), montados sobre rejillas de Níquel-Fomvar de malla 300.

Tanto por el método de la gota como por cortes ultra finos, las muestras son finalmente contrastadas en acetato de uranilo al 0.02 %. La visualización de las rejillas se llevó a cabo en un microscopio de transmisión Libra 120 PLUS de Carl Zeis SMT.

### 3.5.3 DYNAMIC LIGTH SCATERING

Los análisis por Dynamic Ligth Scatering (DLS) son usados de forma rutinaria para la detección de agregados en soluciones macromoleculares, determinar el tamaño de proteínas, ácidos nucleicos y complejos o para monitorizar la unión de ligandos.

De esta manera se procedió a la determinación del tamaño de las EVs presentes en el medio de excreción de los cuatro estadios del parásito. Para ello las muestras de EVs una vez purificadas fueron resuspendidas en una solución de 2 mg/ml de Albúmina bovina de suero (BSA) en solución acuosa con NaCl 0.1M.

La medida fue llevada a cabo usando un sistema Zetasizer Nano range system (Malvern Instruments).

### **3.6 MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE EVS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO MEDIANTE MARCAJE CON PRECURSORES RADIOACTIVOS**

#### **3.6.1 LIBERACIÓN DE EVS VS TIEMPO DE CULTIVO**

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa Pan4 ( $5 \times 10^6$  parásitos/ml) fueron resuspendidos en 10 ml de medio MTL (sin leucina y suplementado con 10 % U-SBFI v/v) y 5  $\mu$ Ci/ml del precursor L-[4,5-<sup>3</sup>H]-Leucina (Perkin Elmer). Los cultivos fueron incubados a 28 °C en distintos intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20 y 24 h) retirándoles el medio con el precursor en cada tiempo establecido. El medio con las EVs liberadas y marcadas radioactivamente en cada periodo de tiempo fueron purificadas mediante al protocolo de purificación y aislamiento por separado, como se describe en el apartado 3.4.2.

#### **3.6.2 LIBERACIÓN DE EVS EN CONDICIONES DE ESTRÉS DE TÉRMICO**

Cuatro cultivos de epimastigotes con una concentración de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml fueron resuspendidos en 25 ml de medio MTL (sin leucina y suplementado con 10 % U-SBFI v/v) con 5  $\mu$ Ci/ml de del precursor L-[4,5-<sup>3</sup>H]-Leucina. Cada uno de ellos fue sometido a una temperatura diferente (18, 28, 37 y 45 °C) durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron los epimastigotes mediante centrifugación y el sobrenadante se usó para la purificación de EVs como se describe en el apartado 3.4.2.

##### **3.6.2.1 LIBERACIÓN DE EVS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

Se utilizaron dos cultivos por separado de epimastigotes ( $5 \times 10^6$  parásitos/ml cada uno) en 10 ml de RPMI (sin aminoácidos y 10 % U-SBFI) y fueron incubados a 28 y 37 °C respectivamente durante 12 h.

## Materiales y Métodos

Por otra parte, también se utilizaron dos cultivos de tripomastigotes metacíclicos ( $5 \times 10^6$  parásitos/ml cada uno) en medio Grace's modificado (suplementado con 10 % U-SBFI) y se sometieron a las mismas temperaturas y al mismo tiempo que los dos cultivos de epimastigotes. Además, los cultivos de tripomastigotes se incubaron en presencia de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Lectina de germen de trigo (WGA = wheat germ agglutinin) durante 4 h a 37 °C. Tras esto, el cultivo se dejó decantar y el sobrenadante se centrifugó a 500 x g durante 10 min. Se obtuvo el pellet y se incubó con una solución 0.1 M de N-Acetilglucosamina en agitación durante 30 min.

Las EVs de los cuatro cultivos fueron marcadas mediante 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  del precursor radioactivo L-[4,5-3H]-Leucina. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de liberación de EVs y se procesó según el protocolo descrito en el apartado 3.4.2.

### 3.6.2.2 LIBERACIÓN DE EVS EN CONDICIONES DE DEPRIVACIÓN DE GLUCOSA

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa Pan4 ( $5 \times 10^6$  parásitos /ml por cultivo) fueron resuspendidos en medio MTL (suplementado con 10 % de U-SBFI v/v) al que se le adicionó 50 mg/l de 2- Deoxi - D- Glucosa (Sigma). A cada uno de ellos se le añadió 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  de del precursor L-[4,5-3H]-Leucina y fueron incubados 12 y 24 h a 28 °C respectivamente.

Como control del experimento dos cultivos de epimastigotes con la misma densidad se separaron en dos frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie en un volumen final de 25 ml de medio RPMI 1640 (suplementado con 20 % de U-SBFI v/v) con 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  del precursor L-[4,5-3 H]-Leucina e incubados a 28 °C durante 12 y 24 h respectivamente.

El sobrenadante de cada uno de los cultivos se obtuvo como se describió en los apartado 3.4.2.

### **3.6.2.3 INHIBICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE EVS MEDIANTE A TRAVÉS DE AGENTES INHIBIDORES DEL CITOESQUELETO**

Un cultivo de epimastigotes ( $5 \times 10^6$  parásitos /ml) fue mantenido en medio MTL (suplementado con 10 % de U-SBFI (v/v)) con 5  $\mu$ Ci/ml de del precursor L-[4,5-  $^3$ H]-Leucina, marcándose durante 24 h a 28 °C. A otro cultivo en las mismas condiciones de crecimiento se le añadió además 10  $\mu$ g/ml del inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto, Citocalasina B, durante 24 h. El sobrenadante de cada uno de los cultivos se obtuvo como se describió en los apartado 3.4.2.

### **3.6.2.4 LIBERACIÓN DE EVS DURANTE LA FASE S DEL CICLO CELULAR**

Partiendo de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, se procedió a la sincronización del ciclo celular de cultivo. Para ello, el cultivo fue lavado y transferido en medio fresco (RPMI suplementado con 20 % (v/v) de U-SBFI) con 20 mM de Hidroxiurea. El tiempo de incubación fue de 30 h, en los que todos los epimastigotes se sincronizaron en la fase S del ciclo celular. Tras esto, los parásitos se lavaron 3 veces con PBS.

El número de epimastigotes se ajustó a  $2.5 \times 10^6$  parásitos/ ml en 10 ml de RPMI (sin SBF) y cada cultivo fue marcado con 1  $\mu$ Ci / ml de los isótopos radioactivos L-[4,5- $^3$ H]-Leucina, T- [Metil- $^3$ H]- Timidina y de U-[ $^3$ H]-Uridina respectivamente. Los tiempos de marcaje fueron 4, 8, 12,16 ,20 y 24 h y la temperatura de incubación la misma para todos, 28 °C. Transcurrido el tiempo, los parásitos fueron centrifugados

Materiales y Métodos

a 500 x g durante 10 min y el medio de cada uno de ellos fue usado para la purificación de las EVs liberadas durante el tiempo de marcaje con cada uno de los precursores radioactivos, mediante la metodología descrita en el apartado 3.4.2.

### **3.6.3 DETERMINACIÓN DEL MARCAJE RADIOACTIVO MEDIANTE LA TÉCNICA DE CENTELLEO LÍQUIDO.**

Tras la obtención de las EVs en todos los experimentos en los que se realizó el marcaje con precursores radioactivos, se procedió a la determinación de la incorporación de los mismos en las EVs. Para ello se siguió el siguiente tratamiento a cada uno de las muestras:

Se adicionó un volumen igual al que se encuentran las EVs disueltas, de una solución de albúmina bovina (BSA) al 1 % (p/v) y TCA (ácido tricloroacético) al 10 % (p/V) e incubándose 1 h a 4 °C para permitir la precipitación de las proteínas presentes en las muestras. Tras la precipitación de las proteínas se procedió a eliminar la solución de precipitación mediante centrifugación en microcentrífuga a 13000 x g 15 min. Posteriormente los pellets se lavaron dos veces con una solución de TCA al 5 % (p/v). Finalmente para eliminar los restos de la solución de TCA se añadió el mismo volumen de etanol absoluto (99 % grado molecular), seguido de un lavado con una solución de etanol al 70 %. El exceso de etanol se eliminó mediante evaporación bajo flujo de aire.

Una vez los pellets se secaron completamente, se re-suspendieron en 50 µl de una solución 0.1 N de NaOH. Finalmente, una alícuota de los pellets se añadieron a 2 ml de líquido de centello.

La lectura de la radioactividad se realizó en un contador de partículas Beckman LS 6000 Scintillation Counter.

### 3.7 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE *T. CRUZI*.

#### 3.7.1 Inmunocitoquímica.

Para la inmuno-localización de las diferentes proteínas y péptidos tanto en EVs como en parásitos, se procedió al marcaje mediante el uso de anticuerpos específicos para cada uno de ellas, obtenidos mediante inmunización en diferentes animales de laboratorio y posterior obtención del suero policlonal como se explica en el apartado 3.9.

El inmuno-marcaje se realizó sobre cortes ultra finos tanto de EVs libres como de los parásitos y cultivos celulares infectados a distintos tiempos preparados como se explicó en el apartado 3.5.2. Tras esto se procedió al bloqueo de las mismas mediante la incubación de los cortes ultrafinos con gelatina de teleósteo al 1 % en PBS durante 10 min a TA. Seguidamente, se añadió tampón Glicina 0.02 M 10 min y finalmente, se bloquearon con ovoalbúmina al 1 % en PBS durante 5 minutos a TA. Tras esto, se procedió a la incubación de cada rejilla con su correspondiente anticuerpo primario, a una dilución de 1/20 y 1/50 en ovoalbúmina al 1 %. La incubación con el anticuerpo primario fue de 2 h a TA en cámara húmeda.

Tras la incubación con el anticuerpo primario se procedió al lavado de las rejillas con PBS durante 5 min tres veces y posteriormente incubadas con 20  $\mu$ l de anticuerpo secundario marcado con oro coloidal, de dos tamaños diferentes, 10 y 25 nm, a una dilución 1/20 en ovoalbúmina al 1 % en las mismas condiciones anteriores. Por último, las rejillas se volvieron a lavar primeramente 5 min con PBS cinco veces seguido de cinco lavados con agua ultra pura en un total de 25 min. Las rejillas se dejaron secar y finalmente se contrastaron con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo de Reynolds. La observación de las mismas se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Libra 120 PLUS de Carl Zeis SMT.

### 3.7.2 **WESTERN BLOT: DE LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS AL BLOTTING.**

La técnica de *immunoblotting* o *western blot* es un método que consiste en la transferencia de proteínas en un gel de poliacrilamida previa electroforesis SDS-PAGE a una membrana de filtro con el fin de localizar proteínas en una muestra a través de la incubación de la membrana con anticuerpos específicos frente a la proteína en cuestión. Esta técnica fue descrita por primera vez por Towbin *et al.* (1979) [258] y es una de las técnicas de rutina más utilizadas en los laboratorios para la identificación de proteínas. La metodología a seguir se describe en los siguientes apartados.

#### 3.7.2.1 **OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y EVS DE *T. CRUZI***

El primer paso para la realización de la técnica de western blot es la obtención y preparación de muestras. En este caso se partió de un cultivo de epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos y amastigotes de  $1 \times 10^7$  parásitos/ml. y de EVs de las tres formas del parásito como se describió en el apartado 3.4.

Para la obtención de las proteínas totales, pellets de Epimastigotes, tripomastigotes sanguíneos y Amastigotes se sometieron a ciclos de congelación/ descongelación  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 h lentamente. Tras esto los pellets se resuspendieron en tres volúmenes de solución de lisis (v/p) se incubaron durante 10 min en hielo. Pasado este tiempo, el pellet se sonicó 2 min en ciclos de 10 seg con 10 seg de descanso entre ciclos. Finalmente, se centrifugaron 10 min a máxima velocidad para eliminar restos y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.

Con el fin de obtener una muestra concentrada de proteínas en el mínimo volumen posible, se procedió a precipitarlas mediante una mezcla (1:1) de Acetona/ TCA al 10 % añadiendo tres veces del volumen inicial dejándose precipitar a 0°C durante 12 h. La mezcla acetona/TCA fue eliminada por centrifugación a máxima velocidad durante 10 min y se le realizó al pellet de proteínas tres lavados con acetona pura fría (-20 °C). Finalmente, la acetona se eliminó y el botón se dejó secar a TA bajo un flujo de aire laminar en la cámara de extractora de gases. El botón de proteínas se guardó a -20 °C hasta su uso.

En el caso de las EVs, tras el proceso de purificación éstas se resuspendieron en solución de lisis y se dejaron incubar 10 min en hielo. Posteriormente, se sometieron a un ciclo de sonicación de 5 min tres veces y se centrifugaron a 12000 x g durante 30 min. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su uso.

### 3.7.2.2 **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**

#### **A. Muestras de EVs. Método Micro BCA.**

Para la determinación de la concentración de proteínas en muestras de ecto y exosomas fue necesario el uso de un método con mayor sensibilidad debido a la poca cantidad de EVs aisladas en cada ultra centrifugación. Para ello se usó el kit comercial Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

Consiste en una formulación de ácido bicinconínico compatible con detergente para la detección colorimétrica y cuantificación de proteína total. El kit Micro BCA ha sido optimizado para el uso con muestras de proteínas diluidas (0.5-20 µg/ml). El método se basa en un reactivo detector para  $\text{Cu}^{1+}$ , el cual es formado cuando el  $\text{Cu}^{2+}$  es reducido por una proteína en un ambiente alcalino. Un producto de reacción de color púrpura se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión

## Materiales y Métodos

cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ). El complejo soluble en agua muestra una fuerte absorbancia a 562 nm que es lineal con el incremento de la concentración de proteínas.

Para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras de EVs primero realizamos una curva estándar con concentraciones conocidas de Albúmina de suero bovino (BSA) (Tabla 1).

**Tabla 1. Curva estándar con BSA mediante Micro BCA.**

| VIAL     | Vol. Diluyente( $\mu\text{l}$ )<br>(WR) | Vol. BSA<br>(1mg/ml) |
|----------|---|----------------------|
| <b>1</b> | 100                                     | 0                    |
| <b>2</b> | 99                                      | 1                    |
| <b>3</b> | 95                                      | 5                    |
| <b>4</b> | 90                                      | 10                   |
| <b>5</b> | 80                                      | 20                   |

El diluyente (WR) que provoca la reacción, se preparó utilizando una mezcla que contuvo 25 partes del reactivo MA del kit y 24 partes del reactivo MB del kit con una parte del reactivo MC (25:24:1; MA:MB:MC). Se prepararon tres réplicas por cada muestra de la curva patrón así como de las muestras problema. De cada muestra se añadió 5  $\mu\text{l}$  en 95  $\mu\text{l}$  de diluyente. Un total de 100  $\mu\text{l}$  por cada estándar y muestra es añadido a una microplaca de 96 pocillos (Thermo) y fue agitado durante 30 seg. Seguidamente se incubó durante 2 h a 37 °C.

Pasado este tiempo, la placa se deja enfriar a TA y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas Multiskan® Spectrum (Thermo Scientific).

### **B. Cuantificación de proteínas totales por el método Bradford.**

La cuantificación de proteína total obtenida de un extracto de las tres formas de *T. cruzi* (E, T y A) se cuantificó mediante el método colorimétrico Bradford [259]. Este método se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G-250 a las proteínas formando un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. El rango de concentración de proteínas que puede medir límite de detección del método es de 1 a 20 µg de proteína. Para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras se preparó una curva patrón de BSA con un rango de 0 hasta 10 µg/ml como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 2. Curva patrón de BSA. Reactivos y volúmenes**

| BSA<br>µg/ml | µl (0,1 mg/ml<br>BSA) | Vol. H <sub>2</sub> O<br>(µl) | Reactivo de<br>Bradford (µl) |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>0</b>     | 0                     | 800                           | 200                          |
| <b>1</b>     | 10                    | 790                           | 200                          |
| <b>2</b>     | 20                    | 780                           | 200                          |
| <b>4</b>     | 40                    | 760                           | 200                          |
| <b>6</b>     | 60                    | 740                           | 200                          |
| <b>8</b>     | 80                    | 720                           | 200                          |
| <b>10</b>    | 100                   | 700                           | 200                          |

Se mezclaron 5  $\mu$ l de cada muestra de proteína en 795  $\mu$ l de agua destilada junto con 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (Sigma). Tanto la curva patrón como las muestras a determinar se dejaron 15 min de incubación posterior a la adición del reactivo de Bradford con el fin de permitir la correcta formación del complejo proteína-colorante. Pasado este tiempo la concentración de proteínas en cada una de las muestras se determinó mediante espectrofotometría a 595 nm de absorbancia en un espectrofotómetro Milton Roy™ (Spectronic 3000).

### **3.7.2.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE EN GELES DE POLIACRILAMIDA.**

La electroforesis SDS-PAGE es un tipo de electroforesis donde las proteínas se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes ( $\beta$ -mercaptoetanol) que rompen los puentes di sulfuro y SDS, que homogeniza las cargas de las proteínas haciéndolas electronegativas, haciendo que se separen a través del gel como cadenas polipeptídicas aisladas. Por tanto, la separación se realiza por diferencia de tamaño y no de carga. Los geles están formados por acrilamida y bis-acrilamida que co-polimerizan a través de la reacción de vinil adición-polimerización, formando una matriz con un tamaño de poro que depende del porcentaje de acrilamida y bis-acrilamida que se vaya a usar.

La electroforesis SDS-PAGE es un sistema discontinuo formado por dos geles, un gel concentrador y un gel separador, que permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración de las proteínas se produce por un proceso de isotacoforesis en el gel concentrador, para posteriormente pasar por el gel separador produciéndose la migración de las proteínas a la misma velocidad cuando se le aplica un cierto voltaje dentro de un circuito eléctrico.

La preparación del gel se realizó usando cristales de 1 mm de grosor (Bio-Rad Laboratories, Inc). Primeramente se preparó el gel separador al 12 % de Acrilamida/Bis-Acrilamida, tras la adición sobre el soporte de cristal se añadió inmediatamente un volumen de isopropanol hasta el final del cristal para homogeneizar el borde superior del gel separador y evitar la aparición de ondas y burbujas. Se dejó polimerizar durante 30 min. Una vez polimerizado, se retiró cuidadosamente el isopropanol añadiendo agua para su eliminación total, y se añadió el gel concentrador hasta su polimerización.

Para llevar a cabo la electroforesis se usó un sistema de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc). También se usaron geles comerciales de gradiente de acrilamida (4 -20 %) (Mini-Protean TGX Gels Bio-Rad Laboratories, Inc). Como marcador de peso molecular se usó Precision Plus Proteins Standards All Blue (Bio-Rad Laboratories, Inc).

Las muestras se prepararon 1:1 con tampón de la muestra 2X y se calentaron durante 5 min a 95 °C en termoplaca. Seguidamente, se aplicó un pulso de 10 seg y se procedió a su carga en el gel. El voltaje necesario para que la electroforesis se llevase a cabo fue de 200 V con una intensidad de entre 20-25 mA en tampón de electroforesis.

#### **3.7.2.4 VISUALIZACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE TINCIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA**

Tras la separación electroforética de las proteínas mediante SDS-PAGE se procedió a la visualización de las mismas mediante la tinción con azul de coomassie. El colorante azul de coomassie se une a las proteínas a través de interacciones iónicas entre los grupos de Ácido sulfónico del colorante y los grupos amino positivos de las proteínas, así como a través de interacciones de Van der Waals. El azul coomassie más usado es el Coomassie R-250 (Brillant Blue-250, SIGMA). El gel se

incubó con la solución de tñido durante 90 min. Para la visualización de las proteínas teñidas se procedió con la retirada de la solución de tñición y se le añadió la solución de desteñido hasta la total eliminación del colorante, permitiendo la correcta visualización de las proteínas teñidas.

#### 3.7.2.5 **WESTERN BLOT.**

Tras corroborar el perfil de proteínas para cada una de las muestras, se procedió a la inmuno-detección de proteínas específicas de *T. cruzi* mediante el *blotting* de proteínas, técnica descrita por primera vez por Towbin *et al.* (1979) [258].

Para ello, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas separadas en la electroforesis a una membrana de polivinildenodifluoruro (PVDF) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Bio-Rad) Para el “electroblotting” se usó el sistema de transferencia Trans blot Turbo (Bio-Rad). Las condiciones de la transferencia fueron de 25 V y 0.5 Am durante 30 min para el caso de geles no comerciales y de 3 minutos para los geles comerciales de gradiente de acrilamida (4 -20 %).

Tras la transferencia, las membranas fueron bloqueadas en tampón de bloqueo durante 2 h a TA y agitación. Tras esto, se realizaron tres lavados con tampón de lavado de 10 min de duración cada uno. Como anticuerpos primarios se usaron anticuerpos policlonales producidos en ratón, conejo y rata frente a distintas proteínas de *T. cruzi* mediante inmunización de las mismas, así como anticuerpos comerciales (Tabla 3).

**Tabla 3. Anticuerpos primarios usados para la inmuno-detección en EVs mediante western blot.**

| Anticuerpo                            | Animal | Dilución |
|---------------------------------------|--------|----------|
| <b>Anti-PS<br/>MASP</b>               | Rata   | 1/500    |
| <b>Anti- C-<br/>Terminal<br/>MASP</b> | Ratón  | 1/200    |
| <b>Anti- EVs<br/>Tripo</b>            | Ratón  | 1/200    |

La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante 2 h a TA ó 4 °C “*overnight*”. Seguidamente, la membrana se lavó con tampón de lavado en tres periodos de 10 min cada uno y posteriormente se procedió a la incubación del anticuerpo secundario a una dilución 1/10.000 para IgG anti-rata HRP (SIGMA) y 1/5.000 para IgG anti-ratón HRP (DAKO), durante 90 min a TA. Tras lavar como en el paso anterior se procedió al revelado de la membrana mediante quimioluminiscencia con luminol Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc). Para la visualización de la quimioluminiscencia emitida se usó el sistema de imagen ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad).

### 3.8 DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS.

Con el fin de obtener anticuerpos específicos frente a los extremos conservados N- y C-terminal de las proteínas MASP de *T. cruzi*, se procedió al diseño de dos péptidos sintéticos de dichas regiones, para su posterior uso en la inmuno-detección de dichas proteínas en las

muestras de EVs obtenidas. El primer péptido corresponde a la secuencia consenso de aminoácidos del extremo amino terminal de la familia de proteínas MASPs, al que denominamos PS (péptido señal) constituyendo el péptido señal de la proteína [137] El segundo péptido sintético corresponde a la secuencia consenso de aminoácidos del extremo carboxilo terminal, sitio de anclaje a la membrana plasmática, y al que denominamos como C-terminal consenso, el cuál fue diseñado mediante el análisis entre secuencias del extremo 3'-MASPs de dos cepas de *T. cruzi*, PAN 4 y CL-Brener mediante la metodología que se describe en el apartado 3.8.5.

### 3.8.1 **EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR**

Para la obtención del ARN total de las formas tripomastigote metacíclico de las cepas PAN4 y CL-Brener se partió de un cultivo de  $1 \times 10^7$  parásitos/ml previamente lavados tres veces con PBS. Para la extracción del ARN total se usó el kit de extracción de ARN RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). La eliminación de la posible contaminación de ADNg se realizó mediante la adición de la enzima ADNasa suministrada por el Kit ARNse- free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany).

La concentración y pureza del ARN extraído se cuantificó mediante la medida de la absorbancia 280/260nm en un equipo Nanodrop- ND 1000 (Thermo Scientific), considerando a los valores próximos a 2.1 de suficiente pureza. El ARN total-fue retrotranscrito a ADNc partiendo de 1µg de ARN total de cada cepa mediante el uso de *random primers* y el kit de síntesis iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Inc).

La amplificación del extremo 3' conservado de los genes MASPs para cada cepa se realizó mediante el uso de cebadores específicos para dicha región denominados MASP-C F (5'- GGTCTCCCACACCACCTC -3') y MASP-C R (5'- CCACCACCGCAGTAGCAG -3').

Las condiciones de PCR para la amplificación fueron:

C0) Desnaturalización inicial: 95 °C, 10 min.

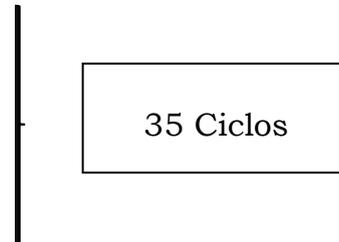
C1) Desnaturalización: 95 °C, 1 min.

C2) Hibridación: 50 °C, 1 min.

C3) Extensión: 72 °C, 1 min.

C4) Extensión: 72 °C, 8 min.

C5) Conservación: 12 °C.



La reacción de amplificación del ADN molde se llevó a cabo en un equipo Termociclador C-100 unido al módulo CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc).

### 3.8.2 ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Los amplicones obtenidos por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Los fragmentos de ADN migran en función de su carga desde el polo negativo hacia el positivo, en una cubeta de electroforesis a la que se le aplica corriente eléctrica, inmerso el gel en el componente amortiguador para evitar el excesivo calentamiento de la agarosa y la consecuente desnaturalización del ADN. En este caso como agente amortiguador se usó el tris-acetato-edta (TAE).

El protocolo que se siguió fue el siguiente: Se pesó para un gel de agarosa al 2 % 1g de agarosa en 50 ml de tampón TAE (1X). Tras fundir la agarosa, se dejó enfriar previo a la adición del agente intercalante ADN SYBR Green (1000X) (Invitrogen) para su posterior visualización por UV. Como marcador de peso molecular se usó el marcador HiperLadder I® (Bioline) de tamaño de bandas comprendido entre 200 y

1000 pb. A continuación, se separaron electroforéticamente las muestras a voltaje constante de 100 V durante 30 min en un equipo de electroforesis MAXI-VG (VWR) acoplado a una fuente de alimentación Power Pac HV (Bio-Rad Laboratories, Inc). La visualización de los fragmentos amplificados se realizó en un equipo transiluminador y fotodocumentador Benchop 2UV Transluminator (UVP).

### **3.8.3 PURIFICACIÓN DE ADN AMPLIFICADO DE GEL DE AGAROSA**

Para la purificación del ADN amplificado se empleó la electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (USBiological) y la extracción del mismo mediante corte de la banda obtenida mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el ADN, se cuantificó su concentración y pureza mediante la realización de las medidas de absorbancia a 280/260 y 230/260 utilizando un equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para asegurar la existencia de una única banda purificada y con el fin de obtener mayor concentración del fragmento de ADN a clonar, se realizó una segunda reacción de PCR siguiendo las condiciones anteriormente descritas. El producto de PCR total se obtuvo mediante el uso del kit “QIAquick PCR Purification kit” (QIAGEN).

### **3.8.4 TÉCNICAS DE CLONACIÓN**

Una vez obtenidos los extremos 3'-MASP de las dos cepas se prosiguió al clonaje de los mismos en el vector de clonación pGEM T®-Easy (Promega) como se describe a continuación.

#### **3.8.4.1 REACCIÓN DE LIGACIÓN**

Los sistemas de vectores pGEM-T y pGEM T®-Easy de Promega son sistemas convenientes para la clonación de productos de PCR.

Estos vectores han sido digeridos con la enzima de restricción EcoRV, y posteriormente añadidos Timidina 3' terminales en ambos extremos. Estas 3'-T sobresale en el sitio de inserción mejorando considerablemente la eficiencia de la ligación del producto de PCR en los plásmidos y previniendo la recircularización del vector. Además, contienen promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 flanqueando una región de clonación múltiple dentro de una región codificante para  $\alpha$ -péptidos de la  $\beta$ - galactosidasa. La inactivación por inserción del producto de PCR de los  $\alpha$ -péptidos permite a los clones recombinantes ser directamente identificados por el color de las colonias sembradas en placas que contienen el azúcar X-Gal como indicador.

Se procedió al ligado del extremo 3'-MASP de las cepas PAN4 y CL-Brener con el vector mediante el uso de la enzima T4 ADN Ligasa que cataliza la unión de dos hebras de ADN entre los grupos 5'- fosfato y 3'-hidroxilo de nucleótidos adyacentes. La reacción de ligado se resume en la Tabla 4.

**Tabla 4. Reacción de ligado vector pGEM T®-Easy y el producto de PCR.**

| REACCIÓN                             | VOLUMEN ( $\mu$ l) |
|--------------------------------------|--------------------|
| <b>Tampón de ligado 2X (Promega)</b> | 10                 |
| <b>Vector pGEM (50ng) (Promega)</b>  | 1                  |
| <b>Producto de PCR</b>               | 7*                 |
| <b>Inserto ADN control</b>           | 2                  |
| <b>T4 ADN Ligasa</b>                 | 2                  |
| <b>Volumen total</b>                 | 20                 |

## Materiales y Métodos

\*El volumen de ADN a insertar dependerá de la concentración obtenida tras su purificación y de la relación molar ADN: Vector, fundamental para que la reacción de ligado sea eficiente. Esta relación es de 3:1-a partir de una concentración de 50 ng de vector por reacción. Para calcular la adecuada cantidad de inserto a incluir en la reacción se usó la siguiente ecuación:

|   |
|---|
| $\frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb del vector}} \times \text{razón molar inserto: vector} = \text{ng de inserto}$ |
|---|

Una vez montada la reacción de ligado esta dejó incubar toda la noche a 4 °C. El ligado resultante se usó para transformar cepas bacterianas competentes portadoras de los clones obtenidos.

### 3.8.4.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES

Para la preparación de células bacterianas competentes se usaron las células bacterianas *E. coli* de la cepa JM109 ( $\geq 1 \times 10^8$  cfu / $\mu$ g ADN). Estas células están provistas con el sistema de vectores pGEM T®-Easy. Se procedió incubando previamente una resiembra de bacterias en medio líquido LB a 30 °C durante 12 h en agitación a 220 rpm. A continuación, se añadió 4 ml del pre cultivo a 100 ml de medio TYM y se incubó a 37 °C durante 2-3 h en agitación hasta que alcanzó una Densidad Óptica (D.O) de 0.5 a 600 nm en espectrómetro Spectronic 3000 de Milton Roy TM. Una vez obtenida la D.O deseada se centrifugó el medio a 3500 x g a 4 °C durante 5 min. El botón de bacterias se resuspendió en 15 ml de medio TFBI y se mantuvo en hielo durante 15 min, volviéndose a centrifugar a 3.500 x g a 4 °C durante 5 min. El botón de bacterias se volvió a resuspender en este caso en medio TFBI

frío, incubándose nuevamente en hielo durante 15 min. Tras esto, se hicieron alícuotas de 100µl de células competentes y se guardaron a -80 °C.

#### **3.8.4.3 TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES**

Para la transformación se usaron células bacterianas competentes de la cepa JM109. Para ello se descongeló un stock de estas células y se añadió 100 µl a un tubo de 1.5 ml. Posteriormente, añadimos 10 µl de la reacción de ligado y se mezcló mediante pipeteo suave dejándose incubar en hielo durante 20 min. Pasado este tiempo, se incubó la mezcla en el baño a 42 °C durante 42 seg provocándose así un choque térmico en las células. Inmediatamente después se pasó a hielo durante 2 min y se añadió 900 µl de medio SOC a TA y se le añadió a los 100 µl de la mezcla. Se dejó incubar a 37 °C en agitación a 225 rpm durante 45 min. Una vez terminado este periodo de tiempo, se procedió al sembrado de las células transformadas en placas con medio LB Agar suplementado con Ampicilina como antibiótico de selección, IPTG como inductor del gen de la β- Galactosidasa y X- Gal como sustrato para el gen anterior (X-Gal) y se dejaron incubar 12 h a 37 °C.

#### **3.8.4.4 SELECCIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMANTES**

La clonación satisfactoria de un inserto dentro del vector pGEM®-T Easy interrumpe la codificación de la secuencia del gen para la enzima β-galactosidasa, por tanto, los clones recombinantes se pudieron identificar por visualización del color de las colonias debido a que al interrumpirse la síntesis del gen de la enzima, ésta no utiliza su sustrato, X-Gal que produce color azul, y las colonias transformantes aparecen con un color blanquecino. Tras seleccionar los clones

“positivos”, éstos se sembraron en placas LB Agar suplementado con Ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C.

Tras haber realizado la transformación y el crecimiento aislado de los clones positivos, estos se confirmaron mediante PCR con los cebadores utilizados en la sección 3.8.1.

En primer lugar, se resuspendió cada posible clon positivo de una colonia aislada en 25µl de agua ultra pura y se lisó por choque térmico a 99 °C durante 2 min. A continuación, se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min y se mantuvieron en hielo para evitar la actuación de ADNasas. Tras obtener el ADN total bacteriano libre de restos celulares se realizó una reacción de PCR con las mismas cantidades y condiciones que se detallaron en la sección 3.8.1.

Tras la reacción, se continuó con la comprobación en gel de agarosa al 2 % para confirmar la existencia de bandas amplificadas. Una vez comprobado que dichos clones eran positivos, se creció una colonia de cada clon en 5 ml de medio LB líquido suplementado con 5 µl de Ampicilina y se dejó crecer en agitación a 240 rpm a 37 °C durante toda la noche, al fin de proceder a la extracción del ADN plasmídico como se describe a continuación.

#### 3.8.4.5 **AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO**

Para purificar el ADN plasmídico de los clones positivos se utilizó el kit comercial “Pure Yield™ Plasmid Miniprep System” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras obtener el ADN plasmídico puro de cada clon se midió la concentración y pureza del mismo como se describió anteriormente.

#### 3.8.4.6 **SECUENCIACIÓN DE ADN**

La secuenciación del ADN se realizó en servicio de secuenciación del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada así como en el servicio de secuenciación de ácidos nucleicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC).

La reacción de secuenciación se llevó a cabo usando una concentración de ADN molde de 0.4 a 0.8 µg en el caso de ADN plasmídico y entre 0.07 a 0.1µg para productos de PCR. Los cebadores se utilizaron a una concentración de 6.4pmol para un volumen final de 12 µl.

#### 3.8.5 **ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS**

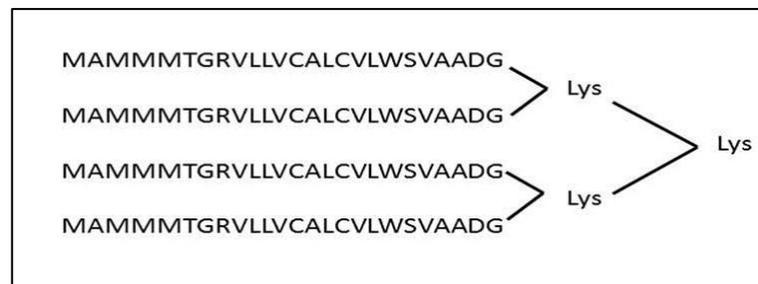
Tras la secuenciación de todos los clones positivos se procedió al análisis bioinformático de las secuencias obtenidas. Para obtener la secuencia consenso de la región C-terminal MASP se analizaron un total de 200 secuencias de proteínas MASP obtenidas a partir de las base de datos del genoma de *T. cruzi* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) y el programa bioinformático Multiple Em for Motif Elicitation 4.3.0. (MEME) ([http://meme.sdsc.edu/meme4\\_4\\_0/intro.html](http://meme.sdsc.edu/meme4_4_0/intro.html)). El análisis se realizó con el máximo número de caracteres (=200 secuencias C-terminal MASP) permitido por el programa como entrada.

El análisis comparativo de los clones secuenciados se realizó mediante el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2> ). Tras esto se obtuvo la secuencia consenso del extremo C-terminal de las proteínas MASP comunes entre las dos cepas comparadas y al cuál llamamos C-terminal consenso y que se utilizó para su inmunización en ratones. Además, para el estudio de la respuesta inmune humoral asociada esta

## Materiales y Métodos

secuencia fue dividida en 6 péptidos solapados en 12 de los 15 aa (C1-C6), así como la región C-terminal de la proteína MASP52 (C7). La síntesis de todos los péptidos se llevó a cabo por Genscript (USA, Inc.) con una pureza > 98 %.

En el caso del extremo N-terminal MASP se realizó una modificación en su síntesis añadiendo cuatro ramas unidas por residuos de Lisinas (Lys-) para aumentar el tamaño de la molécula y hacerlo más inmunogénico. Su síntesis fue llevada a cabo por LifeTein LLC.



**Figura 3.1.** Representación de la molécula del péptido PS sintético.

### 3.9 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.

#### 3.9.1 ACOPLAMIENTO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO A UNA PROTEÍNA CARRIER

Debido al tamaño tan pequeño de estos péptidos sintéticos, la respuesta inmune suele ser débil o incluso ni siquiera llegar a ser reconocidos. Por ello, es necesaria la unión de estos péptidos sintéticos con otras proteínas que les hagan aumentar de tamaño y, por tanto, ser detectados por el sistema inmune y generar respuesta. A estas proteínas se les llama *Carrier* con un tamaño entre 2-5 kDa, y son proteínas inmunogénicas que se unen a un péptido sintético no inmunogénico que se comporta como Hapteno.

El acoplamiento del péptido sintético a la proteína carrier se llevó a cabo mediante el uso de glutaraldehído el cuál actúa como un reactivo de acoplamiento bifuncional uniendo dos componentes a través de sus grupos amino.

Por otra parte, como proteína carrier se usó la hemocianina de cangrejo ó KLH (SIGMA). Su gran tamaño hace que sea muy inmunogénica y su gran número de residuos de Lisina (Lys-) disponibles lo hacen muy útil como portador de haptenos.

Para la unión péptido sintético C-terminal consenso con la proteína carrier se pesó 1 mg de péptido y se disolvió en 100 µl de DMSO hasta su completa disolución completando con 900 µl de PBS. Se mezcló con la misma concentración de KLH (5 mg/ 4 ml) y 0.1 % de glutaraldehído en un volumen final de 20 ml de tampón carbonato pH 8. Se dejó incubar durante 12 h a TA en rotación. Seguidamente se añadió a la solución péptido-KLH 500µl de Glicina 1M para el bloqueo de los grupos amino libres; y se dejó incubar en agitación durante 4 h a TA. Para finalizar, se dializó la solución en una membrana de diálisis de 3.5 kDa (Sprectra/Por, Spectrum Laboratories) de tamaño de poro, previamente hidratada en el tampón de diálisis durante 12 h en tampón de diálisis. Transcurrido este tiempo, se realizaron cambios del tampón de diálisis cada 2 h hasta un total de cuatro cambios. Finalmente, la solución dializada se guardó a -20 °C durante 8 h para su posterior liofilización en un liofilizador LyoQuest-85 (Telstar).

Una vez liofilizado, el complejo péptido-*carrier* se resuspendió en 1 ml de PBS para la determinación de la concentración de proteína por el método Bradford anteriormente descrito en el apartado 3.7.2.2.

En el caso del péptido PS y de las proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4 y CL-Brener no fue necesario el acoplamiento a una proteína carrier por tratarse el primero de un

péptido sintético ramificado con cuatro ramas como se describe en el apartado 3.8.5.

### 3.9.2 **FIJACIÓN DE EVS CON GLUTARALDEHÍDO**

Siguiendo el mismo procedimiento de unión de un péptido a una proteína *carrier* se llevó a cabo la fijación de las proteínas presentes en la cubierta de las EV liberadas por las formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Para ello un total de 140 µg de proteínas totales de EVs fueron resuspendidas en una solución de Glutaraldehído al 2.5 % en tampón Cacodilato a pH 7.2. La fijación se llevó a cabo en agitación a 4 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se trató la muestra con una solución Glicina 1M y se dejó en agitación durante 4 h a TA con el fin de bloquear los grupos aldehídos libres.

Para finalizar se dializaron las muestras para eliminar el exceso de Glutaraldehído y de Glicina mediante casetes G2 de diálisis Slide- A- Lyzer (Thermo Scientific). Para ello se hidrató la membrana del casete introduciéndose previamente en el tampón de diálisis durante 2 min. Posteriormente, se introdujo la muestra en la membrana sumergiéndose totalmente en tampón de diálisis. La diálisis se llevó a cabo durante 24 h a 4 °C haciéndose un total de 4 cambios del tampón de diálisis.

Tras la diálisis, la muestra finalmente fue liofilizada y guardada a - 20 °C hasta su uso.

### 3.9.3 **PROCEDIMIENTO DE INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DEL SUERO**

Tras obtener y conocer la concentración de las proteínas, péptidos y EVs a inmunizar, se procedió a la inmunización de ratones de la cepa BALB/c, ratas cepa Wistar y conejos hembras albinas para la obtención de una batería de inmunoglobulinas específicas frente a los mismos.

La concentración de antígeno a inmunizar depende del tamaño del animal a inmunizar. En el caso de los ratones, la dosis de inmunización fue de 20 µg por inmunización del péptido C-terminal consenso-KLH y 10 µg para las proteínas de las EVs-T. Para el péptido PS en ratas la dosis por inmunización fue de 100 µg y para PTTC (proteína total de *T. cruzi*) la dosis por conejo fue de 320 µg. La administración de cada antígeno se realizó por vía intraperitoneal de una solución compuesta por el antígeno previamente diluido en PBS en el caso del PS y PBS más adyuvante de Freud's (SIGMA) en una proporción 1:1. La primera inoculación del antígeno se acompaña de adyuvante de Freud's completo, siendo las siguientes con adyuvante de Freud's incompleto. Los adyuvantes consisten en una emulsión estabilizada de aceite no metabolizable en agua que contiene paredes bacterianas pertenecientes a *Mycobacterium*. El adyuvante incompleto posee la misma composición pero sin bacterias y ayuda a producir concentraciones más altas y duraderas de anticuerpos.

Se realizaron 4 inoculaciones con intervalos de 15 días hasta un total de 40 días de inmunización. Previo a la primera inoculación, se realizó la extracción de sangre por punción en la vena submandibular para la obtención de suero pre-inmune que se utilizó como control de la inmunización y como suero negativo en los diferentes experimentos a realizar. Para la evaluación y seguimiento de la producción de anticuerpos por parte del animal, se extrajo sangre cada 7 días post-inoculación del antígeno para su análisis por test ELISA.

Tras los últimos 7 días después de la última inoculación del antígeno, se sacrificaron los animales mediante punción cardíaca previa anestesia con isofluorano (Forane, Abbot). La sangre se recogió en tubos colectores (BD Microtainer® tubes) y se incubó 30 min a 37 °C tras los cuales se mantuvo 3 h a 4 °C, a fin de favorecer la retracción del coágulo y obtener el máximo volumen de suero. Una vez coagulada la

sangre se centrifugó a 5000 x g 5 min y el suero resultante se pasó a nuevos tubos para su almacenaje a -20 °C diluidos 1:1 para su correcto almacenamiento y mantenimiento.

#### **3.9.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LOS PÉPTIDOS, PROTEÍNAS Y EVs ENSAYADAS Y SUS ESPECIFICIDADES MEDIANTE TÉCNICA ELISA**

Para evaluar la respuesta inmune frente a las moléculas antigénicas a ensayar se realizó la titulación de los sueros obtenidos mediante la técnica ELISA.

El método ELISA (Enzyme- linked Immunosorbent Assay) es una técnica cuantitativa que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una señal o una reacción enzimática. Para la determinación del título de anticuerpos de los sueros obtenidos tras la inmunización de los ratones y ratas con nuestros antígenos de interés se llevó a cabo el método ELISA indirecta. Se utilizaron placas de 96 pocillos tipo Amino (Nunc, Thermo) y debido al carácter hidrofóbico de los péptidos sintéticos estos fueron resuspendidos en tampón carbonato a una concentración final de 5 µg/pocillo. Para la adsorción del antígeno a la placa, se incubó a TA 1 h en agitación, seguido del lavado en tampón de lavado por tres veces. A continuación, la placa fue bloqueada con 250 µl de tampón de bloqueo 2 h a 37 °C. La solución de bloqueo se eliminó mediante tres nuevos lavados con tampón de lavado.

Seguidamente, se añadieron cada uno de los sueros a ensayar, en el caso de los sueros de los animales fueron diluidos en PBS de forma seriada desde 1/200 hasta 1/6400 e incubados durante 1 h a 37 °C en agitación. Tras otra tanda de tres lavados en tampón de lavado, se incubó la placa con cada anticuerpo secundario correspondiente (anti-inmunoglobulinas totales de ratón y de rata marcadas con Peroxidasa

(DAKO) diluido 1/1000 en PBS. Tras 1 h a 37 °C de incubación, se volvieron a lavar las placas y se procedió al revelado de la unión antígeno-anticuerpo añadiendo 100 µl de la solución sustrato de la Peroxidasa en oscuridad durante 30 min a 37 °C tras los cuales se paró la reacción añadiéndose 50 µl de la solución de parada a cada pocillo. La lectura de las placas se realizó en un lector de ELISA MultiSkan Spectrum (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 492 nm.

Para calcular el valor de corte se usó la siguiente fórmula: (Media de absorbancia + 3 SD) de los sueros negativos.

Una vez conocida la respuesta inmune de los animales inmunizados frente a los antígenos de interés, se procedió al ensayo del péptido señal de las proteínas MASP , y de los péptidos solapantes correspondientes a la región C-terminal (C1-C7) frente a una batería de sueros de pacientes de Chagas cedidos por el Centro de Transfusión de Sangre en Valencia (CTSV), correspondiente a una población de inmigrantes procedentes de Bolivia y Argentina (n=15) clasificados como digestivos, cardiópatas y asintomáticos confirmados por dos técnicas inmunológicas (IFI y kit de ELISA comercial), y cuya parasitemia fue confirmada por PCR. Además fueron tipificados como enfermos de Chagas por la cepa de *T. cruzi* clasificada como TcI. Otros 10 sueros procedentes del CTSV seronegativos para Chagas fueron usados como controles.

Por otro lado se usó una batería de sueros (n=161) cedidos por el Dr. Alejandro Schijman, investigador de CONICET (Argentina), seropositivos por dos test inmunológicos, y cuya parasitemia por PCR fue positiva. De los 161 sueros, 42 fueron inicialmente probados frente a los péptidos C1 al C7 de la región C-terminal, clasificados como digestivos (n= 11), cardiópatas (n= 14) y asintomáticos (n= 12) y negativos (n=5), procedentes de Brasil y tipificados como TcII. Estos

## Materiales y Métodos

sueros fueron clasificados según su historial médico, examinación física, electrocardiograma (ECG), análisis de rayos X, ecocardiografía Doppler, etc., como Cardiópatas Arrítmicos (n=36), Cardiópatas-Insuficientes cardiacos (n= 28), Digestivos (n=28) y Asintomáticos (n=31).

Todos los protocolos que involucraron sujetos humanos fueron aprobados por el Comité Ético Médico del Hospital Ramos Mejía de Buenos Aires y la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta y el Hospital San Bernardo de Salta, Argentina.

Los sueros fueron enfrentados al PS MASP, a la región C-terminal MASP y a proteínas solubles totales de epimastigotes de *T. cruzi* a la misma cantidad por pocillo (5 µg/ pocillo) y a la dilución de 1/100 total, usando como anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas IgG humanas (Sigma) a una dilución 1/1000.

### 3.9.5 **DISOCIACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS (ICs).**

Los sueros procedentes de Argentina fueron divididos en dos grupos, sueros con inmunocomplejos (CICs) y sueros sin inmunocomplejos (SICs). Para la disociación de los inmunocomplejos, una alícuota de 20 µl de cada suero fue diluida en solución Glicina-HCl 0.1M pH 4.5 hasta una concentración final de 1/100 e incubados en agitación durante 15 min a TA. A continuación, se centrifugaron a 500 x g durante 30 min para eliminar los restos de células presentes en el suero. Los sobrenadantes se pasaron a tubos nuevos y se volvieron a centrifugar a 17000 x g 30 min. Finalmente, se realizó un último paso de ultra centrifugación de los sobrenadantes a 100000 x g 1h at 4 °C en una ultracentrífuga Sorwal WX80 y rotor Fiberlite™ F50L-24 x 1.5 Fixed-Angle Rotor en microtubes (Hitachi No 1508) de 1.5 ml. El sobrenadante se pasó a nuevos tubos y se les añadió 20 µl de solución

NaOH 1N para neutralizar el pH ácido y para finalmente ensayarlos mediante ELISA frente al péptido PS y proteínas totales de *T. cruzi*.

Para valorar la respuesta de los sueros sin inmunocomplejos se compararon con los mismos sin tratar, es decir, con inmunocomplejos (CICs) a la misma dilución (1/100) siguiendo el protocolo de la técnica ELISA descrito en el apartado 3.9.4.

El pellet obtenido tras la última ultracentrifugación corresponde a las EVs procedentes de cada uno de los sueros de los grupos de pacientes con patologías Chagásicas tras el tratamiento libres de IgGs.

Para comprobar la correcta separación de los ICs de los sueros, se determinó la concentración de las proteínas de las EVs purificadas libres de IgGs de cada grupo mediante el quit de ensayo de proteínas micro BCA Thermo Scientific TM) como se explicó en el apartado 3.7.2.2.

### 3.9.6 **Detección de EVs por ELISA**

Se usaron placas de 96 pocillos PolySorp (Nunc, Thermo) los cuales fueron cubiertos con 5 µg/ml de anticuerpo anti-PS MASP (obtenido en ratas) en un volumen de 100 µl /pocillo en tampón carbonato (pH 9.6) y se dejó incubar durante toda la noche a 4 °C. Después de tres lavados con PBS los pocillos se bloquearon con 300 µl de tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se procedió a la incubación de la placa con las EVs de los sueros de argentina obtenidos tras el tratamiento para la eliminación de ICs (EVs tratadas), en un volumen total de 50 µl e incubados toda la noche a 37 °C. Tras esto, los pocillos fueron nuevamente lavados tres veces con PBS, y se procedió a la adición de dos anticuerpos diferentes: inmunoglobulinas en ratón anti-EVs-T, inmunoglobulinas anti-PTTC obtenidas en conejo y anticuerpos

## Materiales y Métodos

monoclonales anti-CD9 (Biolegend), a una concentración de 5 µg/ml en PBS (100 µl por pocillo) y, por otra parte, se adicionó en ensayos diferentes 100 µl de una dilución 1/100 de los sueros de los pacientes en PBS tras el tratamiento para eliminar los anticuerpos unidos a ICs.

Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C en agitación. Tras el lavado 3 veces en PBS, se añadió 100 µl de anticuerpo secundario anti-ratón HRP (DAKO) a una dilución 1/10000 en PBS, anticuerpo secundario anti-conejo HRP (DAKO) dilución 1/2000 y anticuerpo secundario anti-Humano (H+L) HRP (SIGMA) dilución 1/1000, y se dejó incubar 1 h TA. Finalmente, se procedió al revelado posteriormente del lavado con PBS mediante incubación con la solución sustrato de la Peroxidasa durante 15 min (SIGMA). La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 3M y se realizó la lectura a 492 nm.

### **3.9.7 DETECCIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS “INMUNOGLOBULINAS-EVs” MEDIANTE ELISA**

Para la detección de inmunocomplejos “inmunoglobulinas-EVs” en los sueros de los pacientes chagásicos procedentes de Argentina (n=123), se procedió a la incubación de placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Thermo) de cada uno de las EVs obtenidas de cada grupo de sueros chagásicos sin previo tratamiento para la eliminación de los anticuerpos presentes en los ICS, según el protocolo descrito en el apartado 3.9.5. Se añadieron 5 µg/ml de EVs purificadas del suero disueltas en 50 µl de tampón carbonato (pH 9.6), incubándose toda la noche a 4 °C. Tras esto se procedió al lavado tres veces con PBS y, posteriormente, los pocillos se bloquearon con tampón de bloqueo toda la noche a 4 °C. El agente de bloqueo se eliminó con tres veces PBS y se incubaron con una dilución 1/1000 de anticuerpo anti-humano (H+L) HRP (SIGMA) durante 1 h a 37°C en agitación. Tras esto se siguió el

mismo protocolo para una ELISA convencional como se describe en el apartado 3.9.4.

Como control de reactividad en los ensayos de inmunocaptura por la posible presencia de la enzima Peroxidasa en dichos ICs, se realizó la incubación de las EVs tratadas de cada grupo de sueros capturadas en los pocillos mediante el anticuerpo anti-PS MASP y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-humano (H+L) HRP (SIGMA) a una dilución 1/1000 para posteriormente ser incubados con la solución sustrato Peroxidasa siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

### 3.10 **Inhibición de la lisis mediada por Complemento.**

Para la determinación de la capacidad del parásito de evadir la actividad del complemento durante la enfermedad de Chagas se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la lisis mediada por el sistema del Complemento humano.

#### 3.10.1 **MARCAJE DE LAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* CON EL ISÓTOPO CR<sup>51</sup>**

Se partió de un cultivo de formas epimastigotas del parásito en crecimiento exponencial ajustándose el número de parásitos a  $1 \times 10^7$  epimastigotes/ml. El cultivo se centrifugó a  $1500 \times g$  15 min y se reemplazó con medio RPMI (Gibco LTD. Middlesex, England; UK) suplementado con 10 % de SBF1 más 50 mCi/ml of Cr<sup>51</sup> (actividad específica de 200-900 Ci/mol (DUPONT, USA)). Después del marcaje durante 2 h a 28 °C, los parásitos fueron lavados tres veces por centrifugación en medio frío. El pellet se resuspendió en tampón Veronal (VB, 10 mM barbital/NaCl 145 mM, CaCl 0.15 mM/MgCl 0.5 mM, pH 7.4 (Virion).

Una vez marcados los parásitos con el radioisótopo, se procedió al ensayo de la capacidad para competir con anticuerpos opsonizantes tanto de los péptidos sintéticos SP , C1-C7 y C-terminal consenso , así como de las EVs secretadas por las formas E, T y A de *T. cruzi* mediante la siguiente metodología:

### I. Cálculo de CH50.

Primeramente se realizó el cálculo de CH50, es decir, la concentración del complemento para la cual aún sigue siendo activo produciendo la lisis del 50 % de las células, en este caso, de las formas E marcadas con Cr<sup>51</sup>. Para ello 2.5x10<sup>6</sup> parásitos/ml fueron tratados a diferentes diluciones de complemento humano (CHS) (SIGMA) (1/200,1/100,1/50 y 1/25) en tampón Veronal más el 10 % de un pool de sueros positivos para Chagas (determinado por ELISA con un título de 1/500) previamente inactivado a 56 °C 30 min e incubados a 37°C 1 h. Tras esto los diferentes tubos fueron centrifugados a 17000 x g 5 min. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos para su posterior medida de la radiactividad liberada. Por otra parte, los pellets fueron tratados con 1 ml de solución SDS 0.1 % NaOH 1N y transferidos a nuevos tubos, añadiéndose para ambos casos hasta un total de 3 ml de Ultima Gold LC Cocktail (SIGMA) (líquido de centelleo). La radiactividad fue determinada mediante la lectura en un contador de partículas  $\gamma$ -Spectrometre (Beckman, LS6000) con el objetivo de calcular la liberación específica de Cr<sup>51</sup> mediante las siguientes fórmulas:

$$\%LE = \frac{CPMSbn.Ctrl.}{CPMSbn.Ctrl. + CPMpelletCtrl.} \times 100$$

$$\%LSP = \frac{CPMSbn.Prb.}{CPMSbn.Prb. + CPMPelletPrb.} \times 100$$

% LE = liberación espontánea; % LSP= liberación específica; CPMSbn= CPM en sobrenadante; CPM pellet= CPM en pellet; Ctrl= control; Prb= problema.

El cálculo de la DL50 (dilución letal 50) del complemento para la lisis del parásito (CH50) fue obtenida mediante regresión lineal de los datos para la liberación específica de las diferentes diluciones del complemento mediante el software Graph Path InStat version 3.06 software.

### 3.10.2 **Ensayo *in vitro* de la protección a la lisis mediada por el complemento**

Tras la determinación de la concentración letal del complemento para el 50 % de los parásitos, se procedió a la incubación de las formas E-Cr<sup>51</sup> con tres grupos de pools de sueros de enfermos crónicos de Chagas diferenciados por presentar patologías diferentes (digestiva, cardíaca o asintomática) junto con la concentración óptima de CHS (CH50=1/18) y 1 µg /100 µl de cada elemento inmuno protector a ensayar ( péptidos PS MASP, C1,C2,C3,C4,C5,C6, C7 y C-terminal consenso, EVs -E, EVs-T y EVs-A), todos incubados a 37 °C durante 1 h. Como control positivo se usó el pool de sueros a de los pacientes con Chagas sin inactivar y como control negativo un pool de loa tres grupos diferentes de sueros previamente inactivados (56 °C 30 min en baño) y sin suplemento de complemento humano.

Tras el tiempo de incubación las muestras fueron procesadas como se ha descrito en el apartado 3.10.1. Los datos del porcentaje de inhibición de la lisis fueron calculados por la fórmula % IC= (LspC-Lsp/LspC) x100, donde % IC es el porcentaje de inhibición del complemento.

### 3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de significancia, con el objetivo de comparar las medias entre los diferentes grupos en los distintos ensayos, utilizándose para ello el programa GraphPad InStat v 3.05. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante un Test ordinario ANOVA de una vía, donde  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*) fue considerado extremadamente significativo. Mediante el test de Tukey-Kramer de comparación múltiple se realizó la comparación de las medias entre grupos en los correspondientes ensayos donde  $p < 0.001$  (\*\*\*) fue considerado extremadamente significativo,  $p < 0.01$  (\*\*) ligeramente significativo, y  $p < 0.05$  (\*) poco significativo y  $p > 0.05$  (ns) no significativo.

### 3.12 SOLUCIONES Y MEDIOS.

#### A. Cultivos de parásitos.

- RPMI (1L) : 16.4 g RPMI-1460 (SIGMA), 2.2 g Carbonato Sódico, 0.134 g Penicilina, 0.060 g Estreptomina, 0.134 g Kanamicina, 100 ml SBF1 10 % ( GIBCO), 900 ml agua destilada, pH 7.7-7.4.
- MTL (1L): 9.91 g Sales de HANKS (HBSS) (SIGMA), 0.350 g Carbonato Sódico. 5 g Lactoalbúmina hidrolizada, 0.1 g Extracto de Levadura, 0.2 g Hemoglobina humana o bovina, 0.056 g de Penicilina, 0.1 g Estreptomina y 0.048 g Kanamicina, pH 7.2, 10 % SBF1 (GIBCO).
- Medio Grace's modificado (100 ml): 0.250 gr de Hemoglobina (inactivada a 56 ° C durante 30 min), 5.2 gr de Grace's Insect Medium (Sigma). La solución fue mezclada y filtrada y posteriormente suplementada con 10 % de SBF1 (v/v). Tras esto, se procedió a bajar el pH hasta niveles comprendidos entre 1 y 1.5 mediante una solución de HCl 1N para luego subir de nuevo el pH a niveles comprendidos entre 5

y 5.8 con una solución de NaOH 1N. Finalmente, el medio fue filtrado para eliminar precipitados formados por la variación brusca de pH.

**B. Purificación de EVs:**

- RPMI (1L), 25 mM HEPES, 10 % U-SBFI : 16.4 g RPMI-1460 medium (SIGMA), 2.2 g Carbonato Sódico, 0.134 g Penicilina, 0.060 g Estreptomicina, 0.134 g Kanamicina, 100 ml U-SBFI 10 % (GIBCO), 5,95 g HEPES, 900 ml agua destilada, pH 7.4.

- RPMI (1L), 25 mM HEPES, 10 % U-SBFI : 16.4 g RPMI-1460 (SIGMA), 2.2 g Carbonato Sódico, 0.134 g Penicilina, 0.060 g Estreptomicina, 0.134 g Kanamicina, 100 ml U-SBFI 10 % ( GIBCO), 5,95 g HEPES, 900 ml agua destilada, pH 6.5.

**C. Cultivo celular:**

- MEM (1L): 9.53 g Eagle Essencial Medium (MEM) (SIGMA), 2.2 g Carbonato Sódico, 4.4 g HEPES, 0.056 g Penicilina, 0.1 g Estreptomicina, 0.048 g Kanamicina, 100 ml SBFI, pH 7.2.

- Tripsina-EDTA (400 ml): 0.1g EDTA, 0.5g Tripsina, pH7.4.

**D. Soluciones para microscopía electrónica de transmisión e Inmunocitoquímica:**

- Tampón de fijación Karnovsky's: Formaldehído 4 %, Glutaraldehído 0.5 %, PBS (0.2 M, pH 7.4).

- Tampón Glicina: Glicina 0.02 M en PBS

- Tampón de Bloqueo 1: Gelatina de teleósteo 1 % en PBS.

- Tampón de Bloqueo 2: Ovoalbúmina 1 % en PBS.

- Tampón fosfato salino (PBS): 10 mM Na HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2.

-Todas las soluciones se prepararon antes de realizar el método y fueron esterilizadas mediante filtración por filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Sartorius).

**E. Soluciones para microscopía láser confocal:**

- Tampón de fijación: Formaldehído 4 % en PBS (0.4 g Para formaldehído en 7 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , calentar en baño a  $60^\circ\text{C}$ , añadir unas gotas de NaOH 1M, dejar enfriar a TA y ajustar hasta 10 ml con PBS (0.2 M). Ajustar el pH a 7.4.
- Tampón de permeabilización: Ácido cítrico 10 mM, 10 % Nonidep-40.
- Tampón de lavado: PBS filtrado en filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Sartorius).
- Tampón de bloqueo: Albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA) 1 % en PBS.

**F. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida:**

- Gel separador: Acrilamida/Bisacrilamida 30 %, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10%, Persulfato de Amonio 10 %, Temed 1 %.
- Gel concentrador: Acrilamida/Bisacrilamida 30 %, Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 10 %, Persulfato de Amonio 10 %, Temed 1%.
- Tampón de la muestra: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, EDTA 0.2 M pH 8, glicerol 50 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 %, 2-mercaptoetanol 0.01 %.
- Tampón de electroforesis: Tris 0.05 M, Glicina 0.384 M, SDS 0.01 %.

**G. Soluciones de tinción de geles de poliacrilamida:**

- Solución de teñido: Azul de Coomassie 0.025 % (p/v), Metanol 40 %, Ácido Acético 10 % en agua bidestilada.

- Solución de desteñido: 2-propanol 10 %, Ácido Acético 10 %, completar con agua bidestilada.

#### **H. Inmunoblotting:**

- Tampón de bloqueo: 2 % Leche en polvo deslipidizada, 0.1 % Tween-20 en PBS.
- Tampón de Lavado: 0.3% Tween-20 en PBS.

#### **I. Soluciones para electroforesis en gel de Agarosa:**

- Tampón TAE (10X): 0.4M Tris-Acetato, 20 mM EDTA, 11.14 ml Ácido Acético pH 8.2.
- Tampón de electroforesis: TAE 1X, agua destilada 1:9 (v/v).
- Agarosa 2 %: 1 g en 50 ml de tampón TAE 1X.

#### **J. Soluciones para células competentes:**

- Medio TYM: 2 % Triptosa, 0.5 % Extracto de levadura, 0.1% NaCl, 0.01 % MgCl<sub>2</sub>. Estéril mediante autoclavado a 121 °C durante 20 min.
- Medio TFBI: Acetato de potasio 30 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Estéril previo filtrado.
- Medio TFBII: NaMOPS 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, 15 % Glicerol, pH 7. Estéril previo filtrado.
- Medio LB: 1g Triptona, 0.5 g Extracto de levadura, 1 g NaCl en 100 ml de agua bidestilada. Estéril mediante autoclavado a 121 °C durante 20 min.

**K. Soluciones para la transformación:**

- Medio SOC (100ml): 2 g Bacto-Triptona, 0.5 g Extracto de levadura, 1 ml NaCl 1M, HCl 1M. Se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante 20 min. A continuación se le añade 1 m Mg<sup>2+</sup> 2 M, 1 ml Glucosa 2 M.
- Mg<sup>2+</sup> 2M: 20.33 g MgCl<sub>2</sub> – 6 H<sub>2</sub>O, 24.65 g MgSO<sub>4</sub> – 7 H<sub>2</sub>O, pH 7. Estéril previo filtrado.
- Solución stock de IPTG (0.1M): 1.2 g Isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG) disueltos en 50 ml. Estéril previo filtrado.
- Solución stock X- Gal: 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa disueltos en 2 ml de N, N'-dimetilformamida. Cubrir con aluminio y guardar a -20 °C.
- Solución stock Ampicilina (100 µg/ml): 100 mg Ampicilina en 1 ml de agua MiliQ.
- Medio LB Agar (100 ml): 1 g Triptona, 0.5 g Extracto de levadura, 1 g NaCl, 2 g Agar.
- Placas LB Agar: Para 100 ml de medio LB se añadió 100 µg/ml de Ampicilina, 0.5 mM de IPTG y 80 µg/ml X-Galactosidasa.

**L. Solución para diálisis:**

- Tampón de diálisis: Acetato de Amonio 1 M, ajustar hasta 0.1 M con agua bidestilada.

**M. Soluciones para ELISA:**

- Tampón carbonato: Carbonato sódico 0.1 M, Bicarbonato Sódico 0.1 M, pH 9.4.

- Tampón de Bloqueo: 2 % Leche en polvo deslipidizada, 0.1 % Tween-20 en PBS.
- Tampón de lavado: 0.3% Tween-20 en PBS
- Solución sustrato Peroxidasa: 12.5 ml tampón Citrato (Ácido Cítrico 0.1 M, Citrato sódico 0.1 M, pH 5), 12.5 ml agua bidestilada, una pastilla de OPD (O-fenil diaminobenzidina) (SIGMA).
- Solución de parada: HCl 3 M.
- Glicina- HCl 0.1 M, pH 4.5.
- NaOH 1 N.

**N. Soluciones inhibición del complemento:**

- Tampón Veronal: 10 mM Barbital/NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM/MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, pH 7.4) (Virion).
- Complemento Humano (SIGMA).
- Medio caliente: RPMI-1460, 10 % SBF1, Cr<sup>51</sup> (50 μCi/ml).
- Medio frio: RPMI-1460, 10 % SBF1.
- Solución de precipitado: Ácido Tricloroacético 10 % en agua destilada.
- Solución de lavado-1: Ácido Tricloroacético 5 % en agua destilada.
- Solución de lavado-2: Etanol 80 % en agua bidestilada.
- Solución de lavado-3: Etanol 70 % en agua bidestilada.
- Solución de medida del marcaje: NaOH 1 N, sodium docecilsulfato (SDS) 0.1 % en agua bidestilada.
- Solución de contaje: Líquido de centelleo (Ultima Gold, Thermo Fisher).



## 4. RESULTADOS

---

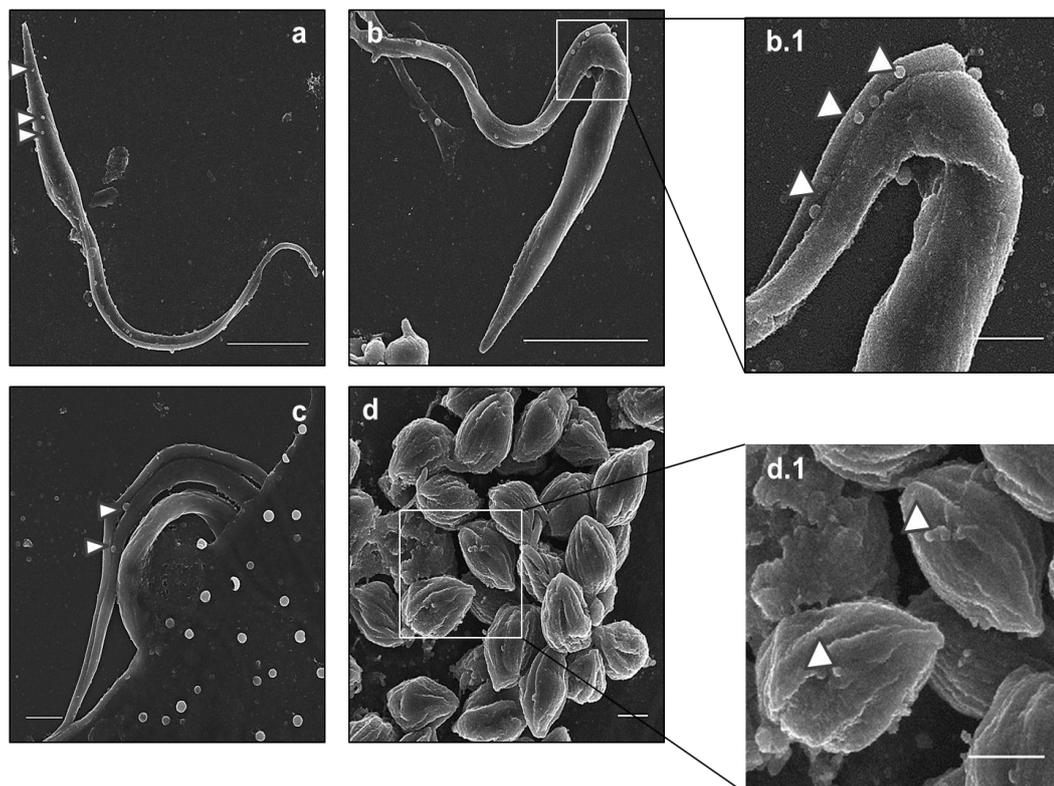


## 4 RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICACIÓN DE EVS SECRETADAS POR *T. CRUZI* CEPA PAN4

Se procedió a la identificación de EVs secretadas por los parásitos mediante microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión y cuantificación del tamaño de las vesículas partícula purificada por Dinamic Ligth Scatering.

En primer lugar se corroboró la secreción de EVs por parte del parásito mediante la observación por microscopía electrónica de barrido como se muestra en la Figura 4.1.

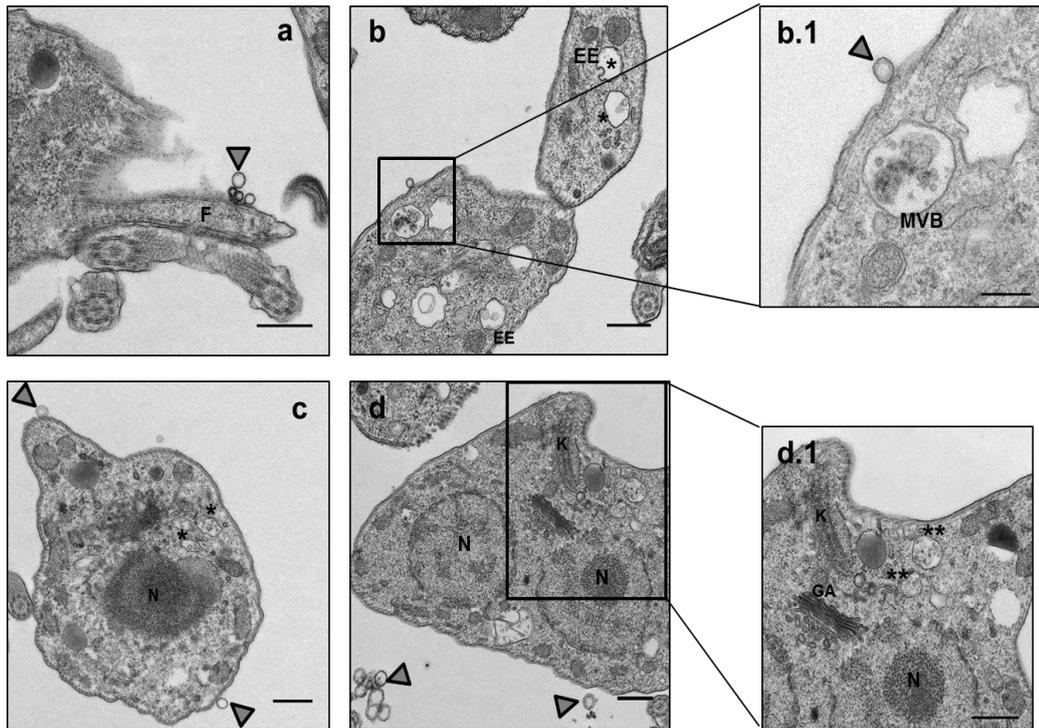


**Figura 4.1. Liberación de EVs desde la superficie de *T. cruzi* cepa PAN4.**

**a, b.** Superficie de formas epimastigote con EVs en el exterior de su superficie como indican las flechas. **b.1.** Ampliación de la imagen B correspondiente a la zona de la bolsa flagelar con liberación de EVs. **c.** Momento de entrada de un tripomastigote metacíclico en la célula hospedadora con EVs en su superficie marcadas por dos flechas. **d** y **d.1.** Liberación de EVs por las formas intracelulares amastigotes de *T. cruzi*. Tamaño de barra 5  $\mu\text{m}$  a y b, 1  $\mu\text{m}$  b.1, C, d.1. Flechas blancas indicar EVs secretadas.

Tanto en la superficie de las formas libres (E, MT y A) como en el momento de entrada del parásito en la célula se observa la existencia de vesículas a lo largo de la superficie del parásito y en la cercanía de la bolsa flagelar (Figura 4.1).

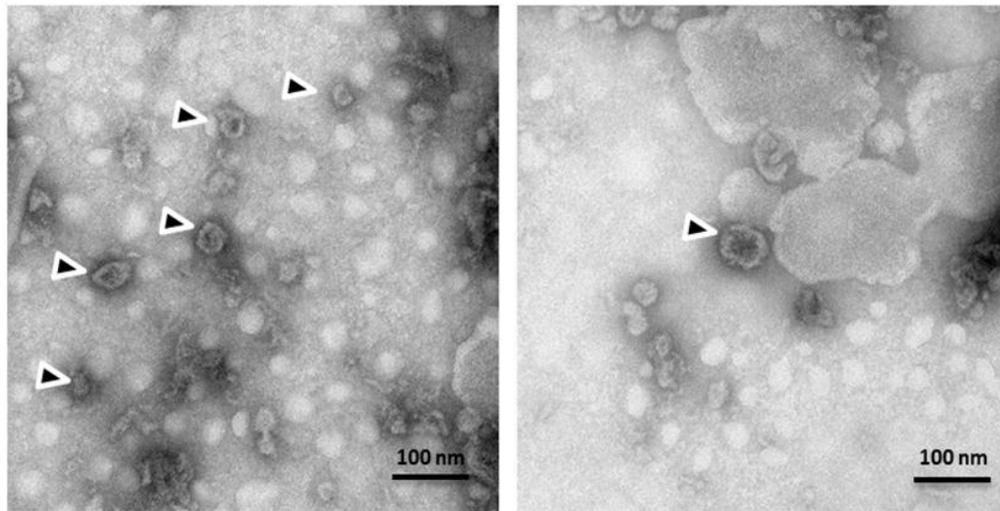
Para verificar que dichas EVs no se trataban de artefactos producidos por la fijación o por algún proceso que afectase a la superficie del parásito, se procedió a la visualización de los mismos por microscopía electrónica de transmisión. El análisis de la ultra estructura del parásito confirmó la existencia de EVs asociadas a la membrana del flagelo y en el exterior de la misma (Figura 4.2 (a), (b), (c) y (d)) así como de la formación de endosomas tempranos y de cuerpos multivesiculares (Figura 4.2 (b.1)) en el citosol de los parásitos asociados al complejo Reticulo Endoplasmático/Aparato de Golgi (Figura 4.2 (d.1)).



**Figura 4.2.** Formación y secreción de EVs en epimastigotes de *T. cruzi*. Desarrollo de la formación de cuerpos multivesiculares y secreción de EVs por microscopía electrónica de transmisión (TEM). F: flagelo; N: núcleo; EE: endosoma temprano MVB: cuerpos multivesiculares; K: kinetoplasto. Tamaño de barra 500 nm. Flechas grises indican EVs secretadas.

Tras esto, se realizó la purificación de EVs libres en el medio de cultivo para la comprobación de la existencia de estas en el medio mediante visualización por TEM (Figura 4.3).

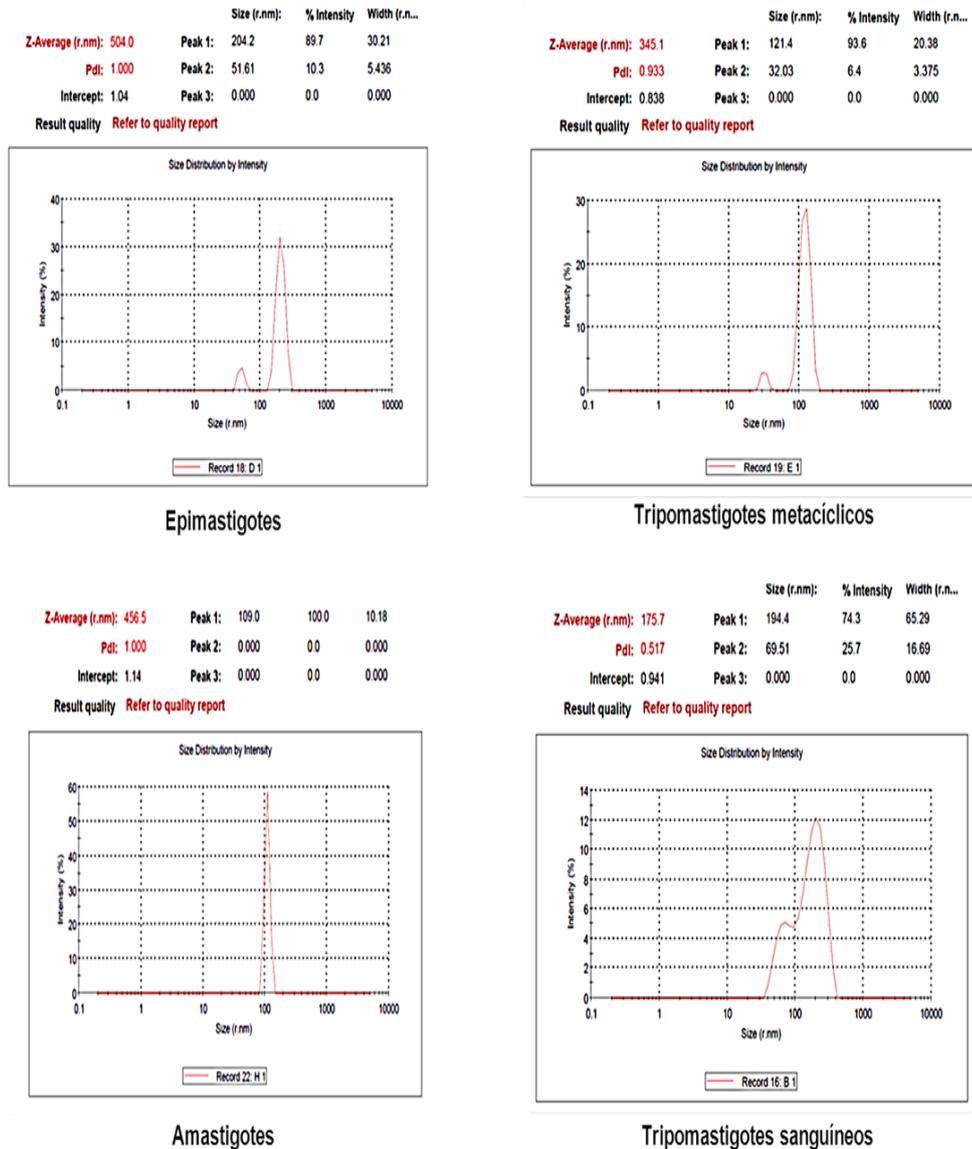
## Resultados



**Figura 4.3.** Micrografía electrónica de transmisión de EVs secretadas por las formas tripomastigotas infectivas de *T. cruzi*. Las flechas indican los exosomas.

Tras el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica se observaron EVs que presentan la forma típica en copa y esféricas con un tamaño medio de  $41 \pm 10.84$  nm.

Para obtener unos datos más detallados y fiables sobre el tamaño de dichas vesículas se llevó a cabo la técnica Dynamic Light Scattering (Figura 4.4) de cada población de EVs secretadas por las cuatro formas del parásito.



**Figura 4.4.** Cuantificación del tamaño de las EVs secretadas por las formas Epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos, amastigotes y tripomastigotes derivados de cultivo infectados de *T. cruzi* mediante Dinamic Light Scattering.

La medida del tamaño de las EVs de cada una de las formas fue diferente. En las formas libres (epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos) se obtuvieron dos picos comprendidos entre 50 y 210 nm, el primero de menor tamaño y menor intensidad, apareciendo un único pico en las formas intracelulares de aproximadamente 100 nm de diámetro. En la Tabla 5 se muestran los

Resultados

tamaños, porcentajes de intensidad y la media para el potencial Z de cada uno de ellos.

**Tabla 5. Medida del tamaño de EVs de las diferentes muestras de *T. cruzi*.**

| <b>EVs</b>                                  | <b>Diámetro<br/>(nm)</b> | <b>%<br/>Intensidad</b> | <b>Potencial Z</b> |
|---|--------------------------|-------------------------|--------------------|
| <b>Epimastigotes<br/>(1)</b>                | 202.4                    | 89.7                    | 504.0              |
| <b>Epimastigotes<br/>(2)</b>                | 51.61                    | 10.3                    | 5.436              |
| <b>Tripomastigotes<br/>metacíclicos (1)</b> | 121.4                    | 93.6                    | 345.1              |
| <b>Tripomastigotes<br/>metacíclicos (2)</b> | 32.03                    | 6.4                     | 3.375              |
| <b>Amastigotes</b>                          | 109.0                    | 100                     | 456.5              |
| <b>Tripomastigotes<br/>sanguíneos (1)</b>   | 194.4                    | 74.3                    | 175.5              |
| <b>Tripomastigotes<br/>sanguíneos (2)</b>   | 69.1                     | 25.7                    | 16.69              |

Por tanto, existe una población de EVs de tamaño variable secretadas por las distintas formas del parásito o bien se podrían encontrar formando agregados, de ahí la variabilidad de tamaños.

#### 4.2 ESTUDIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO EN LA LIBERACIÓN DE EVS POR *T. CRUZI* CEPA PAN4

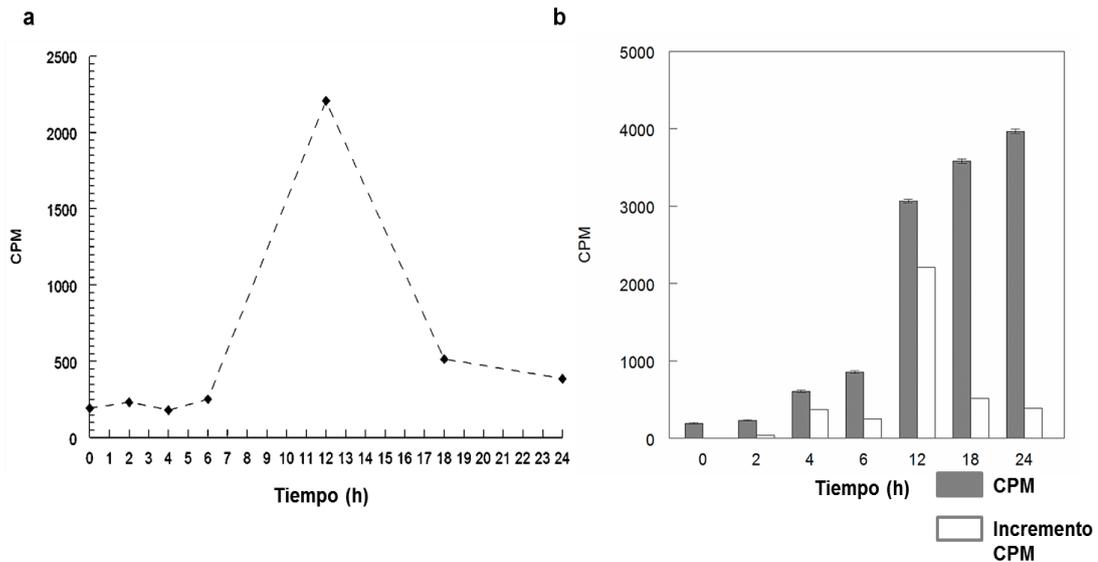
Con el objetivo de estudiar las condiciones óptimas de cultivo a las cuáles se produce una mayor liberación de EVs, se llevaron a cabo varios ensayos variando las condiciones del cultivo incluyendo la temperatura, tiempo, deprivación de glucosa e inhibición del citoesqueleto. La liberación de dichas EVs se midió previo marcaje con el precursor radiactivo leucina-H3 de las proteínas transportadas por las EVs tanto en su superficie como en su interior.

Para ello se realizaron los siguientes experimentos:

##### **A. Evaluación de la influencia del tiempo de cultivo vs liberación de EVs.**

En primer lugar se realizó una curva de liberación de EVs en función del tiempo de cultivo transcurrido estableciendo como condición óptima de liberación la temperatura normal de crecimiento de un cultivo de epimastigotes, es decir, 28 °C y, estableciéndose como tiempos de incubación las 0, 2, 4, 6, 12, 18 y 24 h, tras los cuales los cultivos fueron procesados para la purificación de las EVs secretadas tal como se describe en el capítulo 3. La cuantificación de EVs secretadas y marcadas radioactivamente a los distintos tiempos se muestra en la Figura 4.5 (a), donde el mayor valor de c.p.m (cuentas por minuto) se muestra a las 12 h de cultivo.

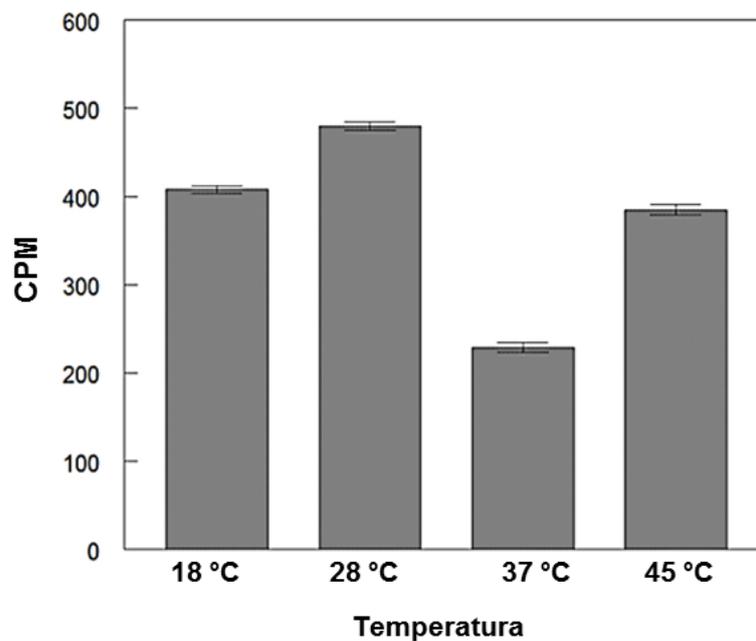
## Resultados



**Figura 4.5. (a).** Curva de secreción de EVs con respecto al tiempo. Cuantificación en CPM de las EVs marcadas y secretadas por epimastigotes de *T. cruzi* cepa PAN4 a lo largo del tiempo. El medio de cultivo fue enriquecido con Leucina- H3 a una concentración de 5  $\mu\text{Ci/ml}$ . **(b)** Incremento de radioactividad creciente cuantificada por horas con respecto a las CPM obtenidas por cada tiempo independiente.

### **B. Evaluación del factor Temperatura vs liberación de EVs.**

Tras determinarse el tiempo de liberación máximo de EVs, se procedió con el estudio de la influencia de la temperatura en dicha liberación. Para ello se incubaron diferentes cultivos de las formas epimastigotas a cuatro temperaturas diferentes siendo 18, 28, 37 y 45  $^{\circ}\text{C}$  las temperaturas a ensayar. Como se muestra en la Figura 4.6, y tras corroborarse en cierta medida en el experimento anterior, la mayor cantidad de aminoácidos radiactivos incorporados a las proteínas de las EVs marcados fue a los 28  $^{\circ}\text{C}$  de temperatura, temperatura óptima de crecimiento de las formas epimastigotas de *T. cruzi* a las 12 h.



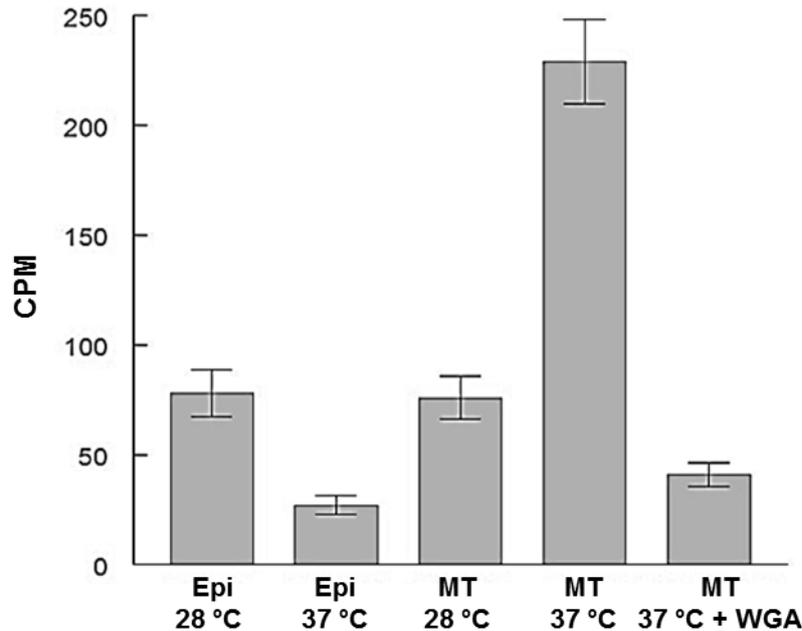
**Figura 4.6.** Influencia del estrés térmico en la liberación de EVs por las formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa PAN4.

Cabe destacar la disminución en la liberación de Evs a los 37 °C, y como a los 45 °C vuelve a elevarse como consecuencia del estrés térmico sufrido por los parásitos.

Para ratificar que esta secreción está afectada por la temperatura óptima a la que cada forma del ciclo de vida del parásito se desarrolla, realizamos una comparación entre las formas epimastigotas y tripomastigotes metacíclicos a las dos temperaturas óptimas de cultivo para cada una de ellas.

Siguiendo el mismo comportamiento anterior, los epimastigotes liberaron una mayor cantidad de EVs a los 28 °C que a los 37 °C de temperatura, en un porcentaje del 48.75 % (Figura 4.7). Para los tripomastigotes metacíclicos el incremento en la liberación de EVs marcadas a los 37 °C fue del 70.83 % del total con respecto a los 28 °C de temperatura (29.17 %).

## Resultados



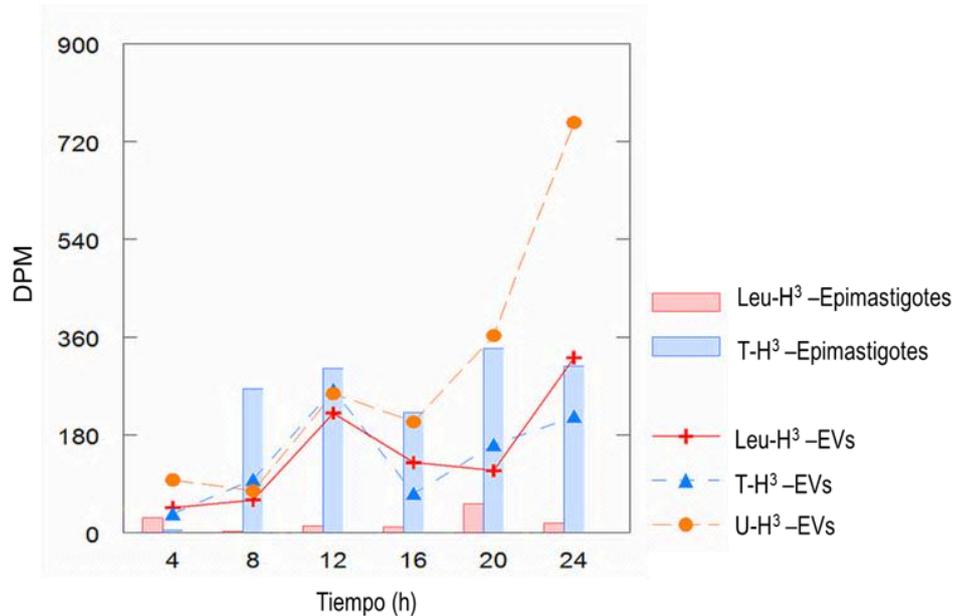
**Figura 4.7.** Comparación de la liberación de EVs entre la fase epimastigote (Epi) y tripomastigote metacíclico (MT) de *T. cruzi* cepa PAN4 a distintas temperaturas mediante el marcaje de proteínas con leucina-H3 tras 24 h y en presencia de lectina de germen de trigo (WGA= wheat germ agglutinin).

Para determinar la presencia de glicoproteínas de superficie en las EVs, los tripomastigotes metacíclicos fueron tratados con lectina de germen de trigo (WGA) capaz de unirse a los grupos N-glicosilados de las glicoproteínas. Este tratamiento produjo una disminución en el porcentaje de liberación de EVs del 83.33 % con respecto a la condición normal de cultivo.

### **C. Relación del ciclo celular del parásito y la secreción de EVs.**

Tras esto se prosiguió con el estudio de la secreción de EVs por *T. cruzi* y su evaluación a lo largo del ciclo celular del parásito. Para ello se marcaron tanto las proteínas como el ADN y ARN mediante los análogos radiactivos leucina-H3, timidina-H3 y uridina-H3 respectivamente, y se sincronizaron en la fase S del ciclo celular. Tras 24 h, en intervalos de 4

h, se cuantificó la cantidad de radiactividad liberada en EVs así como en los parásitos para cada uno de los componentes anteriormente descritos y como se muestra en la Figura 4.8.



**Figura 4.8.** Cuantificación de proteínas, ADN y ARN transportados por EVs secretadas por *T. cruzi* cepa PAN4 durante la fase S del ciclo celular. Se muestra la medida de la radiactividad en DPM (desintegración por minutos) de EVs y epimastigotes marcados con 5  $\mu$ Ci/ml de leucina-H3, timidina-H3 y uridina-H3 tras 30 h de sincronización con 30 mM de HU.

En el periodo de tiempo comprendido entre las 8 y 12 h y las 20 a 24 h ocurre la máxima incorporación en los parásitos de Timidina-H3 correspondiente a la máxima síntesis de ADN así como la presencia de Uridina-H3 en EVs secretadas por las formas epimastigotas del parásito. Si bien en valores absolutos no se corresponden con la mayor cantidad de EVs marcadas con Leucina-H3, quizás como consecuencia las proteínas de las que se componen las EVs sean proteínas pre sintetizadas y estén aún en el RE o AG de los parásitos. Mientras que al ser más fácilmente degradable, son los ARN presentes en la EVs mejores marcadores de la síntesis de dichas vesículas. Existen, por

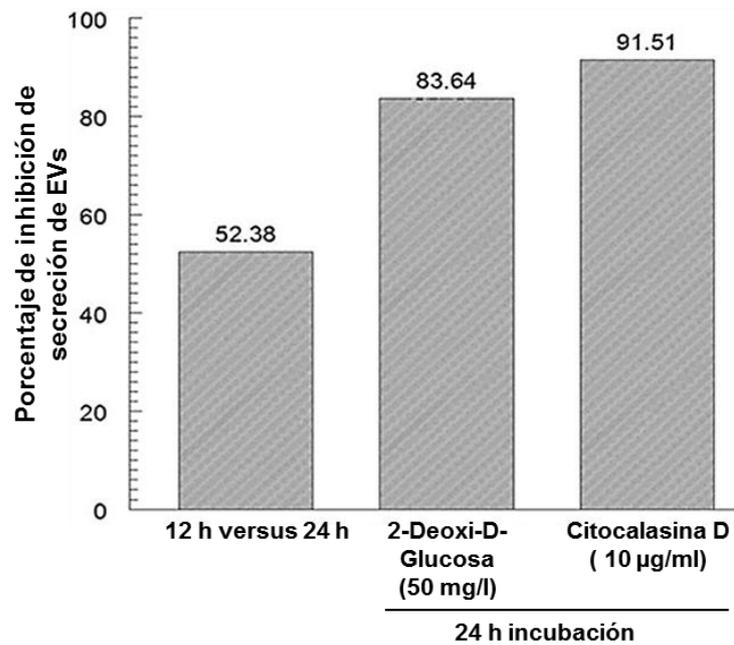
## Resultados

tanto, dos períodos de máxima secreción de EVs, tras las 12 h después de fase S, donde el marcaje en las EVs de ARN, ADN y proteínas es similar, volviendo a disminuir a las 16 h ligeramente, siendo las 24 h donde hay una mayor liberación de ARN, ADN y proteínas en las EVs.

### **D. Evaluación del efecto de la ausencia de Glucosa e inhibición del citoesqueleto sobre la secreción de EVs.**

Para comprobar si una deficiencia en el metabolismo energético afecta a la secreción de EVs y, por lo tanto, al transporte de proteínas, se sometieron a los cultivos a una deprivación de glucosa. Para ello se cultivaron las formas epimastigotas en medio rico en glucosa (RMPI= 0.5 g/l glucosa) a las 12 y 24 h frente a cultivos en medio sin glucosa (MTL) y 2-desoxi-Glucosa como se muestra en la Figura 4.9. De la misma manera, se comprobó el efecto en la inhibición del citoesqueleto sobre la secreción de EVs mediante la comparación de dos cultivos, uno tratado con Citocalasina D y otro en condiciones normales de cultivo.

Tras realizarse el cultivo en condiciones óptimas de temperatura a distintos tiempos, se produjo una disminución del 52.38 % en la secreción de EVs a las 24 h con respecto a las 12 h.



**Figura 4.9.** Efecto de la inhibición del metabolismo energético y del citoesqueleto sobre la secreción de EVs en *T. cruzi*. Porcentajes de EVs secretadas por las formas epimastigotas en presencia de 2-Deoxi-D-Glucosa y Citocalasina B con respecto a las EVs secretadas en condiciones normales.

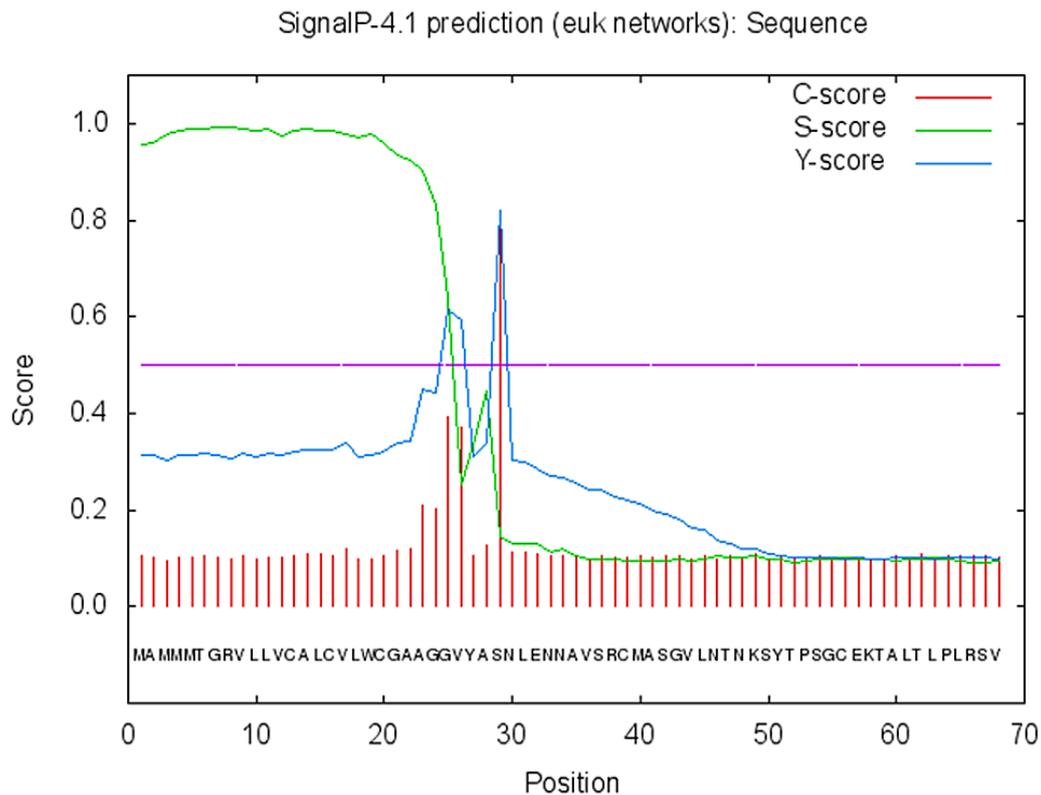
La liberación de EVs en los cultivos de epimastigotes en condiciones de deprivación de glucosa se vio reducida en un 83.64 %, mientras que el porcentaje de inhibición de la liberación de EVs mediante el inhibidor del citoesqueleto Citocalasina D fue del 91.51 %.

#### 4.3 **EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DE *T. CRUZI* EN LOS DISTINTOS ESTADIOS Y EN EVs SECRETADAS**

##### 4.3.1 **EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MASP MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DEL EXTREMO N-Y C-TERMINAL CONSERVADOS**

Como ya se indicó en apartados anteriores, las regiones conservadas de las proteínas MASPs aparecen tanto en el extremo 5' (amino terminal) como en su extremo 3' (carboxilo terminal). A fin de obtener anticuerpos específicos frente a estas dos regiones, se usaron péptidos sintéticos (PS y C-terminal consenso) con los que se inmunizaron ratas Wistar y ratones Balb/c para la obtención del suero policlonal específico para cada uno de ellos como se explica en el apartado 3.8 en el capítulo Materiales y Métodos.

En el caso del péptido sintético PS, se determinó la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal de la proteína MASP52 previamente estudiada por nuestro grupo de investigación mediante el uso del programa informático Signal P como se muestra en la Figura 4.10.



**Figura 4.10.** Predicción del péptido señal de la proteína MASP52 mediante el programa informático SignalP-4.1 (EXPasy tools). La línea verde indica la predicción para el péptido señal (S-score); en rojo se muestra la predicción para el sitio de escisión (C-score) y en azul se muestra la combinación de la predicción para el sitio de escisión dado por los S- y C- score (Y-score).

El péptido señal de la proteína MASP52 presenta un sitio de escisión entre la posición 29 de su secuencia de aminoácidos, correspondiendo con al aminoácido Serina (S), es decir, que es susceptible de escisión tras la maduración de las proteínas MASP en la cara externa del aparato de Golgi.

Para comprobar la alta conservación del extremo N-terminal de las proteínas MASP entre distintas cepas se realizó la búsqueda de dicha secuencia mediante BlastP para un total de 5 cepas diferentes de *T. cruzi* CL-Brener Esmeraldo (Tc VI), CL-Brener Non Esmeraldo (Tc III), DMC28 (Tc I), Sylvio X10 (Tc I) y Marenkellei. Como se muestra en la Tabla 6, el mayor número de secuencias homólogas para el extremo N-

## Resultados

terminal de las proteínas MASP se obtuvo para la cepa CL-Brener Esmeraldo (366), siguiendo un patrón de homología entre secuencias de mayor a menor conforme las cepas se alejan filogenéticamente, como es el caso de la más alejada, Marenkellei, con un total de 159 secuencias altamente homólogas para el extremo N-terminal de la proteína MASP52 expresada en este caso por la cepa CL-Brener Esmeraldo.

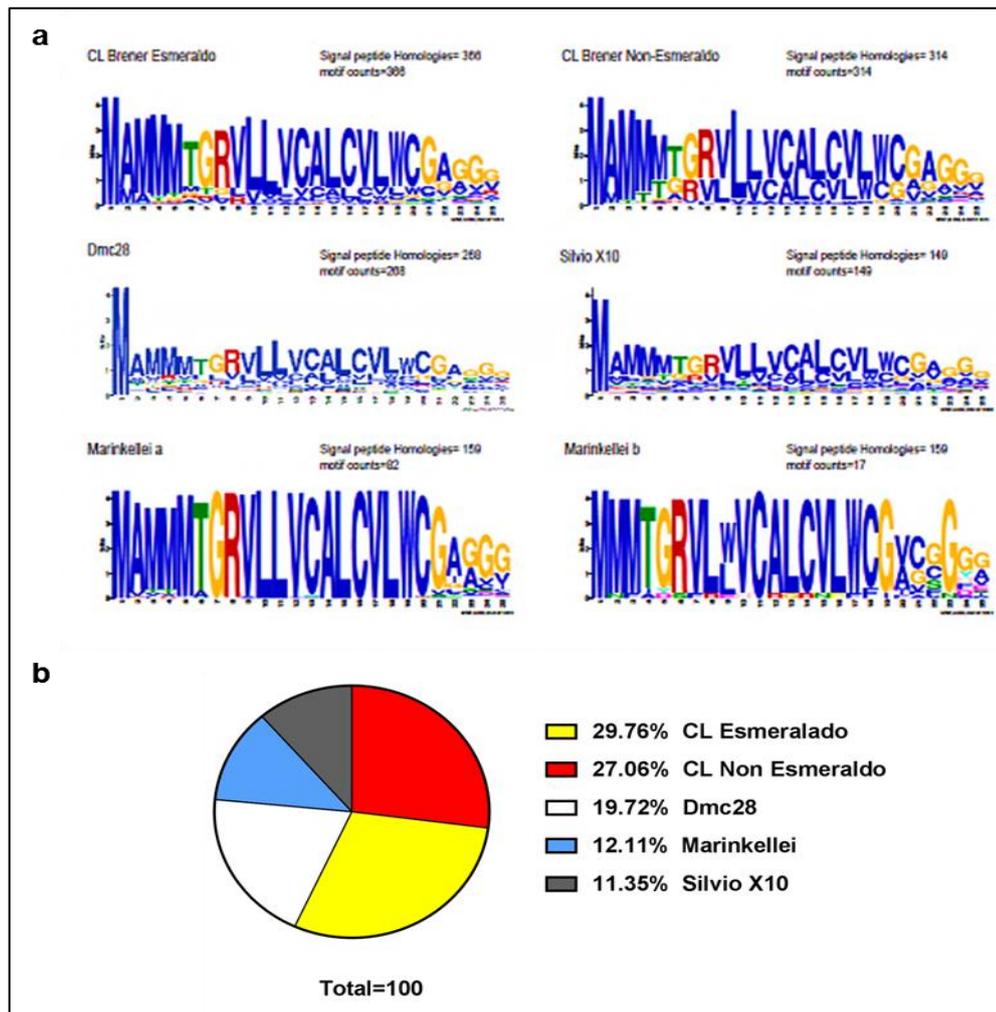
**Tabla 6. Análisis de las secuencias para el extremo N-terminal de las proteínas MASP entre distintas cepas de *T. cruzi* mediante BlastP.**

| Similitud en Blast |                        |                               |       |               |             |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|-------|---------------|-------------|
|                    | CL-Brener<br>Esmeraldo | CL-Brener<br>Non<br>Esmeraldo | Dmc28 | Silvio<br>X10 | Marenkellei |
| <b>Blast*</b>      | 430                    | 391                           | 285   | 164           | 175         |
| <b>Corregido**</b> | 366                    | 314                           | 268   | 149           | 159         |

\*Solo se consideraron en este análisis las secuencias con e-valor  $\leq 1e^{-04}$

\*\* Todos los pseudogenes y secuencias ambiguas fueron eliminadas

El alineamiento múltiple de todas las secuencias correspondientes a los péptidos señales de las proteínas MASP de cada una de las cepas analizadas puso de manifiesto la existencia de una conservación de motivos repetidos para el extremo N-terminal de dichas proteínas como se observa en la Figura 4.11.

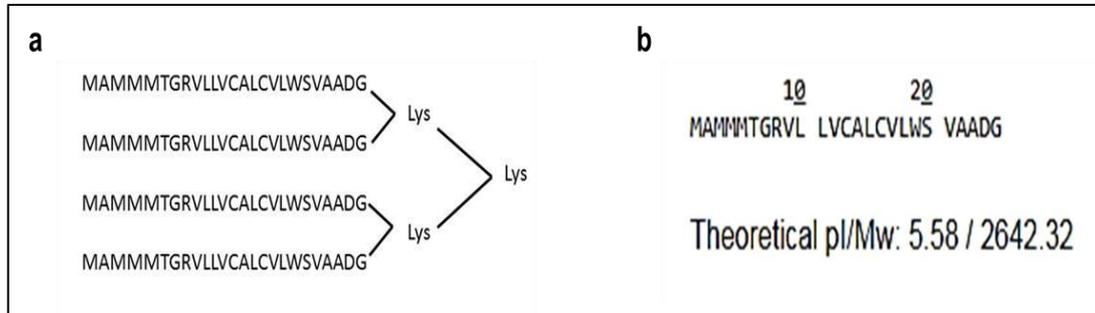


**Figura 4.11. (a)** Representación de los motivos estructurales conservados de las seis secuencias aminoacídicas pertenecientes a los extremos N-terminales de las proteínas MASP de *T. cruzi* de las cepas CL Brener Esmeraldo, CL Brener Non-Esmeraldo, DmC28, Sylvio X10 y Marenkellei, tras el alineamiento múltiple de sus secuencias mediante el programa MEME.4.3.0. **(b)** Porcentaje de conservación de la secuencia de aminoácidos de cada cepa de *T. cruzi* analizada para el PS MASPs.

Tras comprobar el grado de conservación de esta secuencia, se llevó a cabo la síntesis de dicho péptido señal consenso, cuya estructura está formada por la unión de cuatro péptidos iguales ramificados y unidos por residuos de Lisina (Lys-) (Figura 4.12) con una longitud de 25 aminoácidos, el cuál fue utilizado para la inmunización

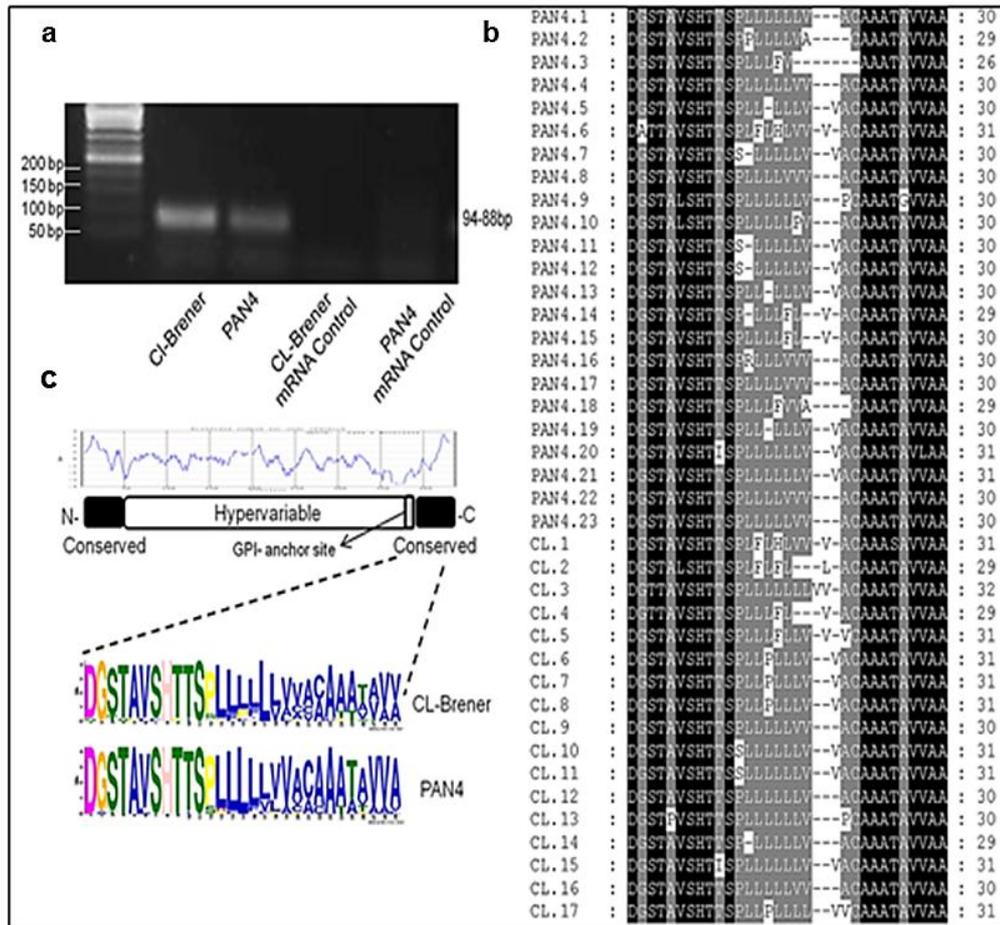
## Resultados

de ratas Wistar sin la necesidad de acoplarlo a KLH debido a que esta ramificación permite multiplicar por cuatro su peso molecular que de manera individual es de 2.64232 kDa.



**Figura 4.12.** Representación esquemática del péptido sintético PS MASP y de su peso molecular teórico analizado mediante la herramienta bioinformática Compute pI/Mw.

Para la región C-terminal de las proteínas MASP se sintetizó un péptido cuya secuencia de aminoácidos es la resultante del alineamiento de 41 secuencias de aminoácidos consenso de dicho extremo entre dos cepas de *T. cruzi*. Para ello se llevó a cabo el estudio de las secuencias de dicho extremo expresadas por formas tripomastigote metacíclico de las cepas CL Brener (Tc VI) y PAN4 (Tc I, a-d), ambas filogenéticamente divergentes y como se muestra en la Figura 4.13 (a).



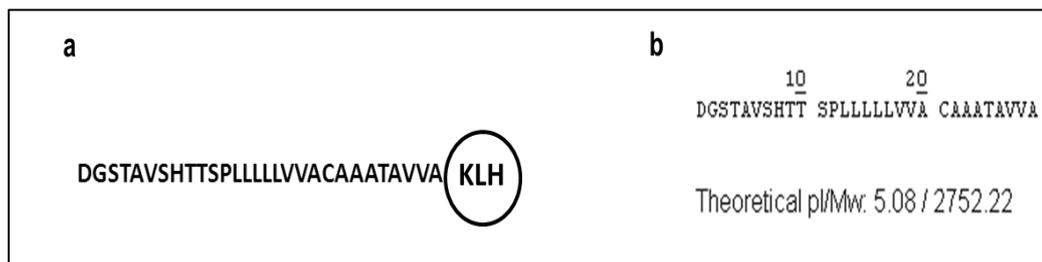
**Figura 4.13.** Análisis de la expresión de las secuencias de aminoácidos de la región extremo C-terminal MASP. **(a)** Gel de agarosa (2 %) de los amplicones de la región C-terminal MASP (94-88 pb) usando ADNc proveniente de las cepas CL-Brener y PAN4 como muestras e incluyendo como control de calidad ARNm de ambas. **(b)** Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas de la región C-terminal en las cepas PAN4 (23 clones) y CL-Brener (17 clones). En negro se muestran los residuos con el 100 % de conservación mientras que los que tienen >80 % aparecen en gris. **(c)** Esquema de la estructura hidrofóbica típica de las proteínas MASP y las frecuencias de aminoácidos del extreme C-terminal de las MASPs expresadas en ambas cepas.

Se obtuvieron un total de 24 clones para la cepa PAN4 y 17 clones para la región C-terminal expresada por la cepa CL-Brener. Como se observa en la Figura 4.13, se obtuvo una homología muy alta entre

## Resultados

secuencias de los distintos clones independientemente de la cepa, además siendo las zonas de mayor conservación las situadas al principio y al final de todas las secuencias obtenidas, donde predomina la secuencia de aminoácidos DGS en los 17 primeros residuos, correspondientes al motivo de unión a lípidos GPI de la proteína. La variación entre las secuencias de los clones entre cepas y entre ellos mismos se produce en los siguientes 18 residuos donde abunda el aminoácido Leucina (L), aminoácido con carga neutra que confiere hidrofobicidad a esta región (Figura 4.13 (c)).

Tras esto, se sintetizó el péptido consenso C-terminal, con un peso molecular teórico de 2.7522 kDa, el cual se unió al hapteno KLH siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.8. Tras la inmunización de ambos se obtuvo un título de anticuerpos por ELISA de 1/1600.

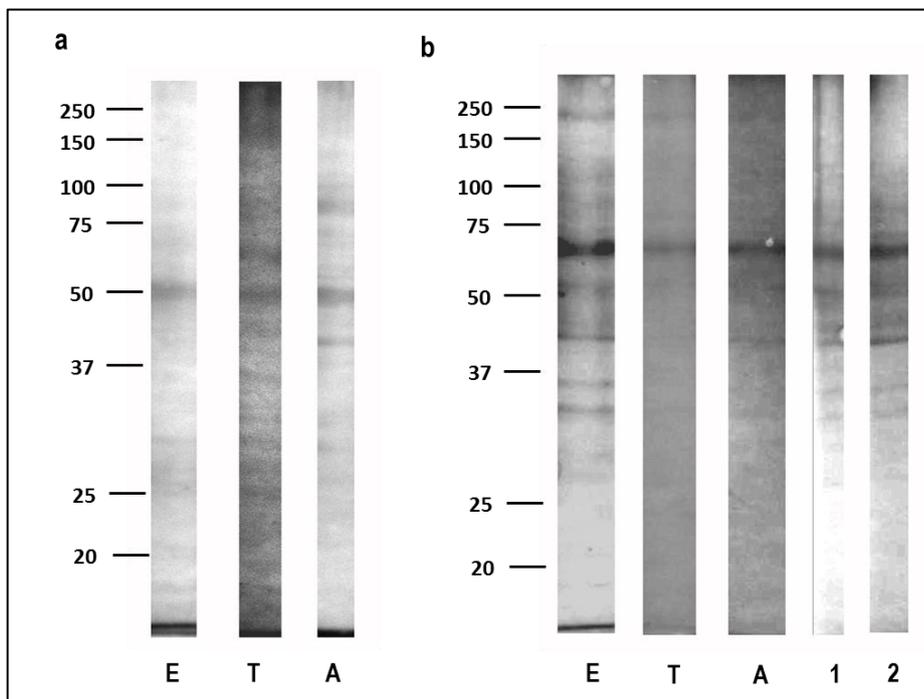


**Figura 4.14.** Representación esquemática del péptido sintético C-terminal consenso (C7) y de su peso molecular teórico (Compute Pi /MW, EXPAsy tools).

Una vez obtenidos los inmunoseros con los anticuerpos específicos para ambas regiones de las proteínas MASP, se procedió a la determinación de la expresión de las mismas en los distintos estadios de *T. cruzi* mediante western blot.

En el caso del péptido señal PS se obtuvo un patrón de bandas de tamaños comprendidos desde los 150 kDa hasta 30 kDa, con

diferencias en el grado de expresión en los diferentes estadios del parásito (Figura 4.15 (a)).



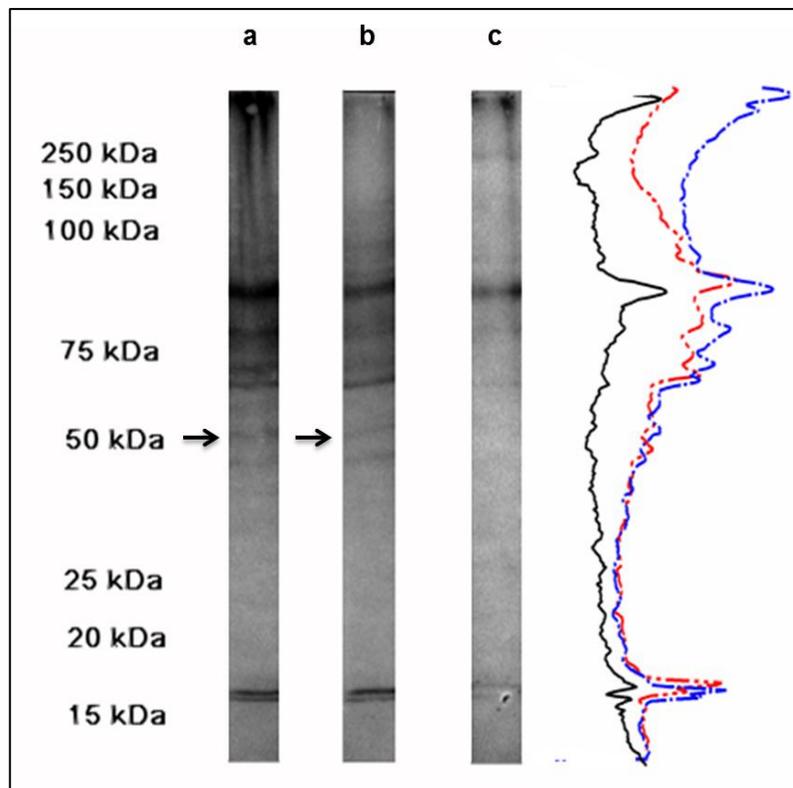
**Figura 4.15.** Western blot de las proteínas solubles totales **(a)** y de las proteínas de las EVs **(b)** en las tres formas del parásito (epimastigotes (E), tripomastigotes derivados de cultivo (T), y Amastigotes (A)), así como de EVs secretadas al medio de interacción (EVs-MI 1 (Ectosomas) y 2 (Exosomas)) parásito-célula mediante el uso de inmunosuero anti-PS MASP. (MW= molecular weight).

Como se puede observar, la presencia de proteínas MASP que conservan el péptido señal es menor en epimastigotes, siendo relativamente mayor en amastigotes, es decir, que en las formas intracelulares del parásito existe un mayor número de proteínas MASP sin procesamiento de su péptido señal. En las tres formas, aparece una banda de alrededor de 52 kDa, que podría corresponder a la anteriormente descrita por De Pablos *et al.* (2011) [127] y registrada como MASP52 en la base de datos GENBAK con el número de identificaciónXP\_820015.1.

## Resultados

El uso de este inmunosuero anti-PS MASP frente a proteínas totales de EVs secretadas al cultivo de cada una de las formas parásitos (Figura 4.25 (b)) reveló la existencia de dicho péptido señal en las mismas. La señal obtenida por quimioluminiscencia es mayor para EVs de epimastigotes así como de Amastigotes, apareciendo menor señal en EVs de tripomastigotes derivados de cultivo.

En el siguiente experimento se procedió a analizar dos poblaciones diferentes de EVs secretadas durante la interacción parásito-célula (Ectosomas y Exosomas) (Figura 4.16).



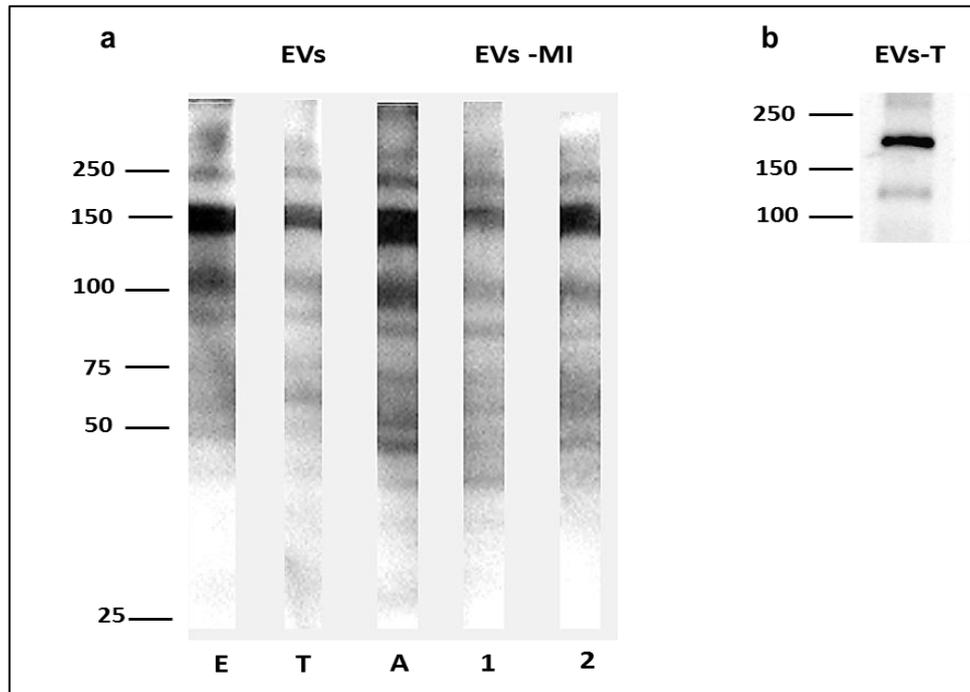
**Figura 4.16.** Densitograma de las proteínas marcadas con el inmunosuero anti-PS MASP en EVs secretadas al medio de interacción parásito-célula, Ectosomas **(a)** y Exosomas **(b)** y en EVs de formas T **(c)**. Línea azul: densitograma para bandas marcadas en Exosomas del MI; Línea roja: densitograma para bandas marcadas en Ectosomas del MI; Línea negra: Densitograma para bandas marcadas en EVs de las formas T.

El patrón de bandas obtenido fue similar en ambos casos, manteniéndose igualmente la banda de 52 kDa (señaladas con flechas), y haciéndose patente la diferencia de bandas e intensidad de las mismas entre las EVs del parásito en cultivo y las presentes en el medio de interacción como se puede ver en el densitograma (Figura 4.16), compartiendo un total de seis bandas. Este resultado indica que la presencia de la célula hospedadora estimula una mayor secreción de proteínas MASP en EVs por parte de los tripomastigotes sanguíneos.

Siguiendo con el estudio de la presencia de proteínas MASP en EVs secretadas por el parásito, se ensayó el inmunosuero anti-C-terminal MASP de igual manera que anti-PS MASP.

El western blot reveló un perfil de bandas muy similar al obtenido frente al PS MASP en EVs, sin embargo, tanto la intensidad como el número de bandas y, por lo tanto, de proteínas MASP, es mayor en este caso. Mientras que para el PS MASP se mantenía una banda de unos 52 kDa aproximadamente, en este caso aparece una banda de aproximadamente 160 kDa en todas las EVs de las tres fases del parásito así como en los ectosomas y exosomas del medio de interacción (Figura 4.17 (a)).

## Resultados



**Figura 4.17. (a)** Identificación mediante western blot del extremo C-terminal de las proteínas MASP en EVs secretadas por los parásitos y secretadas al medio de interacción parásito-célula hospedadora. **(b)** Western blot de EVs de formas T mediante el uso de un inmunosuero anti-EVs-Tripo. (E= Epimastigotes, T= tripomastigotes derivados del cultivo, A= amastigotes, 1 = exosomas del medio de interacción, 2= ectosomas medio de interacción, MW= molecular weight).

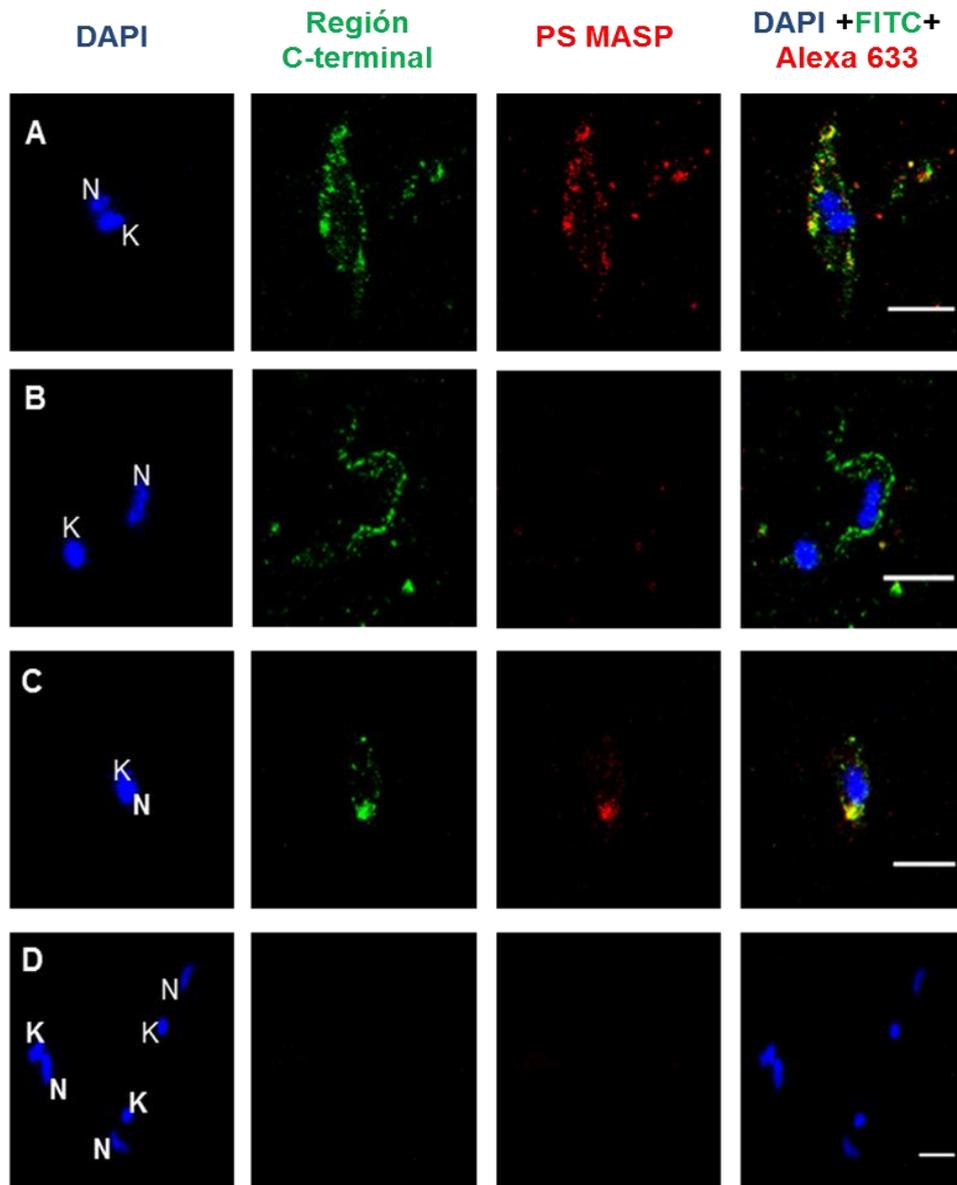
Cuando usamos un inmunosuero específico para proteínas transportadas en EVs de tripomastigotes sanguíneos fijadas con glutaraldehído, frente a proteínas obtenidas a estas mismas, el inmunosuero reconoció un total de tres proteínas (Figura 4.17 (b)), siendo una de ellas de un tamaño de banda de 120 kDa, igual que las que se identifican con el péptido PS MASP, y otra banda entre 100 kDa y 150 kDa de tamaño también presente en ambos casos. A pesar de esto, el número de bandas detectadas fue menor que para el resto de los inmunosueros.

#### 4.3.2 **INMUNO LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MASPs MEDIANTE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL**

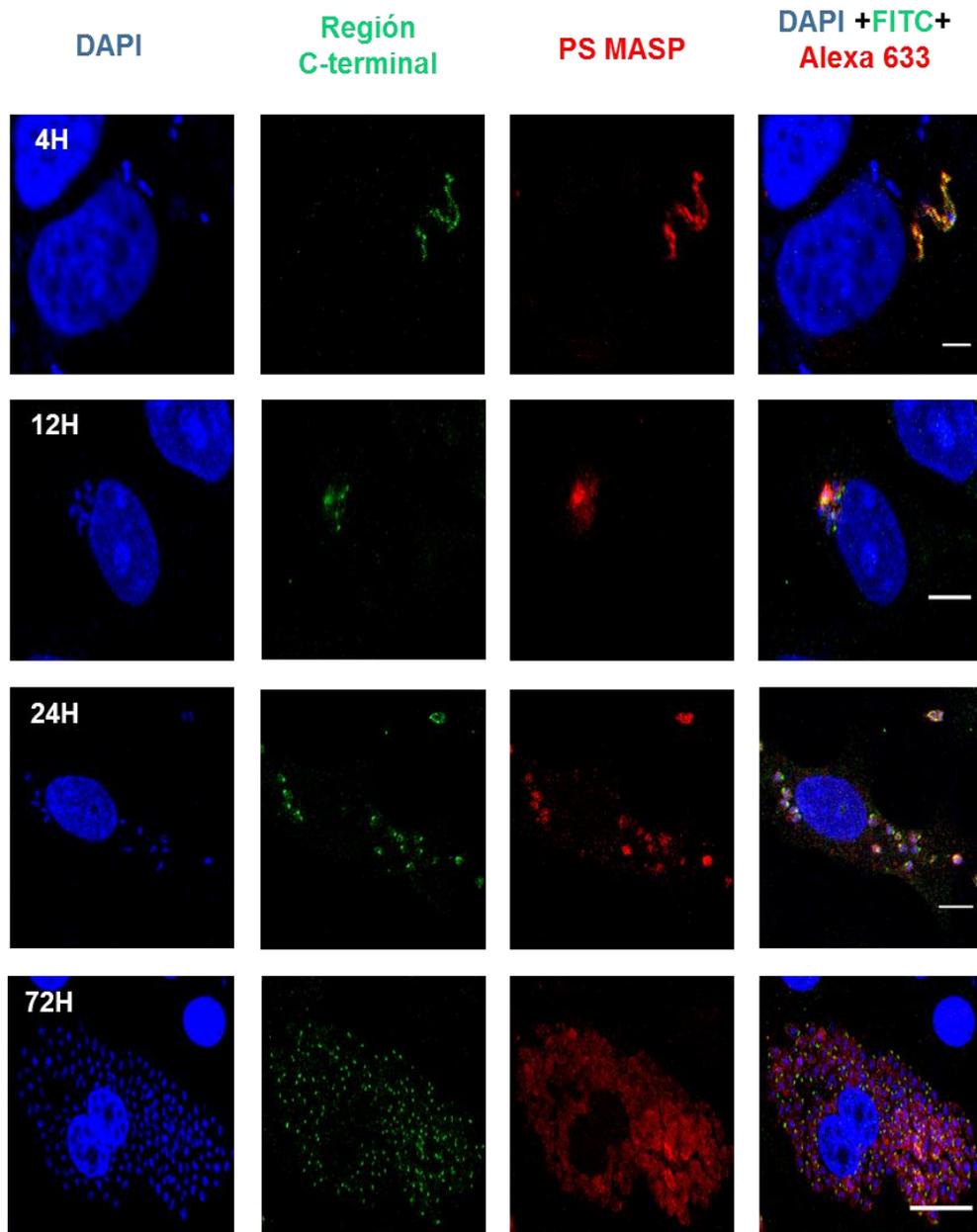
Mediante microscopía láser confocal se realizó el estudio de localización de los extremos N- y C-terminal conservados de las proteínas MASP en los diferentes estadios del parásito y durante el ciclo de vida del mismo.

En los parásitos libres en cultivo, el PS MASPs se localizó en puntos dispersos cercanos a la membrana plasmática de las formas epimastigotes (Figura 4.18). Por el contrario dicho PS no fue localizado en los tripomastigotes infectivos (Figura 4.19) pero sí la región C-terminal MASPs a lo largo de la superficie del parásito e incluso en el citosol. En los amastigotes (Figura 4.18 (C)), el péptido señal se encontró confinado en una posición polarizada, específicamente en una zona posiblemente asociada al complejo RE/AG en el citosol del parásito y, además, co-localizándose con la región C-terminal.

## Resultados



**Figura 4.18.** Inmunolocalización del péptido PS y de la región C-terminal de las proteínas MASPs mediante Microscopía Láser Confocal en formas libres del parásito. Marcaje del péptido PS MASPs mediante inmunosuero anti-PS MASP en rata (Alexa fluor 633) y región C-terminal mediante inmunosuero específico en ratón (FITC). **A.** Epimastigote; **B.** Tripomastigote derivado de cultivo; **C.** Amastigote. **D.** Control negativo con inmunosueros de ratón y rata pre-inmunes. El ADN se marcó mediante DAPI. Tamaño de barra de escala: 5  $\mu$ m.



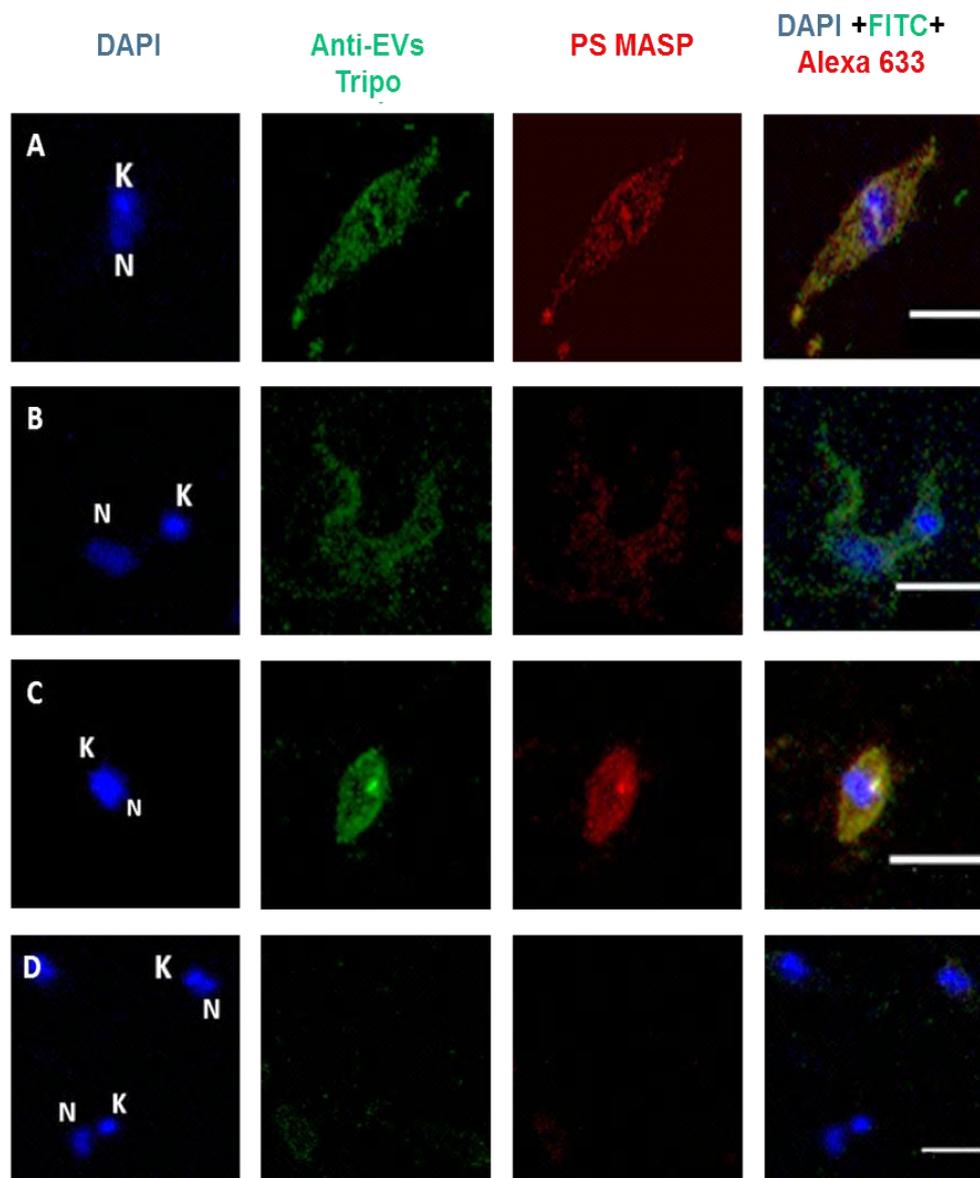
**Figura 4.19.** Inmunolocalización en el ciclo de invasión parásito-célula desde las 4 hasta las 72 h infección. Marcaje del péptido PS MASP mediante inmunosuero anti-PS MASP en rata (Alexa fluor 633) y región C-terminal mediante inmunosuero específico en ratón (FITC). El ADN se marcó mediante DAPI. Tamaño de barra de escala: 10  $\mu$ m.

## Resultados

En experimentos independientes, se procedió a la localización de ambos extremos de las proteínas MASP durante la invasión celular. Después de la infección de las células Vero durante 4 h previamente sincronizadas en la fase S del ciclo celular, éstas fueron fijadas a distintos tiempos post- infección (4, 12, 24 y 72 h) e incubadas con los inmunosueros específicos para dichas regiones (Figura 4.18 (B)). En el primer contacto del parásito con la célula hospedadora (reconocimiento y adhesión), éste co-expresa ambos extremos de las proteínas MASP (Figura 4.19), en contraste con las formas tripomastigotas libres de células hospedadoras (Figura 4.18). Una vez el parásito se transforma a amastigote en el interior de la célula tras 12 h de infección, la fluorescencia para el péptido PS aparece con una localización más difusa mientras que para la región C-terminal se mantiene de manera puntual como muestra la fluorescencia en verde en contraste con la fluorescencia en rojo más dispersa alrededor del amastigote. Tras las 24 y 72 h post-infección, la distribución de ambas marcas en el interior de la forma intracelular del parásito fue claramente diferenciada, con la región C-terminal acumulado probablemente en el aparato de Golgi del amastigote y el péptido PS con un marcaje más específico bordeando toda la superficie del amastigote a través de la membrana y en el citosol.

A continuación, se quiso comprobar la localización mediante el inmunosuero anti-EVs-Tripo y, de las proteínas que transportan, en cada uno de las formas del parásito permeabilizados así como su co-localización con el péptido PS MASP. El marcaje por parte del inmunosuero anti-EVs-Tripo mostró especificidad en las formas epimastigotas y amastigotas con un marcaje difuso por todo el parásito exceptuándose la zona correspondiente a la bolsa flagelar como se muestra en la Figura 4.21 (A) y (C). Ambos anticuerpos mostraron co-

localizarse en la zona entre el núcleo y el kinetoplasto, pudiéndose corresponder al complejo RE/AG.



**Figura 4.20.** Co-localización del péptido PS MASP y de las proteínas transportadas en EVs de tripomastigotes en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* cepa PAN4. Marcaje del péptido PS MASP con inmunosuero anti-PS MASP en rata (Alexa fluor 633), marcaje de EVs-Tripo con inmunosuero anti- EVs-Tripo en ratón (FITC), marcaje del ADN con DAPI. **A.** Epimastigotes. **B.** Tripomastigote derivado de cultivo celular. **C.** Amastigote. **D.** Control del marcaje mediante sueros pre-inmunes de rata y ratón. Barra: 5 $\mu$ m.

## Resultados

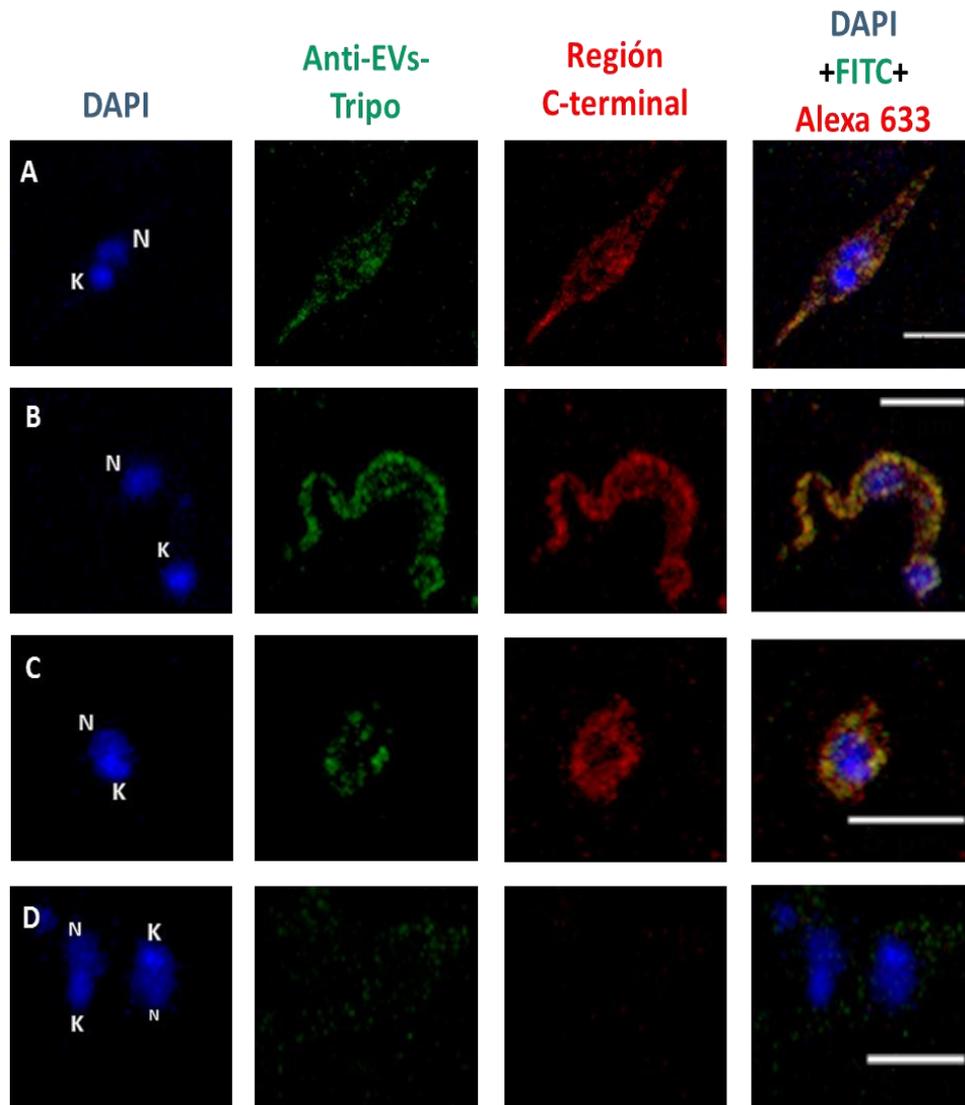
En las formas tripomastigotas infectivas el marcaje de las proteínas marcadoras de EVs fue difuso exceptuándose la membrana ondulante del parásito y la zona de la bolsa flagelar como se observa en la Figura 4.20 (B).

El mismo ensayo de co-localización se realizó para la región C-terminal MASP y las proteínas presentes en las EVs de tripomastigotes derivados de cultivo. Como ambos inmunosueros se obtuvieron en el mismo modelo animal (ratón), la identificación de ambos se realizó mediante la inmunolocalización de ambas proteínas con distintos fluorocromos, puesto que el extremo C-terminal MASP fue anteriormente localizado en la superficie de los parásitos y en el área que correspondería al complejo RE/AG, y el inmunosuero anti-EVs Tripo co-localizado con el PS MASP mostró una localización menos específica pero reconociendo a las proteínas presentes en las tres formas del parásitos ( Figura 4.18 y 4.20).

Por lo tanto, esto permitió diferenciar como en epimastigotes el extremo C-terminal se encontraba anteriormente difuso excepto por algunos puntos cercanos a la membrana plasmática, en esta ocasión también se encuentra disperso pero a su vez se co-localiza con las proteínas presentes en las EVs de las formas infectivas, llegándose a diferenciar unas estructuras con forma de “vesículas” por todo el citoplasma del parásito, encontrándose cercanas al núcleo y al kinetoplasto como se observa en la Figura 4.21 (A).

En tripomastigotes derivados de cultivo (Figura 4.21 (B)) el marcaje seguía el mismo patrón anterior, disponiéndose el extremo C-terminal por la membrana plasmática del parásito, en la bolsa flagelar y en el citoplasma en la zona cercana al núcleo y al kinetoplasto. En amastigotes (Figura 4.21 (C)), la fluorescencia se localiza principalmente

en la membrana plasmática con varios puntos en ella donde el marcaje es más intenso para la co-localización de ambas inmunosueros.



**Figura 4.21.** Co-localización mediante microscopía láser confocal del extremo C-terminal MASP y de las proteínas transportadas en EVs de tripomastigotes en las diferentes etapas del ciclo de vida de *T. cruzi* cepa PAN4. Marcaje del extremo C-terminal con inmunosuero anti-C-terminal MASP (Alexa fluor 633), marcaje de EVs de tripomastigotes con inmunosuero anti- EVs-Tripo (FITC), marcaje del ADN con DAPI. Barra 5  $\mu$ m **A.** Epimastigotes. **B.** Tripomastigote derivado de cultivo celular; **C.** Amastigote “like”; y **D.** Control negativo con suero pre- inmune de ratón. Tamaño de barra de escala: 5 $\mu$ m.

## Resultados

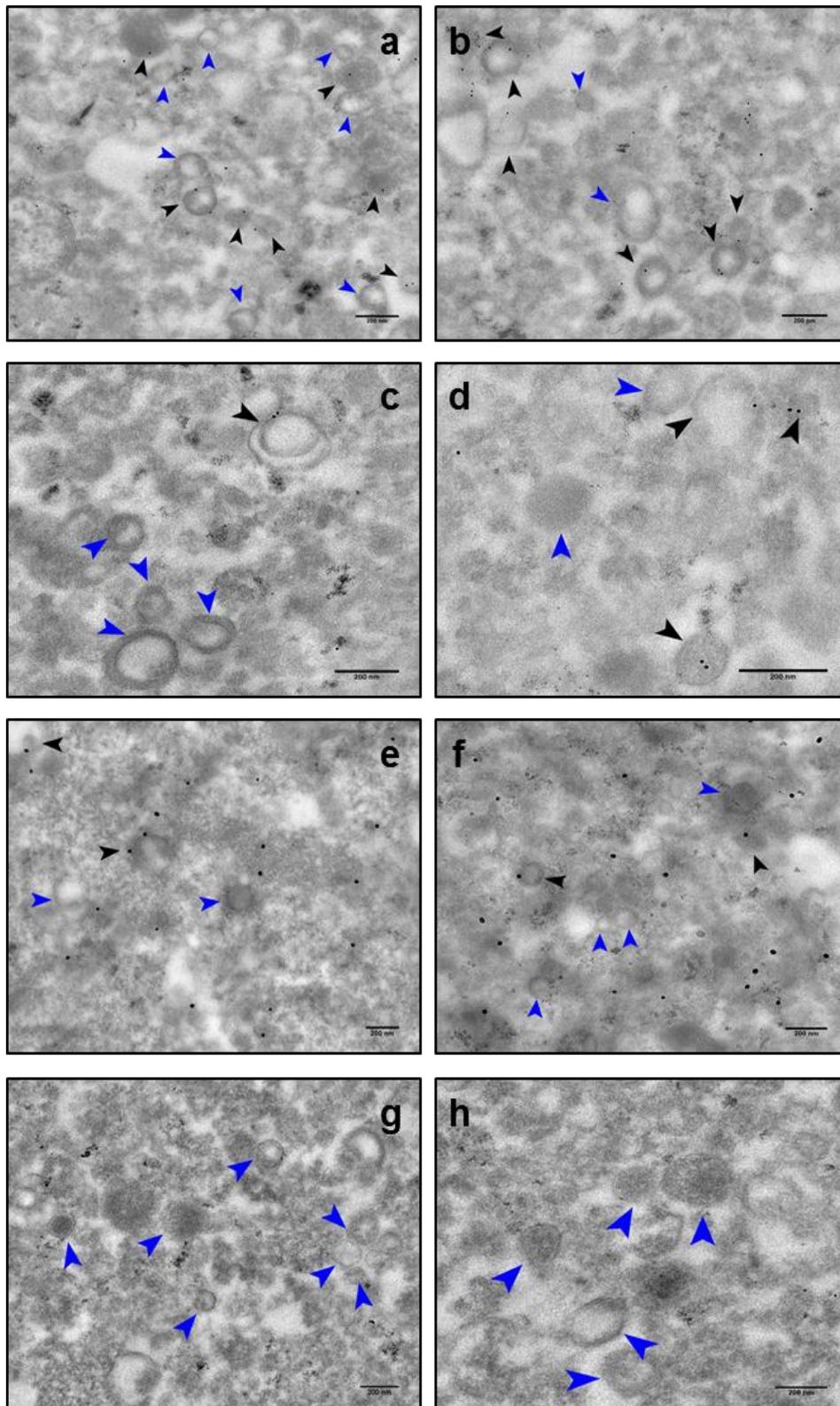
La localización celular de los dos extremos conservados de las proteínas MASP en parásitos sin permeabilizar mostró como en epimastigotes el marcaje es difuso a lo largo del citosol para ambos no así en las formas involucradas en el ciclo celular del parásito (tripomastigotes y amastigotes), localizándose en la superficie del parásito bordeándolo siguiendo el contorno de la membrana plasmática (Figura 4.21).

### **4.3.3 INMUNOCITOQUÍMICA DE LAS EXTREMOS CONSERVADOS DE LAS PROTEÍNAS MASP EN EVS SECRETADAS POR *T. CRUZI*.**

Tras la localización de los extremos conservados de las proteínas MASP en las formas libres del parásito y durante su ciclo de invasión, así como la demostración de la presencia de EVs secretadas por el parásito y del estudio del perfil proteico de éstas mediante western blot en proteínas solubles y EVs, se procedió a inmunolocalizarlas mediante microscopía electrónica de transmisión y marcaje con partículas de oro en cortes ultrafinos de dichas EVs.

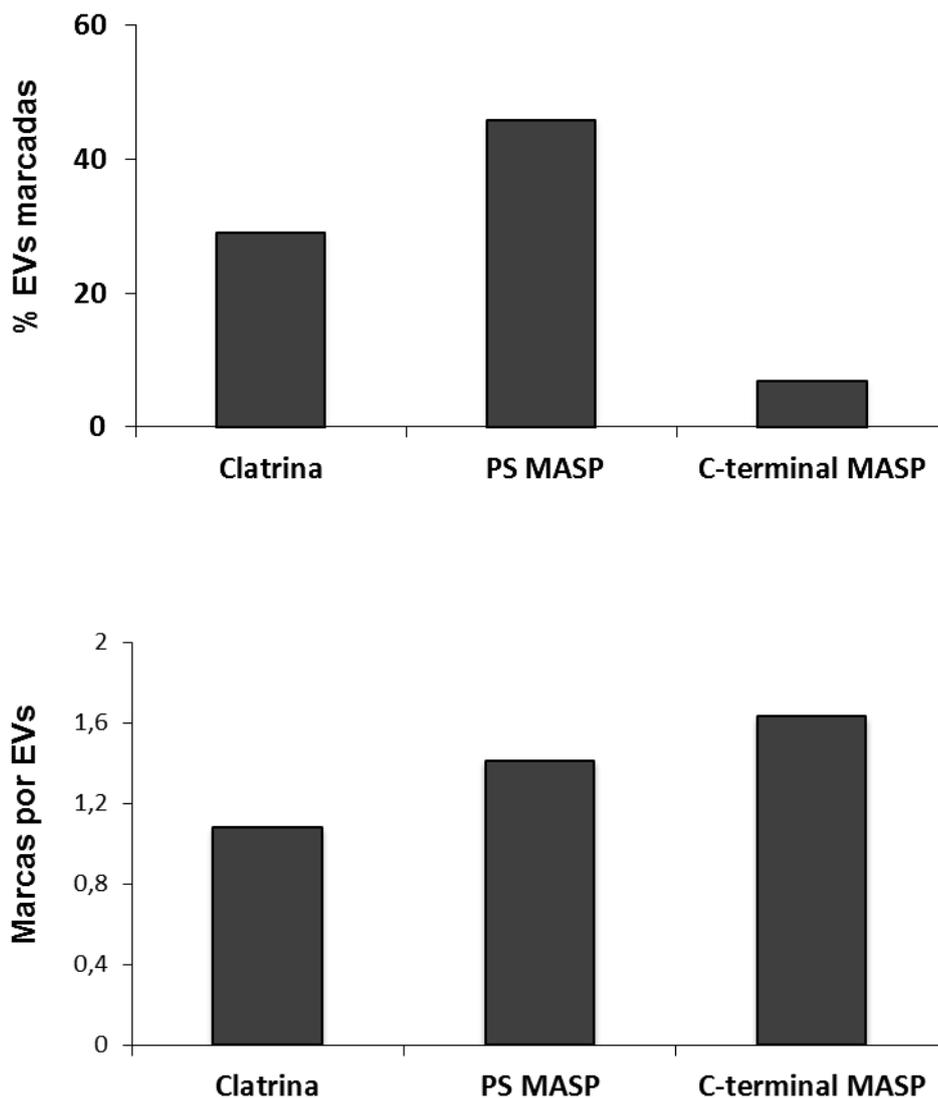
Tras el análisis por microscopía electrónica de las EVs aisladas de las formas tripomastigotas infectivas se determinó el número de EVs marcadas para ambos extremos y para la proteína Clatrina como marcador específico de este tipo de vesículas (Figura 4.22). Mediante el conteo de al menos 100 EVs se determinó el número de EVs para cada uno, presentándose la región C-terminal en aproximadamente el 7 % de las EVs analizadas con un número promedio de  $1.6 \pm 0.8$  de marcas por EVs. En el caso del péptido PS ~46 % de las EVs presentaron marca con  $1.41 \pm 0.2$  marcas promedias por EVs. La proteína Clatrina fue encontrada en el 29.11 % de las EVs analizadas con un promedio de marcas por EVs de  $1 \pm 0.2$ . Por lo tanto, del total de EVs analizadas existe un incremento de ~63 % de EVs que transportan el péptido señal

de las proteínas MASP. (Figura 4.23), y en menor porcentaje aquellas que mantienen la región C-terminal MASP.



## Resultados

**Figura 4.22.** Inmuno-marcaje con oro coloidal de EVs-T transportando el péptido PS y la región C-terminal MASP. **(a y b)**. Inmunomarcaje con inmunosuero anti-C-terminal MASP. **(c y d)** Inmunomarcaje con inmunosuero anti-PS MASP. **(e y f)** Inmunomarcaje con anticuerpos anti-Clatrina. **(g y h)** Control mediante marcaje con anticuerpos anti-CD9. Flechas negras indican las EVs marcadas, flechas azules las que no presentan marca. Tamaño de partículas de oro de 10 y 25 nm. Barra: 200 nm.



**Figura 4.23.** Cuantificación de EVs marcadas. Las barras son representativas de al menos 100 EVs contadas por cada uno de los inmunosueros específicos para cada una de las proteínas.

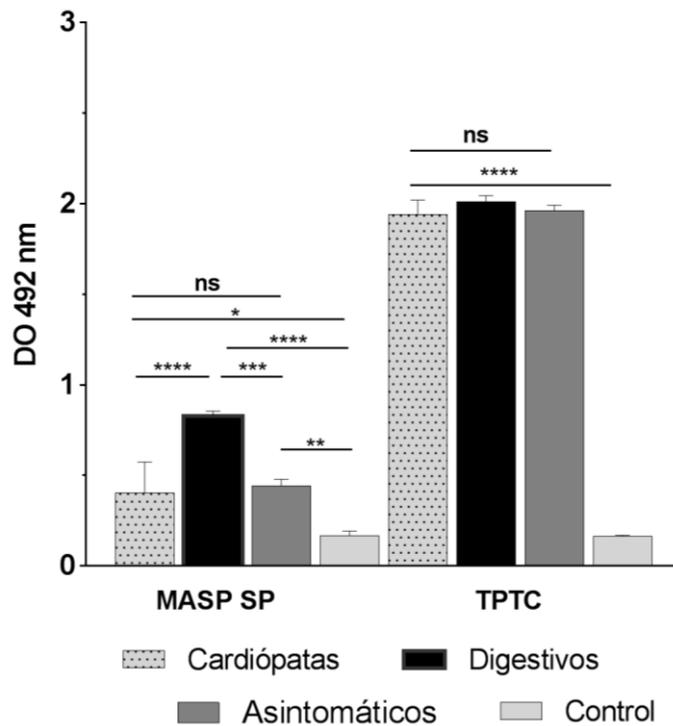
#### 4.4 **RESPUESTA HUMORAL DEL PÉPTIDO PS Y DE LA REGIÓN C-TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS MASP DE *T. CRUZI*.**

Después de demostrar la presencia de ambos extremos conservados de las proteínas MASP en EVs y de la expresión diferencial de esta familia de proteínas durante su ciclo de vida completo, se procedió al estudio de la respuesta humoral asociada a estas dos regiones en diferentes muestras de sueros de pacientes chagásicos.

Para ello, en primer lugar se realizó la evaluación de la respuesta humoral de un pool de los sueros clasificados en grupos según la patología que presentan: cardiópatas, digestivos y asintomáticos. Como control negativo se usó un pool de sueros de individuos sanos procedentes de la misma área que los enfermos y como control positivo frente a Chagas se enfrentaron los sueros a un extracto total de proteínas solubles de las formas no infectivas del parásito.

La respuesta de IgG frente al péptido sintético PS MASP de todos los sueros probados fue positiva aunque más baja que el extracto de proteínas solubles (PTTC) como se observa en la Figura 4.24, sin embargo, ambas fueron superiores al valor de corte ( $DO\ 0.16 \pm 0.02$ ). Comparando este resultado con respecto a la clasificación de los sueros según la patología, la mayor respuesta fue obtenida en el caso del grupo de sueros digestivos ( $DO\ 0.82 \pm 0.02$ ) seguida del grupo de cardiópatas ( $DO\ 0.40 \pm 0.17$ ) y el grupo de asintomáticos ( $DO\ 0.44 \pm 0.03$ ). Sin embargo, la respuesta de los tres grupos de sueros fue similar para TPTC sin diferencias significativas entre ellos.

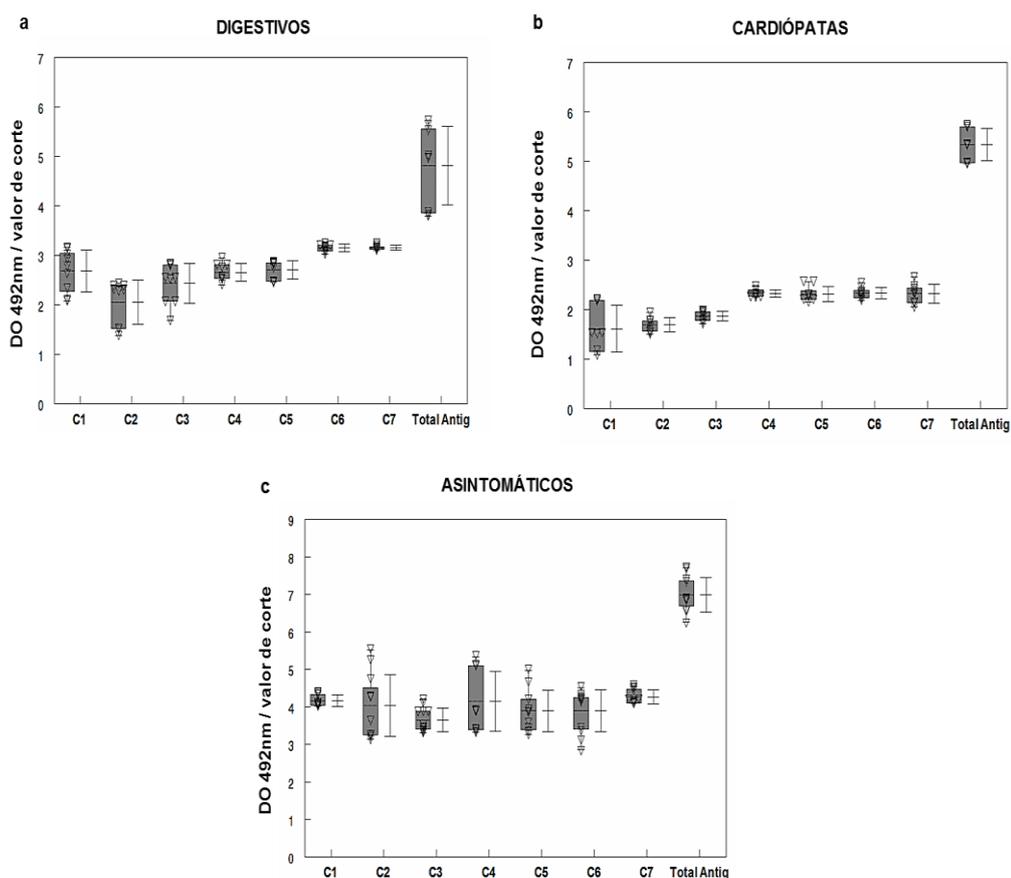
## Resultados



**Figura 4.24.** Respuesta IgG de los distintos grupos de sueros de pacientes con Chagas frente al péptido PS MASP y PTTC (Total Protein *T. cruzi*) clasificados según su patología y del grupo control negativo. Los valores del p-valor  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*) fueron considerados como extremadamente significativos,  $p < 0.001$  (\*\*\*) altamente significativos,  $p < 0.01$  (\*\*) ligeramente significativos,  $p < 0.05$  (\*) baja significancia y *ns* como no significativos.

En ensayos separados se procedió a determinar la respuesta humoral de dichos sueros frente a una batería de péptidos sintéticos correspondientes a epítomos solapantes procedentes de un mapeado de la región C-terminal (C1-C6) y del péptido sintético C7 correspondiente a la región C-terminal de la proteína MASP52 caracterizado por De Pablos *et al.* (2011) [127] y que posee tres sustituciones en la secuencia consenso: Leu-Leu-Val por Phe-Phe-Phe en la posición 16 a la 18. Este péptido sirvió para evaluar una variación en la respuesta humoral debida o no por las sustituciones de aminoácidos con la misma polaridad.

La respuesta de anticuerpos de los péptidos para cada grupo de sueros frente a cada uno de los péptidos fue positiva (Figura 4.25), sin embargo y al igual que ocurrió para el péptido PS, los valores obtenidos por los péptidos C1-C7 fueron menores comparados con el lisado total de parásitos usado como control, indicando que la respuesta frente a ambas regiones de las proteínas MASP corresponde a una fracción de la respuesta humoral total frente a *T. cruzi*.



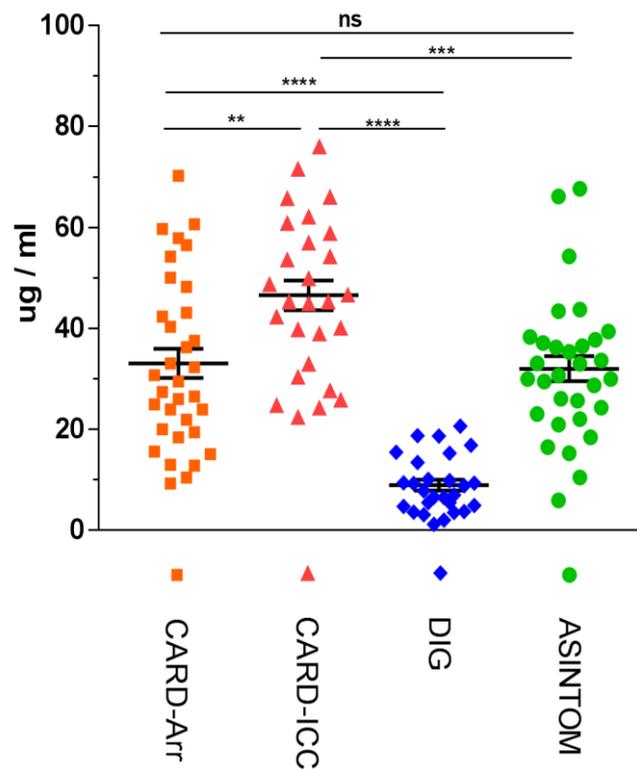
**Figura 4.25.** ELISA de los péptidos C1-C7 y de los parásitos lisados (total antigen) usando sueros de pacientes infectados con *T. cruzi* clasificados según las diferentes manifestaciones de la enfermedad. **(a)** Digestivos. **(b)** Cardiópatas. **(c)** Asintomáticos. Todas las muestras con valores de DO 492 nm / valor de corte  $\geq 1$  fueron consideradas positivas. El valor de corte fue calculado usando un pool de sueros negativos de Panamá con la siguiente fórmula:  $\text{Media} + 3 \times \text{SD}$  pool de sueros negativos.

## Resultados

Por otra parte, con el objetivo de evaluar la capacidad antigénica del péptido señal de las proteínas MASP y de su asociación con la patología que pueden sufrir los enfermos de Chagas, se procedió al estudio de la respuesta humoral de cada uno de los sueros de forma individual en presencia o ausencia de inmunocomplejos (ICs) formados por IgG específicas que se unen al péptido PS MASP mediante la metodología descrita en el apartado 3.9.5. Tras el tratamiento de cada uno de los sueros a bajo pH (4.5) para separar las posibles inmunoglobulinas de los inmunocomplejos, se probaron dichos sueros frente al péptido PS MASP, dividiéndolos en dos grupos: CICs (con inmunocomplejos, es decir, sin tratar) y SICs (sin inmunocomplejos o tratados).

Tras el tratamiento de los sueros se procedió a la determinación de la presencia de EVs libres de IgGs obtenidas por ultra-centrifugación (Figura 4.26).

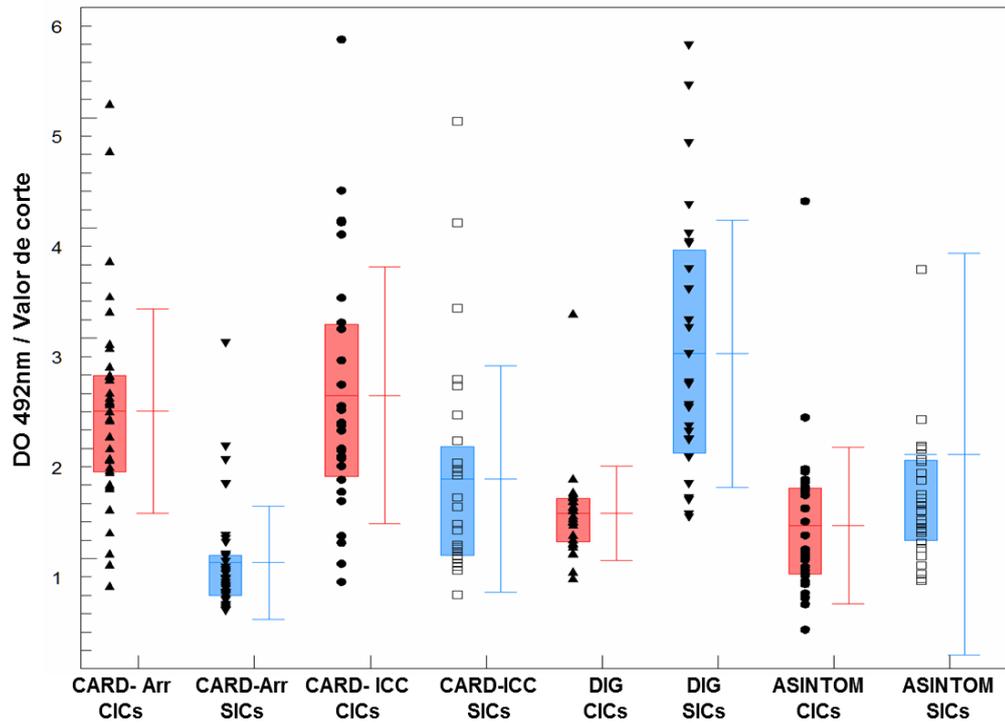
Las concentraciones medias de proteínas de EVs presentes en los ICs de los sueros fueron de  $8.91 \pm 5.53$   $\mu\text{g}$  para los sueros digestivos;  $33.05 \pm 16.62$   $\mu\text{g}$  para los sueros de arrítmicos cardiópatas;  $46.54 \pm 15.23$   $\mu\text{g}$  para los sueros de insuficientes cardiacos y  $32.01 \pm 13.80$   $\mu\text{g}$  para los sueros en fase indeterminada. Todos ellos presentando diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0.0001$ ), excepto con el grupo de sueros asintomáticos donde no hay diferencias significativas, y entre los grupos de sueros cardiópatas donde existió una ligera diferencia significativa ( $p < 0.001$ ).



**Figura 4.26.** Concentración de proteínas procedentes de EVs libres de IgGs humanas obtenidas tras el desacoplamiento de los ICs presentes en cada uno de los sueros individuales de los pacientes agrupados por patologías. Las barras horizontales representan los valores medios y las barras verticales los valores de la desviación estándar SD. Los valores con  $p$ -valor  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*) fueron considerados como extremadamente significativos,  $p < 0.001$  (\*\*\*) altamente significativos,  $p < 0.01$  (\*\*) ligeramente significativos y ns ( $p < 0.05$ ) como no significativos. (CARD-Arr= cardiópatas arrítmicos; CARD-ICC= cardiópatas con insuficiencia cardíaca, DIG= digestivos, Asintómicos= sin síntomas determinados).

Tras corroborar la existencia de proteínas pertenecientes a las EVs que forman los ICs en cada uno de los sueros de los pacientes, se procedió a la determinación de la respuesta frente al péptido señal PS MASP en para cada uno de los sueros CICs y SICs (Figura 4.27).

## Resultados



**Figura 4.27.** Respuesta IgG frente al péptido PS MASP de los sueros de pacientes de Chagas clasificados por patologías y en presencia (CICs) o no (SICs) de ICs. El valor de corte fue calculado mediante un pool de sueros de donantes sanos tratados y sin tratar. CARD-Arr: pacientes cardiopatas arrítmicos; CARD-ICC: pacientes con insuficiencia cardíaca; DIG: pacientes digestivos, ASINTOM: pacientes sin sintomatología. Barras rojas: Sueros con ICs; Barras azules: sueros sin ICs.

Como se observa en la Figura 4.27, la respuesta en los sueros SICs comparada con el grupo control no infectado está en concordancia con la respuesta de IgGs totales previamente ensayadas en la Figura 4.25. Cuando comparamos los sueros CICs y SICs entre grupos, el grupo de pacientes con patología digestiva en ausencia de ICs (DIG SICs) mostró la respuesta frente al péptido PS MASP más alta en relación con la respuesta obtenida con el grupo de sueros con inmunocomplejos (CICs), lo cual indica la presencia de inmunocomplejos formados por IgGs anti-PS MASP en este grupo de sueros. La razón entre la DO obtenida para

cada suero fue relativamente superior a 1 en la mayoría de los casos, excepto para el grupo de pacientes cardiopatas arrítmicos (CARD- Arr).

La sensibilidad del test para los sueros tratados (SICs) fue del 93 % mientras que para los sueros sin tratar (CICs) fue del 41 %, siendo la especificidad del 99 % para ambos casos.

#### 4.5 **DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE EVs Y DEL PÉPTIDO PS MASP EN INMUNOCOMPLEJOS**

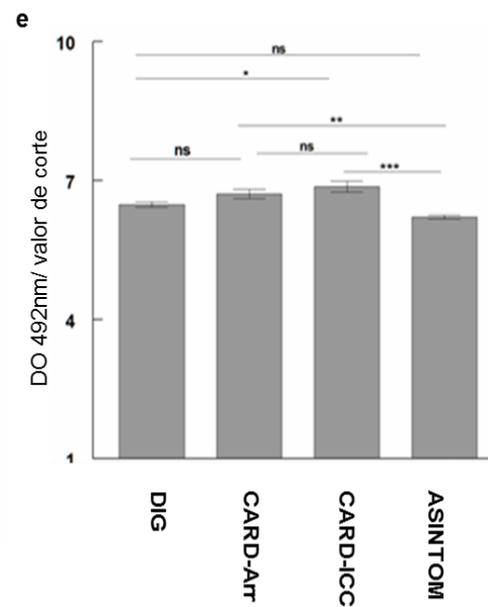
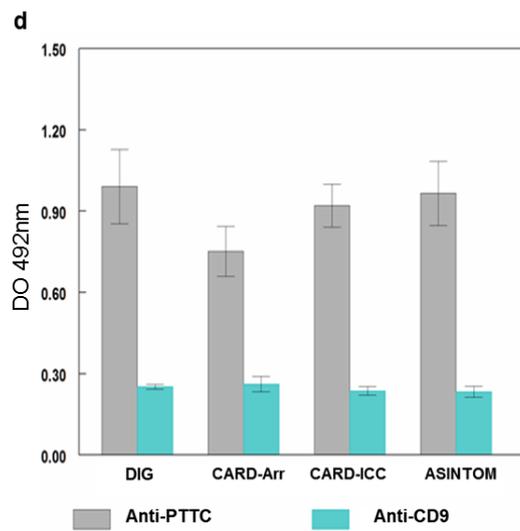
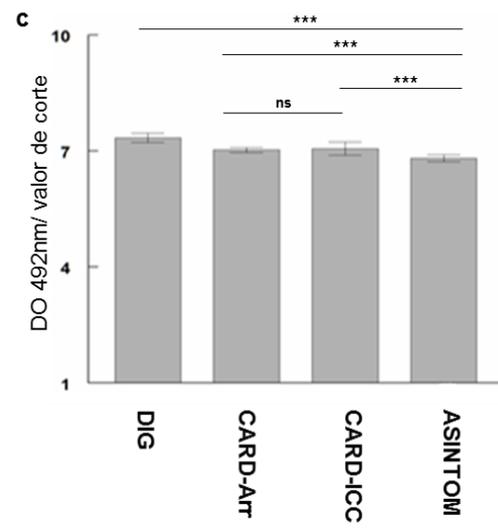
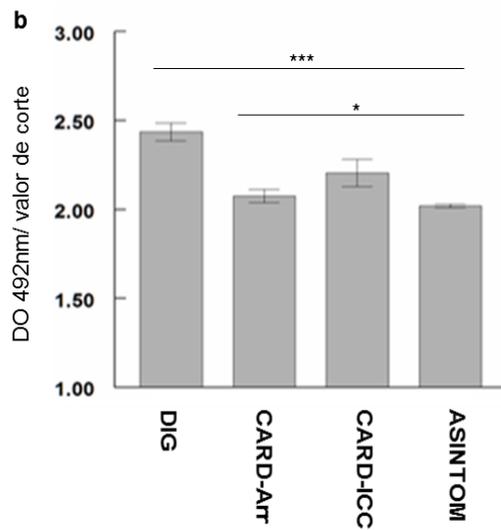
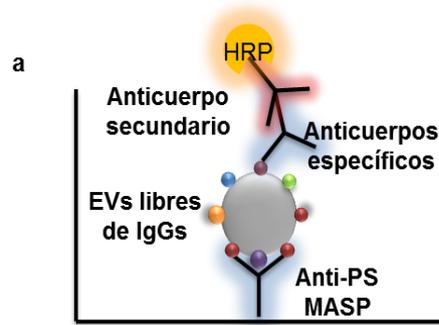
Para determinar si las EVs secretadas por los tripomastigotes sanguíneos presentes en el hospedador son parte de dichos ICs, y de si en la superficie de dichas EVs se encuentran las proteínas MASP, se realizó un ensayo de inmunocaptura. Dicho ensayo se basa en la presencia de anticuerpos en el inmunosuero anti-PS MASP capaces de ligarse a dichas EVs liberadas y obtenidas tras ultracentrifugación diferencial, siendo previamente tratadas para desacoplar las IgGs humanas específicas frente a ellas. Este procedimiento se realizó para cada uno de los grupos de los sueros de pacientes chagásicos. El ensayo de inmunocaptura se detalla en la Figura 4.28 (a) así como los resultados obtenidos.

La incubación con los anticuerpos anti-PS MASP previamente recubriendo el pocillo de la placa de ELISA y la detección de las EVs libres de inmunoglobulinas utilizando un inmunosuero anti-EVs Tripo como elemento de detección, reveló una alta respuesta en los cuatro grupos de pacientes frente al grupo control no infectado (valor de corte = 0.503), siendo el grupo digestivo el más reactivo (DO/ valor de corte = 2.42) (Figura 4.28 (b)), y con diferencias altamente significativas con respecto al resto de grupos ( $p < 0.001$ ). Cuando los ensayos de inmunocaptura- ELISA se realizaron con un pool de los sueros tratados, es decir, sin ICs (dilución 1/100), la respuesta obtenida fue mayor que en el ensayo anterior, pero similar entre todos los grupos (Figura

## Resultados

4.28.c), aunque si existen diferencias significativas ( $p > 0.001$ ) entre el grupo de sueros digestivos y el grupos de sueros (CARD-Arr, CARD-ICC y Asintomáticos), entre los dos grupos de sueros con cardiopatías ( $p < 0.001$ ) con el grupo de sueros asintomáticos, y no encontrándose diferencias significativas entre los dos grupos con cardiopatías ( $p > 0.05$ ). Estos resultados demostraron la existencia del PS MASP en los ICs capturados detectado por inmunoglobulinas específicas anti-PS MASP, presentes en los sueros chagásicos inmune, con los niveles más altos para el grupo digestivo (Figura 4.28.b).

Por otra parte, se probó como control positivo de la reacción un inmunosuero anti-PTTC e inmunoglobulinas anti-CD9 como anticuerpo control de EVs humanas, manteniendo los anticuerpos anti-PS MASP como cebos y las mismas EVs libres de IgGs de cada uno de los grupos de sueros de pacientes chagásicos (Figura 4.28 (d)). El resultado obtenido mostró una alta presencia de antígenos de *T. cruzi* y una baja respuesta para el marcador de EVs humanas CD9. Por lo tanto, este resultado muestra que las EVs procedentes de los ICs capturadas por los anticuerpos específicos anti-PS MASP tienen un origen parasitario predominante, y además, estos no están formados por EVs humanas presentes en los sueros.



## Resultados

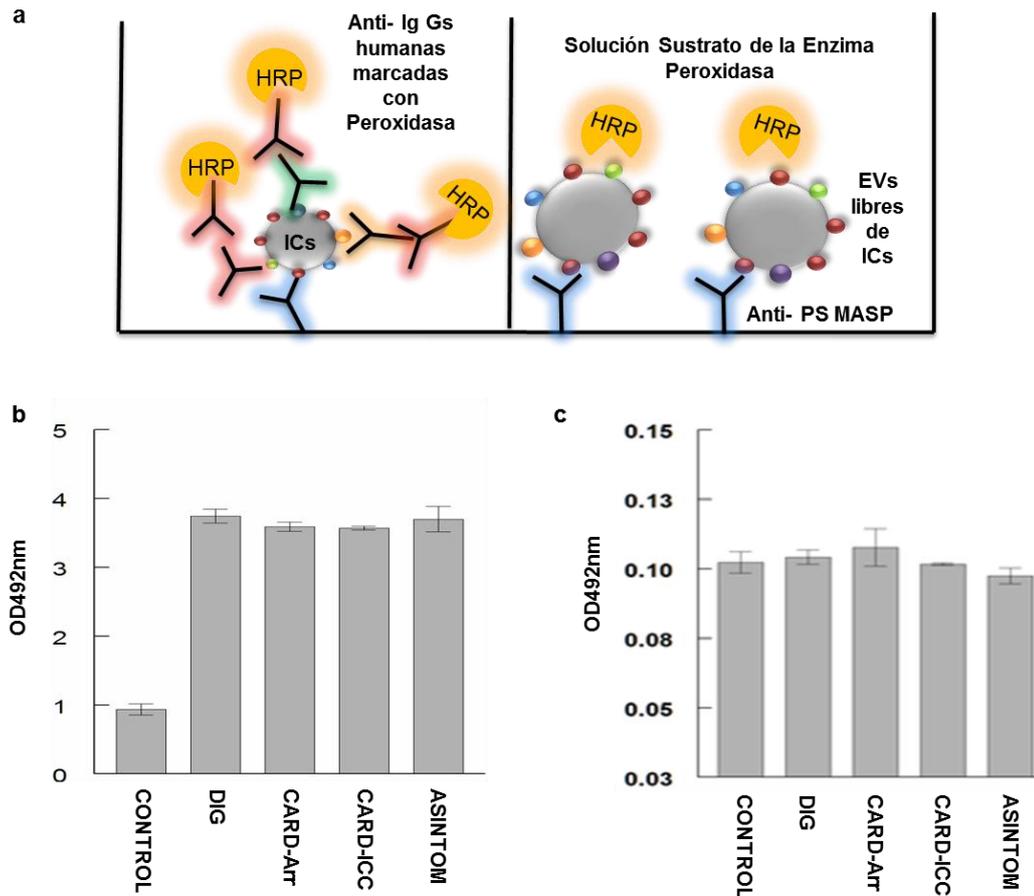
**Figura 4.28.** Ensayos de inmunocaptura de las EVs presentes en los ICs presentes en los sueros de los pacientes de Chagas crónico con diferentes patologías. **(a)** Representación esquemática de la metodología empleada en el ensayo de inmunocaptura. **(b)** Inmunocaptura de EVs libres de IgGs purificadas de un pool de sueros de cada grupo de pacientes de Chagas, con el inmunosuero anti-PS MASP como elemento de captura y anticuerpo específico frente a EVs-Tripo como anticuerpo de detección, revelado mediante inmunoglobulinas anti-ratón (5 µg/ml) marcadas con HRP. **(c)** Inmunocaptura de las EVs presentes en los sueros chagásicos mediante el inmunosuero anti-PS MASP como elemento captador y una dilución 1/100 de cada pool de sueros tratados (SICs) como anticuerpos específicos, revelados mediante anticuerpos anti-IgGs humanas marcadas con HRP. **(d)** Inmunocaptura de las EVs libres de IgGs procedentes de un pool de suero de cada grupo clínico chagásico, mediante inmunosuero anti-PS MASP como elemento captador y dos sueros, anti-PTTC (control positivo para *T. cruzi*) y anti-CD9 (control positivo humano) (5 µg/ml) como anticuerpos específicos, revelado con inmunoglobulinas anti-conejo y anti-ratón con HRP (5 µg/ml). **(e)** Inmunocaptura de EVs secretados por las formas T mediante el inmunosuero anti-PS MASP como elemento captador, enfrentadas a cada uno de los pools de sueros tratados (SICs) como anticuerpos específicos (1/100), revelados con inmunoglobulinas anti-humanas con HRP. (\*=  $p < 0.05$ , \*\*=  $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , ns =  $p > 0.05$ , no significativo)

Para determinar si las EVs de *T. cruzi* están formando parte de los inmunocomplejos, la captura inmunológica fue ligeramente modificada mediante el uso de los mismos anticuerpos anti-PS MASP como cebo, pero como antígenos se usaron las EVs secretadas por las formas T. A continuación, la placa se incubó con el conjunto de sueros de pacientes chagásicos y, finalmente, se reveló utilizando un conjugado de anticuerpos anti-IgGs humanas marcados con HRP (Figura 4.28 (e)). Los resultados muestran que el reconocimiento de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* es muy alto con respecto al grupo de control con una diferencia significativa entre el grupo de insuficientes cardiacos

y los pacientes indeterminados ( $p < 0,001$ ), diferencia ligeramente significativa entre cardiacos arrítmicos e indeterminados ( $p < 0,01$ ) y no significativo ( $p > 0,05$ ) entre los pacientes digestivos e insuficientes cardiacos (Figura. 4.28 (e)).

Para determinar la presencia de inmunoglobulinas humanas en la superficie de los ICs, se purificaron los ICs procedentes de un pool de cada grupo de sueros y se recubrieron con ellos los pocillos de la placa para ELISA. Las placas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgGs humanas marcadas con Peroxidasa. Como se muestra en la Figura 4.29 (b), la absorbancia de los sueros con diferentes patologías fue aproximadamente 2.5 veces superior que el grupo control, revelando que las inmunoglobulinas humanas estaban presentes en las fracciones purificadas.

## Resultados



**Figura 4.29.** Controles de los ensayos de inmunocaptura. **(a)** Representación esquemática de la metodología a desarrollar. **(b)** Ensayo control de la determinación de la presencia inmunoglobulinas humanas en los ICs de los sueros de los pacientes chagásicos usando un anticuerpo anti-Ig Gs humanas marcado con HRP como anticuerpo de detección. **(c)** Ensayo control de la determinación de la ausencia de la enzima Peroxidasa en las EVs libres de ICs tras el tratamiento a pH 4.5. Anticuerpo anti-PS MASP usado como elemento captador y solución sustrato Peroxidasa como elemento de detector.

Finalmente, se realizó un ensayo control para determinar la no presencia de la enzima Peroxidasa en las EVs que forman los ICs. Para ello se usó como antígeno las proteínas libres de los ICs de cada grupo de sueros obtenidos por ultracentrifugación y revelados con el sustrato de la enzima Peroxidasa (Figura 4.29 (c)). Los resultados muestran que

tanto el grupo control como las muestras de los pacientes no hay presencia de la enzima Peroxidasa en las fracciones de las EVs de los ICs la cual podría interferir potencialmente con la reacción.

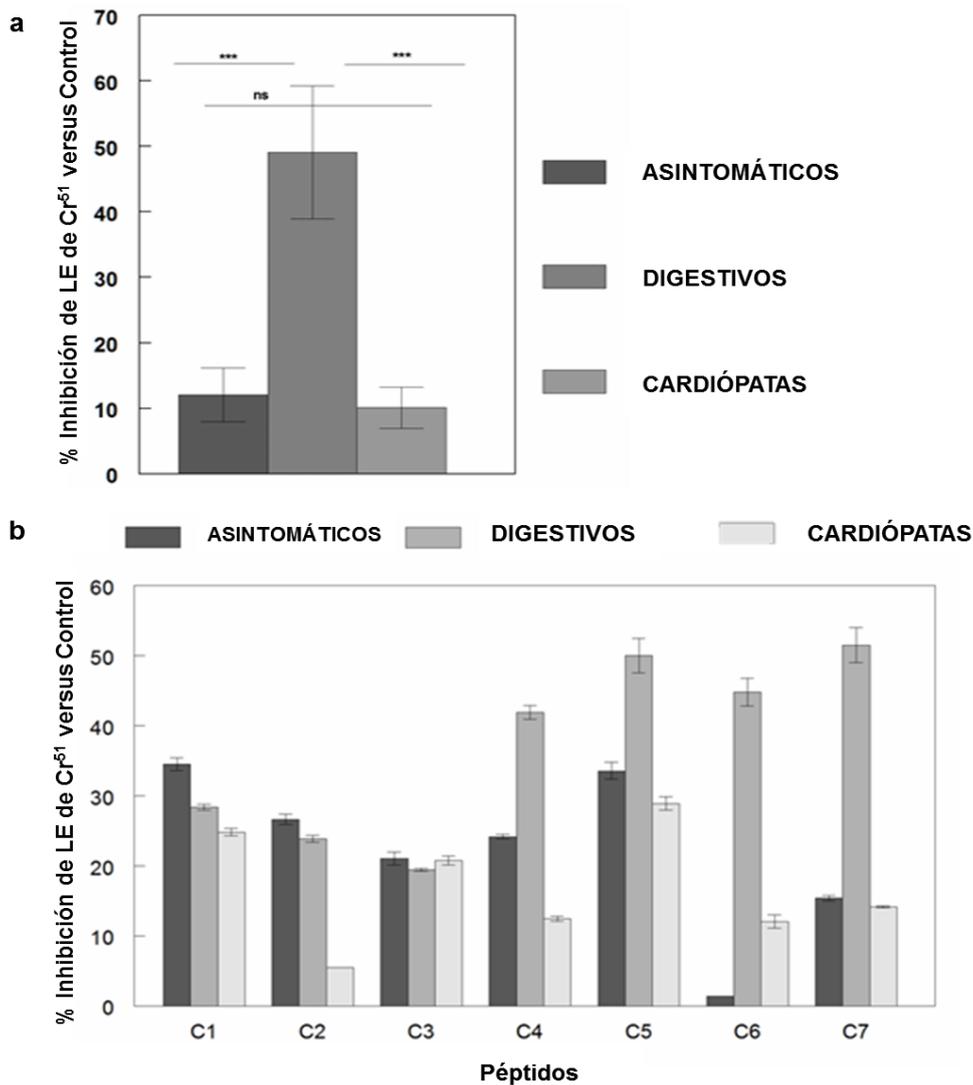
#### 4.6 **ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA LISIS POR EL COMPLEMENTO DEL PÉPTIDO PS, LA REGIÓN C-TERMINAL MASP Y DE LAS EVs DE *T. CRUZI***

Después de verificar la existencia de inmunocomplejos (ICs) en los sueros de pacientes Chagásicos crónicos y de que existe reactividad frente al péptido PS MASP en los sueros de los pacientes digestivos e indeterminados tras el tratamiento para eliminar de los ICs las inmunoglobulinas humanas, y de que además tanto el péptido PS y la región C-terminal MASP son transportados en EVs secretadas por las formas T, se procedió a la evaluación de la funcionalidad de los antígenos liberados por EVs en la evasión del sistema inmune. Para ello se llevó a cabo un ensayo de la inhibición del complemento humano.

Tanto las EVs como el péptido PS MASP y los péptidos C1 al C7 fueron capaces de inhibir la lisis mediada por el sistema del complemento humano presente en los sueros chagásicos en diferentes grados para los distintos pool de los grupos de sueros chagásicos (Figura 4.30 (a) y (b)).

En el caso del PS MASP, el porcentaje de inhibición mayor aparece en el grupo de sueros digestivos con un 50 % de inhibición, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) respecto a los porcentajes obtenidos para los grupos de sueros cardiopatas y asintomáticos, que fueron más bajos (< 20 %) (Figura 4.30 (a)).

## Resultados



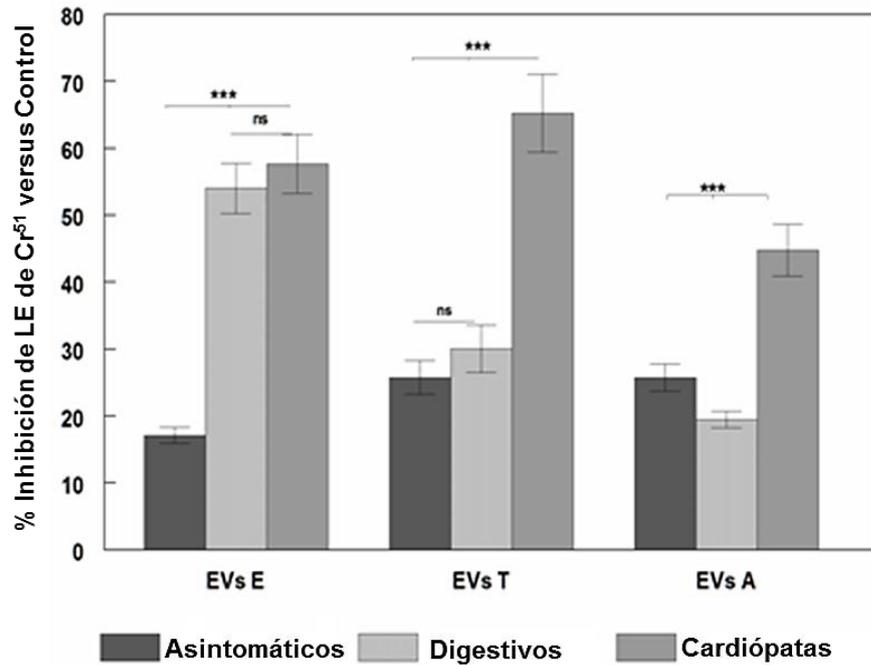
**Figura 4.30.** Inhibición de la lisis mediada por Complemento. **(a)** Porcentaje de inhibición de la lisis mediada por el sistema del complemento por el péptido PS MASP. **(b)** Porcentaje de inhibición de la lisis mediada por el complemento por los péptidos C1 hasta C7 de la región MASP C-terminal. Los Epimastigotes marcados con Cr<sup>51</sup> fueron tratados con 10 % de un pool de suero de pacientes chagásicos inactivados por calor y diagnosticados como digestivos, cardíopatas y asintomáticos. Después se incubaron con una dilución 1/18 del complemento humano (DL50) y 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l para cada péptido a 37 °C durante 1 h. Como control positivo se usaron los pools de sueros de pacientes chagásicos sin inactivar y un pool de sueros inactivados sin adición del complemento como control negativo.

Siguiendo con la evaluación de la capacidad de inhibir la actividad lítica del complemento humano, se procedió a evaluar el panel de péptidos pertenecientes a la región C-terminal de las proteínas MASP y de la presencia de anticuerpos líticos específicos frente a dicha región en los sueros anteriormente probados (Figura 4.30 (b)).

Cada uno de los péptidos mostró capacidad de inhibir la actividad lítica del complemento en todos los grupos de sueros, con un incremento de la acción para los sueros de pacientes con patología digestiva y una disminución en los pacientes asintomáticos. El péptido C5 mostró un alto porcentaje de inhibición, con la excepción del grupo de sueros de pacientes con patología digestiva, donde el péptido C7 presentó el mayor efecto bloqueando la acción de anticuerpos líticos.

Usando la misma metodología, se procedió a evaluar el papel de las EVs secretadas en la evasión inmune del sistema del complemento en las formas E, T y A de *T. cruzi*. La mayor respuesta inhibitoria para la actividad lítica del complemento se obtuvo en el caso de los pacientes con cardiopatías (% inhibición > 50 %) ( $p < 0.001$  entre todos los sueros probados) en EVs obtenidas de las tres formas del parásito, seguidos por los sueros de pacientes con patologías digestivos para las EVs secretadas por las formas E y T (>50 % y 30 % respectivamente) (Figura 4.31). El porcentaje de protección más bajo en los tres grupos de sueros fue para las EVs secretadas por las formas intracelulares con respecto a las EVs de las formas E y T

## Resultados



**Figura 4.31.** Inhibición de la actividad lítica del sistema del complemento humano por EVs secretadas por *T. cruzi*. EVs E= EVs secretadas por epimastigotes; EVs T= EVs secretadas por tripomastigotes; EVs A= EVs secretadas por amastigotes (1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ).

Esto muestra cómo la respuesta inmune frente a *T. cruzi*, y más en concreto, frente a las proteínas de superficie MASP, depende de la patología de procedencia de los sueros y del origen de las EVs como captadoras de anticuerpos capaces de disparar la lisis por complemento.

## 5. DISCUSIÓN

---



## 5 DISCUSIÓN

La secreción de pequeñas vesículas por parte de las células eucariotas fue descubierta en los años 80, cuando se describieron por primera vez como vesículas de origen endosomal secretadas por reticulocitos [142, 260]. Desde entonces, el conocimiento sobre la biogénesis, composición y función de las EVs ha ido en aumento. Es debido a sus particulares funciones donde reside el interés sobre éstas vesículas, dado que intervienen en la comunicación intercelular, capaces de modular respuestas en otras células, así como de intervenir en la presentación de antígenos y, por tanto, modificar la respuesta inmune [139, 174]. Además, debido al conocimiento sobre a su composición y su presencia en todos los fluidos corporales, son usadas como biomarcadores de enfermedades como por ejemplo cáncer [261].

El tipo de vesículas que una célula puede liberar varía desde vesículas de tamaño mayor a 100 nm o Microvesículas, hasta vesículas de pequeño tamaño como los exosomas, de tamaño comprendido entre 30 y 100 nm, pasando por cuerpos apoptóticos, micropartículas, ectosomas y oncosomas, de distinto origen celular, y que pueden ser confundidos con las EVs. Por ello, se han establecido protocolos universales para el aislamiento y reconocimiento por parte de la ISEV (International Society of Exovesicles) [262], independientemente del tipo de célula del que procedan dichas EVs.

En el caso de *T. cruzi*, las condiciones de cultivo juegan un papel muy importante tanto en su crecimiento como en el proceso de diferenciación hacia las formas metacíclicas infectivas. Entre ellos la concentración de electrolitos, la osmolaridad, la concentración de fuentes de carbono, como la glucosa, y la temperatura [50, 263, 264].

## Discusión

Por todo ello, se analizó el efecto producido por el tiempo, temperatura y nutrientes en la liberación de dichas EVs.

Las formas epimastigotas se caracterizan en cultivo por presentar tres fases de crecimiento, la fase adaptativa, la fase logarítmica (con un tiempo de duplicación de ~12 h) y la fase estacionaria. Siguiendo este comportamiento, se estudió la secreción de EVs a lo largo de dicha curva de crecimiento (Figura 4.5). La secreción de EVs fue en incremento conforme el tiempo de cultivo, observándose un máximo de secreción de EVs a las 12 h de incubación repitiéndose a las 24 h. Estos periodos coinciden con la cinética de crecimiento del parásito, el cuál presenta un tiempo de generación de aproximadamente 12 h [265], coincidiendo igualmente con un incremento de la fase S del ciclo celular, donde ocurre la mayor síntesis de ADN y posteriormente una mayor síntesis de proteínas [266].

Por otra parte, se sabe que la variación en la temperatura así como la presencia de algunos medicamentos, metales pesados o deprivación de glucosa, induce un estrés térmico que desencadena una respuesta celular común tanto en eucariotas y como en procariotas que conlleva a la síntesis de proteínas de choque térmico o HSP (Heat Shock Proteins), encargadas de proteger a las células frente a dicho estrés [267] y permitir su supervivencia.

Las proteínas de choque térmico o HSPs son chaperonas encargadas de proteger al proteoma de las células impidiendo que se produzca el *misfolding* de las mismas y su agregación [268].

En *T. cruzi* también han sido estudiadas estas proteínas tanto a nivel de organización genómica como de caracterización molecular [269-272]. *T. cruzi* está sometido a condiciones térmicas diferentes a lo largo de su ciclo de vida, desde la temperatura ambiente a la del insecto vector de (26-28 °C) a la del hospedador mamífero (37 °C).

El stress térmico sobre las formas infectivas tiene un efecto antes y durante la infección, reduciéndose el porcentaje de parasitación así como la capacidad de multiplicación de las formas intracelulares a una temperatura no mayor de 37 °C [264].

Además, de afectar a las tasas de parasitación, el stress térmico influye en la biosíntesis de ADN, ARN y proteínas por parte de los parásitos como demostraron Sánchez-Moreno *et al.* (1997)[273].

La asociación entre stress térmico y la liberación de exosomas reside en la presencia de proteínas HSPs en exosomas secretados, como es el caso de la proteína HSP70, HSP 90 ó HSP 60 secretadas por diferentes tipos de células por las vía no-clásica de secreción que incluye la vía exosomal [274], siendo incluso usadas como proteínas marcadoras de EVs [175].

En consecuencia, la evaluación de la variación de temperatura en la secreción de EVs mostró como ésta es mayor en las formas epimastigotas a la temperatura óptima de crecimiento (28 °C), pero en respuesta a una temperatura extrema (45 °C) vuelve a elevarse la secreción de EVs (Figura 4.6). Puesto que los exosomas intervienen en la comunicación célula-célula, y las proteínas HSPs forman parte de los mecanismos de protección frente al estrés térmico, y son secretadas por la vía exosomal, este aumento de la liberación de EVs podría ser la consecuencia de la activación de un mecanismo protector frente al choque térmico como se demostró en *L. donovani* [202], donde promastigotes sometidos a 37 °C liberaban exosomas con un incremento significativo de estos marcadores de choque térmico y un aumento en la liberación de exosomas.

La influencia del estrés térmico en la secreción de EVs en las formas MT también mostró esta respuesta, con un incremento significativo de las EVs cuantificadas en los cultivos de MT expuestos a

## Discusión

37 °C, por encima de la temperatura a la que se produce la Metaciclogénesis, 28 °C [253]. Este aumento de EVs liberadas podría deberse al hecho de que éstas son las formas que infectan al hospedador mamífero, el cuál presenta un temperatura corporal de 37 °C, además de conocerse la implicación de las EVs en los procesos de infección de los parásitos [194, 211, 235] . Esta participación de las EVs en la propagación de los parásitos podría deberse a la composición proteica de las mismas, ya que como se demostró mediante la disminución del porcentaje de EVs purificadas tras el tratamiento de las formas infectivas del parásito con lectina de germen de trigo, lo que demuestra que éstas EVs están recubiertas por glicoproteínas (Figura 4.7). Las glicoproteínas forman una parte importante de la superficie del parásito (glicocálix) y se han demostrado que son importantes en los procesos de reconocimiento, adhesión y entrada del parásito en la célula hospedadora [76, 275].

La relación entre la liberación de EVs y el ciclo celular del parásito también has sido estudiado en la presente tesis. Para ello se llevó a cabo la sincronización de la síntesis de ADN mediante la adición de Hidroxiurea [266, 276-278]. Tras la sincronización, se produjo la mayor liberación de EVs a las 12 h de incubación, con un aumento en el marcaje de proteínas, ADN y ARN en las mismas, que se corresponden con elevados niveles de incorporación de Uridina H3 y Timidina H3 por parte de los parásitos (Figura 4.8).

La liberación de EVs que trasportan proteínas, ADN y ARN, aparece cíclica, como se observa en la Figura 4.8, con un aumento a las 12 h, disminucióón a las 16 h, y aumento de nuevo a las 24 h. De esta manera se demuestra como en *T. cruzi* existe una correlación entre el ciclo celular y la secreción de vesículas como vía de secreción de proteínas. Además, dichas EVs trasportan ARN y ADN, como se ha

comprobado en todas las EVs secretadas por todos los tipos de células y organismos [171, 208, 279].

Al objeto de conocer si otras condiciones de estrés afectan a la secreción de EVs, los parásitos se sometieron a condiciones de privación de glucosa.

Para su crecimiento, el parásito necesita fuentes de carbono (carbohidratos) que va consumiendo y metabolizando hasta la fase final de su crecimiento exponencial. Debido al metabolismo de la glucosa los parásitos secretan al medio productos derivados de dicho catabolismo como el ácido acético y pirúvico [133]. De esta manera, el pH del medio va acidificándose hasta 5.6 a 6.0, provocando la rápida diferenciación de las formas epimastigotas hacia tripomastigotas metacíclicas [49, 50, 280].

La adición al medio de cultivo del inhibidor de la glicólisis, 2-Deoxi-D-Glucosa, no produjo ningún efecto sobre el proceso de diferenciación [263], sin embargo, cuando se cuantificó la liberación de EVs por epimastigotes en presencia de este análogo de la Glucosa, la reducción del número de EVs cuantificadas fue del 83.64 %, con respecto con el cultivo control tras las 24 h de incubación (Figura 4.9). Este resultado podría explicarse como consecuencia de que las rutas de secreción de EVs son procesos activos dependiente de energía y consumo de ATP. Este consumo es obviamente disminuido por la inhibición de la glicólisis inducida por la 2-Deoxi-D-Glucosa, ya que los tripanosomátidos y, en concreto, las formas epimastigotas de *T. cruzi*, se caracterizan por presentar un alto consumo de glucosa mediante una “fermentación aeróbica” de la misma, de la cual obtienen el ATP necesario para sus funciones metabólicas [281, 282].

Además de energía, el parásito necesita del citoesqueleto para poder secretar dichas vesículas, a través de la polimerización y

## Discusión

elongación de los filamentos de actina mediante la unión de una proteína motora, la Dineína, presente en las EVs de *T. cruzi* entre otros elementos del citoesqueleto, como la Clatrina, proteínas GTPasas y Rab [208]. La inhibición del citoesqueleto mediante la adición al medio de Citocalasina D, que actúa uniéndose a la actina de los microtúbulos impidiendo su polimerización y elongación, provocó práctica ausencia de secreción de EVs con un 91.51 % de inhibición con respecto al control como se muestra en la Figura 4.9. Por lo tanto, la liberación de las EVs en *T. cruzi* se lleva a cabo mediante un proceso de transporte activo de vesículas.

Este transporte está mediado por el citoesqueleto, encargado de transportar las vesículas desde el aparato de Golgi hasta su posterior fusión con los endosomas tempranos liberando las proteínas que transportan [283]. Estos endosomas maduran hacia endosomas tardío para formar los cuerpos multivesiculares (MVBs) por medio de la invaginación de su membrana formando en su interior vesículas intraluminales (ILVs) quedando las proteínas del interior del endosoma tardío encapsuladas en dichas ILVs.

Tras esto, los MVBs se fusionan con la membrana citoplasmática y liberan su contenido al espacio extracelular, siendo las proteínas secretadas a través de los exosomas [140].

Los estudios de microscopía láser de barrido confirmaron junto con los estudios de la ultraestructura del parásito por microscopía electrónica de transmisión, la presencia en todas las formas del parásito de las EVs en la superficie del parásito, cercanas al bolsillo flagelar, así como la presencia de estas vesículas en el momento de interacción con la célula hospedadora (Figura 4.1). El estudio de la ultra-estructura permitió la observación de los de los compartimentos celulares relacionados en la formación de las vesículas, como los endosomas

tempranos y los cuerpos multivesiculares (Figura 4.2) como previamente se han descrito en la cepa Dmc28 de *T. cruzi* [208].

Los estudios de liberación de EVs en distintas condiciones de cultivo y su relación con el ciclo celular del parásito, así como los estudios de microscopía indican la posible funcionalidad que tienen las EVs en el proceso de diferenciación de las formas no infectivas hacia las formas infectivas del parásito, dado que su biogénesis y liberación está directamente relacionada tanto con su ciclo celular y las condiciones necesarias de cultivo para el crecimiento normal de los parásitos, necesitándose glucosa para su transporte llevado a cabo a través del citoesqueleto así como transportando en ellas, proteínas, ADN y ARN.

Los ARNs que transportan dichas EVs de *T. cruzi* podrían ser los encargados, en condiciones de estrés nutricional en cultivos axénicos, de promover la Metacicloogénesis. Debido al alto número de ARNs (ARN de transferencia) liberados en EVs de *T. cruzi*, García-Silva *et al.* 2014 [284] han sugerido la participación de ARNs tanto en la Metacicloogénesis como en el proceso de infección de la célula hospedadora. Este hecho ha sido ampliamente observado en otro tipo de células como las cancerígenas, donde los ARNs que transportan las EVs intervendrían en los procesos comunicación intercelular modulando la diferenciación celular, la apoptosis o la metástasis [285, 286], e incluso en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer) [287-289], cardiovasculares [290], bacterianas o víricas como la tuberculosis o el SIDA [190, 193].

Por tanto, en la presente tesis se quiso comprobar el papel de estas EVs en la enfermedad de Chagas a través del estudio de su composición, y en concreto como transportadoras de la familia de proteínas MASP.

*T. cruzi*, junto con *T. brucei* y *Leishmania spp.*, constituye dentro de los Kinetoplastidos uno de los tripanosomátidos epidemiológicamente más

## Discusión

complejos, así como una mayor diversidad genética como se demostró tras la secuenciación completa de los tres genomas mediante el proyecto denominado Tritryp [134].

Después de la secuenciación del genoma del parásito, nuevas familias de proteínas de superficie de *T. cruzi* DGF-1, TcSMP, TcTASV y MASP han sido conocidas y estudiadas [127, 128, 134, 135, 291].

Todas ellas se encuentran recubriendo la superficie celular conformando el glicocálix de las formas infectivas tripomastigotas, ancladas a la membrana citoplasmática mediante motivos GPI e involucradas en el mecanismo de entrada del parásito en la célula hospedadora [127, 275, 292].

Sin embargo, no todas estas proteínas van a encontrarse formando parte de la superficie sino que pueden ser secretadas al exterior, denominándose al conjunto de éstas proteínas Secretoma. Este secretoma representa alrededor del 9 % del total de proteínas secretadas por la vía clásica de secreción, mientras que el 48 % del total de estas proteínas se secretan por vías no clásicas [98]. Existen evidencias de que estas proteínas son transportadas en EVs (ectosomas y exosomas) [194, 208, 211]. Esto supondría que el parásito usa otras vías para la secreción de proteínas como en el caso de las glicoproteínas, como se demostró mediante el tratamiento con lectina de las formas MT del parásito (Figura 4.7) [293].

Aunque la composición proteica de las EVs de *T. cruzi* ya ha sido estudiada, es poco el conocimiento que existe en relación a la función que algunas desempeñan. Dentro de las proteínas de superficie caracterizadas, se identificó un miembro de la familia de proteínas MASP en exosomas liberados por epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de la cepa Dmc28 de *T. cruzi*, identificada con el número de acceso [gi|322829180](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|322829180), abriendo la posibilidad de la secreción de éstas

proteínas por la vía de secreción exosomal, como se determinó para otras proteínas de superficie de *T. cruzi*.

Los miembros de la familia de proteínas MASP poseen dos extremos altamente conservados (N- y C- terminal), un sitio de anclaje a la membrana o GPI y una región hipervariable central [135].

Debido a dicha ausencia de un patrón definido en la región hipervariable de estas proteínas, se decidió estudiar la presencia de los dos extremos conservados en los parásitos y su ciclo de infección, así como en las EVs secretadas por los mismos.

En las células eucariotas, las proteínas sintetizadas, que pueden ser o bien secretadas, o expuestas hacia el exterior de la superficie celular, presentan un péptido señal en el extremo N-terminal el cuál las dirige hacia el RE [294-296]. Después, éste péptido debe ser escindido por la actuación de una peptidasa del proteosoma, liberando el polipéptido hacia el lumen del RE [297].

En el caso de las proteínas MASP, éste péptido presenta una longitud de 30 aa y un sitio de escisión en la posición 29 (Figura 4.10), previamente descrito para la proteína MASP52 [127], con un alto grado de conservación entre distintas cepas de *T. cruzi* filogenéticamente alejadas (Figura 4.11).

Por otra parte, la región C-terminal de las proteínas MASP como se ha mencionado anteriormente, se caracteriza por tener un motivo altamente repetido que potencialmente sirve como señal para la adición del motivo de anclaje GPI al RE. Los estudios sobre la posible variación aminoácidica de esta región confirmaron, al igual que para el péptido señal, un alto grado de conservación en esta secuencia (Figura 4.13).

## Discusión

Estas dos regiones podrían servir como sitios de recombinación homóloga a nivel nucleotídico y, por tanto, generar diversidad genética en esta familia de genes [134] .

Los estudios de inmunolocalización de estas dos regiones conservadas de las proteínas MASP mostraron una localización diferente dentro de las formas infectivas tripomastigotas, no así en las formas epimastigotas y amastigotas donde muestran una localización similar (Figura 4.18), en el citosol, así como en la superficie de los parásitos. En las formas tripomastigotas infectivas libres, sólo se inmunolocalizó la región C-terminal MASP, siendo la intensidad de fluorescencia para el péptido señal casi inexistente (Figura 4.18 (B)).

La inmunolocalización de ambas regiones constantes de las proteínas MASP durante el ciclo de infección de la célula hospedadora fue diferente para las formas intracelulares amastigotas y las formas infectivas tripomastigotas (Figura 4.19). La localización de las regiones C- y N-terminal difiere dependiendo de si el parásito está libre en el medio de cultivo o en el proceso de infección de la célula hospedadora. En las formas tripomastigotas que están en contacto con las células (después de las 4 h de infección), el extremo N-terminal MASP se encuentra localizado en el citosol, probablemente en el RE y aparato de Golgi, mientras que el extremo C-terminal MASP aparece rodeando la membrana plasmática y en el citosol, al igual que ocurre en las formas tripomastigotas libres en cultivo.

En las formas amastigotas, la localización del extremo N-terminal MASP varía, pudiendo encontrarse polarizado en las formas amastigotas extracelulares, a distribuirse rodeando la membrana plasmática y en el citosol en formas amastigotas intracelulares, especialmente tras las 72 h de infección y tras producirse la disrupción de la célula parasitada. Por su parte, la región C-terminal MASP se encuentra en el interior de

las formas intracelulares con una distribución polarizada hacia un extremo del amastigote al igual que ocurre en las formas amastigotes extracelulares (Figura 4.18 y 4.19), mostrando una distribución concreta dentro de los parásitos.

Los niveles de expresión y síntesis de proteínas de *T. cruzi* varía entre los distintos estadios durante su ciclo de vida [298], así como durante el proceso de invasión intracelular [299]. La diferencia de localización de los extremos N y C-terminal de las proteínas MASP podría deberse a una variación en la funcionalidad y/o procesamiento de estas proteínas cuando el parásito cambia de fase.

Como se ha demostrado para otras glicoproteínas del parásito como las *trans*-sialidasas y las mucinas, estudios recientes mostraron como péptidos procedentes de la región hipervariable MASP provocan una respuesta IgM e IgG variable en infecciones experimentales similares a las descritas para la región C-terminal MASP donde existe un *switching* incorrecto de los Isotipos IgM e IgG [138].

Dicha implicación en la patogénesis del parásito por parte de las proteínas MASP se muestra durante su ciclo de infección (Figura 4.19), además de existir una mayor síntesis de proteínas MASP en las formas tripomastigotas infectivas cuantificadas mediante PCR en tiempo real [127].

La síntesis y expresión de dichas proteínas parece ser secuencial, ya que existen diferencias en su localización conforme avanza la infección y conservándose además dentro de una población clonal de tripanosomátidos, confiriéndole una variabilidad de cara a la evasión de la respuesta del sistema inmune del hospedador mamífero [133, 300].

La conservación de estas dos regiones N- y C-terminal indica que son necesarias y constantes para la funcionalidad de la familia de

## Discusión

proteínas de superficie MASPs. Una de estas funciones sería la de participar en la evasión de la respuesta inmune del hospedador como así ha sido demostrado para otras proteínas de superficie del parásito [230, 231, 233, 236].

La presencia del péptido señal (PS) y del extremo C-terminal en EVs secretadas por *T. cruzi* en una subpoblación de EVs secretadas por tripomastigotes infectivos así como en EVs secretadas en el medio de interacción parásito-célula (Figura 4.15, 4.16, 4.17, 4.22), podría suponer la única forma de exponer estas regiones constantes al sistema inmune del hospedador.

El péptido señal (PS) tiene normalmente un dominio amino terminal básico (dominio N) y un dominio hidrofóbico (dominio H), junto a un dominio polar donde se encuentra el sitio de escisión [297]. La ineficiencia en la escisión depende de variaciones en la secuencia como consecuencia de la variabilidad genética, bien por mutación o presencia de Snips, o de un incorrecto procesamiento proteico, como se ha descrito en el caso del hipotiroidismo o la diabetes [301, 302]

Una excesiva colisión procedente de un exceso de síntesis entre proteínas no procesadas en el RE puede conducir a una baja eficiencia en el procesamiento de éstas. Este suceso ocurre como consecuencia de no disponer de chaperonas que dirijan las proteínas a las enzimas proteolíticas del proteosoma, encargadas de eliminar las zonas que deben ser cortadas para su total maduración y salida al exterior celular. De esta manera, la frecuencia de interacción de estas proteínas con las chaperonas en el RE determinaría las tasas de procesamientos correctos [294].

La acumulación intracelular de proteínas no procesadas con un PS no escindido podría permitir la producción de agregosomas [303] en el RE y aparato de Golgi, como así han sido observados en importantes

enfermedades humanas en los últimos 20 años incluyéndose entre ellas el Alzheimer y el Parkinson, la encefalopatía espongiiforme, la diabetes tipo II, hipotiroidismo [304-306], cáncer [307], enfermedades cardíacas [308], e incluso en infecciones virales[309].

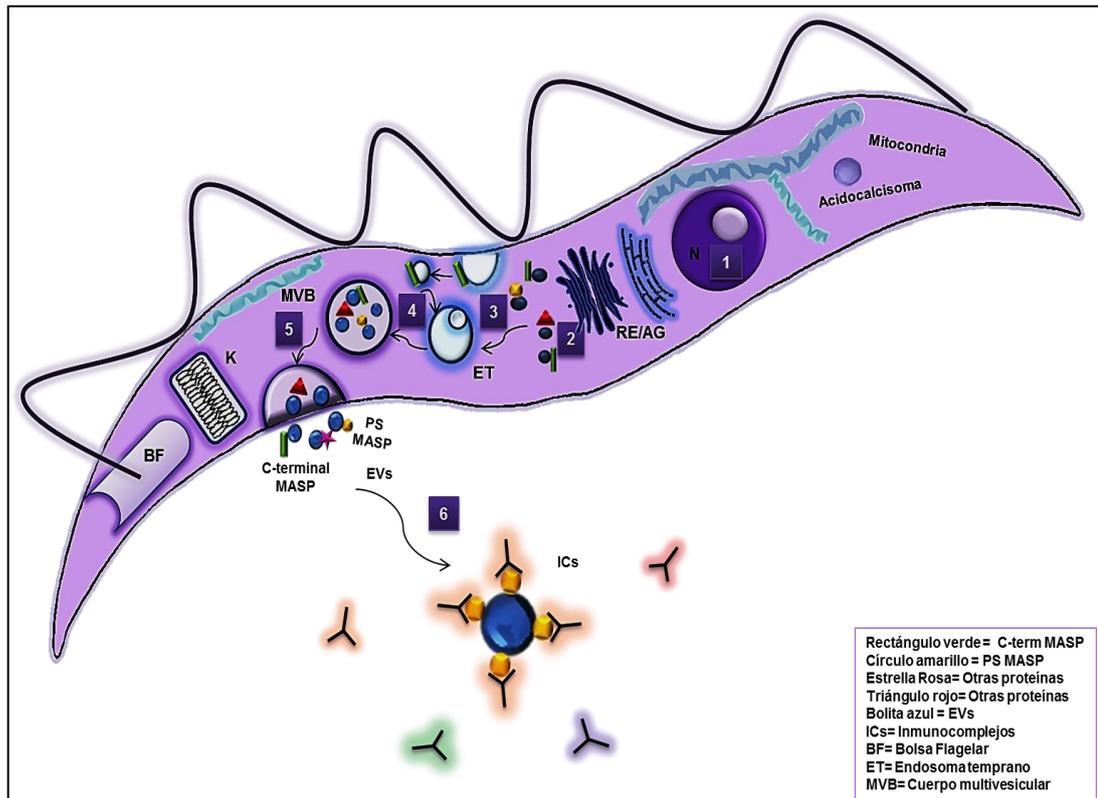
La acumulación en el RE de proteínas inmaduras ha sido también descrito en *T. cruzi* debido a la ineficiencia en el procesamiento de la región N-terminal de la cisteína proteasa Cruzipaina, un proceso similar que podría darse con las proteínas MASPs inmaduras conservando el péptido señal y, por tanto, siendo posteriormente exportadas y secretadas vía EVs [310, 311].

Este “error” teórico de procesamiento del PS de las proteínas por el RE y la subsecuente liberación en EVs en las formas tripomastigotas podría constituir un mecanismo adaptativo para el establecimiento del parásito en el hospedador, contribuyendo en la evasión de la respuesta inmune a la que se enfrenta en el hospedador mamífero.

Por lo tanto, debido a la presencia de las regiones conservadas PS y extremo C-terminal en EVs de *T. cruzi* cabrían dos hipótesis para explicar dicho mecanismo de secreción.

**Hipótesis 1:** el PS y extremo C-terminal se liberarían vía EVs como parte de proteínas MASP no procesadas y, por tanto, inmaduras con ambos extremos intactos. Este caso podría deberse a procesos de estrés celular, como el estrés térmico o el cambio de pH que los parásitos sufren durante la infección de la célula hospedadora. De este modo se sintetizarían como proteínas no procesadas que escaparían de los sistemas de control interno celulares, pudiendo ser cargadas dentro de los MVBs para ser finalmente secretadas en las EVs [312] como se muestra en la Figura 4.32.

**Hipótesis 2:** En el caso del extremo C-terminal, una segunda hipótesis contemplaría la posibilidad de que la secuencia señal para GPI actuara como región trans-membrana en las membranas lipídicas y, por tanto, presentes en proteínas MASP maduras. Como se ha mencionado anteriormente, la gran mayoría de las proteínas maduras con anclaje GPI carecen del segmento hidrofóbico C-terminal. Sin embargo, existen ejemplos donde esta región no se escinde, lo que proporcionaría a las proteínas maduras una región trans-membrana como ocurre con el antígeno 2 de la célula del estroma de la médula ósea humana (BST-2) [313]. Esta hipótesis explicaría que la secuencia señal GPI de las proteínas MASPs hiciera el papel de región trans-membrana en la membrana de las EVs.



**Figura 4.32. Representación de la secreción no-canónica de las proteínas MASP vía EVs de *T. cruzi*.** La ruta de secreción de *T. cruzi* está formada por el complejo RE/AG cercano al núcleo (N) de la célula y de la vía endocítica. Las proteínas MASPs van a ser sintetizadas en el núcleo (1) con una secuencia señal en la región N-terminal dirigida al RE, y una región C-terminal con un dominio de unión a membrana GPI y/o trans-membrana como se ha explicado en el texto (hipótesis 2). Según la hipótesis 1, en condiciones de estrés, el PS o la región C-terminal MASP no van a ser escindidas de las proteínas, generando proteínas no procesadas en el AG (2). El polipéptido PS se transportaría en vesículas provenientes del AG hacia el citosol, entrando en la ruta de secreción endocítica mediante captación por los endosomas tempranos (ET) (3). Por tanto, las proteínas no procesadas con el PS o con la región C-terminal van a ser englobadas en el lumen del MVB por maduración del ET (4), mediante micro invaginación de la membrana endosomal, formando vesículas intraluminales (ILVs) donde quedarían retendrían dichas proteínas. Después el MBV se fusionaría con la membrana citoplasmática para liberar al espacio extracelular los exosomas portando las proteínas MASP con una u otra región

## Discusión

(5). De esta manera, dichas regiones quedarían expuestas a anticuerpos frente a ellas y formarían Inmunocomplejos circulantes a partir de EVs liberados por *T.cruzi*. (6).

Para valorar la capacidad antigénica de éstas dos regiones se realizaron ensayos de ELISA al objeto de evaluar la respuesta humoral frente a ambas regiones conservadas de las proteínas MASP en sueros de pacientes chagásicos crónicos que presentan diferentes patologías (digestivos, cardiopatas y asintomáticos). La respuesta humoral observada fue alta para ambos péptidos procedentes de proteínas inmaduras y para los tres grupos de sueros de pacientes chagásicos con relación al grupo control no infectado (Figuras 4.24, 4.25). Sin embargo, el grupo de sueros con patologías digestivas presentó una mayor reactividad frente al péptido señal (PS), mientras que fue prácticamente idéntica la reactividad de los sueros para los péptidos solapantes C1 al C7 correspondientes a la parte C-terminal de las proteínas MASPs (Figura 4.24 y 4.25).

Debido a la presencia del PS en EVs y la posible formación de inmunocomplejos con las mismas, se procedió a eliminar las inmunoglobulinas de los ICs presentes en los sueros de pacientes y ensayar la reactividad de éstas inmunoglobulinas frente al antígeno, que va a estar formado por el PS MASP presente en las EVs que forman los ICs. La respuesta observada frente al PS MASP se mantuvo muy elevada en el grupo de sueros con patología digestiva (Figura 4.27), confirmando por tanto la formación de inmunocomplejos formados por las EVs portando el péptido SP MASP [314, 315].

La formación de inmunocomplejos constituidos por inmunoglobulinas y las porciones constantes de las secuencias de las proteínas MASPs inmaduras presentes en EVs condujo al estudio de la capacidad de estas regiones para inhibir la acción de anticuerpos líticos en el parásito. Los estudios de inhibición de la actividad lítica del

complemento sí mostraron diferencias en la respuesta para ambos. La respuesta obtenida frente a los péptidos C1 al C7 de la región C-terminal MASP fue más baja en el pool de sueros con patologías cardiacas en comparación con alta inhibición encontrada para los péptidos del C4 al C7 en los sueros de los pacientes con patologías digestivas, al igual que para el PS MASP (Figura 4.31).

Recientemente Henrique *et al.* (2016) han correlacionado la expresión de la proteína *Complement Regulatory Protein* (CRP) con la virulencia de las diferentes cepas del parásito, observando como las cepas de *T. cruzi*, Colombiana y Ninoa, con altos niveles de expresión de esta proteína son más virulentas [316]. De igual manera Zulatay *et al.* (1998) encontraron como los pacientes de Chagas con baja parasitemia eran los que poseían mayores niveles de anticuerpos líticos circulantes [317]. En este sentido, es posible que las cepas de tripanosomas con menores niveles de expresión de la CRP o de producción de EVs sean capaces de desviar hacia ellos menos anticuerpos líticos lo que aumentaría la lisis de las formas circulantes del parásito.

Las patologías digestivas están presentes en tan sólo el 8-10 % de los pacientes con Chagas y están caracterizadas por la aparición de fenómenos mega en los órganos del aparato digestivo, mega esófago, mega colon, mega duodeno o incluso mega colédoco, además del daño provocado en los nervios periféricos, en especial del plexo nervioso del intestino.

Las causas reales de estas patologías se desconocen, habiéndose atribuido o bien a la producción de “toxinas” por parte del parásito o a la producción de auto-anticuerpos que alteren la funcionalidad nerviosa, que lleve a la falta de inervación de los diferentes órganos del aparato digestivo, donde se perdería la contractibilidad y originarían la dilatación de los mismos [318]. Se ha sugerido la existencia de una

## Discusión

respuesta inmune hacia los componentes de la mielina periférica del plexo nervioso [319] o la presencia de depósitos de ICs en el nervio tisular que provocan daño en los mismos, como se ha descrito en otras enfermedades infecciosas como la filariosis y la esquistosomiasis [320].

Como confirmaron los ensayos de inmunocaptura, estos ICs están presentes en los sueros de los pacientes crónicos de Chagas y están formados por EVs que transportan entre otros componentes, el péptido señal de las proteínas MASP (Figura 4.28). Recientemente, Ohyama *et al.* (2016) [321] identificó 39 antígenos de *T. cruzi* en los ICs circulantes en sueros de chagásicos crónicos, incluyendo antígenos de superficie y en especial proteínas *trans*-sialidasas, gp63 y algunas proteínas MASPs. Los mismos autores también mostraron la asociación de dos proteínas hipotéticas con ICs procedentes de pacientes que manifestaban mega colon.

Si bien la teoría del daño causado por los inmunocomplejos no ha tenido mucha relevancia hasta el momento, en los estudios aquí presentados, el PS MASP aparece en los ICs de los pacientes digestivos. De esta manera dichos ICs portadores de estas proteínas inmaduras podrían implicarse en la posible asociación entre la composición de los ICs con la patología digestiva en la enfermedad de Chagas.

Igualmente, la composición de las EVs liberadas por las formas E, T y A y su respuesta asociada debe ser altamente dinámica y variable, como reveló la diferencia en la capacidad de inhibición del sistema del complemento usando diferentes muestras de sueros y de EVs (Figura 4.31). Además, se podría hipotetizar la existencia de una batería de diferentes proteínas MASPs con expresión diferencial dentro de las poblaciones celulares de *T. cruzi* [133, 300] con diferentes funciones: i) ser parte de las proteínas de superficie y jugar un papel en la invasión de la célula hospedadora junto con otras proteínas de superficie [127,

135]; ii) ser secretadas al espacio extracelular o formando parte de la vía de excreción/secreción de EVs, constituyendo un mecanismo de la evasión inmune como se ha demostrado mediante los ensayos de inhibición del complemento.

Por tanto, tanto las regiones N- y C-terminal de las proteínas MASPs como las EVs que las transportan secretadas por *T. cruzi*, formarían parte de la batería de mecanismos de evasión de la respuesta inmune, estando involucradas en la infectividad y patogénesis, bien directamente o a través de la formación de ICs que indujeran las patologías Chagásicas. Además, la secreción de EVs podría constituir un sistema antimedida desarrollado por el parásito capaz de secuestrar anticuerpos líticos y así resguardar y permitir a las formas infectivas libres en el torrente sanguíneo del hospedador la infección de nuevas células, quedando así protegidos de una respuesta humoral desarrollada frente a ellos para su eliminación.



## 6. CONCLUSIONES

---



## 6 CONCLUSIONES

1. La secreción de proteínas MASPs por parte del protozoo parásito *T. cruzi* cepa PAN4 TcI se realiza mediante una vía de secreción no clásica a través de EVs, tras haberse comprobado mediante microscopía láser de barrido y microscopía electrónica de transmisión e inmunolocalización. Dicha secreción es dependiente de energía estando relacionada con la participación del citoesqueleto del parásito y con las situaciones de estrés.
2. La secreción de EVs por *T. cruzi* es dependiente del ciclo celular del parásito, coincidiendo la mayor liberación con la fase final de la fase S del ciclo celular.
3. Las regiones conservadas N- y C-terminal MASP son inmunogénicas, desarrollándose una respuesta inmune específica frente a las mismas en el hospedador parasitado.
4. Las EVs de *T. cruzi* forman parte de inmunocomplejos circulantes en los sueros de los pacientes con Chagas crónicos. El péptido señal se encuentra formando parte de dichos ICs con una respuesta humoral mayor en el caso de los pacientes que presentan patologías digestivas.
5. Las EVs que transportan las regiones conservadas de las proteínas MASPs (PS MASP y región C-terminal MASP) intervienen en la evasión de la respuesta humoral del hospedador mamífero, al secuestrar anticuerpos circulantes frente a los parásitos, inhibiendo la lisis mediada por el complemento *in vitro*. Esta estrategia de evasión estaría más desarrollada en los pacientes que muestran patología digestiva, usando a las proteínas MASPs incorrectamente procesadas y transportadas en EVs como antígenos “cepo” capaces de desviar la

## Conclusiones

respuesta dirigida frente a las fases sanguíneas extracelulares de *T. cruzi*.

6. La presencia de proteínas inmaduras MASPs en EVs con el PS MASP formando parte de ICs circulantes en el suero, podría constituir una de las bases de la patología digestiva. El PS MASP es indicador de la patología digestiva en la fase crónica de la enfermedad de Chagas pudiendo usarse en pacientes en fase indeterminada ó asintomática de la enfermedad como posible biomarcador predictivo del desarrollo de esta patología.

## 6. CONCLUSIONS

---



## 6 CONCLUSIONS

1. MASP protein secretion by the protozoan parasite *T. cruzi* strain PAN4 TcI is performed through EVs via the non-classical secretion pathway, as it was verified by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and immunolocalization. Such secretion is energy-dependent and related to the participation of the parasite cytoskeleton and stressful situations.
2. Secretion of *T. cruzi* EVs is dependent on the parasite cell cycle, the highest release coinciding with the final S phase of the cell cycle.
3. The conserved N- and C-terminal MASP regions are immunogenic, developing a specific immune response against them in the parasitized host.
4. *T. cruzi* EVs are part of circulating immune complexes in sera from chronic Chagas patients. The signal peptide is part of such ICs, with a higher humoral response in the case of patients with digestive syndromes.
5. EVs carrying the MASPs conserved regions (MASP SP and C-term region MASP) are involved in evasion of the humoral response of the mammalian host, by sequestering circulating antibodies against parasites, inhibiting the complement mediated lysis *in vitro*. This evasion strategy would be more developed in patients showing digestive syndromes, using incorrectly processed MASPs and transported in EVs as “bait” antigens able to deflect the directed response against extracellular bloodstream stages of *T. cruzi*.
6. The presence of immature MASPs in EVs with the signal peptide in circulating ICs in serum could form one of the bases for the digestive pathology. The MASP SP in EVs is a marker of the digestive pathology in

## Conclusions

the chronic phase of Chagas disease and can be used for patients in an indeterminate or asymptomatic phase of the disease as a possible predictive biomarker for the development of this pathology.

## 7. Bibliografia

---



## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, Brooker SJ, Brown AS, Buckle G, Budke CM *et al*: **The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases**. *PLoS neglected tropical diseases* 2014, **8**(7):e2865.
2. WHO: **Tropical Disease Research. Program for research and training tropical disease (TDR)**. In. Edited by N°340. Fs. Geneva: World Health Organization.; 2016.
3. Schmunis GA, Yadon ZE: **Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem**. *Acta Tropica* 2010, **115**(1-2):14-21.
4. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ: **Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries**. *Acta tropica* 2010, **115**(1-2):22-27.
5. Moncayo A, Silveira AC: **Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009, **104**:17-30.
6. Ribeiro A, Nunes, MP, Teixeira, MM, Rocha, MO.: **Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy**. *Nature reviews Cardiology* 2012, **9**(10):576-589.
7. Navarro M, Navaza B, Guionnet A, López-Vélez R: **Chagas Disease in Spain: Need for Further Public Health Measures**. *PLoS neglected tropical diseases* 2012, **6**(12):e1962.

## Bibliografía

8. Herrador Z, Rivas E, Gherasim A, Gomez-Barroso D, Garcia J, Benito A, Aparicio P: **Using hospital discharge database to characterize Chagas disease evolution in Spain: there is a need for a systematic approach towards disease detection and control.** *PLoS neglected tropical diseases* 2015, **9**(4):e0003710.
9. EUC: **Directive 2004/33/EC of 22 March 2004 implementing directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for blood and blood components.** In: *Off J Eur Union* 3(L91/25-39). 2004.
10. MSC: **REAL DECRETO 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión.** In., vol. 1088; 2005.
11. Munoz J, Coll O, Juncosa T, Verges M, del Pino M, Fumado V, Bosch J, Posada EJ, Hernandez S, Fisa R *et al*: **Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009, **48**(12):1736-1740.
12. Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F, Loutan L, Gervaix A: **Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland.** *Emerging infectious diseases* 2009, **15**(4):601-603.
13. Buekens P, Almendares O, Carlier Y, Dumonteil E, Eberhard M, Gamboa-Leon R, James M, Padilla N, Wesson D, Xiong X: **Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more?** *Maternal and child health journal* 2008, **12**(3):283-286.

14. Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ *et al*: **Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain)**. *Acta Tropica* 2009, **111**(1):51-55.
15. Coura JR, de Castro SL: **A critical review on Chagas disease chemotherapy**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**(1):3-24.
16. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H: **Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction**. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2003, **52**(3):441-449.
17. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ: **Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model**. *Lancet Infect Dis* 2013, **13**(4):342-348.
18. Robertson LJ, Devleesschauwer B, Alarcón de Noya B, Noya González O, Torgerson PR: ***Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite**. *PLoS neglected tropical diseases* 2016, **10**(6):e0004656.
19. Coura JR: **The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015, **110**(3):277-282.
20. WHO: **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis**. *Technical report series ; no 975* 2012.
21. Coura JR, Borges-Pereira J: **Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review**. *Acta tropica* 2010, **115**(1-2):5-13.

## Bibliografia

22. Rassi A, Jr.Rassi A, Little W: **Chagas' heart disease**. *Clinical cardiology* 2000, **23**(12):883-889.
23. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ: **Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease**. *Seminars in immunopathology* 2012, **34**(6):753-770.
24. Coura JR: **Chagas disease: what is known and what is needed - A background article**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007, **102**:113-122.
25. Myriam HL, Bahamonde MI, Garcia A, Tassara R, Urarte E, Contreras Mdel C, Salinas P, Nunez E: ***Trypanosoma cruzi* transplacental infection in Chile: diagnosis, treatment and control** *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, **38 Suppl 2**:46-48.
26. Bern C: **Chagas' Disease**. *New England Journal of Medicine* 2015, **373**(5):456-466.
27. Portela-Lindoso AA: **Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction**. *Revista de saude publica* 2004, **38**(4):606.
28. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU: **ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis**. *BMC infectious diseases* 2010, **10**:337.
29. Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, Levin MJ, Arnedo A, Nagel C, Schijman AG *et al*: **Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation**. *American journal*

*of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007, **7**(6):1633-1640.

30. Volta BJ, Russomando G, Bustos PL, Scollo K, De Rissio AM, Sánchez Z, Cardoni RL, Bua J: **Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother-child binomial samples.** *Acta Tropica* 2015, **147**:31-37.

31. Oelemann WM, Teixeira MD, Verissimo Da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, Peralta JM: **Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease.** *Journal of clinical microbiology* 1998, **36**(9):2423-2427.

32. do Brasil PEAA, Castro R, de Castro L: **Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2016, **111**(1):1-19.

33. **Guía para el diagnóstico, atención y manejo clínico de la enfermedad de Chagas en Venezuela** [[http://svmi.web.ve/wh/documentos/Guia\\_Chagas\\_2015.pdf](http://svmi.web.ve/wh/documentos/Guia_Chagas_2015.pdf)]

34. **Brazilian consensus on Chagas disease.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, **38 Suppl 3**:7-29.

35. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper NJ, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME: **Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease.** *Journal of clinical microbiology* 1996, **34**(9):2143-2147.

## Bibliografia

36. Nakazawa M, Rosa DS, Pereira VR, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MN, Abath FG, Gomes YM: **Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2001, **8**(5):1024-1027.
37. Granjon E, Dichtel-Danjoy ML, Saba E, Sabino E, Campos de Oliveira L, Zrein M: **Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease.** *PLoS neglected tropical diseases* 2016, **10**(4):e0004596.
38. Meira WS, Galvao LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, Chiari E: ***Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease.** *Journal of clinical microbiology* 2002, **40**(10):3735-3740.
39. Cimino RO, Rumi MM, Ragone P, Lauthier J, D'Amato AA, Quiroga IR, Gil JF, Cajal SP, Acosta N, Juarez M *et al*: **Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: a tool for epidemiological studies.** *Parasitology* 2011, **138**(8):995-1002.
40. Cimino RO, Diosque P, Lopez Quiroga IR, Gil JF, Nasser JR: **Immunoenzymatic evaluation of the recombinant SAPA protein of *Trypanosoma cruzi* in naturally infected dogs.** *Revista Argentina de microbiologia* 2012, **44**(3):177-181.
41. Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, de la Soledad Lagunes-Castro M, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A: **Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic.** *Parasites & Vectors* 2015, **8**(1):1-8.

42. Abras A, Gallego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C, Marti C, Munoz C: **Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change?** *Journal of clinical microbiology* 2016, **54**(6):1566-1572.
43. Tyler KM, Engman DM: **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** *International Journal for Parasitology* 2001, **31**(5-6):472-481.
44. De Souza W: **From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality.** *Kinetoplastid biology and disease* 2002, **1**(1):3.
45. Tan H, Andrews NW: **Don't bother to knock--the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*.** *Trends in parasitology* 2002, **18**(10):427-428.
46. **Centers for Disease Control and Prevention** [<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html#hearttissue>]
47. Piras R, Piras MM, Henriquez D: **The effect of inhibitors of macromolecular biosynthesis on the in vitro infectivity and morphology of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes.** *Molecular and biochemical parasitology* 1982, **6**(2):83-92.
48. Brener Z: **Biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Annual review of microbiology* 1973, **27**:347-382.
49. Adroher F, Lupianez J, Osuna A: **Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** *Cell differentiation* 1988, **22**(2):165-170.
50. Osuna A, Adroher, FJ, Lupianez, JA: **Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma***

Bibliografia

**cruzi**. *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists* 1990, **30**(2):89-95.

51. Osuna A, Castanys S, Rodriguez-Cabezas MN, Gamarro F: **Trypanosoma cruzi: calcium ion movement during internalization in host HeLa cells**. *Int J Parasitol* 1990, **20**(5):673-676.

52. Adroher F, Osuna, A, and Lupiáñez, JA **Influence of some amino acids on multiplication and metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi**. *Chemosphere* 1990, **21**:269-273.

53. Souza W: **Electron microscopy of trypanosomes-a historical view**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, **103**(4):313-325.

54. Rocha GM, Miranda K, Weissmuller G, Bisch PM, de Souza W: **Ultrastructure of Trypanosoma cruzi revisited by atomic force microscopy**. *Microscopy research and technique* 2008, **71**(2):133-139.

55. Souza W: **Structural organization of Trypanosoma cruzi**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104 Suppl 1**:89-100.

56. Rocha GM, Miranda K, Weissmüller G, Bisch PM, de Souza W: **Visualization of the flagellar surface of protists by atomic force microscopy**. *Micron* 2010, **41**(8):939-944.

57. de Souza W, da Cunha-e-Silva NL: **Cell fractionation of parasitic protozoa: a review**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**(2):151-170.

58. Martins AV, Gomes AP, Gomes de Mendonça E, Lopes Rangel Fietto J, Santana LA, de Almeida Oliveira MG, Geller M, de Freitas Santos R, Roger Vitorino R, Siqueira-Batista R: **Biology of Trypanosoma cruzi: An update**. *Infectio* 2012, **16**:45-58.

59. Sant'Anna C, Campanati L, Gadelha C, Lourenco D, Labati-Terra L, Bittencourt-Silvestre J, Benchimol M, Cunha-e-Silva NL, De Souza W: **Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM)**. *Histochemistry and cell biology* 2005, **124**(1):87-95.
60. Landfear SM, Ignatushchenko M: **The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids**. *Molecular and biochemical parasitology* 2001, **115**(1):1-17.
61. Fevrier B, Raposo G: **Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages**. *Current opinion in cell biology* 2004, **16**(4):415-421.
62. Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N: **Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes**. *European journal of cell biology* 2000, **79**(11):858-869.
63. Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenco D, de Souza W, Almeida IC, Cunha ESNL: **Subcellular proteomics of Trypanosoma cruzi reservosomes**. *Proteomics* 2009, **9**(7):1782-1794.
64. Figueiredo RC, Rosa DS, Gomes YM, Nakasawa M, Soares MJ: **Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation**. *Parasitology* 2004, **129**(Pt 4):431-438.
65. Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN: **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man**. *Nature reviews Microbiology* 2005, **3**(3):251-261.

## Bibliografia

66. Rohloff P, Docampo R: **A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*.** *Experimental parasitology* 2008, **118**(1):17-24.
67. Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW: **Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport.** *The Journal of cell biology* 1996, **134**(2):349-362.
68. Rodriguez-Cabezas N, Gonzalez MA, Lazuen J, Cifuentes J, Soler-Diaz A, Osuna A: **Intracellular alkalisation in Vero cells parasitised by *Trypanosoma cruzi*.** *Int J Parasitol* 1998, **28**(12):1841-1851.
69. Hall BF, Furtado GC, Joiner KA: **Characterization of host cell-derived membrane proteins of the vacuole surrounding different intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* in J774 cells. Evidence for phagocyte receptor sorting during the early stages of parasite entry.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1991, **147**(12):4313-4321.
70. Woolsey AM, Burleigh BA: **Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments.** *Cellular microbiology* 2004, **6**(9):829-838.
71. Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C, da Silva S: **Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry.** *Sub-cellular biochemistry* 2008, **47**:101-109.
72. de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES: **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction.** *International journal of cell biology* 2010, **2010**.

73. Watanabe Costa R, da Silveira JF, Bahia D: **Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways.** *Frontiers in microbiology* 2016, **7**:388.
74. Docampo R, Moreno SN: **The role of Ca<sup>2+</sup> in the process of cell invasion by intracellular parasites.** *Parasitology today (Personal ed)* 1996, **12**(2):61-65.
75. Burleigh BA, Andrews NW: **Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *Current opinion in microbiology* 1998, **1**(4):461-465.
76. Yoshida N: **Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 2006, **78**(1):87-111.
77. Osuna A, Ortega G, Gamarro F, Castanys S, Mascaro MC: **Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*.** *Int J Parasitol* 1984, **14**(3):253-257.
78. Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW: **Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells.** *Cell* 1992, **71**(7):1117-1130.
79. Burleigh BA, Andrews NW: **The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells.** *Annual review of microbiology* 1995, **49**:175-200.
80. Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W: ***Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation.** *Frontiers in immunology* 2013, **4**:186.

## Bibliografia

81. Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM: ***Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into mammalian host cell.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2012, **14**(14):1340-1351.
82. Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, Fernandes MC, L'Abbate C, Silva S: **Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms.** *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 2005, **77**(1):77-94.
83. Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V: **Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells.** *The Journal of experimental medicine* 1988, **168**(2):649-659.
84. Pelkmans L, Helenius A: **Endocytosis via caveolae.** *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2002, **3**(5):311-320.
85. Anderson RG: **The caveolae membrane system.** *Annual review of biochemistry* 1998, **67**:199-225.
86. Parton RG, del Pozo MA: **Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2013, **14**(2):98-112.
87. Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**(6633):569-572.
88. Fielding CJ, Fielding PE: **Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships.** *Biochimica et biophysica acta* 2000, **1529**(1-3):210-222.
89. Barrias ES, Dutra JMF, Souza WD, Carvalho TMU: **Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi***

- invasion process.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, **363**(3):828-834.
90. Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli-Guimaraes PH, de Paula AM, Agero U, Mesquita ON, Guatimosim C *et al*: **Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells.** *PLoS neglected tropical diseases* 2012, **6**(3):e1583.
91. Doherty GJ, McMahon HT: **Mechanisms of endocytosis.** *Annual review of biochemistry* 2009, **78**:857-902.
92. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, Tanowitz HB: ***Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion.** *PLoS neglected tropical diseases* 2011, **5**(2):e953.
93. Lu R, Drubin DG, Sun Y: **Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance.** *Journal of Cell Science* 2016, **129**(8):1531-1536.
94. Lim JP, Gleeson PA: **Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps.** *Immunology and cell biology* 2011, **89**(8):836-843.
95. Gil JR, Soler A, Azzouz S, Osuna A: **Ion regulation in the different life stages of *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitology research* 2003, **90**(4):268-272.
96. Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA: **Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 17):3611-3622.

## Bibliografia

97. Osuna A, Ortega, G., Gamarro, F., Castanys, S., and Mascaro, M.C.: **Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi***. *Int J Parasitol* 1984, **14**:253-257.
98. Costa RW, da Silveira JF, Bahia D: **Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways**. *Frontiers in microbiology* 2016, **7**.
99. Cazzulo JJ, Cazzulo Franke MC, Martinez J, Franke de Cazzulo BM: **Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi***. *Biochimica et biophysica acta* 1990, **1037**(2):186-191.
100. Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimaraes JA, Scharfstein J: **Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase**. *Molecular and biochemical parasitology* 1990, **43**(1):27-38.
101. Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J: **Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro**. *Molecular and biochemical parasitology* 1992, **52**(2):175-184.
102. Andrade D, Serra R, Svensjo E, Lima AP, Ramos ES, Jr., Fortes FS, Morandini AC, Morandi V, Soeiro Mde N, Tanowitz HB *et al*: ***Trypanosoma cruzi* invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy**. *British journal of pharmacology* 2012, **165**(5):1333-1347.
103. Maeda FY, Cortez C, Izidoro MA, Juliano L, Yoshida N: **Fibronectin-degrading activity of *Trypanosoma cruzi* cysteine**

- proteinase plays a role in host cell invasion.** *Infection and immunity* 2014, **82**(12):5166-5174.
104. Maeda FY, Cortez C, Yoshida N: **Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion.** *Frontiers in immunology* 2012, **3**.
105. Buscaglia C, Campo VA, Frasch A, Di Noia J: ***Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity.** *Nature reviews Microbiology* 2006, **4**(3):229-236.
106. Marroquin-Quelopana M, Oyama S, Jr., Aguiar Pertinhez T, Spisni A, Aparecida Juliano M, Juliano L, Colli W, Alves MJ: **Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein and mapping the laminin-binding site.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **325**(2):612-618.
107. Chuenkova MV, Furnari FB, Cavenee WK, Pereira MA: ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(17):9936-9941.
108. Chuenkova MV, Pereira MA: **The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway.** *Neuroreport* 2001, **12**(17):3715-3718.
109. Ouaisi MA, Afchain D, Capron A, Grimaud JA: **Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function.** *Nature* 1984, **308**(5957):380-382.
110. Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME: **Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes.** *Molecular and biochemical parasitology* 1994, **65**(1):73-83.

## Bibliografia

111. Moody TN, Ochieng J, Villalta F: **Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3.** *FEBS letters* 2000, **470**(3):305-308.
112. Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJ: **Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(6):3461-3468.
113. Mattos EC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ: **Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation.** *PLoS one* 2012, **7**(10):e46767.
114. Cazzulo JJ, Frasch AC: **SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1992, **6**(14):3259-3264.
115. Rodriguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW: **A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells.** *The Journal of cell biology* 1995, **129**(5):1263-1273.
116. Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA: **Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *The EMBO journal* 1998, **17**(17):4975-4986.
117. Fernandes LC, Bastos IMD, Lauria-Pires L, Rosa ACO, Teixeira ARL, Grellier P, Schrével J, Santana JM: **Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin**

- B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B.** *Microbes and Infection* 2005, **7**(3):375-384.
118. Canepa GE, Degese MS, Budu A, Garcia CR, Buscaglia CA: **Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells.** *The Biochemical journal* 2012, **444**(2):211-218.
119. Hall BS, Pereira MA: **Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells.** *Infection and immunity* 2000, **68**(4):2077-2081.
120. Ramirez MI, Ruiz Rde C, Araya JE, Da Silveira JF, Yoshida N: **Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion.** *Infection and immunity* 1993, **61**(9):3636-3641.
121. Araya JE, Cano MI, Yoshida N, da Silveira J: **Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular and biochemical parasitology* 1994, **65**(1):161-169.
122. Maeda FY, Alves RM, Cortez C, Lima FM, Yoshida N: **Characterization of the infective properties of a new genetic group of *Trypanosoma cruzi* associated with bats.** *Acta tropica* 2011, **120**(3):231-237.
123. Correa PRC, Cordero EM, Gentil LG, Bayer-Santos E, Silveira J, da F: **Genetic Structure and Expression of the Surface Glycoprotein GP82, the Main Adhesin of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes.** *The Scientific World Journal* 2013, **2013**:11.

## Bibliografia

124. Hoft DF: **Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi***. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1996, **55**(4):360-364.
125. Belaunzaran ML, Wilkowsky SE, Lammel EM, Gimenez G, Bott E, Barbieri MA, de Isola EL: **Phospholipase A1: a novel virulence factor in *Trypanosoma cruzi***. *Molecular and biochemical parasitology* 2013, **187**(2):77-86.
126. da Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz MC, da Silva EA, Souto-Padron TC, Krieger MA, Goldenberg S, Briones MR *et al*: **Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion**. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009, **11**(5):563-570.
127. De Pablos LM, Gonzalez GG, Solano Parada J, Seco Hidalgo V, Diaz Lozano IM, Gomez Samblas MM, Cruz Bustos T, Osuna A: **Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi***. *Infection and immunity* 2011, **79**(10):3993-4001.
128. Martins NO, Souza RT, Cordero EM, Maldonado DC, Cortez C, Marini MM, Ferreira ER, Bayer-Santos E, Almeida IC, Yoshida N *et al*: **Molecular Characterization of a Novel Family of *Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion**. *PLoS neglected tropical diseases* 2015, **9**(11):e0004216.
129. Hambrey PN, Tizard IR, Mellors A: **Accumulation of phospholipase A1 in tissue fluid of rabbits infected with *Trypanosoma brucei***. *Tropenmedizin und Parasitologie* 1980, **31**(4):439-443.

130. da Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz MC, da Silva EA, Souto-Padrón TCBS, Krieger MA, Goldenberg S, Briones MRS *et al*: **Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion.** *Microbes and Infection* 2009, **11**(5):563-570.
131. Rodrigues AA, Clemente TM, Dos Santos MA, Machado FC, Gomes RG, Moreira HH, Cruz MC, Brigido PC, Dos Santos PC, Martins FA *et al*: **A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis.** *PloS one* 2012, **7**(12):e51384.
132. Teixeira TL, Machado FC, Alves da Silva A, Teixeira SC, Borges BC, Dos Santos MA, Martins FA, Brigido PC, Rodrigues AA, Notario AF *et al*: ***Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy.** *Scientific reports* 2015, **5**:16877.
133. Seco-Hidalgo V, De Pablos LM, Osuna A: **Transcriptional and phenotypical heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* cell populations.** *Open biology* 2015, **5**(12):150190.
134. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G *et al*: **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** *Science (New York, NY)* 2005, **309**(5733):409-415.
135. Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leao AC, daRocha WD, Pais FS, Macedo C, Djikeng A, Teixeira SM, El-Sayed NM: **Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(10):3407-3417.
136. Agüero F, Verdun RE, Frasch AC, Sanchez DO: **A random sequencing approach for the analysis of the *Trypanosoma cruzi***

**genome: general structure, large gene and repetitive DNA families, and gene discovery.** *Genome research* 2000, **10**(12):1996-2005.

137. De Pablos LM, Osuna A: **Conserved Regions as Markers of Different Patterns of Expression and Distribution of the Mucin-Associated Surface Proteins of *Trypanosoma cruzi*.** *Infection and immunity* 2012, **80**(1):169-174.

138. dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Oliveira AC, Andrade LO, Chiari E, Gazzinelli RT, Teixeira SM *et al*: **The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection.** *PLoS neglected tropical diseases* 2012, **6**(8):e1779.

139. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G: **Exosomes: a common pathway for a specialized function.** *Journal of biochemistry* 2006, **140**(1):13-21.

140. Raposo G, Stoorvogel W: **Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.** *The Journal of cell biology* 2013, **200**(4):373-383.

141. Colombo M, Raposo G, Thery C: **Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.** *Annual review of cell and developmental biology* 2014, **30**:255-289.

142. Harding C, Heuser J, Stahl P: **Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes.** *The Journal of cell biology* 1983, **97**(2):329-339.

143. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C: **Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma.** *International immunology* 2005, **17**(7):879-887.
144. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yanoshita R: **Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva.** *Biological & pharmaceutical bulletin* 2008, **31**(6):1059-1062.
145. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA: **Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(36):13368-13373.
146. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Laheesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S: **Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007, **179**(3):1969-1978.
147. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA: **Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen.** *The Prostate* 2009, **69**(2):159-167.
148. Yang JY, Sun YW, Liu DJ, Zhang JF, Li J, Hua R: **MicroRNAs in stool samples as potential screening biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma cancer.** *American Journal of Cancer Research* 2014, **4**(6):663-673.
149. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borrás FE, Breakefield X, Budnik V *et al*: **Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation.** *PLoS biology* 2012, **10**(12):e1001450.

## Bibliografia

150. Schorey JS, Bhatnagar S: **Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology.** *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2008, **9**(6):871-881.
151. Grant BD, Donaldson JG: **Pathways and mechanisms of endocytic recycling.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(9):597-608.
152. Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL: **Late endosomes derive from early endosomes by maturation.** *Cell* 1991, **65**(3):417-427.
153. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD: **Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.** *Cell* 2001, **106**(2):145-155.
154. Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD: **Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body.** *Developmental cell* 2002, **3**(2):283-289.
155. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD: **Receptor downregulation and multivesicular-body sorting.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2002, **3**(12):893-905.
156. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Thery C, Raposo G: **Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles.** *J Cell Sci* 2013, **126**(Pt 24):5553-5565.

157. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M: **Lipid raft-associated protein sorting in exosomes.** *Blood* 2003, **102**(13):4336-4344.
158. Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C *et al*: **Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization.** *The Biochemical journal* 2004, **380**(Pt 1):161-171.
159. Valapala M, Vishwanatha JK: **Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(35):30911-30925.
160. Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S: **Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73.** *The Journal of cell biology* 1999, **147**(3):599-610.
161. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W: **Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(13):10963-10972.
162. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M: **Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012, **44**(9):1574-1584.
163. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, Morgelin M, Belting M: **Exosome uptake**

**depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1.** *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(24):17713-17724.

164. Ohya T, Miaczynska M, Coskun U, Lommer B, Runge A, Drechsel D, Kalaidzidis Y, Zerial M: **Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes.** *Nature* 2009, **459**(7250):1091-1097.

165. Savina A, Vidal M, Colombo MI: **The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11.** *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 12):2505-2515.

166. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP *et al*: **Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway.** *Nature cell biology* 2010, **12**(1):19-30; sup pp 11-13.

167. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Gronborg M, Mobius W, Rhee J *et al*: **Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C.** *The Journal of cell biology* 2010, **189**(2):223-232.

168. Zylbersztejn K, Galli T: **Vesicular traffic in cell navigation.** *The FEBS journal* 2011, **278**(23):4497-4505.

169. Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S: **Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle.** *Developmental cell* 2007, **12**(5):671-682.

170. Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI: **TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways.** *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1793**(12):1901-1916.

171. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ: **ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids**. *Nucleic acids research* 2012, **40**(Database issue):D1241-1244.
172. Kim DK, Lee J, Simpson RJ, Lotvall J, Gho YS: **EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research**. *Seminars in cell & developmental biology* 2015, **40**:4-7.
173. They C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S: **Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles**. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2001, **166**(12):7309-7318.
174. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G: **The biogenesis and functions of exosomes**. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2002, **3**(5):321-330.
175. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G: **Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells**. *Cancer research* 2005, **65**(12):5238-5247.
176. Segura E, Amigorena S, They C: **Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses**. *Blood cells, molecules & diseases* 2005, **35**(2):89-93.
177. Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugiere S, Tomaskovic-Crook E, Heath JK, Cerf-Bensussan N, Heyman M: **Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice**. *Gut* 2003, **52**(12):1690-1697.

## Bibliografia

178. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R: **Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2012, **1820**(7):940-948.
179. Vidal M, Sainte-Marie J, Philippot JR, Bienvenue A: **Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase".** *Journal of cellular physiology* 1989, **140**(3):455-462.
180. Batista BS, Eng WS, Pilobello KT, Hendricks-Munoz KD, Mahal LK: **Identification of a conserved glycan signature for microvesicles.** *Journal of proteome research* 2011, **10**(10):4624-4633.
181. Gerlach JQ, Griffin MD: **Getting to know the extracellular vesicle glycome.** *Molecular bioSystems* 2016, **12**(4):1071-1081.
182. Gerlach JQ, Kruger A, Gallogly S, Hanley SA, Hogan MC, Ward CJ, Joshi L, Griffin MD: **Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles.** *PloS one* 2013, **8**(9):e74801.
183. Menck K, Scharf C, Bleckmann A, Dyck L, Rost U, Wenzel D, Dhople VM, Siam L, Pukrop T, Binder C *et al*: **Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN.** *Journal of molecular cell biology* 2015, **7**(2):143-153.
184. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.** *Nature cell biology* 2007, **9**(6):654-659.

185. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM: **Functional delivery of viral miRNAs via exosomes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(14):6328-6333.
186. Arenaccio C, Chiozzini C, Columba-Cabezas S, Manfredi F, Affabris E, Baur A, Federico M: **Exosomes from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-dependent mechanism.** *Journal of virology* 2014, **88**(19):11529-11539.
187. Munson P, Shukla A: **Exosomes: Potential in Cancer Diagnosis and Therapy.** *Medicines (Basel)* 2015, **2**(4):310-327.
188. Marcilla A, Trelis M, Cortes A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, Valero ML, Sanchez del Pino MM, Munoz-Antoli C, Toledo R *et al*: **Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells.** *PloS one* 2012, **7**(9):e45974.
189. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE: **Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(52):52347-52354.
190. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez, M., Erkizia, I., Puertas, M. C., Borrás, F. E., Blanco, J. & Martínez-Picado, J.: **HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse?** *PLoS pathogens* 2010, **6**(3):e1000740.

## Bibliografia

191. Ellis TN, Kuehn MJ: **Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles.** *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2010, **74**(1):81-94.
192. Kuehn MJ, Kesty NC: **Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction.** *Genes & development* 2005, **19**(22):2645-2655.
193. Kruh-Garcia NA, Wolfe LM, Dobos KM: **Deciphering the role of exosomes in tuberculosis.** *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2015, **95**(1):26-30.
194. Marcilla A, Martin-Jaular L, Trelis M, de Menezes-Neto A, Osuna A, Bernal D, Fernandez-Becerra C, Almeida IC, del Portillo HA: **Extracellular vesicles in parasitic diseases.** 2014 2014.
195. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>]
196. Campos FM, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho AL, de Paula SC, Fontes CJ, Brito CF, Carvalho LH: **Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection.** *Malaria journal* 2010, **9**:327.
197. Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del Portillo HA: **Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections.** *PloS one* 2011, **6**(10):e26588.
198. Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, Grau GE, White NJ, Viriyavejakul P, Day NP *et al*: **Circulating red cell-derived microparticles in human malaria.** *The Journal of infectious diseases* 2011, **203**(5):700-706.
199. Estevez AM, Kempf T, Clayton C: **The exosome of *Trypanosoma brucei*.** *The EMBO journal* 2001, **20**(14):3831-3839.

200. Atyame Nten CM, Sommerer N, Rofidal V, Hirtz C, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB, Geiger A: **Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains.** *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, **2010**:212817.
201. WHO: **Control of the Leishmaniases.** *WHO Technical Report Series* 2010, **949**:197.
202. Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE: **An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 6):842-852.
203. Hassani K, Olivier M: **Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis.** *PLoS neglected tropical diseases* 2013, **7**(5):e2185.
204. Peters NC, Sacks DL: **The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis.** *Cellular microbiology* 2009, **11**(9):1290-1296.
205. Campelo R, Diaz Lozano I, Figarella K, Osuna A, Ramirez JL: ***Leishmania major* telomerase TERT protein has a nuclear/mitochondrial eclipsed distribution that is affected by oxidative stress.** *Infection and immunity* 2015, **83**(1):57-66.
206. da Silveira JF, Abrahamsohn PA, Colli W: **Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Biochimica et biophysica acta* 1979, **550**(2):222-232.
207. Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, de Souza W, Alves MJM, Zingales B, Colli W: ***Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface**

Bibliografia

**antigens as membrane vesicles.** *Experimental parasitology* 1991, **72**(1):43-53.

208. Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP, Cordero EM, Marques AF, Varela-Ramirez A, Choi H, Yoshida N, da Silveira JF, Almeida IC: **Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins.** *Journal of proteome research* 2013, **12**(2):883-897.

209. Nickel W, Seedorf M: **Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells.** *Annual review of cell and developmental biology* 2008, **24**:287-308.

210. Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, NC ES, de Almeida Abrahamsohn I, Colli W, Manso Alves MJ: ***Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009, **11**(1):29-39.

211. Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W: **Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases.** *Microbes and Infection* 2012, **14**(15):1465-1474.

212. Abuin G, Colli W, Alves MJ: **Turnover and shedding of the Tc-85 surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes.** *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 1996, **29**(3):335-341.

213. Cardillo F, de Pinho RT, Antas PRZ, Mengel J: **Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection.** *Pathogens and Disease* 2015, **73**(9).

214. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS: **Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells.** *Infection and immunity* 1996, **64**(1):128-134.
215. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT: **Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2001, **167**(1):416-423.
216. Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, Silva JS, Canizzaro H, Gazzinelli RT, Teixeira MM: **Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages.** *Journal of leukocyte biology* 2002, **71**(5):837-844.
217. Kayama H, Takeda K: **The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2010, **12**(7):511-517.
218. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS: **Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro.** *Infection and immunity* 1994, **62**(11):5177-5182.
219. Ouaiissi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin P: **The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal**

## Bibliografia

**infection.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2002, **168**(12):6366-6374.

220. Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A *et al*: **Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004, **173**(9):5688-5696.

221. Medeiros MM, Peixoto JR, Oliveira AC, Cardilo-Reis L, Koatz VL, Van Kaer L, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A, Bellio M: **Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*.** *Journal of leukocyte biology* 2007, **82**(3):488-496.

222. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A: **Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006, **177**(6):3515-3519.

223. Nunes MP, Fortes B, Silva-Filho JL, Terra-Granado E, Santos L, Conde L, de Araujo Oliveira I, Freire-de-Lima L, Martins MV, Pinheiro AA *et al*: **Inhibitory effects of *Trypanosoma cruzi* sialoglycoproteins on CD4+ T cells are associated with increased susceptibility to infection.** *PloS one* 2013, **8**(10):e77568.

224. Jacobs T, Erdmann H, Fleischer B: **Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*.** *European journal of cell biology* 2010, **89**(1):113-116.

225. Soares-Silva MC, Diniz FF, Gomes GN, Bahia D: **The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: role in immune evasion by trypanosomatids.** *Frontiers in microbiology* 2016, **7**.
226. Chang CF, D'Souza WN, Ch'en IL, Pages G, Pouyssegur J, Hedrick SM: **Polar opposites: Erk direction of CD4 T cell subsets.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2012, **189**(2):721-731.
227. Mosmann TR, Kobie JJ, Lee FE, Quataert SA: **T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation.** *Immunologic research* 2009, **45**(2-3):173-184.
228. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M: **Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites.** *Critical reviews in microbiology* 2002, **28**(3):187-248.
229. Beucher M, Meira WS, Zegarra V, Galvao LM, Chiari E, Norris KA: **Expression and purification of functional, recombinant *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein.** *Protein expression and purification* 2003, **27**(1):19-26.
230. Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M: **Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1991, **147**(7):2240-2247.
231. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV: **Complement evasion by human pathogens.** *Nature reviews Microbiology* 2008, **6**(2):132-142.
232. Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR: **Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1991, **146**(7):2394-2400.

Bibliografia

233. Fischer E, Ouaiissi MA, Velge P, Cornette J, Kazatchkine MD: **gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway.** *Immunology* 1988, **65**(2):299-303.
234. Ramirez-Tolozza G, Abello P, Ferreira A: **Is the Antitumor Property of *Trypanosoma cruzi* Infection Mediated by Its Calreticulin?** *Frontiers in immunology* 2016, **7**:268.
235. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI: ***Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2012, **188**(4):1942-1952.
236. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H: **IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010, **185**(2):1150-1157.
237. Cai CW, Blase JR, Eickhoff CS, Hoft DF: **Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*.** *The Journal of Immunology* 2016, **196**(1 Supplement):135.133.
238. Magalhaes LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO: **High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease.** *The Journal of infectious diseases* 2013, **207**(4):661-665.
239. Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, Singh AK, Khim S, Mucci J, Liggitt D *et al*: ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that**

- leads to IL-17 production by activated B cells.** *Nature immunology* 2013, **14**(5):514-522.
240. Leon B, Lund FE: **IL-17-producing B cells combat parasites.** *Nature immunology* 2013, **14**(5):419-421.
241. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK: **The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin.** *Annual review of pathology* 2013, **8**:477-512.
242. Chan AC: **B cell immunotherapy in autoimmunity--2010 update.** *Molecular immunology* 2011, **48**(11):1344-1347.
243. Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H, McLatchie AP, Miles MA, Kelly JM: **Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection.** *Cellular microbiology* 2014, **16**(9):1285-1300.
244. Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M, Weigle WO: **Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1980, **124**(1):121-126.
245. Ouaiissi A, Da Silva AC, Guevara AG, Borges M, Guilvard E: ***Trypanosoma cruzi*-Induced Host Immune System Dysfunction: A Rationale for Parasite Immunosuppressive Factor(s) Encoding Gene Targeting.** *Journal of biomedicine & biotechnology* 2001, **1**(1):11-17.
246. Eggleton P, Ward FJ, Johnson S, Khamashta MA, Hughes GR, Hajela VA, Michalak M, Corbett EF, Staines NA, Reid KB: **Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization.** *Clinical and experimental immunology* 2000, **120**(2):384-391.

## Bibliografía

247. Verreck FA, Elferink D, Vermeulen CJ, Amons R, Breedveld F, de Vries RR, Koning F: **DR4Dw4/DR53 molecules contain a peptide from the autoantigen calreticulin.** *Tissue antigens* 1995, **45**(4):270-275.
248. Ribeiro CH, López NC, Ramírez GA, Valck CE, Molina MC, Aguilar L, Rodríguez M, Maldonado I, Martínez R, González C *et al*: **Trypanosoma cruzi calreticulin: A possible role in Chagas' disease autoimmunity.** *Molecular immunology* 2009, **46**(6):1092-1099.
249. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J: **Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(8):3541-3545.
250. de Oliveira RB, Troncon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG: **Gastrointestinal manifestations of chagas' disease.** *Am J Gastroenterol* 1998, **93**(6):884-889.
251. Ribeiro BM, Crema E, Virmondés Rodrigues J: **Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease.** *Human immunology* 2008, **69**(8):484-489.
252. Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Jayawardhana S, Kelly JM: **Host and parasite genetics shape a link between Trypanosoma cruzi infection dynamics and chronic cardiomyopathy.** *Cellular microbiology* 2016.
253. Osuna A, Jiménez A, Lozano J: **Medio de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de Trypanosoma cruzi.** *RevIberParasitol* 1979, **39**:129-133.

254. Osuna A, Gamarro F, Castanys S, Ruiz-Perez LM.: **Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages.** . *Int J Parasitol* 1986, **16**:629–632.
255. Castanys S, Osuna A, Gamarro F, Ruiz-Perez LM: **Purification of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* by Percoll discontinuous gradient centrifugation.** *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 1984, **70**(4):443-449.
256. Lässer C, Eldh M, Lötvall J: **Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes.** *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 2012(59):3037.
257. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-Hoehn EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J *et al*: **Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research.** *Journal of Extracellular Vesicles* 2013, **2**:10.3402/jev.v3402i3400.20360.
258. Towbin H, Staehelin GJ: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, **76**:4350–4354.
259. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *AnalBiochem* 1976, **72**:248–254.
260. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C: **Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).** *The Journal of biological chemistry* 1987, **262**(19):9412-9420.

## Bibliografia

261. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C: **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** *Journal of Cell Science* 2010, **123**(10):1603-1611.
262. Witwer K, Buzás E, Bemis L, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-‘t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J *et al*: **Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research.** 2013 2013.
263. Adroher FJ, Osuna A, Lupianez J: **Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigote to metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Acta tropica* 1991, **50**(1):79-85.
264. Rodriguez-Cabezas M, Osuna A, Rmiqui A, Entrala E, Sanchez-Moreno M.: **The Effects of heat shock on the internalization and multiplication of *Trypanosoma cruzi* in the host cell.** . *Research and Reviews ill Parasitology* 1998, **58**(2):139-144.
265. Fernandes JF, Castellani O: **Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*.** *Experimental parasitology* 1966, **18**(2):195-202.
266. Santori MI, Laria S, Gomez EB, Espinosa I, Galanti N, Tellez-Inon MT: **Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular and biochemical parasitology* 2002, **121**(2):225-232.
267. Morimoto RI: **Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.** *Science (New York, NY)* 1993, **259**(5100):1409-1410.
268. Lindquist S: **The heat-shock response.** *Annual review of biochemistry* 1986, **55**:1151-1191.

269. Olson CL, Nadeau KC, Sullivan MA, Winkvist AG, Donelson JE, Walsh CT, Engman DM: **Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi***. *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(5):3868-3874.
270. De Carvalho EF, De Castro FT, Rondinelli E, Carvalho JF: **Physiological aspects of *Trypanosoma cruzi* gene regulation during heat-shock**. *Biological research* 1994, **27**(3-4):225-231.
271. Sullivan MA, Olson CL, Winkvist AG, Engman DM: **Expression and localization of *Trypanosoma cruzi* hsp60**. *Molecular and biochemical parasitology* 1994, **68**(2):197-208.
272. Palmer G, Louvion JF, Tibbetts RS, Engman DM, Picard D: ***Trypanosoma cruzi* heat-shock protein 90 can functionally complement yeast**. *Molecular and biochemical parasitology* 1995, **70**(1-2):199-202.
273. Sanchez-Moreno M, Rodriguez-Cabezas N, Fernandez-Becerra C, Mesa-Valle C, Osuna A: **Induction of stress proteins in the plant trypanosome *Phytomonas characias***. *Parasitology research* 1997, **83**(8):771-775.
274. Lancaster GI, Febbraio MA: **Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins**. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(24):23349-23355.
275. De Pablos LM, Osuna A: **Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity**. *Infection and immunity* 2012, **80**(7):2258-2264.
276. Filho SA, Pereira de Almeida ER, Gander ES: **The influence of hydroxyurea and colchicine on growth and morphology of *Trypanosoma cruzi***. *Acta tropica* 1978, **35**(3):229-237.

## Bibliografía

277. Rojas MV, Galanti N: **Relationship between DNA methylation and cell proliferation in Trypanosoma cruzi.** *FEBS letters* 1991, **295**(1-3):31-34.
278. Galanti N, Dvorak JA, Grenet J, McDaniel JP: **Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida.** *Experimental cell research* 1994, **214**(1):225-230.
279. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S: **Exosomes: composition, biogenesis and function.** *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(8):569-579.
280. Adroher FJ, Osuna, A, Lupiáñez JA: **Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigote to metacyclic forms of Trypanosoma cruzi.** *Acta Tropica* 1992, **50**(1):79-85
281. Cazzulo JJ: **Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1992, **6**(13):3153-3161.
282. Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ: **End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids.** *Molecular and biochemical parasitology* 1985, **16**(3):329-343.
283. Kim K: **Cargo trafficking from the trans-Golgi network towards the endosome.** *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2016, **108**(8):205-218.
284. Garcia-Silva MR, das Neves RF, Cabrera-Cabrera F, Sanguinetti J, Medeiros LC, Robello C, Naya H, Fernandez-Calero T, Souto-Padron T, de Souza W *et al*: **Extracellular vesicles shed by Trypanosoma cruzi are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and**

- susceptibility to infection of mammalian cells.** *Parasitology research* 2014, **113**(1):285-304.
285. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K *et al*: **Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line.** *PloS one* 2010, **5**(10):e13247.
286. Soekmadji C, Russell PJ, Nelson CC: **Exosomes in prostate cancer: putting together the pieces of a puzzle.** *Cancers* 2013, **5**(4):1522-1544.
287. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ: **Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers.** *Mol Neurodegener* 2012, **7**:42.
288. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF: **Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases?** *Frontiers in Physiology* 2012, **3**:124.
289. Vella LJ, Hill AF, Cheng L: **Focus on Extracellular Vesicles: Exosomes and Their Role in Protein Trafficking and Biomarker Potential in Alzheimer's and Parkinson's Disease.** *International journal of molecular sciences* 2016, **17**(2):173.
290. Yu X, Deng L, Wang D, Li N, Chen X, Cheng X, Yuan J, Gao X, Liao M, Wang M *et al*: **Mechanism of TNF-alpha autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1alpha, presented by exosomes.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2012, **53**(6):848-857.

## Bibliografia

291. Garcia EA, Ziliani M, Agüero F, Bernabo G, Sanchez DO, Tekiel V: **TcTASV: a novel protein family in *Trypanosoma cruzi* identified from a subtractive trypomastigote cDNA library.** *PLoS neglected tropical diseases* 2010, **4**(10).
292. Walker D, Oghumu S, Gupta G, McGwire B, Drew M, Satoskar A: **Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites.** *Cell Mol Life Sci* 2014, **71**(7):1245-1263.
293. Cooper GM: **The Cell: A Molecular Approach.**: ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
294. Kamada A, Nagaya H, Tamura T, Kinjo M, Jin HY, Yamashita T, Jimbow K, Kanoh H, Wada I: **Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(20):21533-21542.
295. Harbut MB, Patel BA, Yeung BK, McNamara CW, Bright AT, Ballard J, Supek F, Golde TE, Winzeler EA, Diagana TT *et al*: **Targeting the ERAD pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(52):21486-21491.
296. Conte I, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ: **The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum.** *Molecular biology of the cell* 2003, **14**(9):3529-3540.
297. Hegde RS, Bernstein HD: **The surprising complexity of signal sequences.** *Trends in biochemical sciences* 2006, **31**(10):563-571.
298. Astolfi Filho S, De Sa MF, Gander ES: **Protein synthesis in purified trypo- and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Acta tropica* 1984, **41**(2):109-115.

299. Lima MF, Kierszenbaum F: **Biochemical requirements for intracellular invasion by Trypanosoma cruzi: protein synthesis.** *The Journal of protozoology* 1982, **29**(4):566-570.
300. Seco-Hidalgo V, Osuna, A. & Pablos, L. M.: **To bet or not to bet: deciphering cell to cell variation in protozoan infections.** *Trends in parasitology* 2015, **31**(8):350-356.
301. Karaplis AC, Lim SK, Baba H, Arnold A, Kronenberg HM: **Inefficient membrane targeting, translocation, and proteolytic processing by signal peptidase of a mutant preproparathyroid hormone protein.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(4):1629-1635.
302. Ito M, Oiso Y, Murase T, Kondo K, Saito H, Chinzei T, Racchi M, Lively MO: **Possible involvement of inefficient cleavage of preprovasopressin by signal peptidase as a cause for familial central diabetes insipidus.** *J Clin Invest* 1993, **91**(6):2565-2571.
303. Dobson CM: **Principles of protein folding, misfolding and aggregation.** *Seminars in cell & developmental biology* 2004, **15**(1):3-16.
304. Dobson CM: **Protein misfolding, evolution and disease.** *Trends in biochemical sciences* 1999, **24**(9):329-332.
305. Horwich A: **Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions.** *The Journal of Clinical Investigation* 2002, **110**(9):1221-1232.
306. Datta R, Waheed A, Shah GN, Sly WS: **Signal sequence mutation in autosomal dominant form of hypoparathyroidism induces apoptosis that is corrected by a chemical chaperone.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(50):19989-19994.

Bibliografia

307. Gardner BM, Walter P: **Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response.** *Science (New York, NY)* 2011, **333**(6051):1891-1894.
308. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M: **Endoplasmic Reticulum Stress As a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease.** *CircRes* 2010, **107**(9):1071-1082.
309. Diwaker D, Mishra KP, Ganju L: **Effect of modulation of unfolded protein response pathway on dengue virus infection.** *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2015, **47**(12):960-968.
310. McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD: **Secretory pathway of trypanosomatid parasites.** *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2002, **66**(1):122-154; table of contents.
311. Brooks DR, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC: **Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*.** *J Cell Sci* 2000, **113 ( Pt 22)**:4035-4041.
312. Wang S, Thibault G, Ng DT: **Routing misfolded proteins through the multivesicular body (MVB) pathway protects against proteotoxicity.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(33):29376-29387.
313. Andrew AJ, Kao S, Strebhel K: **C-terminal hydrophobic region in human bone marrow stromal cell antigen 2 (BST-2)/tetherin protein functions as second transmembrane motif.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(46):39967-39981.
314. Mosca W, Cedillos R: **Autoantibodies and immunocomplexes in Chagas' disease.** *Acta científica venezolana* 1988, **39**(4):363-367.

315. Corral R, Freilij H, Grinstein S: **Specific circulating immune complexes in acute Chagas' disease.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1987, **29**:26-32.
316. Henrique PM, Marques T, da Silva MV, Nascentes GA, de Oliveira CF, Rodrigues V, Gomez-Hernandez C, Norris KA, Ramirez LE, Meira WS: **Correlation between the virulence of *T. cruzi* strains, complement regulatory protein expression levels, and the ability to elicit lytic antibody production.** *Experimental parasitology* 2016, **170**:66-72.
317. Zulantay I, Venegas J, Apt W, Solari A, Sanchez G: **Lytic antibodies in *Trypanosoma cruzi*-infected persons with low parasitemia.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1998, **58**(6):775-779.
318. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N: **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity.** *Clinical Microbiology Reviews* 2011, **24**(3):592-630.
319. Oliveira EC, Fujisawa MM, Hallal Longo DEM, Farias AS, Contin Moraes J, Guariento ME, de Almeida EA, Saad MJA, Langone F, Toyama MH *et al*: **Neuropathy of Gastrointestinal Chagas' Disease: Immune Response to Myelin Antigens.** *Neuroimmunomodulation* 2009, **16**(1):54-62.
320. dos-Santos WLC, Sweet GMM, Bahiense-Oliveira M, Rocha PN: **Schistosomal glomerulopathy and changes in the distribution of histological patterns of glomerular diseases in Bahia, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, **106**:901-904.
321. Ohyama K, Huy NT, Yoshimi H, Kishikawa N, Nishizawa JE, Roca Y, Revollo Guzman RJ, Velarde FU, Kuroda N, Hirayama K:

Bibliografia

**Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease.** *Parasite Immunol* 2016.