



Universidad de Granada
Instituto de Biotecnología
Departamento de Parasitología

**Vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*:
caracterización estructural, proteómica y estudio
de los cambios fisiológicos inducidos en células**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

Lisette Retana Moreira

Mayo, 2019



Universidad de Granada
Instituto de Biotecnología
Departamento de Parasitología



**Vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*:
caracterización estructural, proteómica y estudio
de los cambios fisiológicos inducidos en células**

Memoria presentada por:
Lisette Retana Moreira
Lcda. en Microbiología y Química Clínica,
para optar al título de Doctor

Director

Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Mayo, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Lissette Retana Moreira
ISBN: 978-84-1306-293-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56846>

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en:

- XX congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA). Póster titulado: “Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* affect the infection rate of cells and induce cell permeabilization”. Tenerife, Islas Canarias, España. Julio, 2017.
- Conferencia para el curso de Parasitología UNU-BIOLAC, titulada: “Expression of mucine-associated surface proteins (MASPs) specific to *Trypanosoma cruzi*”. Antofagasta, Chile. Septiembre, 2017.
- XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP). Conferencia titulada: “Expression of mucine-associated surface proteins (MASPs) specific to *Trypanosoma cruzi*”. Santiago de Chile, Chile. Diciembre, 2017.
- XIV International Congress of Parasitology (ICOPA). Conferencia titulada: “Exovesicles in trypanosomatids: *Trypanosoma cruzi*”. Daegu, Korea. Agosto, 2018.
- Curso en la Universidad Menéndez Pelayo. Conferencia titulada: “Chagas, la enfermedad que mata callando. Aspectos moleculares para entender la enfermedad”. Santander, España. Agosto, 2018.
- XXI Annual Linz Winter Workshop “Advances in single-molecule research & nanoscience. Título de los pósters: “Visualizing the cellular uptake of extracellular vesicles (EVs) of *T. cruzi* using AFM” y “Nanomechanical properties of extracellular vesicles (EVs) and immune complexes of *Trypanosoma cruzi*”. Linz, Austria. Febrero, 2019.

Además, parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en el siguiente artículo científico:

- Retana Moreira, L., Rodríguez Serrano, F. & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), pp. 0007163. doi: 10.1371/journal.pntd.0007163.

Se encuentran en proceso de publicación:

- Prescilla Ledezma, A.*, Retana Moreira, L.*, Linares, F., Osuna, A. Cellular uptake of extracellular vesicles (EVs) of *Trypanosoma cruzi* and comparison of nanomechanical properties versus active immune complexes.
- Retana Moreira, L.*, de Pablos Torró, L. M.*, Linares, F., Ibarrola Vanucci, A., Prescilla Ledezma, A. & Osuna, A. Proteomic and nanomechanical characterization of exosomes from trypomastigote and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.

*Coautoría

*A mis papás, Elsie y William, por tanto amor,
paciencia, comprensión y apoyo incondicional.*

*A mis sobrinos, Estela y Alejandro, los
responsables del brillo de nuestros ojos, quienes nos
hacen sonreír con el corazón.*

Agradecimientos

Quiero empezar este apartado dando gracias a Dios por guiar siempre mis pasos y presentarme tantas oportunidades en mi camino, acompañadas de gente noble. El camino no siempre es fácil pero con fe y esfuerzo se supera casi cualquier obstáculo.

Agradezco al doctor Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, mi director de Tesis Doctoral, por muchísimas cosas, pero sobre todo por abrirme las puertas de su laboratorio, por ser un gran maestro y por confiar en mí, dándome la oportunidad de proponer y realizar. Siempre voy a admirar que es una de las pocas personas eternamente ilusionada con la ciencia y la investigación. A Antonio le guardaré un gran aprecio ya que fueron más de 4 años trabajando “hombro con hombro”. A otro entusiasta de la ciencia, el Dr. Luis Miguel de Pablos le agradezco toda su colaboración con los análisis proteómicos. Luismi es una persona con mucha disposición para colaborar y mucha iniciativa. Al Dr. Fernando Rodríguez Serrano le agradezco toda la asesoría y el apoyo con los experimentos de citometría de flujo (incluidos los reactivos) y a la Dra. Susana Vílchez Tornero toda la asesoría con respecto a los trámites del programa de doctorado.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, los cuales se convirtieron en una familia para mí durante este tiempo: Anita, Albert, Martita, Nuria y Samir, entre muchas otras personas. Tengo tantos momentos bonitos con ellos que recordaré con mucha nostalgia. Cómo olvidar las escapadillas del laboratorio y todos los dulces que compartí con Anita, mi vecina de mesa de trabajo y motivadora personal, los momentos “chifrijo” y las canciones inventadas con Albert mientras estábamos trabajando en las cámaras de flujo, tantas conversaciones, consejos, el mercadillo navideño y las cenas preparadas por Martita (¡siempre pasta!), además de que fue la primera en visitarme y conocer a mi gente en Costa Rica, la sensación de paz y la dulzura que transmite Nuri y las carillas de preocupación de Sami (incluido el

momento ratón). Gracias también a Mercedes y a Gloria por compartir su experiencia en el trabajo de laboratorio y por las salidas de fines de semana y a Alberto por los abrazos de oso, sobre todo en momentos difíciles. Hago una mención especial a mi compañera de mesa de trabajo/piso/tema de investigación, vecina de país y amiga Alexa, una persona con un corazón enorme y bondadoso que se ha convertido en una hermana para mí. Con ella he reído, llorado, viajado y compartido muchísimos momentos. Espero que el trabajo no termine aquí sino que nos lo llevemos para Latinoamérica y lo continuemos allá, así siempre tendremos una excusa para viajar. No puedo dejar de lado a Carlos y a Encarna, también del laboratorio, personas que siempre me tendieron una mano y todos los días me recibían con palabras bonitas. Espero algún día encontrarme a Carlos en Costa Rica, disfrutando de unas merecidas y largas vacaciones.

Extiendo mi agradecimiento al personal del Centro de Instrumentación Científica, fundamental para el desarrollo de muchos de los experimentos de esta Tesis. Destaco especialmente a las doctoras Ana Santos y Fátima Linares, personas muy profesionales, con una curiosidad científica increíble y muchas ganas de enseñar, con quienes compartí tantas horas de microscopía, además de galletas, chocolates, charlas largas y amenas e incluso un curso y congreso con Fátima. Mi admiración total para ella, una mujer luchadora, valiente, perseverante y muy amable.

A mis compañeros de trabajo y amigos, Eli y Jacob, por ser ejemplo, apostar por mí y empujarme siempre hacia adelante. El camino hubiese sido más difícil sin la motivación y el apoyo de Eli. A la gente de micro en la UCR, en especial a Dennis, Alfredo, Iván, Ólger, Eugenia, María Laura, Mau y Meli por todas sus muestras de cariño. A mis amigos de Costa Rica, sobre todo a Pao, Silvia, Angélica, Sara, Merry, Óscar, Esteban, Hans y Charlie, quienes, junto mis amigos de Granada, Ricardo y mamá Rose, han hecho este proceso más fácil al mostrarme su afecto, escucharme, aconsejarme y hacerme reír. Incluyo también a todas las personas que pasaron por mi casa granadina de visita (muchas, por cierto), quienes me hicieron recordar la calidez y el

pura vida del tico, además de llenarme de comida costarricense para que no extrañara tanto mi casa y sacarme un rato de mi mundo de laboratorio. A Diana, Paulina y Ana Elena, mis amigas ticas en Granada, les doy las gracias porque juntas llegamos a formar algo similar a una familia costarricense fuera de nuestro país.

Por último, incluyo a las personas más importantes en mi vida, a quienes les dedico esta Tesis Doctoral y todo el esfuerzo invertido para conseguir este objetivo, mi familia. Mis papás, Elsie y William y mis hermanos Karina, Ronny, Eduardo y Melania me han demostrado lo que es el amor y el apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida y son ellos quienes me inspiran a ser una mejor persona. Con ellos nunca me he sentido sola, ya que están siempre en mi corazón (¡en whatsapp y skype también!) e incluso vinieron a visitarme. Tengo que incluir a abuela Zora, a tía Irma, tía Ledys y tío Geovanny y a Meli, Lari y Carlos, los mejores cuñados del mundo. No puedo dejar de lado a mis sobrinitos Estela y Alejandro, los niños más lindos y dulces, a quienes espero inspirar para que luchen siempre por sus sueños. Me siento una persona muy bendecida al tener esta familia y de corazón, esto es para ellos.

El apoyo económico para realizar esta Tesis Doctoral fue otorgado por la Oficina de Asuntos Internacionales y Cooperación Externa (OAICE) de la Universidad de Costa Rica junto con el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones (MICITT) y el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) del gobierno de Costa Rica, instituciones que cofinanciaron mi beca de postgrado, por lo que valoro el apoyo económico que se me brindó y les doy las gracias.

La financiación para la investigación de esta a Tesis Doctoral se obtuvo gracias a la concesión de los proyectos:

- ERA-NET UE, con las referencias ELAC2014/HID-0328 y ERANet17/HLH-0142 (Cochaco), titulados: “Research in prevention of congenital Chagas disease: parasitological, placental and

immunological markers". Estos proyectos han sido financiados por la Unión Europea y por el gobierno de España.

- “Interactoma de las exovesículas de *Trypanosoma cruzi* y de los inmunocomplejos que forman con las células del hospedador: implicaciones en la patología de la Enfermedad de Chagas”. Fundación Ramón Areces, 2019 (Diálogo intercelular e interactoma: implicaciones patológicas).

También, la Red de Excelencia en Investigación SAF 2015-71231-RDIT: “Red de investigación e innovación en exosomas” del Ministerio Economía y Competitividad (MINECO) del Gobierno de España.

Resumen

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo intracelular obligado en el hospedador mamífero y con un ciclo de vida donde interviene un insecto hematófago vector y el hospedador mamífero. Esta enfermedad se caracteriza por presentar una fase aguda y una fase crónica, con variaciones en la sintomatología y la patología entre los individuos infectados. El proceso patogénico en la enfermedad de Chagas es complejo y multifactorial e involucra la participación de respuestas conjuntas y a veces sinérgicas, tanto del parásito como de la célula hospedadora, entre las que se involucran las vesículas extracelulares o exovesículas (VEs).

Hasta la fecha existen publicaciones que demuestran la participación de las VEs de *T. cruzi* en la comunicación intercelular, la patogénesis de la enfermedad y la evasión de la respuesta inmune y se ha comprobado su papel en el incremento de parasitación celular y en la adhesión e invasión del parásito en las células hospedadoras. Sin embargo, existe muy poca información sobre la forma en la que las VEs del parásito condicionan la fisiología celular para permitir y favorecer la entrada del parásito a la célula y permitir su sobrevivencia y multiplicación intracelular o las alteraciones que desencadenan las diferentes patologías de la enfermedad de Chagas.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado el aislamiento mediante centrifugación diferencial de las VEs a partir de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Pan4, caracterizándose dichas exovesículas mediante diferentes técnicas como microscopía electrónica, “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”. Se ha analizado la interacción de dichas VEs con los cultivos celulares para evidenciar el incremento en los porcentajes de parasitación generado por estas vesículas, comprobándose que el efecto sobre las células es específico para el parásito y que dichos efectos son temporales en las células con las que interaccionan.

Por otra parte, se ha estudiado el papel de las exovesículas de *T. cruzi* Pan4 en diferentes procesos celulares como la inducción de una permeabilización celular, la inducción de la movilización intracelular de calcio, la generación de cambios en el citoesqueleto celular, su efecto sobre el ciclo celular y sobre la apoptosis. Dado que se observaron cambios en estos procesos celulares, se evaluó de manera general la participación de las proteínas Rho GTPasas y el efecto que las vesículas ejercen sobre dichas proteínas. Además, se han determinado las propiedades nanomecánicas de dichas VEs, comparándolas con las propiedades de los inmunocomplejos formados *in vitro* de estas vesículas con IgGs anti-*T. cruzi*, estudios llevados a cabo mediante microscopía de fuerza atómica. De igual manera, se ha pretendido investigar la biodistribución de las VEs y de los inmunocomplejos que forman, tras su inoculación y seguimiento por IVIS en un modelo animal. Por último, se ha llevado a cabo un estudio comparativo del proteoma de las VEs procedentes de los tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*, con el fin de analizar el “carga” de proteínas de las VEs de cada fase del parásito.

De los resultados obtenidos de la presente Tesis Doctoral se desprende que la incubación de las células con las VEs de las formas tripomastigotas infectivas de una cepa DTU I de *T. cruzi* produjo cambios importantes en las células, entre los que destacan el cambio en la permeabilidad celular, el incremento de los niveles de calcio intracelular que altera la dinámica del citoesqueleto celular y el ciclo celular. Además, las VEs del parásito fueron capaces de generar un efecto “protector” frente a la apoptosis celular, ya que se obtuvieron valores más bajos de apoptosis temprana y tardía en aquellas células incubadas con estas vesículas. Además, disminuyeron los niveles de expresión de los genes *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* cuando las células fueron incubadas con las VEs del parásito.

Los análisis mediante microscopía de fuerza atómica revelaron detalles de la estructura de las VEs y de los inmunocomplejos, así como diferencias en propiedades mecánicas como la adhesión, rigidez y módulo de

Young. En el caso de la biodistribución, cabe resaltar la presencia de las VEs al cabo del tiempo en órganos como el hígado y el bazo, mientras que cuando se usaron los inmunocomplejos formados por estas VEs se pudieron localizar también en el tracto digestivo. Por último, la comparación del proteoma entre las VEs de tripomastigotes y epimastigotes reveló la presencia de una mayor cantidad de proteínas en las VEs de las formas tripomastigotes infectivas, así como una cantidad significativamente mayor de las enzimas pertenecientes a la familia de las *trans*-sialidasas, proteínas claves durante el proceso de invasión del parásito.

Índice general

1. Introducción	
1.1. La enfermedad de Chagas.....	3
1.1.1. Epidemiología.....	3
1.1.2. El agente causal: <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.1.2.1. Características generales.....	8
1.1.2.2. Ciclo de vida.....	8
1.1.2.3. Fases del parásito.....	12
1.1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad.....	14
1.1.4. Diagnóstico y tratamiento.....	16
1.2. El proceso de invasión celular de <i>T. cruzi</i>	18
1.2.1. Formación de la vacuola parasitófora y “escape” del parásito al citoplasma celular.....	26
1.3. Vesículas extracelulares o exovesículas.....	29
1.3.1. Clasificación de las VEs.....	30
1.3.1.1. Los cuerpos apoptóticos.....	31
1.3.1.2. Los ectosomas, micropartículas o microvesículas.....	31
1.3.1.3. Los exosomas.....	34
1.3.2. Funciones generales de las VEs.....	42
1.3.3. Las VEs en las enfermedades infecciosas con énfasis en las enfermedades parasitarias.....	46
1.3.4. Las VEs de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
1.3.4.1. “Cargo” de proteínas de las VEs de <i>T. cruzi</i> y sus funciones.....	54
2. Justificación y objetivos	
2.1. Objetivo general.....	62
2.2. Objetivos específicos.....	62
3. Materiales y métodos	
3.1. Cultivo de células.....	67
3.1.1. Cultivo de células Vero y NIH/3T3.....	67
3.1.2. Cultivo de células HL-1.....	68
3.1.3. Sincronización del ciclo celular.....	69

3.2. Cepas de parásitos..	69
3.2.1. Metaciclologénesis <i>in vitro</i> de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	70
3.2.2. Infección de células Vero con tripomastigotes metacíclicos de <i>T. cruzi</i>	71
3.3. Aislamiento y purificación de las vesículas extracelulares o exovesículas de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	71
3.3.1. Cuantificación de la concentración de proteínas de las VEs mediante el kit comercial micro BCA.....	74
3.3.2. Observación de las VEs de <i>T. cruzi</i> mediante microscopía electrónica de transmisión.....	76
3.3.3. Cuantificación y determinación del tamaño de las VEs de <i>T. cruzi</i> mediante “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”.....	77
3.3.4. Detección de las proteínas cruzipaina y <i>trans</i> -sialidasa (mAb 39) en las VEs de <i>T. cruzi</i> mediante Western blot.....	78
3.3.4.1. Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.....	78
3.3.4.2. Visualización de las bandas de proteínas mediante la tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomasie.....	80
3.3.4.3. Western blot.....	80
3.4. Optimización de las condiciones de incubación de las células con las VEs de <i>T. cruzi</i>	81
3.5. Experimentos de invasión celular.....	82
3.5.1. Efecto de las VEs de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> Pan4 en la infección celular.....	83
3.5.2. Efecto de los tratamientos térmico y químico/enzimático de las VEs en la interacción parásito-célula.....	83
3.6. Evaluación de la especificidad del efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> Pan4 sobre células Vero.....	84
3.6.1. Aislamiento de las VEs procedentes de las formas coanomastigotes de <i>Crithidia mellificae</i> y de células de ratón NIH/3T3.....	85
3.6.2. Obtención de tripomastigotes metacíclicos de la cepa 4162 de <i>T. cruzi</i> (Tc IV) y cultivo de los taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	86
3.6.3. Experimentos de infección celular después de la incubación de las células con las VEs de <i>C. mellificae</i> y de células NIH/3T3.....	86
3.7. Efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> en la permeabilización celular.....	87

3.7.1. Ensayos de viabilidad celular.....	87
3.7.2. Detección del epítipo intracitoplasmático del receptor β_2 -adrenérgico mediante microscopía confocal láser como método para evaluar la posible permeabilización celular tras la interacción VEs de <i>T. cruzi</i> -células HL-1.....	89
3.8. Determinación del movimiento intracelular de calcio provocado por las VEs de <i>T. cruzi</i> usando el colorante Fluo4-AM.....	90
3.9. Observación del efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> sobre el citoesqueleto (filamentos de actina y vimentina) mediante microscopía láser confocal.....	92
3.10. Efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> sobre el ciclo celular.....	93
3.10.1. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	93
3.10.2. Análisis de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma mediante Western blot.....	94
3.10.2.1. Determinación de proteínas mediante el método colorimétrico Bradford.....	95
3.10.2.2. Análisis de la fosforilación de la proteína pRb mediante Western blot.....	96
3.11. Análisis del efecto de la VEs sobre la apoptosis celular mediante citometría de flujo.....	98
3.12. Análisis de la expresión de los genes <i>RhoA</i> , <i>Rac1</i> y <i>Cdc42</i> mediante RT-qPCR en células incubadas con las VEs de <i>T. cruzi</i>	99
3.12.1. Extracción de RNA de las células incubadas con las VEs de <i>T. cruzi</i>	100
3.12.2. Tratamiento de las muestras de RNA con DNAsa y retrotranscripción a cDNA.....	100
3.12.3. Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de la expresión de los genes de las Rho GTPasas <i>RhoA</i> , <i>Rac1</i> y <i>Cdc42</i>	101
3.13. Fosforilación de la RhoA GTPasa.....	104
3.14. Formación <i>in vitro</i> de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti- <i>T. cruzi</i> y observación de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , IgGs anti- <i>T. cruzi</i> e inmunocomplejos mediante microscopía de fuerza atómica.....	105
3.14.1. Producción de anticuerpos policlonales anti- <i>T. cruzi</i> para la purificación de las IgGs.....	105
3.14.2. Determinación del título de anticuerpos mediante ELISA.....	106
3.14.3. Obtención de las IgGs a partir del inmunisero en ratón anti- <i>T. cruzi</i> y preparación de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti <i>T. cruzi</i>	108

3.14.4. Microscopía de fuerza atómica.....	109
3.15. Biodistribución de las VEs de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> y los inmunocomplejos VEs-IgGs anti- <i>T. cruzi</i> mediante el sistema de análisis de imágenes IVIS.....	112
3.15.1. Preparación y tinción de las muestras de VEs e inmunocomplejos VEs-IgGs anti- <i>T. cruzi</i>	112
3.16. Análisis y comparación del proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	114
3.16.1. Preparación de las muestras de VEs de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> Pan4.....	114
3.16.2. Análisis proteómico de las muestras.....	116
3.16.3. Análisis bioinformáticos.....	117
3.17. Análisis estadístico de los datos.....	118
3.18. Soluciones, reactivos y medios de cultivo.....	118
3.19. Control de contaminación de los cultivos celulares por <i>Mycoplasma</i> sp.....	122
4. Resultados	
4.1. Microscopía electrónica de transmisión, “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”	127
4.2. Detección de las proteínas cruzipaina y <i>trans</i> -sialidasa (mAb 39) en VEs de <i>T.</i> <i>cruzi</i> Pan4 mediante Western blot.....	129
4.3. Optimización de las condiciones de incubación de las células con las VEs de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	130
4.4. Efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> en la infección celular a través del tiempo.....	132
4.5. Efecto del tratamiento térmico y químico/enzimático de las VEs de <i>T. cruzi</i> en la infección de células Vero.....	134
4.6. Evaluación de la especificidad del efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> Pan4 sobre células Vero.....	137
4.7. Efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> en la permeabilización celular.....	142
4.8. Detección del receptor β_2 -adrenérgico mediante microscopía confocal láser....	145
4.9. Derminación de los movimientos de calcio intracelular inducidos por la interacción VEs-células Vero.....	148
4.10. Efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> sobre el citoesqueleto celular mediante microscopía láser confocal.....	152

4.11. Efecto de las VEs de <i>T. cruzi</i> sobre el ciclo celular.....	157
4.12. Análisis del efecto de la VEs sobre la apoptosis celular.....	159
4.13. Análisis de la expresión de los genes <i>RhoA</i> , <i>Rac1</i> y <i>Cdc42</i> en células Vero incubadas con VEs de <i>T. cruzi</i> y fosforilación de la RhoA-GTPasa.....	161
4.14. Observación de las VEs de <i>T. cruzi</i> y de los inmunocomplejos formados por las VEs de <i>T. cruzi</i> con IgGs anti <i>T. cruzi</i> mediante Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).	167
4.14.1. Caracterización estructural de las VEs de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> Pan4, IgGs de un suero anti- <i>T. cruzi</i> y los inmunocomplejos VEs de <i>T. cruzi</i> -IgGs anti- <i>T. cruzi</i> empleando Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).....	167
4.14.1.1. VEs de tripomastigotes <i>T. cruzi</i> Pan4.....	169
4.14.1.2. IgGs de ratón anti- <i>T. cruzi</i>	171
4.14.1.3. Inmunocomplejos VEs-IgGs anti- <i>T. cruzi</i>	172
4.14.2. Resultados del estudio de las propiedades mecánicas de las VEs de los tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> y los inmunocomplejos VEs-IgGs anti- <i>T. cruzi</i>	175
4.15. Bioistribución de las VEs de <i>T. cruzi</i> y los inmunocomplejos VEs-IgGs anti- <i>T. cruzi</i> mediante el sistema de análisis de imágenes “ <i>in vivo</i> ” IVIS.....	177
4.16. Análisis y comparación del proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> Pan4.....	183
5. Discusión	193
6. Conclusiones	239
7. Bibliografía	245
8. Anexos	
Anexo 1.....	319

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

- Tabla 3.3.1.** Diluciones de BSA para preparar una curva patrón y determinar las concentraciones de proteína mediante el método micro BCA.
- Tabla 3.10.2.1.** Volúmenes y reactivos empleados para la preparación de la curva patrón de BSA y la cuantificación de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford.
- Tabla 3.12.3.1.** Reactivos y cantidades empleadas para las reacciones de PCR que amplifican los genes *RhoA*, *Rac1*, *Cdc42*, *GAPDH* y *18S*.
- Tabla 3.12.3.2.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de Rho GTPasas. Se incluyen las secuencias de los genes empleados como normalizadores (*GAPDH* y *18S*).
- Tabla 3.12.3.3.** Reactivos y cantidades empleadas en las RT-qPCR.
- Tabla 4.14.2.** Propiedades nanomecánicas de VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* e inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi*: rigidez, módulo de Young y adhesión (nN).

Figuras

- Figura 1.1.1.1.** Ecotopo doméstico (a), peridoméstico (b) y ambiente donde se desarrolla el contacto humano con el ciclo selvático de transmisión de *T. cruzi* (c) (Salvatella & Schofield, 2003; Náquira, 2014; Chedid et al., 2015).
- Figura 1.1.1.2.** Distribución global de los casos de enfermedad de Chagas entre los años 2006 y 2010 (Perez et al., 2015).
- Figura 1.1.1.3.** Rutas de migración desde América Latina y estimación del número total de personas infectadas con *T. cruzi* en

- países no endémicos (Schmunis & Yadon, 2010).
- Figura 1.1.2.2.** Ciclo de vida de *T. cruzi* (Teixeira et al., 2012).
- Figura 1.1.2.3.1.** Representación esquemática de los tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Figura 1.1.2.3.2.** Representación esquemática de los amastigotes de *T. cruzi*.
- Figura 1.1.2.3.3.** Representación esquemática de los epimastigotes de *T. cruzi*.
- Figura 1.2.** Moléculas implicadas en el proceso de interacción parásito-célula (de Souza et al., 2010).
- Figura 1.2.1.** Modelo de invasión de *T. cruzi* (de Souza et al., 2010).
- Figura 1.3.1.** Tipos de vesículas extracelulares (van der Pol et al., 2012).
- Figura 1.3.1.2.** Composición y biogénesis de los ectosomas (Kalra et al., 2016).
- Figura 1.3.1.3.1.** Composición de proteínas de los exosomas y sus funciones (Schorey & Bhatnagar, 2008).
- Figura 1.3.1.3.2.** Biogénesis de los MVBs y liberación de los exosomas (Schorey & Bhatnagar, 2008).
- Figura 1.3.1.3.3.** Detalle de la biogénesis de los exosomas (Robbins & Morelli, 2014).
- Figura 1.3.1.3.4.** Representación de una célula eucariótica donde se muestra la vía endocítica y el origen mediante MVBs de los exosomas y el mecanismo de liberación de las micropartículas mediante la activación de la calpaína y la escramblasa (Deolindo et al., 2013).
- Figura 1.3.1.3.5.** Mecanismos propuestos para la captura de las VEs por las células receptoras: fusión de membranas (a) e ingreso de las VEs completas vía endocitosis (b) (Edgar, 2016).
- Figura 1.3.4.1.** Mecanismos de acción de algunas proteínas de *T. cruzi*

secretadas en las VEs (Borges et al., 2016).

- Figura 3.3.** Protocolo de aislamiento de VEs a partir de tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Figura 4.1.1.** Observación de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Figura 4.1.2.** Cuantificación del tamaño de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 mediante NTA (A) y DLS (B), donde es posible observar que la mayoría de las VEs obtenidas de tripomastigotes tienen un tamaño inferior a los 100 nm cuando se emplean ambas técnicas para realizar la cuantificación. En la Figura también se muestra la cuantificación de los tamaños de las VEs de coanomastigotes de *C. mellificae* (C) y de células NIH/3T3 (D).
- Figura 4.2A.** Detección de la proteína cruzipaina en las VEs de *T. cruzi* Pan4 mediante Western blot.
- Figura 4.2B.** Detección de la proteína *trans*-sialidasa (mAb 39) en un lisado de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (1), así como en las VEs de la misma cepa (2), mediante Western blot.
- Figura 4.3.** Porcentaje de parasitación de células Vero con *T. cruzi* Pan4 después de la incubación de las células con diferentes dosis de VEs.
- Figura 4.4A.** Porcentajes de parasitación obtenidos al infectar células Vero previamente incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 con tripomastigotes de la misma cepa.
- Figura 4.4B.** Fotografías de las tinciones de Giemsa que ilustran células Vero incubadas con las VEs de *T. cruzi* durante 2 horas e infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 durante 4 horas (a y b).

- Figura 4.5A.** Porcentaje de parasitación de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* sometidas a tratamientos térmicos.
- Figura 4.6.1A.** Porcentajes de parasitación de células Vero incubadas con VEs de *C. mellificae* y VEs de células NIH/3T3 e infectadas con *T. cruzi* Pan4, así como células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectadas con tripomastigotes de la cepa 4162 de *T. cruzi*.
- Figura 4.6.1B.** Fotografías de las tinciones de Giemsa que ilustran células Vero incubadas con las VEs de *C. mellificae* (a) y con las VEs de células NIH/3T3 (b) durante 2 horas e infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 durante 4 horas y células Vero incubadas con VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi* durante 2 horas e infectadas con tripomastigotes de las cepas 4162 (c) y Pan4 (d) de *T. cruzi*.
- Figura 4.6.2A.** Porcentajes de parasitación de las células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectadas con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*.
- Figura 4.6.2B.** Fotografías de las tinciones de Giemsa que ilustran células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectadas con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*.
- Figura 4.7.1A.** Porcentajes de mortalidad celular de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 y tratadas con la toxina α -sarcina, obtenidos mediante la tinción con azul tripán 0.4%.
- Figura 4.7.1B.** Porcentajes de viabilidad celular de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 y tratadas con la toxina α -sarcina, obtenidos mediante el ensayo con el reactivo MTT.
- Figura 4.7.2.** Monocapas de células Vero incubadas con VEs de *T.*

cruzi, la toxina α -sarcina o ambos.

- Figura 4.8.1.** Representación gráfica de la secuencia de aminoácidos y la posible topografía en la membrana del receptor β_2 -adrenérgico.
- Figura 4.8.2.** Permeabilización de la línea celular de cardiomiocitos HL-1 por las VEs de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.9A.** Análisis de la concentración intracelular de Ca^{2+} en células Vero incubadas con las VEs de *T. cruzi* Pan4 mediante microscopía láser confocal.
- Figura 4.9B.** Seguimiento de la movilización intracelular de calcio en células Vero incubadas con VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi* durante 25 minutos.
- Figura 4.10.1.** Despolimerización de los filamentos de actina y formación de filópodos en células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* durante 15 y 30 minutos.
- Figura 4.10.2.** Magnificación de la Figura 4.10.1 donde se observa la despolimerización de los filamentos de actina (flechas blancas) y la formación de filópodos (F) en células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 durante 15 y 30 minutos.
- Figura 4.10.3.** Efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre los filamentos de actina y la vimentina de las células Vero a los 120 minutos y 24 horas de incubación.
- Figura 4.11.1.** Efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre el ciclo celular.
- Figura 4.11.2A.** Fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) en células Vero incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.11.2B.** Niveles de proteína de retinoblastoma (sin fosforilar) en células tincubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.

- Figura 4.12.** Efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre la apoptosis celular.
- Figura 4.13.1.** Fotografía del gel de agarosa al 2% donde se muestra la amplificación del gen 18S del RNA ribosomal a partir de muestras de cDNA de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.13.2.** Niveles de expresión normalizados de los genes que codifican para las Rho GTPasas *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* mediante RT-qPCR en células incubadas con las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* y células control sin incubar con las VEs durante diferentes tiempos.
- Figura 4.13.3A.** Fosforilación de la proteína RhoA en células Vero incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.13.3B.** Niveles de proteína de RhoA (sin fosforilar) en células incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.13.4A.** Niveles de la proteína efectora ROCK1 en células Vero incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.13.4B.** Niveles de la proteína efectora ROCK2 en células incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.
- Figura 4.14.1.1.** Imágenes representativas de VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (a), de IgGs anti-*T. cruzi* (b) y de los inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi* (c) empleando MFA.
- Figura 4.14.1.2.** Magnificación de la Figura 4.14.1.1 donde se muestran las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (a), de IgGs anti-*T. cruzi* (b) y de los inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi* (c) empleando MFA.
- Figura 4.14.1.1.1.** Imágenes representativas de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud).

- Figura 4.14.1.2.1.** Imágenes representativas de las IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud).
- Figura 4.14.1.3.1.** Imágenes representativas de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud).
- Figura 4.14.1.3.2.** Imágenes representativas de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud).
- Figura 4.14.1.3.3.** Amplificación de las imágenes representativas de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y contraste de fase).
- Figura 4.14.2.1.** Imágenes de altura Z y mapas nanomecánicos de inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* (a) y VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 obtenidos mediante MFA.
- Figura 4.15.1A.** Reconocimiento de las proteínas de las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* por las IgGs anti-*T. cruzi* (obtenido en ratón) mediante Western blot.
- Figura 4.15.1B.** Reconocimiento mediante Western blot de la proteína CD9 (24 KDa), específico de los exosomas de mamíferos, en las VEs de células Vero por un anticuerpo anti-CD9 (obtenido en ratón).
- Figura 4.15.1C.** Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida que muestra las fracciones de las IgGs tras el tratamiento con la papaína.
- Figura 4.15.2.** Distribución de las VEs de *T. cruzi* Pan4 e inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti *T. cruzi* teñidos con el colorante DiR mediante IVIS.
- Figura 4.15.3.** Observación mediante IVIS de los órganos de los ratones sacrificados a las 72, 96 y 120 horas de inyectados con las VEs e inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs de *T. cruzi* teñidos con el colorante DiR, mediante IVIS.

- Figura 4.15.4.** Observación de los órganos de los ratones sacrificados a las 140 y 164 horas de inyectados con las VEs e inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs de *T. cruzi* teñidos con el colorante DiR, mediante IVIS.
- Figura 4.16.1.** Observación de las VEs de tripomastigotes (a, b) y epimastigotes (c, d) de la cepa Pan4 de *T. cruzi* mediante MFA.
- Figura 4.16.2.** Diagrama de Venn donde se compara el proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*.
- Figura 4.16.3.** Proteínas de superficie presentes en las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*.
- Figura 4.16.4.** Clasificación de las *trans*-sialidasas de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* según el grupo al que pertenecen.
- Figura 4.16.5A.** Análisis “GO term” de ontología génica que muestra las posibles funciones moleculares y los procesos biológicos de las proteínas contenidas en las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*.
- Figura 4.16.5B.** “Tree map” del análisis “GO term” de ontología génica que muestra las posibles funciones moleculares y los procesos biológicos de las proteínas contenidas en las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*.

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
VEs	Vesículas extracelulares o exovesículas
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
GIPLs	Glicoinositolfosfolípidos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
PCR	“Polymerase chain reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)
DNA	“Desoxiribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay” (ensayo por inmunoabsorción asociado a enzimas)
RT-qPCR	“Real time quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa en tiempo real)
MASPs	“Mucine-associated surface proteins” (proteínas de superficie asociadas a mucinas)
GPI	“Glycosylphosphatidylinositol” (glicosilfosfatidilinositol)
KDa	Kilodaltons
PLC	“Phospholipase C” (fosfolipasa C)
DAG	Diacylglycerol (diacilglicerol)
IP3	Inositol triphosphate (Inositol trifosfato)
PKC	“Protein kinase C” (Proteína quinasa C)
Ca²⁺	Iones de calcio
SAP	“Serine/alanine/proline rich proteins” (proteínas ricas en serina/alanina/prolina)
PLA1	“Phospholipase A1” (fosfolipasa A1)
Galp	Galactopiranososa
POP 80	“Prolyl oligopeptidase 80” (Prolil oligopeptidasa 80)

WGA	“Wheat-germ agglutinin” (aglutinina de germen de trigo)
RCA I	“ <i>Ricinus communis</i> agglutinin” (aglutinina de <i>Ricinus communis</i>)
ConA	Concanavalina A
PI3K	“Phosphatidylinositol 3-kinase” (fosfatidilinositol 3-quinasa)
CK 18	“Citokeratin 18” (citoqueratina 18)
TGF-β	“Tumoral growth factor β” (factor de crecimiento tumoral β)
TrK	“Tyrosine kinase” (tirosina quinasas)
TLR	“Toll-like receptor” (receptor Toll-like)
PIP3	“Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate” (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato)
PI3K	“Phosphatidylinositol 3-kinases” (fosfatidilinositol 3-quinasas)
ARF6	“ADP ribosylation factor 6” (factor de ribosilación de ADP 6)
PLD	“Phospholipase D” (fosfolipasa D)
ERK	“Extracellular signal regulated kinase” (quinasa regulada por señal extracelular)
MLCK	“Myosin light chain kinase” (quinasa de la cadena ligera de miosina)
ESCRT	“Endosomal sorting complexes required for transport” (complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte)
PHB	“Prohibitin homology domain” (dominio de homología con prohibitina)
TSG101	“Tumor susceptibility gene 101” (gen de susceptibilidad tumoral 101)
MVBs	“Multivesicular bodies” (cuerpos multivesiculares)
EGF	“Epidermal growth factor” (factor de crecimiento epidérmico)
ILVs	“Intraluminal vesicles” (vesículas intraluminales)
MHC	“Major histocompatibility complex” (complejo mayor de

	histocompatibilidad)
RNA	“Ribonucleic acid” (ácido ribonucleico)
SNARE	“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors” (receptores de proteínas de fijación soluble de NSF)
IL	Interleuquina
miRNA	“Micro RNA” (micro ARN)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA-DR	“Human leucocyte antigen D receptor” (receptor del antígeno leucocitario humano D)
PAMPs	“Pathogen associated molecular patterns” (patrones moleculares asociados a patógenos)
LRV1	“ <i>Leishmania</i> sp. RNA virus 1” (virus RNA de <i>Leishmania</i> sp.)
EBA	“Erythrocyte binding antigen” (antígeno de unión a eritrocitos)
SRA	“Serum resistance associated” (asociada con la resistencia al suero)
tRNA	“Transfer RNA” (ARN de transferencia)
rRNA	“Ribosomal RNA” (ARN ribosomal)
MEM	“Minimum essential media” (medio esencial mínimo)
SFBI	Suero fetal bovino inactivado
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid” (ácido etilendiaminotetraacético)
LIT	“Liver infusion tryptose” (infusión de hígado y triptosa)
TAU	“Triatomine artificial urine” (orina artificial de triatomino)
MET	Microscopía electrónica de transmisión
NTA	“Nanoparticle tracking analysis” (análisis de rastreo de nanopartículas)
DLS	“Dynamic light scattering” (dispersión dinámica de luz)
NADH	“Nicotinamide adenine dinucleotide” (nicotinamida adenina)

	dinucleótido)
NADPH	“Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate” (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)
MFA	Microscopía de fuerza atómica
BSA	“Bovine serum albumin” (albúmica sérica bovina)
SDS	“Sodium docecyl sulfate” (dodecil sulfato sódico)
TEMED	N,N,N', N'-tetrametiletilendiamina
PVDF	Polivinildenodifluoruro
mAb	“Monoclonal antibody” (anticuerpo monoclonal)
<i>C. mellificae</i>	<i>Crithidia mellificae</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAPI	“4,6-diamino-2-phenylindole” (4,6-diamino-2-fenilindol)
NP-40	Nonidet-P40
pRb	Proteína del retinoblastoma
cDNA	“Complementary DNA” (ADN complementario)
pb	Pares de bases
GTP	“Guanosine triphosphate” (guanosín trifosfato)
GDP	“Guanosine diphosphate” (guanosín difosfato)
LPA	“Lysophosphatidic acid” (ácido lisofosfatídico)
HCl	“Hydrochloric acid” (ácido clorhídrico)
IVIS	“ <i>In vivo</i> imaging system” (sistema de imágenes <i>in vivo</i>)
DTT	Ditiotreitol
ANOVA	“Analysis of variance” (análisis de varianza)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina
OPD	“ <i>o</i> -phenylenediamine dihydrochloride” (<i>o</i> -fenilendiamino dihidrocloruro)
TSSA	“Trypomastigote small-surface antigen” (antígeno pequeño de superficie de tripomastigotes)
GEF	“Guanine exchange factors” (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina)”

BAPTA	“1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrapotassium salt” (1,2-bis(2-Aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-sal de ácido tetraacético tetrapotasio)
Arp	“Actin related protein” (proteína relacionada con actina)
CDK1A	“Cyclin dependent kinase inhibitor 1A” (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A)
GAP	“GTPase activating proteins” (proteínas activadoras de las GTPasas)
GID	“Guanine nucleotide dissociation inhibitors” (inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina)
Trh	Treonina
Ser	Serina
SAECs	“Small airway epithelial cells” (células epiteliales humanas de las vías respiratorias pequeñas)
SRE	Sistema reticuloendotelial
Asn	Asparagina

1. Introducción

1. Introducción

1.1. La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo intracelular obligado (Mott et al., 2010) con un ciclo de vida complejo, donde se involucran hospedadores invertebrados y vertebrados mamíferos. La enfermedad en los humanos se caracteriza por presentar una fase aguda y una fase crónica, con variaciones sintomatológicas y patológicas diferentes entre los individuos infectados (Wyllie & Ramirez, 2017).

Más de 100 años después del descubrimiento del parásito por el médico e investigador Carlos Chagas (Chagas, 1909a, 1909b), la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la tripanosomiasis americana como una de las enfermedades infecciosas “olvidadas” más importantes (Lannes Vieira et al., 2010), dado que ha presentado una “globalización” a nivel mundial de los casos diagnosticados, expandiéndose como consecuencia de los procesos migratorios a zonas no endémicas (Hotez et al., 2012).

A continuación, se describen los aspectos más relevantes de la enfermedad de Chagas, así como de su agente causal, el parásito *Trypanosoma cruzi*.

1.1.1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica del continente americano. A nivel mundial, se estima que existen aproximadamente 8 millones de personas infectadas con el parásito (World Health Organization WHO, 2017), donde cada año aparecen unos trescientos mil casos nuevos con unos 15000 fallecimientos por causa directa o indirecta de esta enfermedad (World Health Organization WHO, 2017).

Se considera que los insectos vectores diseminaron *T. cruzi* entre animales salvajes de América Central y América del Sur durante millones de años, antes de que la enfermedad se manifestara en animales domésticos y en los seres humanos, hace más de 9000 años (Aufderheide et al., 2004; Bonney, 2014). La urbanización de las poblaciones rurales, junto con la migración de individuos infectados a áreas de bajo riesgo de transmisión vectorial, ha extendido la enfermedad a las ciudades (Bonney, 2014). Aun así, la enfermedad permanece con una alta endemicidad en zonas rurales pobres (Figura 1.1.1.1) (Bonney, 2014). Desde finales de los años 90, la OMS y OPS han reconocido la enfermedad como una enfermedad olvidada, ya que afecta principalmente a poblaciones de bajos ingresos poco visible para la sociedad, siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en los países endémicos, muchos de ellos en vías de desarrollo, lo que ha hecho que históricamente se tome poco en cuenta dentro de los programas de promoción de la salud de los gobiernos y organizaciones públicas de dichos países endémicos (Bonney, 2014).



Figura 1.1.1.1. Ecotopo doméstico (a), peridoméstico (b) y ambiente donde se desarrolla el contacto humano con el ciclo selvático de transmisión de *T. cruzi* (c) (Salvatella & Schofield, 2003; Náquira, 2014; Chedid et al., 2015).

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica desde el norte de México, América Central y América del Sur. Sin embargo, se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta abarcar un total de 22 países en el continente americano (Neves Santos et al., 2016) (Figura 1.1.1.2.). En Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y

Venezuela, la enfermedad de Chagas se caracteriza por la presencia de ciclos domésticos, peridomésticos y selváticos con zonas de alta prevalencia de infecciones en humanos y la presencia de miocardiopatía y anormalidades digestivas en los casos crónicos de la enfermedad (Coura & Viñas, 2010). No obstante, en estos países desde hace aproximadamente veinte años han existido programas de control vectorial y de transmisión transfusional bien establecidos, con una cobertura del 100% de los bancos de sangre (excepto en el caso de Bolivia) (Coura & Viñas, 2010). En otros países como Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá se presenta el mismo ciclo epidemiológico pero la manifestación clínica de la fase crónica se corresponde con una cardiopatía, sin manifestaciones digestivas diagnosticadas (Coura & Viñas, 2010). En estos países también se cuenta con controles vectoriales y transfusionales establecidos más recientemente (Coura & Viñas, 2010). Finalmente, en Belice, Guyana Francesa, Surinam, México y el sur de los Estados Unidos predomina el ciclo selvático de transmisión pero la información sobre las manifestaciones clínicas son muy limitadas y el control vectorial y transfusional está en una etapa muy incipiente (Coura & Viñas, 2010).

Durante las últimas tres décadas, la enfermedad se ha diagnosticado con más frecuencia en América del Norte (los Estados Unidos y Canadá), y en muchos países europeos (principalmente Bélgica, España, Francia, Italia, el Reino Unido y Suiza, y en menor grado Alemania, Austria, Croacia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Rumanía y Suecia), del pacífico occidental (particularmente Japón y Australia) (Figura 1.1.1.2), debido a las migraciones poblacionales desde América Latina (Schmunis & Yadon, 2010; World Health Organization WHO, 2016).

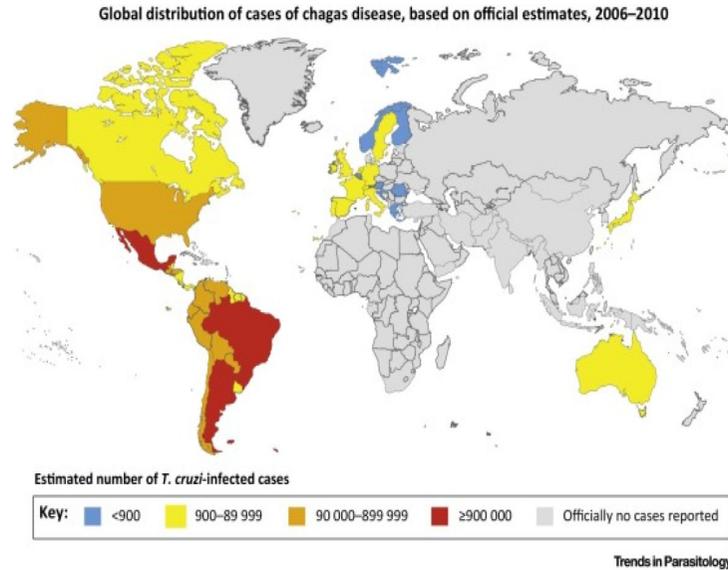


Figura 1.1.1.2. Distribución global de los casos de enfermedad de Chagas entre los años 2006 y 2010 (Perez et al., 2015).

Como se ha comentado, la presencia de la enfermedad fuera de América Latina se debe principalmente a los movimientos poblacionales debido a la migración, aunque se han detectado casos en viajeros que regresan infectados desde los países latinoamericanos y en niños adoptados (World Health Organization WHO, 2017). Con menor frecuencia, las infecciones en estos países se deben—a transfusiones sanguíneas, transmisión vertical (o congénita) y al trasplante de órganos (World Health Organization WHO, 2016). En la Figura 1.1.1.3 se presenta un mapa con las rutas de migración de la población desde América Latina, donde se indica la estimación del número total de personas infectadas en países no endémicos, más de 300000 personas infectadas con *T. cruzi* en Estados Unidos, más de 5500 personas infectadas en Canadá, más de 80000 personas infectadas en Europa y la región pacífico occidental, más de 3000 personas infectadas en Japón y más de 1500 personas infectadas en Australia, si bien dichas cifras no se corresponden con los casos detectados por las autoridades sanitarias de los países no endémicos, receptores de la migración (Coura & Viñas, 2010).

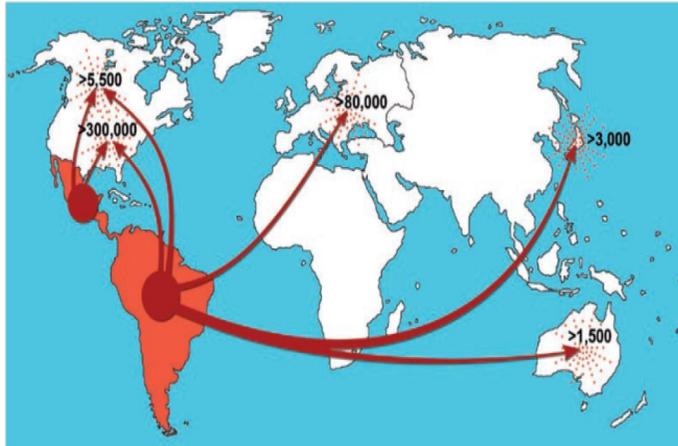


Figura 1.1.1.3. Rutas de migración desde América Latina y estimación del número total de personas infectadas con *T. cruzi* en países no endémicos (Schmunis & Yadon, 2010).

En Europa, se estima que hay más de 100000 personas con la enfermedad de Chagas (Gascon et al., 2010) y que, excepto por parte de España, la mayoría de países del continente no invierten mucho esfuerzo ni recursos en esta enfermedad, siendo considerada como una enfermedad “exótica” (Gascon et al., 2010). La mayoría de casos se presentan en España, Italia, Francia y Alemania; aun así, solamente España, Francia y el Reino Unido han implementado un programa de análisis obligatorio en los donantes de sangre que provienen de zonas endémicas y en Italia se excluyen directamente de la donación aquellas personas provenientes de zonas endémicas (Gascon et al., 2010). La mayoría de migrantes latinoamericanos infectados en Europa provienen de Brasil, Ecuador, Colombia, Argentina, Perú y Bolivia (Gascon et al., 2010).

1.1.2. El agente causal: *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es el protozoo parásito responsable de la enfermedad de Chagas. Este parásito pertenece al orden Kinetoplastida, el cual recibe su nombre debido a la presencia de una estructura submicroscópica, correspondiente a una zona de la mitocondria conocida como kinetoplasto, presente en todas las familias de este orden. Una

descripción de las características generales, así como el ciclo de vida y el proceso de invasión celular de este parásito se detallan a continuación.

1.1.2.1. Características generales

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado, parásito intracelular obligatorio en los hospedadores vertebrados. Su ciclo de vida fue descrito a principios del siglo XX por el médico brasileño Carlos Chagas, el cual, mientras realizaba estudios epidemiológicos con malaria, sospechó que los insectos triatomíneos que infestaban las viviendas de las zonas rurales debían ser capaces de transmitir alguna enfermedad (Walker et al., 2014). Después de realizar la disección de triatomíneos de la familia Reduviidae, encontró unas formas móviles flageladas en el tracto intestinal y determinó que estas formas eran infectantes para los mamíferos al realizar infecciones animales experimentales y observar en su sangre la presencia de flagelados (Walker et al., 2014). Posteriormente, fue capaz de encontrar el mismo parásito en la sangre y tejidos de pacientes infectados (Walker et al., 2014).

La clasificación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente: reino Protista, filo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*. La característica principal de los organismos del orden Kinetoplastida es la presencia de una estructura celular conocida como kinetoplasto; de hecho, la ubicación de dicha estructura es empleada para diferenciar entre las distintas fases del parásito.

1.1.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es un ciclo complejo que se desarrolla en dos tipos de hospedadores, uno invertebrado (insectos de la familia Reduviidae) y uno vertebrado (mamíferos). Durante este ciclo de vida se producen procesos de diferenciación y división del parásito dentro de ambos hospedadores, encontrándose cuatro fases principales: los epimastigotes (formas de multiplicación en el intestino de los insectos), tripomastigotes metacíclicos (formas infectantes que se encuentran en el recto e intestino

posterior de los insectos infectados), los amastigotes (formas de multiplicación intracelular en el hospedador mamífero) y tripomastigotes sanguíneos en el hospedador vertebrado.

El ciclo de vida del parásito se inicia cuando insectos de la familia Reduviidae se alimentan de la sangre de un hospedador vertebrado que contiene las formas de tripomastigote circulantes en sangre (tripomastigotes sanguíneos). Una vez ingeridos por el insecto, la mayoría de las formas van a ser lisadas en el proventrículo (Castro et al., 2007), mientras que los que sobreviven se van a transformar en el intestino anterior en formas esféricas (esferomastigotes) o en epimastigotes (de Souza et al., 2010). Los epimastigotes van a migrar al intestino, donde se van a multiplicar activamente por fisión binaria longitudinal en el intestino medio, y se van a adherir a las membranas perimicrovilares secretadas por las células del intestino posterior (Alves et al., 2007). Esta adhesión, en la que participan proteínas de las membranas y los glicoinositolfosfolipidos (GIPLs) del parásito (Alves et al., 2007), parece ser un proceso importante para la transformación de los epimastigotes en los tripomastigotes metacíclicos (de Souza et al., 2010), proceso al que se conoce como metaciclologénesis, el cual esta mediado por la elevación de los niveles de AMPc (Gonzales Perdomo et al., 1988) y sucede al soltarse los epimastigotes de la superficie intestinal en la región más posterior del intestino y el recto. Los tripomastigotes metacíclicos se liberan con la orina y las heces del insecto (Garcia et al., 2007) y van a ser capaces de infectar, con la salida con las heces del insecto, directamente a cualquier célula nucleada de los hospedadores mamíferos presente en la mucosa ocular o en la piel lesionada cuando el parásito se está alimentando (de Souza et al., 2010). Otros mecanismos de transmisión del parásito incluyen la transfusión sanguínea, transmisión transplacentaria o transmisión congénita, mediante el trasplante de órganos y por vía oral al ingerirse alimentos o bebidas contaminadas con las heces del insecto (Yoshida, 2009; de Souza et al., 2010).

Una vez dentro del hospedador vertebrado, los tripomastigotes van a invadir las células nucleadas en el lugar de la inoculación (fibroblastos, macrófagos y células epiteliales), a través de un complejo mecanismo de reconocimiento, donde están implicados diferentes mecanismos moleculares sobre los que se comentará más adelante. El ciclo del parásito dentro de las células de este hospedador incluye varios pasos como la formación de una vacuola endocítica conocida como vacuola parasitófora, la diferenciación de los tripomastigotes en las formas redondeadas conocidas como amastigotes y el escape de la vacuola parasitófora mediante mecanismos propios del parásito, lo que permite que los amastigotes entren en contacto directo con el citoplasma y se multipliquen mediante fisión binaria longitudinal (de Souza et al., 2010), proceso que se inicia aproximadamente a las 12 horas después de la infección y que puede tardar hasta 72 horas (Tan & Andrews, 2002). Dentro de la célula y completada la división de los amastigotes, se van a transformar en tripomastigotes sanguíneos que tras la ruptura de la célula hospedadora y van a llegar al torrente sanguíneo para invadir nuevas células e iniciar otro ciclo de replicación, además de estar disponibles para ser ingeridos por el insecto vector cuando se alimente de la sangre infectada, continuando así el ciclo de vida (Figura 1.1.2.2).

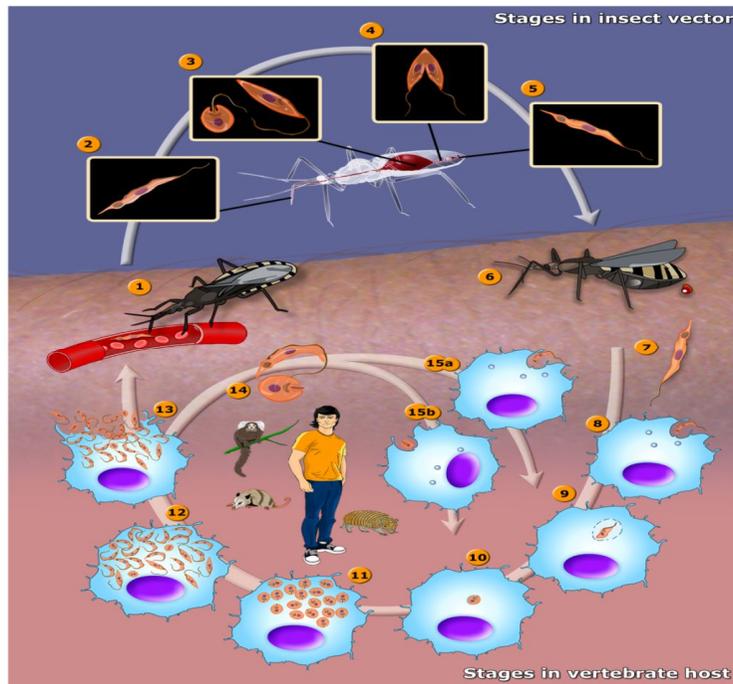


Figura 1.1.2.2. Ciclo de vida de *T. cruzi* (Teixeira et al., 2012). 1) El insecto vector se alimenta de un hospedador vertebrado infectado e ingiere los tripomastigotes (2); 3) los tripomastigotes se transforman en algunos esferomastigotes y epimastigotes, los últimos se replicarán en el intestino medio (4), para luego transformarse en tripomastigotes metacíclicos en la parte posterior del intestino (5). 6) Cuando el insecto se alimenta de la sangre del hospedador vertebrado, pasa los tripomastigotes metacíclicos (7) con las heces al sitio de la picadura y estas formas van a infectar células como los macrófagos (8), donde se van a transformar en amastigotes (9), los cuales van a ser liberados de la vacuola parasitófora (10) y se multiplicarán en el citoplasma celular (11). Posteriormente, estas formas se van a transformar en tripomastigotes (12) para salir de la célula (13), aunque algunas veces los parásitos se liberarán como amastigotes (14). Los tripomastigotes (15a) y amastigotes (15b) van a infectar nuevas células.

En la naturaleza existen más de 100 especies de mamíferos potencialmente reservorios para *T. cruzi*, que abarcan desde marsupiales, murciélagos, roedores, armadillos, conejos, cánidos, félidos y primates (Rodrigues Coura, 2015). Además, más de 140 especies de triatominos, pertenecientes a 19 géneros y 5 tribus, son reconocidos como vectores del

parásito (Galvao et al., 2016). Entre los principales géneros se encuentran *Panstrongylus* sp., *Rhodnius* sp. y *Triatoma* sp.

1.1.2.3. Fases del parásito

Las características de las principales fases del parásito son:

- Tripomastigotes (Figura 1.1.2.3.1): existen dos tipos, los tripomastigotes sanguíneos y los metacíclicos, formas incapaces de multiplicarse. Los tripomastigotes sanguíneos muestran formas alargadas de aproximadamente 12 μm a 20 μm y se observan en la sangre y otros fluidos corporales (como la linfa o el fluido cerebroespinal) (Siqueira Batista et al., 2014). Poseen una membrana ondulante y un flagelo largo que emerge del corpúsculo basal (ubicado cerca del kinetoplasto) y representa aproximadamente un tercio de la longitud del parásito. El kinetoplasto se ubica en la parte posterior del parásito, en posición terminal. Los tripomastigotes metacíclicos son formas alargadas, más delgadas, de aproximadamente 17 μm y poseen un kinetoplasto terminal en la parte posterior. El flagelo es más corto que el de los tripomastigotes sanguíneos y la membrana ondulante es estrecha. Estas son las formas infectantes para el hospedador vertebrado, generadas en la parte posterior del intestino y la ampolla rectal del insecto.

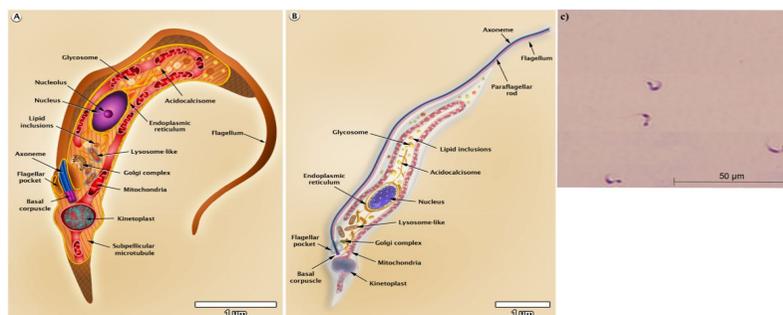


Figura 1.1.2.3.1. Representación esquemática de los tripomastigotes de *T. cruzi*. Modelos en 2D (A) y 3D (B) (Teixeira et al., 2012). C) Tinción de Giemsa de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*.

- Amastigotes (Figura 1.1.2.3.2): son formas esféricas, de 3 μm a 5 μm de diámetro, que se replican por fisión binaria longitudinal cada 12 horas, dentro de las células del hospedador vertebrado. No posee flagelo libre ni membrana ondulante, aunque es posible observar el cuerpo basal y la base del flagelo. Estas formas se transformarán en tripomastigotes sanguíneos aproximadamente 11-13 horas antes de la ruptura de la célula. Si se liberan al torrente sanguíneo, también son capaces de infectar nuevas células.

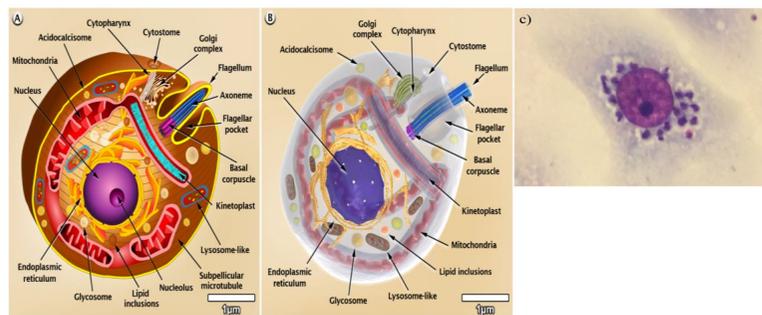


Figura 1.1.2.3.2. Representación esquemática de los amastigotes de *T. cruzi*. Modelos en 2D (A) y 3D (B) (Teixeira et al., 2012). C) Tinción de Giemsa de una célula Vero con amastigotes de *T. cruzi*.

- Epimastigotes (Figura 1.1.2.3.3): son formas alargadas, de 20 μm a 40 μm , que se replican por fisión binaria longitudinal en el intestino del hospedador invertebrado. Presentan una membrana ondulante poco desarrollada que termina en un flagelo libre y el kinetoplasto se ubica en posición anterior al núcleo. Estas formas son capaces de transformarse en tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto, formas infectantes para el hospedador vertebrado.

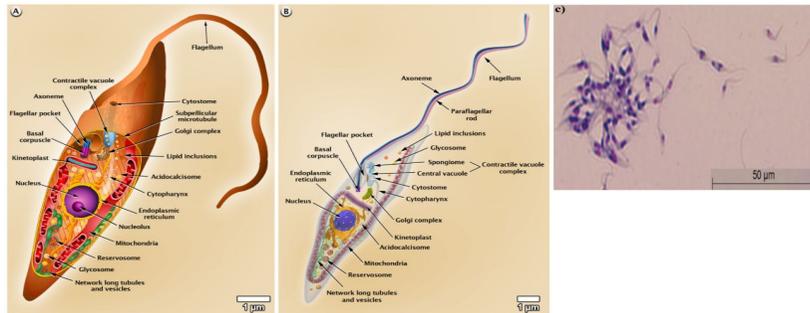


Figura 1.1.2.3.3. Representación esquemática de los epimastigotes de *T. cruzi*. Modelos en 2D (A) y 3D (B) (Teixeira et al., 2012). C) Tinción de Giemsa de epimastigotes de *T. cruzi*.

1.1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Cuando un hospedador vertebrado se infecta con *T. cruzi* inicia la fase aguda, después de un período de incubación de aproximadamente 1-2 semanas (Rassi et al., 2010). Esta fase puede durar entre 8-12 semanas y se caracteriza por la presencia del parásito en la sangre de los individuos infectados, así como la generación de respuesta inmune (Malik et al., 2015). La ubicación de los parásitos en sangre permite evidenciar las formas tripomastigotas mediante observación microscópica directa de la muestra, sin embargo, esta fase es asintomática en el 95% de los casos (Teixeira et al., 2006). En algunas ocasiones se forma un granuloma (chagoma) en el sitio de inoculación de los parásitos (Rassi et al., 2000), el cual consiste en una pápula eritematosa que se convierte en queratósica que luego sana, formando una cicatriz hiperpigmentada (Roberts, 2018). Cuando se inoculan los parásitos en la conjuntiva, se produce un edema periorbital unilateral extensivo conocido como el signo de Romaña (Chagas, 1909b).

La sintomatología presentada durante la fase aguda es variable e incluye fiebre, cefalea, malestar general, dolor muscular y de articulaciones, linfadenopatía generalizada, hepatoesplenomegalia, diarrea y vómitos, edema facial o generalizado, malestares respiratorios y hasta cianosis, síntomas considerados inespecíficos (Teixeira et al., 2006; Roberts, 2018), por lo que debe realizarse un diagnóstico diferencial con enfermedades como la

brucelosis, la toxoplasmosis y la fiebre tifoidea, entre otras (Roberts, 2018). Se estima que durante esta fase menos del 5% de las personas infectadas con sintomatología mueren (Teixeira et al., 1978), debido principalmente a miocarditis o meningoencefalitis, con complicaciones como bronconeumonía (Teixeira et al., 2006). En la mayoría de individuos infectados, esta fase remite espontáneamente (Roberts, 2018).

El 40-70% de los individuos infectados con *T. cruzi* se mantienen asintomáticos durante toda la vida, fase de la enfermedad que se conoce como indeterminada (Coura & Borges Pereira, 2010). Aun cuando los niveles de parasitemia son muy bajos, los pacientes tienen resultados positivos en las pruebas serológicas de diagnóstico e incluso por PCR (Coura & Borges Pereira, 2010).

Como ya se ha indicado, aproximadamente dos terceras partes de las personas infectadas con *T. cruzi* no presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad durante la fase crónica. El tercio restante de la población infectada en esta fase de la enfermedad desarrolla manifestaciones clínicas que afectan el corazón en el 94.5% de los casos, presentando insuficiencia cardíaca y arritmias, principalmente (Prata, 1994). La cardiomiopatía chagásica se considera una condición debilitante que puede llevar a la muerte súbita de los individuos infectados debido a fibrilación ventricular o a eventos tromboembólicos (Rassi et al., 2010) como consecuencia de una inflamación focal con células linfo-mononucleares, lo que a su vez genera una destrucción de las fibras musculares cardíacas y posteriormente, una fibrosis que afecta el miocardio (Machado et al., 2012). Solo el 4.5% de los enfermos crónicos con manifestaciones clínicas, presenta los megasíndromes del esófago (megaesófago) y el colon (megacolon) (Meneghelli et al., 1982), donde las manifestaciones se deben principalmente a la disperistalsis de ambos órganos causada por la afectación del plexo mientérico (Rodrigues Coura, 2007).

Los pacientes sintomáticos en la fase crónica de la enfermedad podrían presentar otro tipo de lesiones que involucran el sistema nervioso periférico, lo cual explicaría la condición fisiológica del corazón y los

megasíndromes descritos (Castro et al., 1994). Se ha comprobado que *T. cruzi* es capaz de invadir células de la glía, incluyendo los astrocitos y células de la microglia, mientras que las neuronas se infectan muy infrecuentemente (Tanowitz et al., 1982).

En mujeres embarazadas, la infección con *T. cruzi* podría producir abortos, partos prematuros y lesiones al feto, aunque la mayoría de recién nacidos no tienen síntomas o pueden ser inespecíficos (Myriam et al., 2005). En el caso de personas infectadas que se encuentran inmunosuprimidas, es posible detectar una alta parasitemia en sangre y el sistema nervioso central, así como miocarditis difusa y meningoencefalitis (Rodrigues Coura, 2007).

1.1.4. Diagnóstico y tratamiento

La observación directa del parásito en muestras de sangre de los hospedadores vertebrados solamente es posible durante la fase aguda de la enfermedad debido a que la parasitemia en esta fase es alta (Malik et al., 2015). Sin embargo, como la fase aguda se caracteriza por la inespecificidad de sus síntomas, es difícil realizar un diagnóstico específico y claro de la enfermedad. Otros métodos empleados consisten en el xenodiagnóstico, técnica basada en hacer ingerir sangre del paciente a triatominos no infectados y 30 días después buscar los parásitos en las heces de los insectos (Apt et al., 2015; Semenovitch et al., 2017). Otras técnicas empleadas son las moleculares como PCR, donde se detecta el DNA del parásito, fundamentalmente del kinetoplasto (Portela Lindoso & Shikanai Yasuda, 2003), el cual a veces es combinado con el xenodiagnóstico, realizándose la PCR con el intestino del insecto usado para ingerir la sangre del paciente (Zulantay et al., 2007).

Dado que, dentro de los primeros 90 días de la infección la parasitemia descende, la mayoría de técnicas de diagnóstico empleadas durante la fase crónica se basan en la demostración indirecta de anticuerpos específicos anti *T. cruzi* en el suero de los pacientes infectados y en las técnicas basadas en la identificación de los ácidos nucleicos del parásito con

sondas específicas (Braga et al., 2000). Las pruebas que se emplean para detectar la presencia de anticuerpos en los sueros de los pacientes específicos incluyen la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta y el ELISA, cuya sensibilidad oscila entre el 96.5% y el 100% y su especificidad varía del 87% al 98.9% (Teixeira et al., 2006). Sin embargo, el problema de estas técnicas radica en que se podrían presentar reacciones cruzadas con otras infecciones por kinetopláستidos o algunos parásitos intracelulares (*Plasmodium* sp., *Toxoplasma gondii*), infecciones bacterianas (tuberculosis, lepra y sífilis) y condiciones autoinmunes como la artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, entre otros (Teixeira et al., 2006). Actualmente, la OMS recomienda el uso de al menos dos técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad (Melo et al., 2015) y de ser posible, realizarlas empleando antígenos procedentes de parásitos de diferentes zonas geográficas del continente americano. No obstante, muchas veces los resultados de las pruebas son poco concluyentes, por lo que el diagnóstico serológico se podría confirmar mediante PCR e incluso RT-qPCR (Ramírez et al., 2015; Melo et al., 2015).

Aunque los hallazgos son poco específicos, los electrocardiogramas podrían proveer una evidencia inicial de afección cardíaca (Malik et al., 2015), donde las anormalidades más comunes son el bloqueo de la rama derecha, el bloqueo fascicular anterior izquierdo y cambios difusos de ST-T (Apt et al., 2005; Zulantay et al., 2005; Rassi et al., 2010). La ecocardiografía puede demostrar también alteraciones funcionales y estructurales en las etapas iniciales de la afección cardíaca, incluyendo una disfunción diastólica (Malik et al., 2015).

Con respecto al tratamiento, los únicos dos fármacos antiparasitarios disponibles y desarrollados desde hace tiempo para combatir la enfermedad son el benznidazol y el nifurtimox, efectivas sólo durante la fase aguda de la enfermedad y en niños de hasta 12 años que se encuentren en la fase crónica temprana de la infección (de Andrade et al., 1996). En adultos, se ha comprobado una cura parasitológica en el 60-80% de las personas infectadas,

si bien no modifican las alteraciones patológicas inducidas por la enfermedad (Malik et al., 2015).

El tratamiento para la enfermedad de Chagas se recomienda en todos los casos que se encuentren en fase aguda, reactivada o en infecciones congénitas y en menores de 18 años con enfermedad crónica (Rassi et al., 2010). En España, se emplea el benznidazol para todos los enfermos chagásicos diagnosticados, independientemente de la fase en que se encuentre la enfermedad. El problema de estos fármacos son los efectos secundarios adversos que pueden generar (Malik et al., 2015), la baja tasa de curación durante la fase crónica (Sales et al., 2017) y que es un tratamiento caro. Se calcula que el costo anual del tratamiento por paciente es de aproximadamente \$1028 (Castillo Riquelme et al., 2008), por lo que muchos pacientes no tienen acceso al mismo (Hotez et al., 2012). Los gastos derivados del tratamiento médico a nivel mundial más la pérdida de horas trabajadas fueron evaluados y publicados en Lancet por Lee y colaboradores (2013), mostrando unas pérdidas de 9000 millones de US\$, datos que están por encima de enfermedades muy reconocidas por la sanidad de los países del primer mundo como las infecciones por rotavirus (aproximadamente 2000 millones US\$) o de cáncer cervical (7000 millones US\$).

Otros fármacos que ha sido probados en modelos murinos y parece que presentan actividad antitripanocida son el posaconazol (Malik et al., 2015), el itaconazol y la amiodarona/dronedarona, los cuales parecen tener algún efecto contra *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* (Sales et al., 2017).

1.2. El proceso de invasión celular de *T. cruzi*

T. cruzi es capaz de infectar tanto células fagocíticas como no fagocíticas. El proceso de invasión celular de *T. cruzi* es considerado un mecanismo complejo y dinámico de múltiples pasos (Walker et al., 2014; Borges et al., 2016), que varía dependiendo de factores tales como la cepa del parásito y el tipo de célula hospedadora, entre otros (de Souza et al., 2010).

De forma general, se puede considerar que este proceso tiene tres etapas: adhesión y reconocimiento, señalización e invasión (de Souza et al., 2010).

El proceso de adhesión implica la interacción de moléculas tanto del parásito como de la célula hospedadora, dependiendo de los receptores presentes en las membrana (de Souza et al., 2010). En el caso de *T. cruzi*, una serie de familias de proteínas glicosiladas presentes en las membranas como las mucinas, *trans*-sialidasas y “mucine-associated surface proteins” (MASPs) ancladas en las membranas (la mayoría mediante anclajes GPI), juegan un papel importante como ligandos de receptores celulares en los procesos de adhesión (Romano et al., 2012).

Las mucinas son las principales glicoproteínas en la superficie del parásito, las cuales generan una matriz densa de oligosacáridos que lo protegen (Valenzuela et al., 2013). Estas mucinas juegan un papel importante en los procesos de adhesión, en un proceso comparable con la unión de lectinas a los azúcares y además participan en los mecanismos de escape de la respuesta inmune, así como en la inmunomodulación (Buscaglia et al., 2006; Romano et al., 2012). Las *trans*-sialidasas y moléculas “*trans*-sialidasa like” son proteínas de 60 a más de 220 KDa (Colli, 1993) que transfieren residuos de ácido siálico de los glicoconjugados, especialmente a aquellos con azúcar terminal de galactosa, de la célula hospedadora del parásito y después del corte del anclaje de GPI, se liberan al torrente sanguíneo para regular la infección temprana (Villalta et al., 2001). Además, el proceso de sialilación en *T. cruzi* le confiere protección frente al complemento humano, lo cual se considera un requisito esencial durante la infección (Tomlinson et al., 1994).

En el caso de la invasión a células no fagocíticas, ésta se inicia con el contacto del parásito con la célula por medio de proteínas de la superficie de su membrana que actúan como ligandos (Walker et al., 2014). La superfamilia de las gp85/*trans*-sialidasas aparece involucrada en este proceso, destacando por otra parte las glicoproteínas gp82, gp35/50, gp90, gp85/TS y gp30 (variante de la gp82 en aquellas cepas deficientes de gp82). Cada una de estas

proteínas aparecen expresadas en diferente grado dependiendo de la cepa del parásito (Walker et al., 2014).

Al inicio de la infección, una serie de proteínas específicas de los tripomastigotes metacíclicos como la gp82 y la gp30 se unen al receptor celular y mediante un proceso de receptor-ligando, inducen la movilización de calcio intracelular tanto en la célula como en la forma infectiva del parásito (Burleigh & Andrews, 1998; Yoshida & Cortez, 2008). En el parásito, esto desencadena la activación de la fosfolipasa C (PLC), con la generación de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), el cual va a activar a la protein quinasa C (PKC) que va a provocar la salida de iones Ca^{2+} del retículo endoplásmico y de la mitocondria celular. Por otra parte, en la célula se activa también la PLC que va a provocar la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares mediante la señalización por IP3 (Osuna et al., 1990; Walker et al., 2014).

Con el avance de la infección y en el caso de los tripomastigotes sanguíneos, la invasión sucede de forma similar, pero con interacciones diferentes (Walker et al., 2014) ya que, por ejemplo, la activación de la PLC de la célula ocurre a través de la estimulación del receptor de la bradikinina celular mediante la participación del enzima del parásito cruzipaina (gp57/51) (Cazzulo et al., 1990), al romper la enzima al kininógeno y generar moléculas de kinina que son reconocidas por los receptores celulares de bradikinina B2, lo que conducirá a la producción de IP3 y la consecuente liberación de Ca^{2+} . Además de los cambios en la concentración intracelular de calcio, la concentración de AMPc también juega un papel importante en el proceso de invasión, ya que se cree que es responsable de la capacidad de invasión residual de los parásitos cuando se bloquea la movilización de Ca^{2+} (Caler et al., 2000).

Como ya se ha mencionado, en las formas de tripomastigotes sanguíneos las *trans*-sialidasas contribuyen en el proceso de invasión al transferir residuos de ácido siálico de la membrana de la célula hospedora a varias proteínas tipo mucinas (mucinas y MASPs) del parásito, lo que induce

la activación de diferentes vías de señalización dentro de la célula (Walker et al., 2014). Los parásitos también se aprovechan de componentes secretados como la familia de proteínas ricas en “serina, alanina y prolina” (SAP), las cuales poseen un dominio central para la invasión (Baida et al., 2006). La fosfolipasa A (PLA1) parece estar implicada en los eventos iniciales de la interacción parásito-hospedador, activando la PKC de las células y con esto modula la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Watanabe Costa et al., 2016). Por otra parte, la proteína P21 es capaz de inducir la movilización de Ca^{2+} de los acidocalcisomas del parásito, participar en la fosforilación de algunos polipéptidos (Fernandes et al., 2006) y activar a Rac1, lo que lleva a la formación de “ruffles” de actina (Fernandes & Mortara, 2004) que van a permitir la internalización del parásito, favoreciendo su fagocitosis (Santos et al., 2015).

La unión de los parásitos a proteínas de la matriz extracelular (como fibronectina, laminina y colágeno) y proteoglicanos (heparina y heparán sulfato) también es importante en el proceso de invasión (Santana et al., 1997; Moody et al., 2000; Nde et al., 2012), habiéndose descrito receptores para la fibronectina, proteína rica en ácido sialico, en la superficie del parásito (Ouassii et al., 1986). Las formas de tripomastigotes derivados de cultivo expresan las proteínas Tc-85, gp83 y Tc-1, así como proteasas como la cruzipaina (gp57/51), oligopeptidasa B y POP Tc80, que ayudan al parásito a atravesar la matriz extracelular (Burleigh & Andrews, 1998; Yoshida & Cortez, 2008).

Brevemente, la adhesión del parásito a las células está mediada por Tc-85 (Alves et al., 1986), gp83 (Villalta et al., 2001) y Tc-1 (Augustine et al., 2006), interacciones que inducen la activación de la oligopeptidasa B (Burleigh & Andrews, 1995), la cual genera una molécula señalizadora de calcio. Alternativa ó simultáneamente, el parásito secreta cruzipaina, enzima que actúa sobre el kininógeno para generar bradikinina, la cual termina induciendo otra señal de calcio al interactuar con su receptor, como ya ha sido mencionado (Todorov et al., 2003). El aumento de calcio citosólico

mediante las diferentes interacciones de las proteínas va a promover dos eventos que facilitan la invasión de los tripomastigotes: la disrupción del citoesqueleto de actina dependiente de calcio y el reclutamiento de los lisosomas para la formación de la vacuola parasitófora y posterior invasión celular (Valenzuela et al., 2013). Durante el proceso de invasión se libera gp83, que regula la expresión de la laminina γ -I en la célula hospedadora (Nde et al., 2006), con lo que la proteína galectina-3 procedente de la célula estimula la adhesión del parásito a la laminina (Moody et al., 2000). La superfamilia de gp85/*trans*-sialidasas consiste en una serie de glicosiltransferasas ancladas a la membrana del parásito por GPI y su función principal consiste en la transferencia de residuos de ácido siálico desde los glicoconjugados del hospedador mamífero a los residuos β -Galp terminales en las mucinas que cubren la superficie celular del parásito, generando unidades de β -galactopiranososa ($\alpha 2 \rightarrow 3$) sialiladas de los parásitos, permitiendo así la unión a la fibronectina/laminina, glicoproteínas ricas en ácido siálico terminal que abren el paso para que enzimas como la POP Tc80 hidrolicen el colágeno tipo I y IV (Santana et al., 1997; Grellier et al., 2001). Otra proteína de 60 KDa, conocida como penetrina, es capaz de unirse selectivamente a la heparina, heparán sulfato y colágeno y participar en la adhesión y penetración en los fibroblastos (Ortega et al., 1991). Al final, todas estas interacciones entre proteínas van a contribuir a la adhesión y posterior entrada del parásito a la célula y contribuir con la enfermedad.

En el caso de las infecciones por la vía oral, las mismas se producen generalmente por el consumo de zumos de frutas contaminados con triatomíneos infectados o con la orina de zangüeyas, donde se encuentran presentes las formas tripomastigotes en los marsupiales infectados que beben de dichos zumos, lo que lleva a dichos tripomastigotes metacíclicos al estómago y duodeno y son capaces de invadir el revestimiento de la mucosa gástrica (Walker et al., 2014). En este proceso, la proteína gp82 parece jugar un papel fundamental y se produce la degradación proteolítica de la gp90 (proteína con funciones “anti-invasivas”), lo que facilita la infección por parte

del parásito (Neira et al., 2003; Yoshida, 2009). Las cepas que no expresan gp82 emplean gp30, la cual también induce una señalización mediada por Ca^{2+} (Walker et al., 2014). Moléculas tipo mucina gp35/50 son resistentes a la digestión por las proteasas, fundamentalmente a la pepsina, por lo que protegen a los tripomastigotes metacíclicos de su destrucción cuando infectan por esta vía (Yoshida, 2009).

Con respecto a las moléculas presentes en la superficie celular implicadas en el proceso de adhesión e invasión, cabe destacar que dependen del tipo celular (de Souza et al., 2010). Un tipo de receptores presente en las células de mamíferos consiste en moléculas tipo lectinas, proteínas que reconocen los azúcares de diferentes patógenos. En el caso de *T. cruzi*, la galectina-3, una lectina implicada en la respuesta inmune que une residuos de β -galactosil, media la unión y entrada del parásito en las células dendríticas (da Silva et al., 2009) y en las células del músculo liso (Kleshchenko et al., 2004). Los residuos de carbohidratos presentes en la membrana plasmática de las células pueden funcionar como receptores, tal como las lectinas WGA, RCA I y ConA (Barbosa et al., 1992). De hecho, los residuos galactosil, manosil y sialil de la membrana de la célula hospedadora se internalizan en el citoplasma celular unidos al parásito (Barbosa et al., 1992).

Las integrinas, receptores que median la unión entre dos células o entre una célula y la matriz extracelular, también participan en el proceso de invasión y, más allá de funcionar como unnexo celular de la laminina y la fibronectina, funcionan como receptores que pueden activar las vías de señalización mediadas por la PI3K (de Souza et al., 2010). Tc85 es capaz de unirse a la CK 18, una proteína de citoesqueleto que funciona como receptor para el parásito (Favoreto et al., 1998).

Otras moléculas de la superficie celular implicadas son el receptor TGF- β que facilita la entrada del parásito en las células epiteliales (Hall & Pereira, 2000), así como los receptores de bradikinina: el receptor de bradikinina 1 expresado en tejidos con algún daño originado por el parásito (Scharfstein et al., 2000) y el receptor de bradikinina 2 expresado

constitutivamente en las células cardíacas, implicados en la movilización transitoria de calcio, como ya se ha mencionado. En células neuronales participan los receptores TrkA y TrkC, involucrados en la invasión del parásito a través de la unión con las *trans*-sialidasas (Weinkauff & Pereiraperrin, 2009). Por último, el GPI unido a las glicoproteínas tipo mucinas y los GIPLs son reconocidos por los receptores TLR2/CD14 de las células (Campos et al., 2001), los cuales activan el factor nuclear NF κ b y la vía dependiente del factor regulador de interferón desencadenando una respuesta de tipo Th1 (Tarleton, 2007). Los receptores Toll-like 2 igualmente participan al inducir la fagocitosis del parásito tras estimular la activación de Rab5 (Maganto Garcia et al., 2008). La Figura 1.2. resume las moléculas implicadas en el proceso de interacción parásito-célula (de Souza et al., 2010).

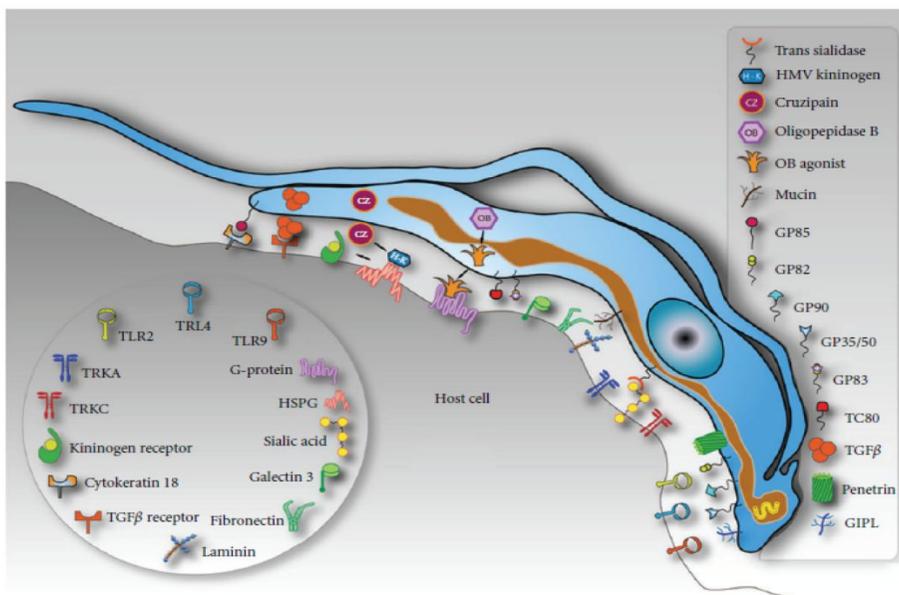


Figura 1.2. Moléculas implicadas en el proceso de interacción parásito-célula (de Souza et al., 2010).

T. cruzi se considera un patógeno bien evolucionado a la vida parasitaria intracelular y capaz de infectar múltiples tipos celulares mediante sus diferentes vías de entrada (Walker et al., 2014). Una de las vías depende

de los lisosomas, donde se reclutan estos orgánulos en el sitio de unión del parásito a la célula. Este mecanismo es Ca^{2+} -dependiente, mediado por los microtúbulos, la kinesina (Rodríguez et al., 1999) y la actina (Mortara et al., 2008) y tiene lugar la exocitosis de los orgánulos al fusionarse con la membrana celular. En ese momento, el parásito induce la liberación de esfingomielinasa para generar ceramida a partir de la esfingomielina de la membrana. Esta producción de ceramida en la parte externa de la membrana va a deformar (Romano et al., 2012) e inducir la endocitosis de la membrana, con el fin de intentar repararla (Walker et al., 2014). El intento de contracción de la membrana es el proceso del que se aprovecha el parásito para ser internalizado en los endosomas. Por el contrario, en la vía independiente de los lisosomas, los parásitos se ubican en una especie de vacuolas derivadas de la membrana celular que contienen fosfoinosítidos, que eventualmente se fusionarán con los lisosomas en un proceso posterior al proceso de infección (Woolsey & Burleigh, 2004). De hecho, mediante esta vía, los parásitos entran a través de invaginaciones de la membrana que acumulan PIP3 (de Souza et al., 2010). Un mecanismo adicional sugiere que los parásitos emplean la vía autofagocítica bajo condiciones de carencia de nutrientes, donde son capaces de invadir y alojarse en vacuolas autofagocíticas que eventualmente se fusionarán con los lisosomas para crear un compartimiento ácido autofagolisosomal (Walker et al., 2014), rico en nutrientes para que el parásito sobreviva y se diferencie a amastigotes debido a la presencia de las poliaminas (Barclay et al., 2011). Este último modelo se considera una versión modificada de la vía independiente de los lisosomas especializada para condiciones de estrés nutricional autofagolisosomal (Walker et al., 2014), lo que le da cierta ventaja al parásito ya que, bajo estas condiciones celulares hay una mayor cantidad de vesículas ácidas, en comparación con la disponibilidad de los lisosomas cuando las células se mantienen en medios de cultivo ricos en nutrientes (Yu et al., 2010).

Experimentos realizados con marcadores específicos para evaluar las diferentes vías de entrada del parásito revelaron que aproximadamente 20-

30% de los parásitos ingresan por la vía dependiente de los lisosomas, mientras que 50% están dentro de invaginaciones de la membrana celular (Woolsey et al., 2003) y el otro 20-30% se rodea de vacuolas que presentan el marcador de endosomal temprano EEA1 (Woolsey et al., 2003). Aunque penetren empleando vías diferentes, todos los parásitos necesitarán fusionarse en algún momento con los lisosomas de la célula hospedadora, con el fin de progresar y escapar de la vacuola parasitófora (Woolsey & Burleigh, 2004).

La infección de células fagocíticas como los macrófagos ocurre especialmente al inicio de la infección, aunque los amastigotes liberados de las células infectadas también son capaces de infectar estas células (Ley et al., 1988; Walker et al., 2014). Esta entrada de los parásitos puede darse por un proceso fagocítico dependiente de actina o por invasión activa, similar a lo que ocurre en las células no fagocíticas (Mortara, 1991; Procópio et al., 1999; Walker et al., 2014), lo que requiere de la activación de la PI3K, enzima reguladora del proceso de fagocitosis (Woolsey & Burleigh, 2004). En este proceso, el mantener la integridad de los “lipid rafts” de la membrana es fundamental para que la infección tenga éxito, ya que si se presenta una disrupción de la membrana, posiblemente ocurre una desagregación de proteínas importantes en las vías de señalización que inician el proceso de invasión celular (Walker et al., 2014).

1.2.1. Formación de la vacuola parasitófora y “escape” del parásito al citoplasma celular

Posterior al proceso de invasión del parásito, se produce la formación de la vacuola parasitófora donde se va a alojar en los primeros estadios de la infección, la cual va a contener enzimas, receptores Fc (en el caso de que los tripomastigotes fueran opsonizados por anticuerpos anti-*T. cruzi*) (Hall et al., 1991), glicoproteínas de la membrana lisosomal, β 1 integrinas, receptores del complemento (CR3) y glicoconjugados, así como residuos galactosil procedentes de la degradación de los grupos gliosilados de las proteínas (Barbosa et al., 1992). En el caso de las células no fagocíticas, los lisosomas

se movilizarán al sitio de unión del parásito con la célula, por lo que contribuyen junto con la membrana en la formación de la vacuola (de Souza, 2010). La presencia de las proteínas Rab5 y Rab7 en las vacuolas parasitóforas indica que dichas vacuolas se fusionan con los endosomas, donde se ha comprobado la presencia de la proteína autofágica LC3 (Romano et al., 2009), así como los microdominios GM1, flotilina, caveolina (Barrias et al., 2007; Fernandes et al., 2007) y dinamina (Ouaisi et al., 1986), enzima responsable directa la fisión de la vacuola (Santos Barrias et al., 2013). Por último, en células fagocíticas se ha comprobado que los tripomastigotes emplean la membrana celular para la formación de la vacuola parasitófora, en un proceso facilitado por la despolimerización de los filamentos de actina (Woolsey et al., 2003).

La formación de la vacuola parasitófora no va a depender del mecanismo empleado por el parásito para acceder al citoplasma celular. El parásito se va a localizar dentro de la vacuola parasitófora (de Souza et al., 2010) y allí, los tripomastigotes liberarán *trans*-sialidasas capaces de eliminar los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas de la membrana de la vacuola, haciéndola sensible a la acción de la proteína Tc-Tox, una toxina formadora de poros (Ley et al., 1990) que se expresa y activa gracias al bajo pH de los lisosomas. Esto facilitará la salida del parásito al citoplasma celular, paso crítico en el desarrollo de *T. cruzi* (Romano et al., 2012). La formación de esos pequeños poros, junto con la acción de las enzimas secretadas (como las *trans*-sialidasas) llevará a la fragmentación de la membrana de la vacuola parasitófora (de Souza et al., 2010), lo que permite el acceso del parásito al citoplasma celular para iniciar la transformación y división de los amastigotes (Woolsey & Burleigh, 2004; Andrade & Andrews, 2005). Sin embargo, los tripomastigotes pueden iniciar el proceso de diferenciación a amastigotes aun cuando están dentro de la vacuola parasitófora y durante ese proceso de fragmentación de la membrana (de Souza et al., 2010).

La Figura 1.2.1 resume las vías de entrada de *T. cruzi* a la célula hospedadora y el escape del parásito hacia el citoplasma celular.

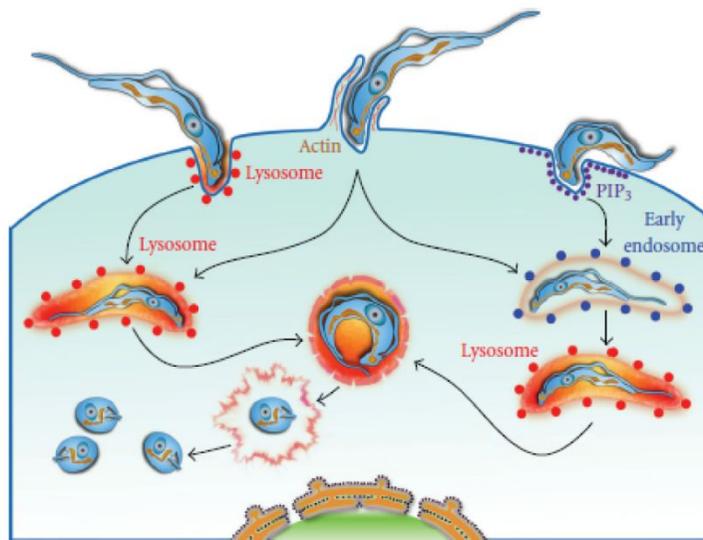


Figura 1.2.1. Modelo de invasión de *T. cruzi* (de Souza et al., 2010). Se ilustran tres diferentes mecanismos que el parásito emplea para entrar a una célula: la vía dependiente de lisosomas, la vía dependiente de actina (penetran mediante una expansión de la membrana plasmática que culmina con el ensamblaje de la vacuola parasitófora) y la vía independiente de lisosomas (entrada mediante invaginaciones de la membrana que acumulan PIP3). Luego los parásitos internalizados se ubicarán dentro de vacuolas formadas por la membrana plasmática, las cuales van a madurar y adquirir marcadores de endosomas tempranos (Rab5 y EEA1) y posteriormente, marcadores de lisosomas. Los tripomastigotes pueden transformarse en amastigotes con la lisis simultánea de la membrana de la vacuola parasitófora. En el citoplasma, las formas amastigotas empezarán su división.

Durante una infección *in vivo*, los tripomastigotes sanguíneos también podrían transformarse en amastigotes extracelulares y la ruptura de las células infectadas puede liberar amastigotes intracelulares, formas que contribuyen con la progresión de la enfermedad al infectar las células mediante un proceso dependiente de actina (Ley et al., 1988; Fernandes et al., 2006). Los amastigotes extracelulares son capaces de infectar tanto células fagocíticas como no fagocíticas de forma activa, al reclutar la actina de la célula al sitio de unión (Fernandes et al., 2006, 2013). Sin embargo, las moléculas de superficie implicadas en los procesos de unión e internalización no se conocen

con exactitud (de Souza et al., 2010). Se cree que la proteína P21 de los amastigotes extracelulares está involucrada en el proceso de invasión de estas formas (da Silva et al., 2009). Cuando las células se infectan con los amastigotes, estos también emplean *trans*-sialidasas y TcTox para romper la membrana de la vacuola parasitófora, proceso que ocurre más rápido que en el caso de los tripomastigotes (de Souza et al., 2010).

1.3. Vesículas extracelulares o exovesículas

La comunicación intercelular es un aspecto fundamental en los organismos y puede realizarse mediante el contacto directo célula-célula o mediante la transferencia de moléculas secretadas. Hasta hace poco más de tres décadas se describió un tercer mecanismo de comunicación intercelular que involucra la liberación de vesículas extracelulares (Raposo & Stoorvogel, 2013) o exovesículas. Tanto las células procarióticas como las eucarióticas son capaces de liberar estas vesículas, las cuales son partículas esféricas rodeadas de una bicapa de fosfolípidos (van der Pol et al., 2012) que cada vez adquieren más importancia debido a las funciones especializadas que realizan, haciéndose evidente en la literatura el creciente interés en sus posibles aplicaciones clínicas (van der Pol et al., 2012; Willms et al., 2018; Jaiswal & Sedger, 2019).

El descubrimiento de las vesículas derivadas de células se remonta a los años 40, con estudios que evidenciaron la importancia biológica de la proteína tromboplástica de la sangre (Chargaff & West, 1946). En aquel momento, los tiempos de coagulación se determinaban tras la centrifugación a diferentes velocidades y se observó que la centrifugación a alta velocidad extendía significativamente el tiempo de coagulación del sobrenadante (van der Pol *et al.*, 2012). Además, cuando se adicionaba al botón de la centrifugación junto con el factor de coagulación al plasma, los tiempos de coagulación se acortaban, lo que hizo sospechar que el plasma libre de células contenía un factor subcelular capaz de promover la coagulación de la sangre (Chargaff & West, 1946). No fue hasta el año 1967 cuando se identificó ese

“factor subcelular” mediante microscopía electrónica y se observó que consistía en pequeñas vesículas originadas a partir de las plaquetas, con un diámetro comprendido entre los 20 a 50 nm y una densidad de 1.020 a 1.025 g/mL a las que denominaron como “polvo plaquetario” (Wolf, 1967).

En el año 1975 se comprobó que el suero fetal bovino también contenía numerosas microvesículas de 30 a 60 nm (Dalton, 1975), mientras tanto, en un estudio en paralelo, se introdujo el término “exosoma” a las vesículas aisladas a partir del medio condicionado de reticulocitos de oveja, las cuales se caracterizaban por tener aspectos en común con la membrana plasmática, como la presencia del receptor de transferrina, lo que llevó a concluir que la externalización de las vesículas podía ser un mecanismo para segregarse y exportar proteínas específicas de la membrana (Johnstone et al., 1987). Tiempo después, se concluyó que los exosomas podrían ser parte esencial de un mecanismo específico y sofisticado que permitiría la eliminación de proteínas transmembrana (van der Pol et al., 2012).

El término exosoma fue empleado inicialmente para vesículas de 40 a 1000 nm, secretadas por una gran variedad de células (Trams et al., 1981) cuando aún no se conocía el origen subcelular de las mismas. Con el tiempo y las investigaciones subsecuentes, se produjo un cambio en la nomenclatura y aunque aún no existe un consenso, las VEs se clasifican en tres grupos diferentes, dependiendo de su tamaño, biogénesis y composición. Estos tres grupos consisten en cuerpos apoptóticos, ectosomas o micropartículas, microvesículas y exosomas.

1.3.1. Clasificación de las VEs

La clasificación de las VEs se basa en las características que posee cada grupo con respecto a su tamaño, densidad, biogénesis y composición, como ha sido mencionado. Dentro de las mismas se encuentran los cuerpos apoptóticos, los ectosomas (micropartículas o microvesículas) y los exosomas (Figura 1.3.1), cuyas características se resumen a continuación.

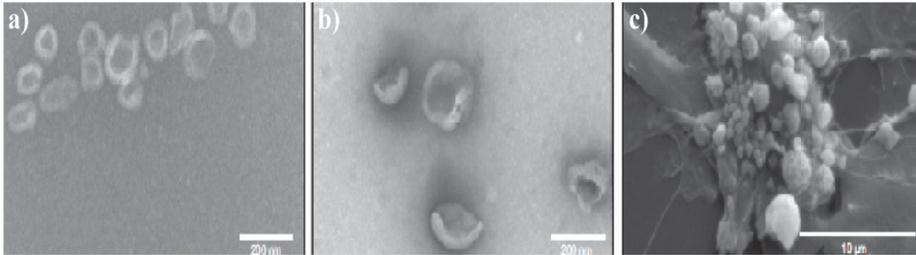


Figura 1.3.1. Tipos de vesículas extracelulares. Fotografías mediante microscopía electrónica de exosomas de plasma (a), ectosomas de orina (b) y cuerpos apoptóticos de una célula endotelial. Tomado de van der Pol et al., 2012.

1.3.1.1. Los cuerpos apoptóticos

Los cuerpos apoptóticos son vesículas liberadas cuando las células están en apoptosis. La principal diferencia con las demás vesículas descritas es su tamaño, ya que su diámetro varía entre 1 y 5 μm (Kerr et al., 1972; Théry et al., 2001), aunque pueden encontrarse de tamaños menores. Su densidad varía entre 1.16 a 1.28 g/mL , densidad que coincide en algunos casos con la de los exosomas, lo que obliga a tener que separarlos con otros métodos diferentes a la centrifugación en gradiente de densidad. Con respecto a la morfología, ésta es mucho más heterogénea que la de otras vesículas al visualizarlas mediante microscopía electrónica de transmisión. Su composición es variable y se ha descrito que las que se originan de la membrana plasmática contienen DNA e histonas, mientras que las que se originan del retículo endoplásmico no contienen DNA y obviamente no poseen histonas pero exponen glicopéptidos inmaduros (Bilyy et al., 2012).

La secreción de los cuerpos apoptóticos se presenta mediante gemación de la membrana y su liberación de forma inapropiada ha sido considerada una de las principales causas de las enfermedades autoinmunes generalizadas (van der Pol et al., 2012).

1.3.1.2. Los ectosomas, micropartículas o microvesículas

Al igual que los cuerpos apoptóticos, estas vesículas son partículas muy heterogéneas en forma y se conocen como partículas de membrana ya

que se secretan por gemación de la misma. En general, su tamaño varía entre 100 nm a 1 μm (Raposo & Stoorvogel, 2013; Marcilla et al., 2014), solapándose con el tamaño de algunos exosomas.

Con respecto a su composición (Figura 1.3.1.2), la misma varía dependiendo del tipo de célula que los origine y a diferencia de los exosomas, es poco conocida (Kalra et al., 2016). Se ha descrito la presencia de glicoproteínas como GPIb, GPIIb-IIIa y P-selectina (Heijnen et al., 1999; del Conde et al., 2005; Mezouar et al., 2015) integrinas (Pluskota et al., 2008) y metaloproteasas (MMPs) (Gasser et al., 2003; Martínez de Lizarrondo et al., 2012); de hecho, se sugiere que MMP2 podría ser considerada un marcador de este tipo de vesículas (Muralidharan Chari et al., 2009; 2010). Una característica importante es la ausencia de las tetraspaninas CD133 y CD63, lo cual las diferencia de los exosomas (van der Pol et al., 2012). Por último, las micropartículas contienen diferente proporción en la composición de fosfolípidos y lípidos bioactivos, dependiendo del estímulo o del origen celular, además de RNAs (mRNA y miRNA) derivados del citoplasma (Fox et al., 1990; Deolindo et al., 2013).

La biogénesis de los ectosomas es diferente a la de los exosomas, ya que no se originan por la vía endocítica sino que se forman mediante la gemación de la membrana, mecanismo que depende de la concentración intracelular de Ca^{2+} . De hecho, la formación de las microvesículas es una propiedad innata de la mayoría de tipos celulares y ocurre en respuesta a la activación de diferentes procesos celulares (Hugel et al., 2005; Nolan et al., 2008). Los estímulos externos, activadores celulares o algún tipo de daño celular incrementa la entrada de iones Ca^{2+} al citoplasma o su liberación desde los depósitos intracelulares, lo que provoca la despolimerización del citoesqueleto de actina mediado por la calpaína que activa la enzima escramblasa, encargada de transportar los fosfolípidos cargados negativamente desde la cara interna hasta la cara externa de la membrana (Angelot et al., 2009), exponiendo a la fosfatidilserina, mediante un mecanismo mediado por las flopasas. Estas enzimas son importantes ya que

inducen la formación de la curvatura de la membrana, con la consecuente formación de vesículas (Kalra et al., 2016), mientras que la entrada de iones Ca^{2+} atenúa la actividad de las flipasas.

La traslocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana genera un desbalance estructural en la bicapa lipídica, haciendo que se abulte la cara de la membrana y, si la actividad translocasa es lo suficientemente elevada, la curvatura resultante puede ser suficiente para que ocurra la fisión de la vesícula, de forma análoga a lo que harían las flipasas pero en dirección opuesta (Kalra et al., 2016). Sin embargo, en el proceso de formación de estas vesículas también ha sido comprobada la participación de proteínas que promueven la contracción del citoesqueleto, en particular el factor ARF6 (Muralidharan Chari et al., 2009), responsable de iniciar una cascada de señalización que activa a la PLD, enzima que hidroliza a la fosfatidilcolina y produce ácido fosfatídico unido a la membrana, el cual recluta a la kinasa ERK y otras moléculas que participan en la formación de la curvatura de la membrana (Kalra et al., 2016). La kinasa ERK es la encargada de fosforilar a la kinasa MLCK y ésta, a su vez, fosforilará a la cadena ligera de miosina, dando como resultado la contracción de actomiosina, con el subsecuente desprendimiento del ectosoma (Kalra et al., 2016).

Existen evidencias de que pueden ocurrir cambios en la organización de la membrana plasmática independientes de la translocasas y que la biogénesis de los ectosomas se podría presentar mientras se mantiene la asimetría lipídica, siendo la liberación de estas vesículas el resultado de contracciones llevadas a cabo por el citoesqueleto (Kalra et al., 2016) y componentes del complejo ESCRT, implicados también en la liberación de los exosomas. En este caso, se ha comprobado que la subunidad TSG101 del complejo ESCRT-I interacciona con otras proteínas y que, junto con Alix, podría estar implicado en las etapas tardías de formación de la vesícula y su liberación (Kalra et al., 2016). Otros complejos como el ESCRT-III y la ATPasa Vsp4 son reclutados y ensamblados en el proceso para liberar el

ectosoma y reciclar la maquinaria encargada de formar las vesículas (Kalra et al., 2016).

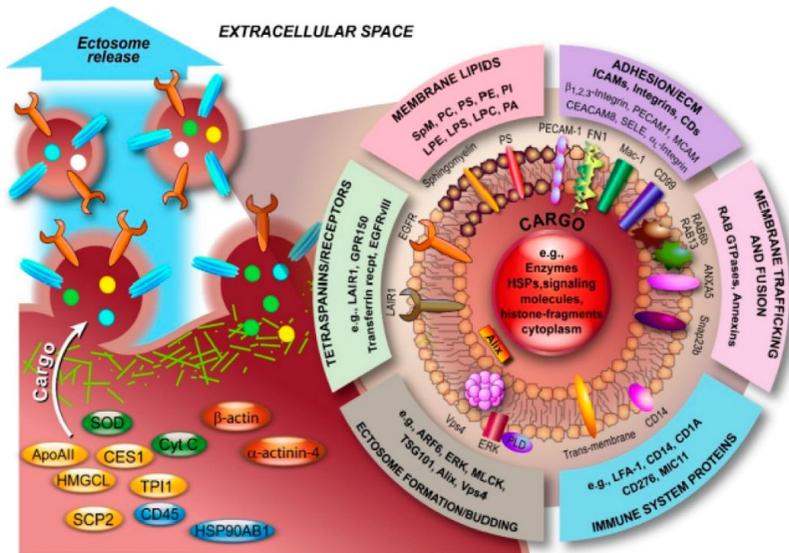


Figura 1.3.1.2. Composición y biogénesis de los ectosomas (Kalra et al., 2016).

1.3.1.3. Los exosomas

Los exosomas son vesículas de 30 a 100 nm, con una densidad entre 1.13 y 1.19 g/mL, aislados normalmente mediante ultracentrifugación (100000-200000 xg) (van der Pol et al., 2012; Schorey et al., 2015). La morfología descrita originalmente se refiere a partículas en forma de “copa o taza” que se observa al estudiarlos usando microscopía electrónica.

Con respecto a su composición, también varía dependiendo del tipo celular de origen. De forma general, consisten en una membrana fosfolipídica con altos niveles de colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea, ceramidas, diacilglicérols y con dominios de membrana resistentes a los detergentes (van der Pol et al., 2012), donde se insertan las proteínas que presentan dominios PHB como las flotilinas o las prohibitinas. Las proteínas de membrana tienen la misma orientación que las de la célula que las origina y dentro del contenido proteico

se incluyen aquellas proteínas implicadas en el transporte de membrana y fusión, tales como las proteínas Rabs y las anexinas (I, II, V, VI) (Schorey & Bhatnagar, 2008; Colombo et al., 2014) que regulan la dinámica del citoesqueleto y los eventos de fusión; flotilina (Colombo et al., 2014), GTPasas (Chacon Heszele et al., 2014), moléculas de adhesión como la molécula intercelular de adhesión-1, CD146, CD9, MFG-E8, CD18, CD11, CD166 y LFA-3/CD58; tioredoxina peroxidasa II, Alix y TSG101 (componentes del complejo ESCRT) (Mantel & Marti, 2015), 14-3-3 y galectinas (Fernandes et al., 2017), implicadas en la apoptosis; proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) (Han et al., 2019), las cuales facilitan el poder cargar los péptidos al complejo mayor de histocompatibilidad I y II, tetraspaninas como la CD63, CD81 y CD82 (van der Pol et al., 2012; Andreu & Yáñez Mó, 2014) y enzimas metabólicas como peroxidasas, piruvatoquinasas y kinasas de lípidos y enolasa, entre otras (Hegmans et al., 2004). Como consecuencia de su origen endosomal, los exosomas no contienen proteínas del retículo endoplásmico, mitocondria o proteínas nucleares (van der Pol et al., 2012). La Figura 1.3.1.3 ilustra la composición proteica general de un exosoma de mamífero.

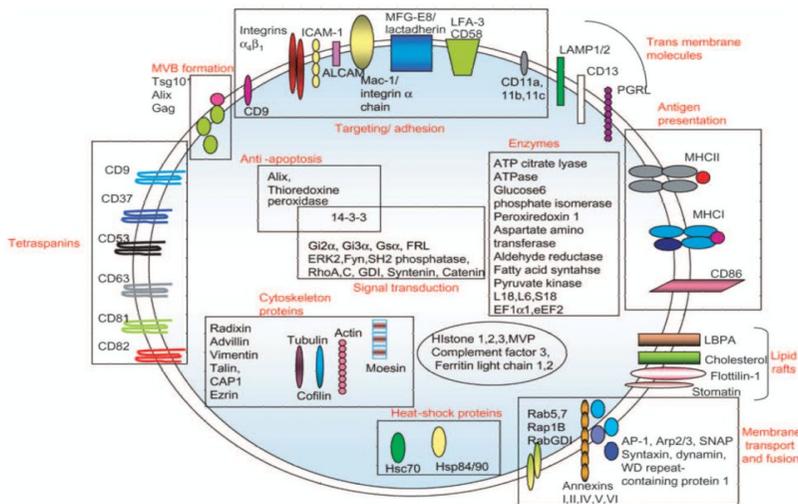


Figura 1.3.1.3. Composición de proteínas de los exosomas y sus funciones (Schorey & Bhatnagar, 2008).

A diferencia de los cuerpos apoptóticos y los ectosomas, los exosomas son de origen endosomal, formados dentro de los cuerpos multivesiculares, importantes también en la vía lisosomal porque se fusionan con los lisosomas para poder degradar su contenido. La secreción de los exosomas también involucra a los cuerpos multivesiculares, pero los exosomas no serán degradados en el lisosoma sino que son liberados desde la célula. Se cree que la localización y la cantidad de colesterol podría influir en el destino de esos MVBs (los exosomas contienen más colesterol) (Möbius et al., 2002), así como la presencia de ácido lisobifosfatídico, ausente en los exosomas pero presente en los cuerpos multivesiculares junto al EGF, destinados estos a la ruta lisosomal (Wubbolts et al., 2003). La generación de cuerpos multivesiculares implica la segregación de un “carga” en la membrana delimitante del endosoma y la gemación hacia adentro de las vesículas hacia el lumen endosomal. Así, dentro de los cuerpos multivesiculares y debido a los procesos de gemación de su membrana, se generan las vesículas intraluminales, las cuales a la hora de fusionarse con la membrana plasmática se van a liberar formando los exosomas.

Las ILVs y, por tanto, los exosomas, se pueden generar mediante dos mecanismos, uno dependiente y otro independiente del complejo transportador ESCRT. El ESCRT consiste en complejos de proteínas citosólicas que son reclutadas hacia los endosomas por medio de proteínas de membrana que han sido marcadas en sus dominios citosólicos mediante ubiquitina (Edgar, 2016). La marca de la ubiquitina es reconocida por el primer complejo, el ESCRT-0, el cual se transporta a la membrana del endosoma y pasa aquellas ubiquitinadas a ESCRT-I. El reclutamiento de la maquinaria de ESCRT agrupa a las proteínas ubiquitinadas en el endosoma e induce la curvatura de la membrana endosomal para formar las vesículas intraluminales (ILVs). ESCRT-I, -II y -III también reconocen las proteínas monoubiquitinadas y promueven su inclusión dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs). Una vez completado el proceso, el complejo

ESCRT se disocia del MVB mediante la proteína Vsp4 siendo nuevamente reciclado (Yeo et al., 2003; Schorey & Bhatnagar, 2008).

En el caso de las proteínas que no cuenten con la marca de ubiquitina, éstas son repartidas en las ILVs gracias a sus propiedades, con preferencia a segregarse en microdominios tipo “raft”, enriquecidos en lípidos (de Gassart et al., 2003). En algunos casos, la secreción de los exosomas no requiere de ESCRT pero depende de la esfingomielinasa, enzima que produce ceramida (Trajkovic et al., 2008). Por ejemplo, el reclutamiento de MHC II a los exosomas de células presentadoras de antígenos ocurre independientemente de la ubiquitinación, lo que apoya la existencia de mecanismos independientes de ESCRT (Buschow et al., 2010). Las tetraspaninas han sido de igual manera propuestas como participantes en la formación de las ILVs y de los exosomas (Simons & Raposo, 2009), ya que se ha visto como las moléculas de MHC II en los exosomas están asociadas con complejos más grandes de proteínas que también contienen tetraspaninas (Buschow et al., 2009). La agregación de las proteínas lleva a la movilización de los antígenos a los MVBs (Vidal et al., 1997). En resumen, no todos los componentes del “carga” de las VEs son reclutados hacia los MVBs mediante el mismo mecanismo y en el caso de los independientes de ESCRT, éstos están menos estudiados y se conocen menos, por lo que requieren de una mayor investigación.

Las Figuras 1.3.1.3.2 y 1.3.1.3.3 muestran en detalle los componentes implicados en la formación de los MVBs y la liberación de los exosomas y en la Figura 1.3.1.3.4 se compara el proceso de biogénesis de exosomas y microvesículas.

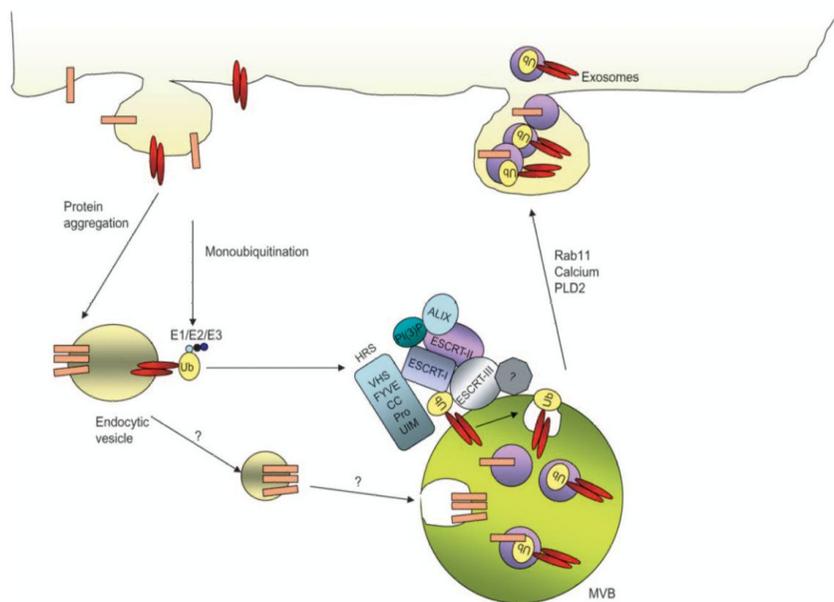


Figura 1.3.1.3.2. Biogénesis de los MVBs y liberación de los exomas (Schorey & Bhatnagar, 2008). En la Figura se observa que la ubiquitinación o la agregación son las señales que promueven el tráfico de proteínas y lípidos a los MVBs. Dentro de la maquinaria necesaria para clasificar las proteínas ubiquitinadas se encuentra la proteína multidominios Vsp27/HRS, que actúa como un puente entre las proteínas transmembrana monoubiquitinadas y la clatrina en los endosomas (Katzmann et al., 2003). Los complejos ESCRT también son importantes durante este proceso; así, ESCRT-I, -II y -III reconocen los “cargos” monoubiquitinados y promueven su inclusión dentro de los MVBs (Teo et al., 2004). La fusión de los MVBs con la membrana plasmática y la liberación de las ILVs como exomas requieren PLD, calcio y Rab1.

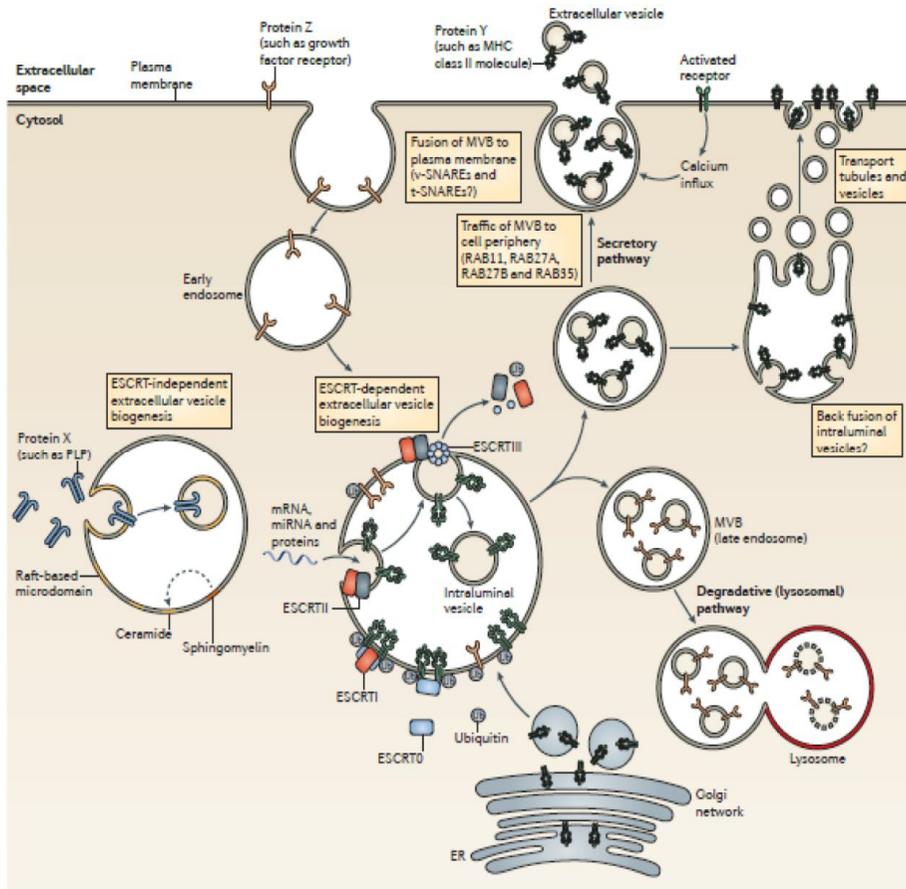


Figura 1.3.1.3.3. Detalle de la biogénesis de los exosomas (Robbins & Morelli, 2014). Los exosomas se generan como ILVs dentro de los MVBs mediante mecanismos dependientes e independientes de la maquinaria de los complejos ESCRT. Las proteínas que se transportan desde el aparato de Golgi (como las del MHC II) o las que se internalizan desde la superficie celular (como los factores de crecimiento activados) requieren de ubiquitinación en sus dominios citosólicos. El complejo ESCRT-0 reconoce las proteínas ubiquitinadas en la cara citosólica del endosoma o membrana del MBV, separa las proteínas en microdominios y se une a ESCRT-I, el cual a su vez recluta a ESCRT-II. Ambos complejos inician la gemación inversa de la ILV naciente dentro de los MVBs. Además, RNAs y proteínas citosólicas tienen acceso directo al interior de las vesículas en formación. Luego, ESCRT-II recluta a las subunidades de ESCRT-III en el cuello de la ILV naciente, lo que resulta en el corte y liberación como vesículas libres. Las moléculas de ubiquitina y las subunidades de ESCRT se liberan al citoplasma para ser recicladas. Otras proteínas (como la proteína proteolipídica PLP) son dirigidas hacia las ILVs independientemente de la maquinaria de ESCRT mediante microdominios tipo “raft”, los

cuales son ricos en esfingolípidos, de los cuales se forman las ceramidas que inducen la fusión de los microdominios y estimula la formación de las IVLs. Las MBVs siguen dos rutas: una secretora o una degradativa. En la secretora, se dirigen hacia la membrana celular y se fusionan con la misma, liberando las ILVs ahora como exosomas. Por el contrario, en la degradativa, los MVBs liberan las ILVs dentro de lisosomas. La ruta lisosomal es crucial para limitar la señalización de receptores de factores de crecimiento activados. Es posible que diferencias en los MVBs estén implicadas en el destino de los mismos.

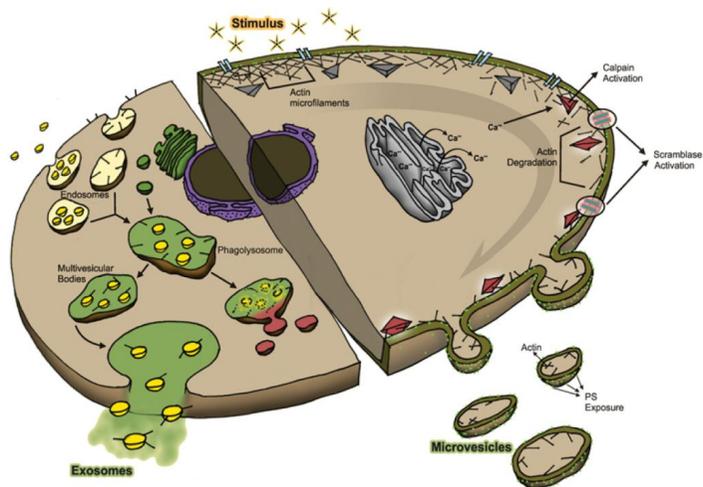


Figura 1.3.1.3.4. Representación de una célula eucariótica donde se muestra la vía endocítica y el origen mediante MVBs de los exosomas y el mecanismo de liberación de las micropartículas mediante la activación de la calpaína y la escramblasa (Deolindo et al., 2013).

La movilización de los exosomas hacia la membrana involucra al citoesqueleto celular, sobre todo a los filamentos de actina y a la proteína reguladora cortactina (Sinha et al., 2016). Una vez en contacto con la membrana, se cree que el complejo de proteínas SNARE media en la fusión con la membrana para la posterior secreción de los exosomas (Zylbersztejn & Galli, 2011). De hecho, la unión del complejo SNARE vesicular con el complejo diana o t-SNARE provoca la formación de un bucle de hélices paralelas compuestas de 4 cadenas (complejo SNARE) con la posterior fusión de las membranas (Cai et al., 2007; Zylbersztejn & Galli, 2011).

A pesar de que la interacción entre las VEs y las células ha sido comprobada, el proceso de captura de los exosomas por parte de las células receptoras no está del todo claro. Por ejemplo, en el caso de las células dendríticas se ha descrito que ocurre una endocitosis de los exosomas (Morelli et al., 2004), mientras que en el caso de células fagocíticas, se propone la entrada mediante fagocitosis (Feng et al., 2010). En otros tipo de células se cree que ocurre una fusión de membranas, con la participación de los microdominios “raft” de las membranas (del Conde et al., 2005; Parolini et al., 2009) (Figura 1.3.1.3.5).

Se ha propuesto que, en cierto modo, el contacto VEs-célula se asemeja al contacto virus-célula, donde ocurre un deslizamiento de la vesícula sobre la membrana hasta encontrar el receptor adecuado (Taylor et al., 2011), se lleva a cabo la fusión de las membranas y se forma un poro por donde las VEs vacían su contenido al interior de la célula (Podbilewicz, 2014). A pesar de esto, la mayoría de autores postulan que la captura de los exosomas se produce por mecanismos que dependen de procesos activos energéticamente dependientes, semejantes a la fagocitosis (Feng et al., 2010) (Nanbo et al., 2013) o la macropinocitosis (Fitzner et al., 2011; Tian et al., 2014). Quizás el mecanismo de entrada a las células esté relacionado con el origen de las VEs y obviamente de la célula blanco.

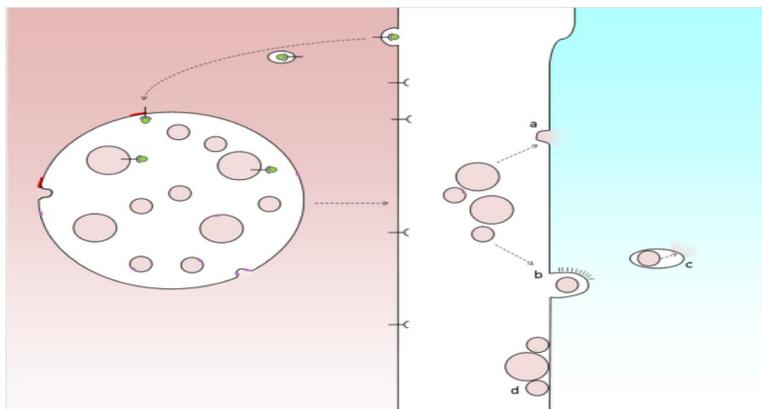


Figura 1.3.1.3.5. Mecanismos propuestos para la captura de las VEs por las células receptoras: fusión de membranas (a) e ingreso de las VEs completas vía endocitosis (b).

Alternativamente, se ha propuesto que podría presentarse la unión de las VEs a la membrana celular y provocar una respuesta de señalización celular (Edgar, 2016).

1.3.2. Funciones generales de las VEs

La secreción de VEs se ha considerado como un mecanismo de comunicación intercelular (Schorey & Bhatnagar, 2008). Con el transcurso del tiempo se revela cada vez más la participación de estas vesículas en más procesos celulares y se evidencian numerosas funciones que van a depender tanto de su composición como del tipo celular que las forma (Schorey & Bhatnagar, 2008). Dentro de las funciones más destacadas de las VEs se encuentran las siguientes:

- **Secreción alternativa de proteínas:** se considera que las células liberan VEs como una forma alternativa de secretar proteínas. De hecho, al inicio del estudio de las VEs se llegó a considerar la liberación de los exosomas como una forma de eliminar aquellas proteínas ya no funcionales durante los procesos de maduración y diferenciación celular, en concreto en el caso de la maduración de los reticulocitos (Schorey & Bhatnagar, 2008), al demostrarse la pérdida del receptor de transferrina en el proceso de maduración de los eritrocitos en ovejas (Johnstone et al., 1987). También se ha demostrado que proteínas sin péptido señal son secretadas por la célula dentro de exosomas, así como la secreción de moléculas solubles (Schorey & Bhatnagar, 2008).
- **Presentación de antígenos y supresión de la respuesta inmune:** se ha comprobado la liberación de moléculas intactas de MHC II en los exosomas secretados por líneas celulares de células B humanas y murinas (Raposo & Stoorvogel, 2013) y que son capaces de transferir antígenos de células tumorales a las células dendríticas, por lo que participarían en la presentación cruzada de antígenos (Wolfers et al., 2001; Schorey & Bhatnagar, 2008). Además, los exosomas pueden participar en la presentación de antígenos tumorales a las células T

sensibilizadas y promover el rechazo del tumor *in vitro* (Chen et al., 2006).

Con respecto a la supresión de la respuesta inmune, se ha comprobado que el empleo de exosomas de células dendríticas de médula ósea del haplotipo del donante antes de un trasplante produjo una mayor supervivencia del aloinjerto de corazón en el modelo animal. Estudios *in vivo* han demostrado un descenso significativo en el recuento de células T CD4⁺ en el animal receptor tratado con exosomas, lo que sugiere un efecto de inmunotolerancia (Pêche et al., 2003). Se ha comprobado la producción de exosomas con actividad antiinflamatoria (Kim et al., 2006), por lo que también se ha sugerido que podrían ser empleados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

- **Inflamación:** se ha comprobado que las VEs pueden estimular la producción de factor tisular y citoquinas proinflamatorias al activar a las células diana (van der Pol et al., 2012). Por ejemplo, se ha visto que las micropartículas de leucocitos polimorfonucleares estimulados con *N*-formyl-Met-Leu-Phe son capaces de activar a las células endoteliales al incrementar la fosforilación de tirosina de la kinasa JNK, lo que resulta en la expresión y producción del factor tisular (factor tisular, factor tisular de tromboplastina o factor III es una glicoproteína de membrana presente en los fibroblastos del endotelio venoso y de monocitos) e IL-6 (Kim et al., 2006). También se ha comprobado que las VEs afectan el proceso inflamatorio al transferir receptores de transporte y mediadores inflamatorios como la IL-1, la cual carece de péptido señal (MacKenzie et al., 2001).
- **Transferencia de información genética:** las VEs incluyen ácidos nucleicos en su composición. Se ha comprobado el intercambio de información genética a través de las VEs tanto en bacterias (Yaron et al., 2000) como en células eucarióticas (van der Pol et al., 2012). Los exosomas contienen mRNA y miRNA (Valadi et al., 2007), mRNA

que puede ser traducido (van der Pol et al., 2012), por lo que es biológicamente activo. El intercambio intercelular de miRNAs por las vesículas es capaz de afectar la regulación post-transcripcional (Montecalvo et al., 2012).

- Crecimiento tumoral, metástasis y angiogénesis: se ha evidenciado que los exosomas son capaces de transferir la actividad metastásica de células tumorales altamente metastásicas a líneas celulares poco metastásicas *in vitro* debido a una transferencia de antígenos funcionales, por lo que participan en la regulación de las vías de señalización celular (van der Pol et al., 2012). Quizás los exosomas pueden proteger a las células tumorales frente a los fármacos antitumorales al capturarlos y disminuir la concentración efectiva de los mismos o al permitir el intercambio de transportadores de fármacos entre células, contribuyendo posiblemente a la resistencia de las células a dichas moléculas antitumorales (van der Pol et al., 2012). Las VEs son capaces de promover el desarrollo vascular mediante el control de vías de señalización, la liberación de enzimas que degradan la matriz (Hakulinen et al., 2008) y la estimulación de la angiogénesis de forma directa (Taverna et al., 2012), además de la producción y liberación del factor tisular (Uno et al., 2007).
- Biomarcadores para diagnóstico: las investigaciones sobre el empleo de las VEs como biomarcadores están en aumento ya que las VEs son liberadas por todo tipo de células y se pueden aislar dichas VEs de prácticamente cualquier fluido biológico. De hecho, se han detectado proteínas asociadas con enfermedad renal en exosomas aislados de orina (Pisitkun et al., 2006). Los exosomas resultan interesantes en el diagnóstico de cáncer, sobre todo en el cáncer de vejiga (van der Pol et al., 2012) y de enfermedades infecciosas, pudiendo ser usadas para conocer la efectividad de los tratamientos (van der Pol et al., 2012).
- Vacunación: el uso de exosomas como candidatos para vacunas ha ganado mucho interés en el área de la inmunoterapia tumoral

(Delcayre & Le Pecq, 2006). Exosomas derivados de tumores que portan antígenos tumorales y moléculas del MHC I son capaces de transferir antígenos tumorales a las células dendríticas e inducir una respuesta inmune antitumoral dependiente de células T CD8+ (Yao et al., 2013). Los exosomas aislados de células tumorales pueden tener un amplio uso ya que se ha visto que aun aislados de diferentes tumores son capaces de inhibir el crecimiento tumoral singeneico y alogénico, lo que indica que dichos exosomas contienen algunos antígenos tumorales (Wolfers et al., 2001). Resultados recientes revelan que se puede aislar exosomas de células tumorales o de células dendríticas puestas en contacto con antígenos tumorales para presentar un inmunógeno capaz de inducir una respuesta inmune efectiva, lo cual haría que se puedan considerar vacunas libres de células (van der Pol et al., 2012) actualmente existen algunos estudios de fase I completados. Estos mismos resultados se pueden aplicar en algunas enfermedades infecciosas, ya que se ha visto que los exosomas derivados de células dendríticas incubadas con taquizoítos sonicados de *Toxoplasma gondii* son capaces de inducir una respuesta protectora contra la infección frente a este parásito, al inducir respuestas tanto humorales como celulares específicas a los antígenos (Aline et al., 2004). Este tipo de estudios han dado resultados positivos en el caso de infecciones frente a *Mycobacterium bovis* (Giri y Schorey, 2008). Una revisión sobre este tema ha sido publicada por Devhare y Ray en 2017 (Devhare & Ray, 2017).

Además de todas las funciones anteriormente descritas, ha sido comprobada la participación de las VEs en la transferencia de morfógenos y de los priones (Fevrier et al., 2004), así como su rol en la adhesión celular (Merten et al., 1999; Clayton et al., 2004), en el proceso de coagulación (Wolf, 1967; Dvorak et al., 1981; Bastida et al., 1984; Shet et al., 2003; van Beers et al., 2009), función vascular (Vanwijk et al., 2002;

Martin et al., 2004) y en la protección contra el estrés intracelular y extracelular (Sims et al., 1988; Shedden et al., 2003), entre otras.

1.3.3. Las VEs en las enfermedades infecciosas con énfasis en las enfermedades parasitarias

Las VEs han sido aisladas y caracterizadas en todas las clases de patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos (Schorey et al., 2015) y pueden derivar del patógeno directamente o del hospedador infectado.

- Virus: en este grupo, uno de los más estudiados ha sido el VIH, sobre todo aspectos que tienen que ver con el origen de la gemación viral y el papel de proteínas como las ESCRT durante este proceso, además de la participación de las VEs en el proceso de patogénesis (Schorey et al., 2015). Se han detectado proteínas de membrana del virus en exosomas de células T, el factor de virulencia Nef (Campbell et al., 2008) y RNAs virales en las exovesículas obtenidas de los sobrenadantes de células T infectadas (Narayanan et al., 2013). Con respecto a las VEs del hospedador infectado, se ha comprobado la transferencia de receptores de quimiocinas a las células blanco, lo que aumenta la susceptibilidad a la infección por el virus (Rozmyslowicz et al., 2003). Además del VIH, se han comprobado los efectos de VEs en la infección con virus de la familia de los herpesvirus como el Epstein Barr, en especial a nivel del sistema inmune, sospechándose su participación en la patogénesis del cáncer (Chugh et al., 2013), en especial en la transferencia de miRNAs capaces de inducir la represión de algunos genes diana del virus (Pegtel et al., 2010). VEs procedentes de células infectadas con citomegalovirus son capaces de aumentar la susceptibilidad de las células a la infección por el mismo (Plazolles et al., 2011). De igual forma las VEs procedentes de células infectadas con el virus de la hepatitis C son capaces de aumentar la infectividad del virus

en las células (Masciopinto et al., 2004) y en el caso del virus herpes simplex, los exosomas generados por los cultivos infectados pueden dirigir el transporte de HLA-DR a los MVBs, limitando la cantidad del complejo MHC-péptido en la superficie celular y con esto evadiendo la detección del virus por el sistema inmune (Temme et al., 2010).

- Hongos: la mayoría de estudios se han centrado en la liberación de los exosomas directamente de los cultivos de los hongos. Se ha descrito la presencia de antígenos fúngicos en exosomas de *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues et al., 2008), capaces de activar los macrófagos y de inducir a que se produzcan altos niveles de interleuquinas capaces de limitar la infección (Oliveira et al., 2010). Por otra parte, otros estudios sugieren que estas vesículas son capaces de promover la virulencia del hongo (Panepinto et al., 2009). La producción de VEs de otras especies como *Malassezia sympodialis* y *Paracoccidioides brasiliensis* también han sido descritas (Schorey et al., 2015).
- Bacterias: mucha de la información publicada con respecto a la producción de exosomas y sus funciones durante las infecciones bacterianas proviene del estudio de las micobacterias (Schorey et al., 2015). Se ha comprobado la presencia de PAMPs en VEs secretadas por macrófagos infectados (Beatty et al., 2001) y que estas células son capaces de liberar vesículas que estimulan una respuesta proinflamatoria en macrófagos no infectados (Bhatnagar & Schorey, 2007). Los resultados obtenidos en las infecciones con micobacterias sugieren que los exosomas liberados por las células infectadas son capaces de promover el reclutamiento y la activación de células del sistema inmune tanto *in vitro* como *in vivo* y que dichas VEs presentan un papel de promover la respuesta inmune innata durante una infección con estos microorganismos (Schorey et al., 2015). El estudio de VEs

en bacterias se han llevado a cabo principalmente en *Salmonella* sp., *Bacillus anthracis*, *Chlamydia pneumoniae* y *C. trachomatis*, así como en *Streptococcus pneumoniae*, entre otras (Schorey et al., 2015).

- Parásitos: los primeros estudios de VEs en parásitos se realizaron empleando *Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito del filo Apicomplexa, donde se comprobó que los exosomas aislados de células dendríticas cultivadas con proteínas del parásito eran capaces de estimular una respuesta inmune protectora contra la infección aguda y crónica al transferirlas dichas células a ratones, obteniendo así una respuesta específica al antígeno y que incluye un respuesta tanto humoral como celular (Aline et al., 2004). Los resultados se acompañan del desarrollo de un número menor de quistes tisulares en el cerebro (Beauvillain et al., 2007), observándose como los monocitos humanos (la línea THP-1) eran capaces de producir mediadores inflamatorios al ser estimuladas por las células infectadas con el parásito (Beauvillain et al., 2009).

La liberación de VEs por *Leishmania* sp. también ha sido ampliamente estudiada (Silverman & Reiner, 2011; Atayde et al., 2016). De hecho, los estudios iniciales establecieron que los exosomas derivados del parásito son un vehículo para la secreción de proteínas y su captura por macrófagos (Silverman et al., 2010a), por lo que se propuso que la liberación de exosomas constituía un mecanismo de entrega directa de moléculas del parásito a estas células (Schorey et al., 2015). Además, los exosomas del parásito son capaces de suprimir la respuesta inmune (Silverman et al., 2010a) y recientemente se ha publicado que las VEs de *Leishmania* sp. constituirían las envolturas virales de virus específicos de las cepas del protozoo, lo que facilitaría la transmisión de los virus específicos LRV1 del protozoo productor

de la Leishmaniosis mucocutánea, aumentando la infectividad en el hospedador vertebrado (Atayde et al., 2019). Para el caso de *Plasmodium* sp., las investigaciones se han enfocado en comparar los exosomas derivados del hospedador versus los producidos por el parásito (Schorey et al., 2015). Se ha visto que los exosomas aislados de la sangre de ratones infectados con *P. yoelii* portan proteínas del parásito y son capaces de generar protección en los animales al estimular la producción de IgGs específicas (Martin Jaular et al., 2011). En el caso de *P. falciparum* y *P. vivax*, los estudios han sido más limitados ya que son especies que infectan eritrocitos maduros, los cuales carecen de MVBs (Schorey et al., 2015); sin embargo, estas especies al infectar reticulocitos son capaces también de liberar exosomas. En una infección por *P. falciparum*, se ha comprobado que los exosomas aumentan la infectividad al contener proteínas que promueven la invasión de los glóbulos rojos, como la EBA-175 y EBA-181 (Mantel et al., 2013), mientras que los ectosomas son capaces de modular la respuesta inmune al estimular una respuesta proinflamatoria, asociada con la patología de la enfermedad (Barteneva et al., 2013). Otros parásitos en los que se han estudiado las VEs incluyen a *Eimeria tenella* (del Cacho et al., 2011), *Cryptosporidium parvum* (Hu et al., 2013), *Trichomonas vaginalis* (Twu et al., 2013) y *Giardia intestinalis* (Evans Osses et al., 2017). En el caso de los tripanosomas, *Trypanosoma brucei* produce VEs capaces de transferir tanto la proteína asociada con la resistencia al suero SRA, importante en la resistencia del parásito frente a la respuesta inmune innata, como lípidos y proteínas del parásito a los eritrocitos, con la consecuente generación de alteraciones en la membrana e inducción de anemia (Harrington et al., 2016). El estudio de las VEs secretadas por las

diferentes fases del parásito *T. cruzi* es bastante amplio y se comentará más adelante.

Además de estos parásitos protozoos, las investigaciones sobre las VEs en parásitos abarca a los helmintos, sobre todo al nematodo *Heligmosomoides polygyrus* (Buck et al., 2014) y a los trematodos *Echinostoma caproni* y *Fasciola hepatica* (Trelis et al., 2012), comprobándose la presencia de miRNAs en el primero y la captura de las vesículas por las células del hospedador junto la secreción de proteínas atípicas en las VEs en los segundos (Trelis et al., 2012). Es importante destacar que el estudio de las VEs en el contexto de las infecciones parasitarias es complicado debido a que ambos, el patógeno y el hospedador, liberan vesículas al ambiente extracelular que tienen un rol en la patogénesis de la enfermedad, aun cuando apenas se está iniciando con la determinación de las funciones específicas de los mismos en los procesos patogénicos (Schorey et al., 2015).

1.3.4. Las VEs de *Trypanosoma cruzi*

La invasión celular por protozoos parásitos requiere la interacción de proteínas de ambos, el parásito y el hospedador (Borges et al., 2016), como ya ha sido comentado. Al ser capaz *T. cruzi* de establecer infecciones crónicas, se demuestra su capacidad para evadir la respuesta inmune (Borges et al., 2016). A la fecha, los estudios relacionados con las VEs de este parásito confirman que el “carga” que llevan promueve, además de la evasión de la respuesta inmune, la invasión celular del parásito y la modulación de la infección (Borges et al., 2016), al ser capaces de alterar el contenido de las VEs derivadas de las células, favoreciendo su perpetuación dentro del hospedador (Borges et al., 2016).

La primera publicación que hace referencia al aislamiento de VEs de *T. cruzi*, específicamente de vesículas de membrana, se remonta al año 1979, cuando da Silveira y colaboradores descubrieron la secreción de vesículas

lisas y membranosas por epimastigotes de la cepa Y en fase exponencial tardía de crecimiento (80 a 100 horas de incubación) (da Silveira et al., 1979), inducida por acetato, ptalato, ácido cítrico y a pH 4. Doce años después, Gonçalves y colaboradores describieron la liberación espontánea de antígenos de superficie en vesículas de membrana de 20 a 80 nm de diámetro, a partir de las formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular, un fenómeno que resultó dependiente de la temperatura y el tiempo de incubación (Gonçalves et al., 1991).

En el año 2009, Trocoli Torrecilhas y colaboradores describieron la composición de las vesículas de membrana secretadas por tripomastigotes de la cepa Y, la cual incluía lípidos, Tc-85 y *trans*-sialidasas (Trocoli Torrecilhas et al., 2009), proteínas importantes durante el proceso de invasión del parásito. Además, en ese mismo estudio, los autores evidenciaron que, al incubar las células con estas vesículas se observaba fluorescencia dentro de las células durante los primeros 5 a 15 minutos de la incubación, comprobándose así su captura por parte de las células. Al realizar ensayos en animales de laboratorio inoculados con dichas vesículas, también determinaron aumentos en los niveles de parasitemia, áreas de inflamación más amplias, la presencia de más nidos chagásicos y células T CD4+ y macrófagos en los infiltrados del corazón, junto con una expresión disminuida de iNOS (Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Los resultados en este estudio demostraron que las vesículas inyectadas en los animales fueron capaces de incrementar el parasitismo en el corazón al aumentar la producción de IL-4 e IL-10, pero no fueron capaces por sí solas de causar la muerte de los animales. Estos resultados reflejan la capacidad de las vesículas de modificar el microambiente tisular rápidamente, al interactuar con las células del hospedador (Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Es importante señalar la presencia de las *trans*-sialidasas en las VEs ya que se cree que estas enzimas pueden estar implicadas en el incremento de la parasitemia y las mayores tasas de mortalidad observadas en los animales infectados, además de promover la apoptosis de las células del sistema inmune al inducir la

sialilación de la membrana en las células del hospedador (Mucci et al., 2006), interactuar con el CD43 de las células T (Todeschini et al., 2002) y provocar la disminución del recuento plaquetas durante la fase aguda de la enfermedad (Tribulatti et al., 2005).

En el año 2012, Cestari y colaboradores confirmaron que los tripomastigotes metacíclicos de la cepa Silvio X10/6 de *T. cruzi* eran capaces liberar microvesículas a partir de las células del torrente sanguíneo en las primeras etapas de la infección, las cuales formaban un complejo en la superficie del parásito con la C3 convertasa del complemento, lo que inhibe la acción del complemento y con esto se favorece la supervivencia del parásito (Cestari et al., 2012). Además, los autores indicaron que las microvesículas liberadas por los monocitos y linfocitos que portan citoquinas inmunomoduladoras como el TGF- β eran capaces de promover la invasión del parásito a las células y con esto evadir el ataque del complemento (Cestari et al., 2012). Con respecto a la parasitemia, los resultados de estos investigadores coinciden con los de Trocoli Torrecilhas y colaboradores, al reportar niveles más altos de parasitación en aquellas células previamente incubadas con las vesículas, confirmando la participación de las mismas en la evasión de la respuesta inmune al inducir en las células del hospedador la liberación de microvesículas capaces de inhibir la lisis mediada por complemento. Posteriormente, Bayer Santos y colaboradores realizaron un análisis proteómico del secretoma y evidenciaron la presencia de aproximadamente 367 proteínas (Bayer Santos et al., 2013). Dichas proteínas aparecen asociadas a aspectos relacionados con el metabolismo, señalización, transportadores, oxidación-reducción, unión a ácidos nucleico, metabolismo de carbohidratos, supervivencia y virulencia del parásito (Bayer Santos et al., 2013).

La transferencia de los RNAs pequeños incluidos en VEs de *T. cruzi* se confirmó en 2014, cuando Bayer Santos y colaboradores analizaron el contenido de las VEs de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento y las excretadas por tripomastigotes metacíclicos del clon DM28c, demostrando

que la expresión de estos RNAs varía entre las diferentes fases del parásito, lo que sugiere que podrían trabajar como potenciales reguladores de diferentes funciones celulares. Los autores llegaron a especular sobre la posibilidad de que ocurra un intercambio de material genético entre parásitos o entre parásitos y células mediante la participación de dichas exovesículas (Bayer Santos et al., 2014). Ese mismo año, García Silva y colaboradores comprobaron la secreción de RNAs pequeños derivados de tRNA y rRNA en vesículas extracelulares, los cuales resultaron completamente funcionales, y que podrían participar en la metacicloogénesis del parásito y en la susceptibilidad a la infección, aspecto importante para los mecanismos de la comunicación parásito-parásito y parásito-célula (García Silva et al., 2014a). Al analizar los cambios en la expresión génica en células HeLa incubadas con VEs de epimastigotes del clon DM28c del parásito, los autores evidenciaron la influencia en la expresión de los genes implicados en el citoesqueleto de las células, la matriz extracelular y la respuesta inmune, sugiriendo la posibilidad de que las vesículas secretadas por el parásito pueden ser importantes actores en los eventos tempranos de la interacción parásito-hospedador (García Silva et al., 2014b).

Comparaciones entre las VEs de diferentes cepas del parásito se han llevado a cabo por otros autores donde, por ejemplo, se han caracterizado las actividades fosfatasa (ácida y alcalina) en los de tripomastigotes de las cepas Y y CL Brener, consideradas como las cepas que representan los “polos opuestos del espectro” de acuerdo a su comportamiento *in vitro* e *in vivo* (Neves et al., 2014). Los resultados de los análisis sugieren además que las vesículas liberadas por la cepa Y derivan principalmente de la superficie celular y que la actividad fosfatasa participa en el aumento de la adhesión del parásito a las células, mientras que la cepa CL Brener secreta exosomas principalmente y la actividad fosfatasa está involucrada en los incrementos en las infecciones celulares (Neves et al., 2014)

En el año 2016, Ramírez y colaboradores demostraron por primera vez la interacción de las VEs de *T. cruzi* con las membranas de la célula

hospedadora y comprobaron que las VEs de diferentes fases del parásito eran capaces de estimular la liberación de VEs a partir de células THP-1, una línea celular monocítica humana (Ramirez et al., 2016). Con estos resultados se concluyó que las VEs liberadas por el parásito eran capaces de modificar las funciones de la célula diana, al llevar factores del complemento, citoquinas, péptidos, miRNAs y otras biomoléculas y que su composición depende directamente de la fase del parásito que las libera (Ramirez et al., 2016). Este es el primer estudio en el que se realiza el aislamiento de las VEs a partir de sueros de pacientes chagásicos y se detectó un patrón de moléculas diferente entre pacientes con manifestaciones cardíacas o en fase indeterminada, lo que indicaría la existencia de marcadores específicos asociados con el diagnóstico diferencial entre las fases de la enfermedad (Ramirez et al., 2016). En el año 2017, Díaz Lozano y colaboradores comprobaron la formación de inmunocomplejos con VEs de *T. cruzi* e IgGs anti-MASPs (péptido señal) en pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad y demostraron que las exovesículas eran capaces de inhibir la acción del complemento, además de participar en la generación de una respuesta humoral en pacientes con patologías digestivas (Díaz Lozano et al., 2017).

1.3.4.1. “Carga” de proteínas de las VEs de *T. cruzi* y sus funciones

De forma general, se puede indicar que las VEs de *T. cruzi* contienen el siguiente “carga” de proteínas, con funciones variables según la fase del parásito (Figura 1.3.4.1):

- Proteínas como la TcPIWI-tryp: podría estar asociada con la inducción de la metacicloogénesis y la susceptibilidad de las células a la infección (Fernandez Calero et al., 2015).
- Familias de proteínas como la TcSMP: involucradas en la señalización de calcio y la movilización de los lisosomas hacia la membrana celular (Bautista López et al., 2017).
- Cruzipaina: proteína presente en las VEs que se encuentra en todas las fases del parásito, siendo más abundante en las formas replicativas

(se ubica en los reservosomas de los epimastigotes y se asocia a la membrana mediante un anclaje de GPI en los amastigotes) (Borges et al., 2016). Esta proteína es fundamental para *T. cruzi* ya que promueve la penetración de los tripomastigotes en las células a través de la proteólisis del kininógeno o mediante la conversión de prekalicreína a kalicreína, para que después se genere el péptido proinflamatorio (Lys-bradikinina) que interactúa con los receptores B2 e induce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (del Nery et al., 1997; Scharfstein et al., 2000). Este incremento resulta fundamental para el reclutamiento de los lisosomas y su fusión con la membrana celular, evento que antecede la formación de la vacuola parasitófora (Aparicio et al., 2004). Además de su participación en el proceso de invasión, la cruzipaina se considera importante durante el desarrollo intracelular del parásito y en el proceso de metacicloogénesis, al igual que en la interacción con el hospedador invertebrado (Ferrão et al., 2015) y en la evasión de la respuesta inmune, al ser capaz de digerir las regiones bisagra de todas las subclases de IgGs (Berasain et al., 2003).

- Glicoproteínas de la superfamilia de gp85/*trans*-sialidasas y mucinas: la gp85 participa en la adhesión del parásito a la célula al unirse a la proteína de los filamentos intermedios CK 18, que activa la cascada de señalización de ERK1/2, vía que permite la entrada de los parásitos a las células al promover la desfosforilación de CK 18 y con esto el desensamblaje de los filamentos (Magdesian et al., 2007).
- Proteínas SAP: la región carboxi-terminal de estas proteínas es capaz de interactuar con las membranas de las células hospedadoras e inducir la exocitosis de los lisosomas para formar la vacuola parasitófora, al incrementar los niveles intracelulares de calcio como lo hace la gp82 (Zanforlin et al., 2013). Estas proteínas están descritas en VEs de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Borges et al., 2016).

- Gp82: molécula de adhesión implicada en la invasión en cepas altamente infectantes (Ramirez et al., 1993) que interactúa con la PLC, la cual genera IP3, implicado en la movilización de calcio desde el retículo endoplásmico (Yoshida et al., 2000; Yoshida, 2006), movilización que lleva a la reorganización del citoesqueleto, facilitando el proceso de invasión (Dorta et al., 1995; Rodríguez et al., 1996; Martins et al., 2011).
- Familia de proteínas MASPs: la región C-terminal de la familia de proteínas MASPs inmaduras está presentes en las VEs liberadas por las formas tripomastigotas de *T. cruzi* (de Pablos et al., 2016) y se ha visto que son capaces de inhibir la lisis mediada por complemento (Díaz Lozano et al., 2017; Wyllie & Ramirez, 2017). De igual manera se ha visto que portan las proteínas MASPs con la región N terminal o péptido señal de dichas proteínas inmaduras, lo que sugiere que la presencia de estas proteínas no procesadas respondería a un estrés del retículo endoplasmático al no haber procesado dichas partes por el proteasoma del parásito. La región N terminal o péptido señal forma parte de los antígenos capaces de producir los inmunocomplejos con anticuerpos IgG anti-MASPs presentes en los exosomas circulantes en el suero de pacientes con las diferentes manifestaciones clínicas de la fase crónica de la enfermedad (Díaz Lozano et al., 2017).

De hecho, se conoce que la vía de las lectinas es la principal vía del complemento que inhiben las VEs y que la respuesta a esta lisis mediada por complemento varía entre las cepas y es dependiente de la misma (las VEs de una cepa no afectan la resistencia al complemento ni el proceso de invasión de parásitos de otra cepa) (Wyllie & Ramirez, 2017). En relación con la respuesta inmune, Chodhury y colaboradores determinaron que las micropartículas generadas durante una infección con *T. cruzi* portan información sobre el estado inflamatorio/oxidativo del hospedador y son importantes porque revelan información sobre la progresión de la enfermedad, pudiendo

ser empleadas para evaluar la severidad de la enfermedad y la eficacia de terapias durante la fase crónica de la enfermedad (Chowdhury et al., 2017).

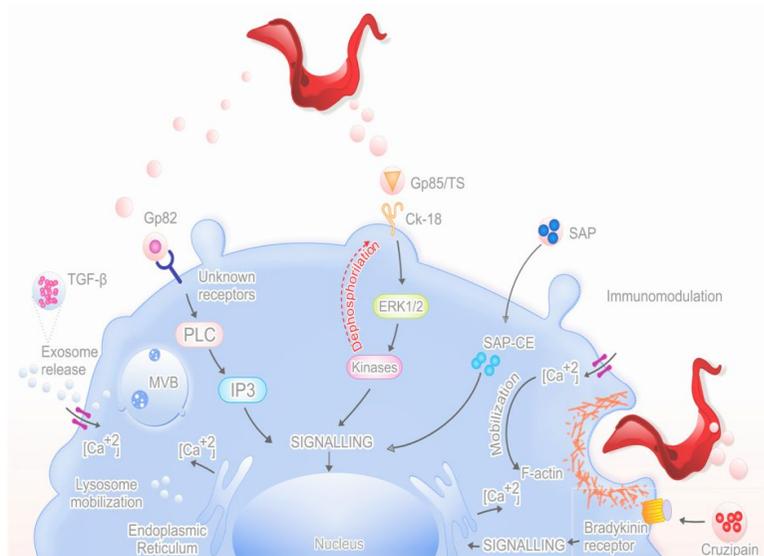


Figura 1.3.4.1. Mecanismos de acción de algunas proteínas de *T. cruzi* secretadas en las VEs (Borges et al., 2016).

A pesar de que las VEs de *T. cruzi* han sido ampliamente investigadas durante años, se conoce muy poco sobre su capacidad para modular las condiciones fisiológicas de las células hospedadoras, importante para explicar sobre todo los pasos previos a la invasión del parásito. Borges y colaboradores concluyeron que la maquinaria involucrada en los procesos en los que participan las VEs del parásito, así como la magnitud de la actividad moduladora de estas vesículas sobre las células no está del todo bien explicada (Borges et al., 2016).

Con los resultados derivados de la investigación llevada a cabo con esta Tesis Doctoral se ha pretendido dilucidar algunos de los procesos celulares que podrían ser inducidos por las VEs del parásito. De igual manera, se ha realizado la caracterización de la estructura y propiedades mecánicas de estas VEs e inmunocomplejos formados por las mismas, incluyendo algunos

ensayos de biodistribución como paso previo a otras investigaciones. Para finalizar, se ha comparado el proteoma de las VEs aisladas de diferentes fases biológicas del parásito de la cepa Pan4 de *T. cruzi*.

2. Justificación y objetivos

2. Justificación y objetivos

La comunicación intercelular y el estudio del interactoma en particular han cobrado una enorme importancia en la investigación de los últimos años, con el fin de poder dar una explicación a los mecanismos de comunicación intercelular y la modulación que ejercen unas células sobre las otras. Dicha comunicación, en muchas ocasiones llevada a cabo en tejidos y células muy distantes de las células que inducen la modulación, se realiza mediante el denominado secretoma celular, donde las células, además de la liberación de proteínas y otros factores solubles, secretan una serie de exovesículas rodeadas de componentes lipídicos, de diferentes tamaños y capaces de fusionarse con las membranas de las células blanco a las que modulan. Entre estas vesículas se encuentran los cuerpos apoptóticos, los ectosomas y los exosomas, todas ellas de diferente origen y liberadas por las células mediante mecanismos activos en los que interviene el retículo endoplasmático o las membranas celulares. Dichas exovesículas rodeadas por membranas citoplasmáticas portan, entre otros componentes, proteínas y ácidos nucleicos responsables de la modulación antes mencionada.

La enfermedad de Chagas, como ya se ha indicado, es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, un parásito intracelular obligado capaz de multiplicarse en el citoplasma celular. La enfermedad cursa con dos fases: una aguda, donde el parásito está presente en sangre tras los ciclos de multiplicación celulares y una fase crónica, donde se restringe a “nichos de parasitación tisular” y aparecen las denominadas “patías”, que se manifiestan como daños a nivel de órganos como el corazón o del aparato digestivo y que limitan la calidad de vida de los enfermos o les causan la muerte. Las causas reales de estas “patías” se desconocen, habiéndose atribuido a diferentes procesos como la producción de “toxinas” por parte del parásito; la generación de autoanticuerpos que alteran la funcionalidad nerviosa al afectar la inervación de los diferentes órganos, con pérdida de la contractibilidad y

que originaría la dilatación de los mismos; o la persistencia del parásito en pequeños focos dentro de tejidos específicos conocida como “hipótesis de la persistencia” y que da lugar a una reactividad inflamatoria crónica. En todas estas hipótesis, la participación de las VEs es factible. Sin embargo, todavía se desconoce cómo el parásito es capaz de persistir o los factores liberados por el protozoo que influyen su dinámica y daño en tejidos durante la infección crónica. Para responder a estas preguntas, la hipótesis de trabajo de nuestro grupo de investigación se ha centrado en el papel de las vesículas extracelulares o exovesículas como parte esencial en la supervivencia y la patología de *T. cruzi*, enfocándonos en la forma en la que dichas exovesículas alteran la fisiología celular para permitir tanto la entrada del parásito a su célula o su distribución tisular dependiendo de las cepas del parásito.

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto de las VEs de las formas infectivas tripomastigotes de la cepa Pan4 de *Trypanosoma cruzi* en la fisiología celular, con especial énfasis en las alteraciones celulares que facilitan el proceso de invasión por parte de las formas infectantes y las consecuencias que esto conlleva en la biología de la célula, además de caracterizar las VEs con respecto a su estructura, propiedades mecánicas, la biodistribución en los tejidos de animales, determinar su carga proteica y las diferencias entre los proteomas de VEs secretadas por las formas tripomastigotas infectantes y las formas epimastigotas propias del insecto vector, no infectivas para las células de los mamíferos.

2.2. Objetivos específicos

1. Poner a punto, aislar y caracterizar mediante microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica, las vesículas extracelulares de las formas tripomastigotas infectantes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*, así como analizar mediante “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering” el

tamaño y homogeneidad de las poblaciones de VEs aisladas y detectar marcadores del parásito en estas VEs mediante Western blot.

2. Evaluar la influencia y especificidad del efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre cultivos celulares, al realizar infecciones con otras cepas de *T. cruzi* y con otra especie de protozoo de desarrollo intracelular obligado como *Toxoplasma gondii* y al incubar con VEs de otros orígenes, además de determinar la naturaleza de los componentes de las VEs de *T. cruzi* involucradas en la interacción VEs-célula.
3. Evidenciar las modificaciones fisiológicas celulares ejercidas por las VEs de las formas infectantes de *T. cruzi* Pan4 sobre la permeabilización celular, la movilización intracelular de Ca^{2+} , el citoesqueleto, el ciclo celular y en los procesos de apoptosis/necrosis.
4. Determinar los niveles de expresión de los genes *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* y el nivel de fosforilación de la proteína RhoA en células incubadas con VEs de *T. cruzi* , como posible explicación de las modificaciones celulares inducidas por las VEs.
5. Caracterizar y determinar mediante microscopía de fuerza atómica las propiedades mecánicas como rigidez, módulo de elasticidad longitudinal o módulo de Young y adhesión de las VEs de las formas tripomastigotas y de los inmunocomplejos formados *in vitro* al incubar IgGs anti-*T. cruzi* purificadas con las VEs de *T. cruzi*.
6. Evaluar mediante el sistema de análisis de imágenes IVIS la biodistribución en los diferentes órganos de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* e inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* inoculados en animales.

7. Analizar y comparar el proteoma de las VEs procedentes de los tripomastigotes y de las formas epimastigotas de *T. cruzi* Pan4.

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivo de células

Para realizar la mayoría de los estudios de esta Tesis Doctoral, incluidos los experimentos de infectividad, la obtención de las formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivadas de los cultivos celulares y los estudios fisiológicos y bioquímicos, se utilizó la línea celular Vero (ATCC CCL-81), una línea de células epiteliales de riñón de mono verde africano, proporcionada por el banco de líneas celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Para otros estudios se empleó la línea celular NIH/3T3 (ATCC CRL-1658), una línea de fibroblastos de origen murino. Esta línea celular también fue proporcionada por el banco de líneas celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

En el caso de los experimentos de evaluación de la permeabilización celular, se utilizó la línea celular HL-1, una línea derivada de cardiomiocitos atriales murinos, proporcionada por el Dr. F.E. Barallem y la Dra. E. Hernández del Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (ICGEB, por sus siglas en inglés) en Trieste, Italia.

3.1.1. Cultivo de células Vero y NIH/3T3

El cultivo de células Vero y células NIH/3T3 se realizó en frascos NUNC® de 75 cm² de superficie (Thermo Fisher Scientific, EEUU) cultivadas, en medio MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (SFBI) (Gibco, EEUU) y suplementado con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL).

Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con un 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron la monocapa,

el cultivo se preparó para llevar a cabo los subcultivos. Para esto, los frascos con células se tripsinizaron con una solución de tripsina 0.05%/EDTA 0.02%. Para llevar a cabo dicha tripsinización, se retiró el medio de cultivo de los frascos y se lavaron tres veces con PBS estéril, con el fin de retirar los iones calcio y magnesio del medio de cultivo. Posteriormente, se les agregó un volumen de la solución de tripsina 0.05%/EDTA 0.02% que permitiera cubrir la superficie de los frascos. Los frascos con células se incubaron durante 5-10 minutos a 37°C, con el fin de despegar las células de la superficie de crecimiento. Posteriormente, se agregaron 5 mL de medio MEM con SFBI para inactivar la tripsina y la suspensión con las células se colocó en tubos cónicos de 15 mL, los cuales fueron centrifugados a 500 xg por 5 minutos para obtener el botón de células. Este botón de células se lavó una vez con PBS estéril, las células se resuspendieron en medio MEM suplementado con 10% de SFBI y antibióticos y fueron sembradas en frascos NUNC® de 75 cm² de superficie. La observación de los cultivos celulares se realizó diariamente.

3.1.2. Cultivo de células HL-1

La línea celular HL-1 es una línea de cardiomiocitos murinos capaz de mantener sus propiedades morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas *in vitro*, así como su capacidad contráctil (Claycomb et al., 1998). Estas células se cultivaron en frascos NUNC® de 25 cm² de superficie (Thermo Fisher Scientific, EEUU) con medio Claycomb (Sigma Aldrich, EEUU) suplementado con 10% de SFBI, norepinefrina 0.1 mM, L-glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL) bajo las mismas condiciones de cultivo e incubación de las células Vero. El medio de cultivo se cambió diariamente y el proceso de tripsinización se realizó tal como se describió anteriormente.

3.1.3. Sincronización del ciclo celular

Antes de realizar los experimentos con células, así como previo a las infecciones celulares con las formas infectantes del parásito, se sincronizó el ciclo celular en la fase S siguiendo el protocolo descrito por Osuna y colaboradores (1984) (Osuna et al., 1984). Para ello, las células se incubaron durante 12 horas con el medio de cultivo al cual se le agregó timidina a una concentración 25 mM (Sigma Aldrich, EEUU). Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS estéril y se mantuvieron en medio de cultivo sin timidina, suplementado con SFBI y antibióticos, durante al menos una hora antes de iniciar los experimentos.

3.2. Cepas de parásitos

Los experimentos se realizaron utilizando la cepa Pan4 de *Trypanosoma cruzi* (Tc Ia + 1d) (Cura et al., 2010), una cepa aislada de un paciente de la comunidad de Burunga (Panamá) en 2004 y donada al laboratorio por la profesora A. Ying de la Universidad de Panamá. En algunos experimentos se empleó la cepa 4162 de *T. cruzi* (Tc IV), donada al laboratorio por el Dr. A. Schijman del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (INGEBI-CONICET) de Buenos Aires, Argentina.

Las formas del parásito usadas en la mayor parte de los experimentos fueron las formas tripomastigotas derivadas de cultivos en células y formas epimastigotas, estas últimas empleadas en los ensayos de microscopía de fuerza atómica, proteómica y para obtener las formas metacíclicas para iniciar los cultivos celulares y obtener los tripomastigotes derivados de cultivos celulares de forma continua.

Las formas tripomastigotas se obtuvieron a partir de cultivos en células Vero después de su infección con tripomastigotes metacíclicos, como se detallará más adelante. Estas formas infectantes se obtuvieron mediante la inducción de la metaciclogénesis en las formas epimastigotes.

Los cultivos de epimastigotes se llevaron a cabo a 28°C en medio LIT suplementado con 10% SFBI. Estas formas no infectivas se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento mediante resiembras cada 4 a 5 días.

3.2.1. Metaciclologénesis *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi*

La obtención de tripomastigotes metacíclicos de la cepa Pan4 de *T. cruzi* fue posible mediante la inducción de la diferenciación *in vitro* de los epimastigotes, empleando la metodología descrita por Osuna et al. (1979) (Osuna et al., 1979). Brevemente, se partió de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, el cual se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos para obtener un botón de parásitos y eliminar el sobrenadante. Se realizó un recuento de parásitos empleando la cámara de Neubauer, ajustándose la concentración a 1×10^5 parásitos/mL. Estos epimastigotes se sembraron en frascos NUNC® de 25 cm² con 5 mL de medio Grace modificado (Gibco, EEUU) y los cultivos se mantuvieron a 28°C sin agitación, hasta que se obtuvo una tasa de transformación de aproximadamente el 90% (a los 7 días del cultivo). El sobrenadante con los parásitos se colocó en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugó a 1000 xg durante 5 minutos para obtener el botón con los tripomastigotes metacíclicos, el cual se lavó tres veces con PBS estéril, centrifugándose de la misma forma. Finalmente, el botón se resuspendió en 1 mL de medio MEM sin SFBI para llevar a cabo las infecciones de las células Vero.

En el caso de la transformación de epimastigotes de la cepa 4162 de *T. cruzi*, se trabajó con parásitos en la fase logarítmica de crecimiento, los cuales se cultivaron de la misma forma que la descrita para la cepa Pan4 de *T. cruzi*. En este caso, 5×10^8 formas se colocaron en frascos NUNC® de 25 cm² con 5 mL de medio TAU, se incubaron durante 2 horas a 28°C, según lo descrito por Contreras y colaboradores en 1988 (Contreras et al., 1988). Posteriormente, los parásitos se diluyeron a 1×10^7 epimastigotes, se colocaron en 5 mL de medio TAU3AAG donde se incubaron durante 72 horas a 28°C, tiempo en el que se evaluó la tasa de transformación de los parásitos. El

sobrenadante con los tripomastigotes metacíclicos se colocó en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugó a 1000 xg durante 5 minutos para obtener un botón que se lavó tres veces con PBS estéril y se resuspendió en 1 mL de medio MEM sin SFBI para ser utilizado en las infecciones de las células Vero.

3.2.2. Infección de células Vero con tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*

La infección de las células Vero se realizó incubando cultivos semiconfluentes de células Vero, previamente sincronizadas, con los tripomastigotes metacíclicos obtenidos tal como se describió en el apartado anterior. Brevemente, los frascos con las células sincronizadas se lavaron tres veces con PBS estéril, se les adicionaron los tripomastigotes metacíclicos lavados y resuspendidos en medio MEM sin SFBI en una relación 10:1 (parásitos: célula). Después de 24 horas de incubación, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS estéril y se les agregó el medio MEM con 10% de SFBI y antibióticos. Estos cultivos se mantuvieron en la incubadora a 37°C y 5% CO₂, con adición de medio de cultivo cada 2-3 días, hasta que se observaran formas de tripomastigotes en el sobrenadante. A partir de ese momento, el sobrenadante con tripomastigotes se recolectó todos los días durante quince días, con el fin de obtener los parásitos para realizar el aislamiento y purificación de las vesículas extracelulares diariamente.

3.3. Aislamiento y purificación de las vesículas extracelulares o exovesículas de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*

El método que se seleccionó para el aislamiento y purificación de las VEs fue la centrifugación diferencial, técnica considerada como el estándar de oro y una de las más empleadas y reportadas para el aislamiento de exosomas (Li et al., 2017).

Previo al proceso de centrifugación diferencial, los tubos empleados se lavaron durante 4 horas con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%

para eliminar la existencia de contaminación bacteriana y de posibles endotoxinas (Silverman et al., 2010a; 2010b). Después de este tratamiento, los tubos fueron lavados con abundante agua destilada estéril y se sometieron a un tratamiento de secado en cámara de flujo laminar durante quince minutos.

En el caso de la obtención de las VEs secretadas por los tripomastigotes, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados que se centrifugaron a 3500 xg durante 5 minutos, con el fin de concentrar los parásitos en el botón. Después de esta centrifugación, los sobrenadantes se descartaron y los botones con los tripomastigotes se lavaron 4 veces con PBS estéril, centrifugándose bajo las mismas condiciones, con el fin de eliminar los restos de SFBI y de medio. Posterior a los lavados, los tripomastigotes se contaron en una cámara de recuento de Neubauer, ajustándose a una concentración de 1×10^7 parásitos que se colocaron en frascos NUNC® de 25 cm² de superficie con 10 mL del medio empleado para la obtención de las VEs: RPMI con 25 mM de HEPES (Sigma Aldrich, EEUU), suplementado con 10% de SFBI libre de VEs, pH 7.4, medio tamponado que impide la disminución del pH como consecuencia de la liberación de catabolitos. La eliminación de las VEs del suero se realizó previamente mediante centrifugación diferencial, de la misma manera que se describe más adelante para la obtención de las VEs de los parásitos, con la diferencia de que en la última centrifugación lo que se conserva es el sobrenadante en vez del botón donde están las exovesículas. El cultivo en este medio permite que se mantengan las formas tripomastigotas durante el tiempo de incubación, evitando así que se desarrollen en formas “amastigote-like” o en formas epimastigotas. Los frascos con los parásitos se incubaron a 37°C durante 5 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación de las formas tripomastigotas, el medio con los parásitos se centrifugó a 3500 xg durante 15 minutos a 4°C, con el fin de eliminar los tripomastigotes y restos que pudiesen estar en el medio de cultivo y trabajar con el sobrenadante donde se encuentran las VEs. Una alícuota del botón de parásitos se tiñó con azul tripán y se realizó un

recuento para evaluar la viabilidad de los tripomastigotes después de las 5 horas de incubación. Al sobrenadante con las VEs se le agregó un cocktail de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche, Suiza) que se centrifugó a 17000 xg durante 30 minutos a 4°C para eliminar los cuerpos apoptóticos y ectosomas grandes. El sobrenadante obtenido después de esta centrifugación se filtró con un filtro de tamaño de poro de 0.22 µm (Sartorius, Alemania) para eliminar partículas mayores de 220 nm, el que posteriormente se centrifugó a 100000 xg durante 18 horas a 4°C para sedimentar las VEs. El botón obtenido fue sometido a tres lavados de una hora a 100000 xg a 4°C con PBS estéril con inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche, Suiza). Finalmente, se resuspendió en 50 a 100 µL de PBS estéril con inhibidores de proteasas como se describe en el paso anterior. La Figura 3.3 muestra un esquema del protocolo de aislamiento de las VEs.

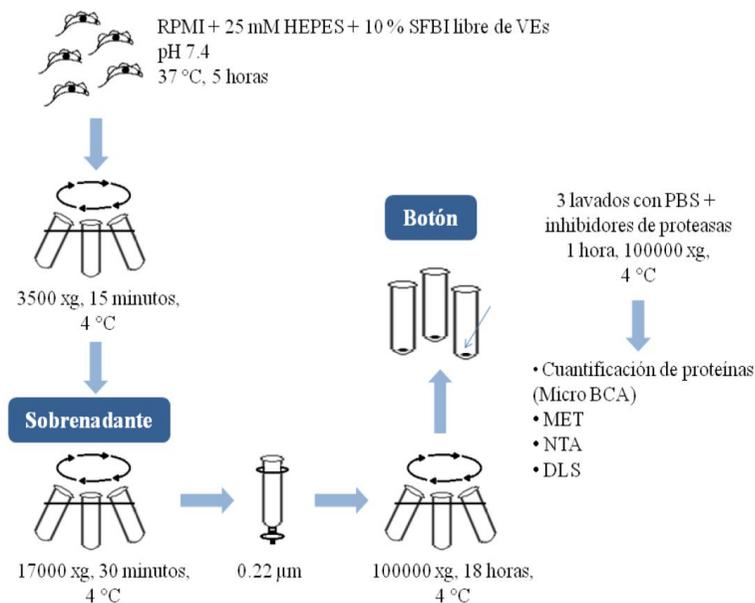


Figura 3.3. Protocolo de aislamiento de VEs a partir de tripomastigotes de *T. cruzi*.

En el caso de los epimastigotes, 1×10^7 parásitos se colocaron en frascos NUNC® de 25 cm² de superficie con 15 mL de medio LIT

suplementado con 10% de SFBI, incubándose a 28°C durante 5 días. Al sexto día, el medio de cultivo con los epimastigotes se centrifugó a 300 xg durante 5 minutos. El botón con los parásitos se lavó 4 veces con PBS estéril y los parásitos se colocaron en frascos con 10 mL de medio LIT suplementado con SBF1 libre de exovesículas como se ha descrito anteriormente, a 28°C durante 5 horas. Después de este tiempo, el aislamiento de las VEs se realizó como se describió previamente para el aislamiento a partir de las formas tripomastigotas.

El protocolo de aislamiento de VEs se realizó en una ultracentrífuga Avanti J-30I (Beckman Coulter, EEUU) con el rotor JA-30.50 Ti. En el caso de los lavados y la concentración de los botones en microtubos, se utilizó una ultracentrífuga Sorwal WX80 con el rotor Fiberlite™ F50L-24 x 1.5 Fixed-Angle Rotor (Thermo Fisher Scientific, EEUU). En el caso de ambas formas del parásito, la mayoría de los experimentos se realizó con las VEs obtenidas el día antes de los experimentos, con el fin de asegurar la integridad de las mismas. Estas VEs se almacenaron en alícuotas, a 4°C. En algunos casos, y dependiendo del ensayo en que iban a ser empleadas, las VEs se congelaron a -80°C, agregándose a cada alícuota un 20% de glicerol estéril.

La cuantificación de la concentración de proteínas de las VEs se realizó utilizando el kit comercial micro BCA (Thermo Fisher Scientific, EEUU), usando como control albúmina bovina sérica para realizar la curva patrón. La observación, medición del tamaño y cuantificación de las VEs se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión, “nanoparticle tracking analysis”, “dynamic light scattering” y microscopía de fuerza atómica.

3.3.1. Cuantificación de la concentración de proteínas de las VEs mediante el kit comercial micro BCA

Debido a la cantidad de VEs que se obtienen en el proceso de aislamiento y a la pérdida de material en cada lavado, se hace necesario un método de cuantificación proteica lo más sensible posible. En este caso se

utilizó el kit comercial micro BCA Protein Assay Kit® (Thermo Fisher Scientific, EEUU), el cual consiste en una formulación de ácido bicinónico (BCA) compatible con detergentes que permite la detección colorimétrica y la cuantificación de las proteínas totales. El BCA detecta el cobre Cu^{+1} que se forma cuando las proteínas reducen el Cu^{+2} en un ambiente alcalino (Smith et al., 1985). Al final de la reacción se obtiene un producto color púrpura por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión Cu^{+1} . Este complejo es soluble en agua y posee una máxima absorbancia a 562 nm. Así, la relación entre la absorbancia y las concentraciones crecientes de proteína es una relación lineal.

Para la determinación de la concentración de proteína de las muestras de VEs se realizó una curva patrón con soluciones de concentraciones conocidas de BSA (Tabla 3.3.1), siguiendo las instrucciones del fabricante que se describen a continuación. Como solución diluyente (WR) se empleó una mezcla de 25 partes del reactivo MA, con 24 partes del reactivo MB y una parte del reactivo MC. Un volumen de 150 μL de cada dilución del estándar de albúmina, así como de las muestras, se colocó en 150 μL del reactivo completo formado, en una microplaca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU), la cual se agitó activamente durante 60 segundos y se incubó a 37°C durante 2 horas, protegida de la luz. La absorbancia fue medida a 562 nm en un lector de placas Multiskan® Spectrum (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Todas las muestras se analizaron por triplicado y el valor de concentración de proteína se interpoló de la curva de regresión del control como patrón utilizando el software GraphPad Prism v5.

Tabla 3.3.1. Diluciones de BSA para preparar una curva patrón y determinar las concentraciones de proteína mediante el método micro BCA.

Vial	Volumen de diluyente (mL)	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA ($\mu\text{g/mL}$)
A	4.5	0.5 mL del stock del kit	200
B	8.0	2.0 mL de la dilución del vial A	40
C	4.0	4.0 mL de la dilución del vial B	20
D	4.0	4.0 mL de la dilución del vial C	10
E	4.0	4.0 mL de la dilución del vial D	5
F	4.0	4.0 mL de la dilución del vial E	2.5
G	4.8	4.0 mL de la dilución del vial F	1
H	4.0	4.0 mL de la dilución del vial G	0.5
I	8.0	0 mL	0 (blanco)

3.3.2. Observación de las VEs de *T. cruzi* mediante microscopía electrónica de transmisión

Para la observación de las VEs se realizó una tinción negativa de la muestra como se describe a continuación. Para ello, se colocaron 10 μL de la muestra fijada en una solución de glutaraldehído al 4% sobre un fragmento de Parafilm y sobre la muestra una rejilla de Níquel-Fomvar que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las rejillas se colocaron sobre una gota de agua destilada, con el fin de realizar el lavado de la muestra. Se realizaron cuatro lavados en total, la rejilla se colocó sobre una gota con 50 μL de acetato de uranilo (2% vol/vol) que se incubó durante 1

minuto. Finalmente, se absorbió el exceso de líquido con un papel de filtro bajo la rejilla que se inclinó para eliminar el exceso de colorante. La rejilla se dejó secar al aire.

La observación de las muestras se realizó utilizando un microscopio electrónico LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss.

3.3.3. Cuantificación y determinación del tamaño de las VEs de *T. cruzi* mediante “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”

El tamaño y la concentración de las VEs obtenidas fueron evaluadas mediante un análisis de las partículas o “nanoparticle tracking analysis”. Esta técnica emplea las propiedades de la dispersión de la luz, así como el movimiento Browniano, para obtener una distribución de las partículas en función de su tamaño en aquellas muestras que se encuentran en suspensión. Para ello, un rayo de luz láser impacta sobre la cámara en la que se coloca la muestra y las partículas en suspensión sobre las que incide dicha luz monocromática de alta intensidad dispersa el haz, de tal forma que se pueden visualizar en un microscopio con un objetivo de 20x y una cámara de vídeo acoplada al mismo. La cámara es capaz de grabar un archivo de vídeo de las partículas que se mueven con movimiento Browniano y el software del equipo es capaz de rastrear estas partículas individualmente y calcular sus diámetros hidrodinámicos. Con esta técnica es posible obtener información del tamaño de las partículas, la concentración de partículas en la muestra e incluso realizar medidas de agregación si se utiliza el modo de fluorescencia en partículas marcadas previamente (Panalytical, 2018).

Para este análisis, muestras de VEs se diluyeron a la dilución 1/100 en PBS esterilizado por filtración a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm . La dilución se llevó a cabo en microtubos de baja unión de proteínas o “low binding” y se colocaron en la cámara de la muestra. Las mediciones se realizaron a 25°C en un Nanosight NS300 (Malvern Instruments, RU) equipado con una cámara sCMOS y un haz de luz láser azul de 488 nm. Para cada muestra se analizaron 3 vídeos de 10 segundos cada uno, utilizando el

NTA software 3.2 build 3.2.16. Con esto, se obtuvo la media, la moda y la desviación estándar del tamaño y la concentración de las partículas en suspensión.

El análisis mediante “dynamic light scattering” también involucra el movimiento Browniano, ya que el principio de la técnica consiste en que las partículas y moléculas que se encuentran en constante movimiento Browniano difunden a una velocidad relacionada con su tamaño, donde las partículas más pequeñas van a difundir más rápido (Panalytical, 2018). En este caso, las muestras de las VEs se resuspendieron en PBS estéril filtrado con un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm y las medidas se realizaron en un sistema Zetasizer Nano range system (Malvern Instruments, RU).

3.3.4. Detección de las proteínas cruzipaína y *trans*-sialidasa (mAb 39) en las VEs de *T. cruzi* mediante Western blot

La presencia de algunas moléculas consideradas como marcadores de las VEs de *T. cruzi* y relacionadas con los procesos de invasión del parásito a las células, tales como la cruzipaína y las *trans*-sialidasas, se determinaron mediante Western blot. Para esto, se realizaron electroforesis SDS-PAGE de las muestras con 300 μg de proteína de las VEs aisladas de tripomastigotes y de 90 μg de un lisado de tripomastigotes usados como control. El protocolo se describe a continuación.

3.3.4.1. Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida

La electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) es un tipo de electroforesis donde se emplea la matriz formada de la polimerización de la acrilamida y bis-acrilamida para separar las proteínas en función de su masa molecular relativa, en lugar de por su carga eléctrica. Previamente, la muestra se trata con el detergente dodecil sulfato sódico que homogeniza las cargas de las proteínas, volviéndolas electronegativas y con el β -mercaptoetanol a 98 $^{\circ}\text{C}$, con el fin de romper los puentes disulfuro y linearizar sus estructuras

terciarias, fragmentando las subunidades que puedan formar parte de su estructura.

La preparación de los geles o matriz a través de la cual se separan las proteínas incluye, como ya se ha citado, a la acrilamida y la bis-acrilamida, las cuales co-polimerizan en presencia de TEMED, a través de una reacción de vinil adición-polimerización y se llega a formar una matriz con un tamaño de poro variable, dependiendo del porcentaje de reactivos que se emplee.

Este tipo de electroforesis consiste en un sistema discontinuo de dos geles: un gel concentrador, donde se concentran todas las proteínas para que migren a la misma velocidad y un gel separador, por donde migran las proteínas al aplicarse un voltaje dentro de un circuito eléctrico. En este caso, los geles se prepararon entre cristales de 1 mm de grosor (Bio-Rad Laboratories, EEUU). El primer gel que se preparó fue el gel separador al 12% de acrilamida/bis-acrilamida, el cual se colocó sobre el soporte de cristal e inmediatamente se agregó una cantidad de isopropanol para conseguir una línea horizontal en el borde superior del gel separador y así evitar la formación de burbujas. El gel se dejó polimerizar durante 20 minutos y una vez polimerizado se eliminó el isopropanol añadiendo agua, la cual se eliminó y se colocó el gel concentrador hasta que polimerizara. La electroforesis se realizó utilizando un sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, EEUU).

La preparación de las muestras se realizó mezclando 300 μg de las proteínas totales de las VEs obtenidas de los tripomastigotes o 90 μg de proteína total de un lisado de tripomastigotes con el tampón de la muestra 5X en proporción 1:4 y calentándolas durante 10 minutos a 98°C. Las muestras se centrifugaron durante 10 segundos a 14000 rpm y se cargaron en el gel, junto con un marcador de peso molecular de proteínas PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, EEUU). La corrida electroforética se realizó en una cubeta con tampón de electroforesis, usando un voltaje de 70 V para la corrida de las muestras en el gel espaciador y 150 V para la separación en el gel separador. Tras la corrida electroforética, los geles se

extrajeran de los soportes y se incubaron con la solución de tinción con azul de Coomasie.

3.3.4.2. Visualización de las bandas de proteínas mediante la tinción de los geles de poliacrilamida con azul de Coomasie

La visualización de las proteínas se realizó mediante la tinción de los geles con el colorante Coomasie R-250 al 0.025% p/v (Brillant Blue-250, Sigma Aldrich, EEUU) durante 2 horas. El azul de Coomasie es un colorante que se une a las proteínas por medio de interacciones iónicas entre los grupos de ácido sulfónico del colorante y los grupos amino de las proteínas, así como mediante interacciones de van der Waals.

Después de las 2 horas de tinción, los geles se colocaron con una solución de desteñido para eliminar totalmente el colorante y permitir una mejor visualización de las bandas de proteínas.

3.3.4.3. Western blot

Posterior a la observación del perfil de proteínas de cada muestra, se realizó la inmunodetección de las proteínas específicas mediante el uso de la técnica de inmunoblotting de proteínas. Para ello, una vez realizada la electroforesis en SDS-PAGE se llevó a cabo la transferencia de las proteínas, separadas previamente mediante la electroforesis, a una membrana de PVDF de 0.2 μm de tamaño de poro (Bio-Rad Laboratories, EEUU). Para ello, se utilizó un sistema de transferencia semi seco Trans blot Turbo (Bio-Rad Laboratories). Las condiciones de la transferencia fueron de 25 V y 0.5 A durante 30 minutos. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en tampón de bloqueo preparado con leche en polvo sin grasa al 5% durante toda la noche, a 4°C en agitación suave. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado compuesto por PBS-Tween 20 (0.1%), para posteriormente incubarse con los anticuerpos primarios anti-cruzipaina (obtenido en conejo) a una dilución 1:3000 o anti-*trans*-sialidasa (mAb 39) (obtenido en ratón) a una dilución 1:1000, durante

toda la noche, a 4°C en agitación suave. Después de la incubación durante toda la noche, las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa, un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgGs obtenido en oveja (1:2000) (Dako Agilent Pathology Solutions, EEUU) en el caso de la membrana incubada previamente con el anticuerpo primario anti-cruzipaína y un anticuerpo obtenido en cabra anti-IgGs de ratón (1:1000) (Dako Agilent Pathology Solutions, EEUU) para el caso de la membrana incubada previamente con el anticuerpo anti-*trans*-sialidasa (mAb 39). La reacción se visualizó utilizando el sustrato Clarity® ECL Western substrate (Bio-Rad Laboratories, EEUU) en un equipo de análisis de imágenes ChemiDoc® (Bio-Rad Laboratories, EEUU).

Los anticuerpos primarios anti-cruzipaína y anti-*trans*-sialidasa (mAb 39) fueron donados por el Dr. J. González, de la Universidad de Antofagasta, Chile.

3.4. Optimización de las condiciones de incubación de las células con las VEs de *T. cruzi*

Para estos experimentos se emplearon cultivos de células Vero de 5×10^4 células, adheridas sobre cubreobjetos redondos de vidrio borosilicado de 13 mm (Marienfeld, Alemania), colocados dentro de los pocillos de placas NUNC® de 24 pocillos. Las células se cultivaron en medio MEM suplementado con 10% de SFBI más antibióticos, a 37°C durante 24 horas, en atmósfera húmeda enriquecida con 5% de CO₂. Después de este tiempo, el medio de cultivo se retiró de las células, las cuales se lavaron 3 veces con medio MEM sin SFBI. Después de los lavados, las células se incubaron durante dos horas con las diferentes concentraciones de proteína de las VEs secretadas por los tripomastigotes: 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2.5 µg/mL de proteína. Transcurrido el tiempo de interacción VEs-células, las células se infectaron con las formas tripomastigotes de *T. cruzi* en una relación parásito:célula de 5:1, manteniéndose el tiempo de la infección durante 4 horas. Posteriormente,

se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células tres veces con MEM sin SFBI y se les añadió medio MEM con SFBI. Las células se mantuvieron en cultivo hasta las 24 horas de iniciada la incubación con las VEs.

Los cubreobjetos se extrajeron de las placas, se lavaron tres veces con PBS estéril y se fijaron durante 5 minutos con metanol para después teñirse con el colorante de Giemsa. Finalmente, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje DPX y se realizó un recuento y estudio microscópico de al menos 400 células por cubreobjeto, anotándose tanto el número de células infectadas, con el fin de calcular el porcentaje de parasitación y el número de parásitos por célula, para poder calcular el índice de parasitación. Los experimentos se realizaron por triplicado, empleándose un mínimo de tres cubreobjetos para cada una de las concentraciones de VEs.

Con los resultados obtenidos de los porcentajes de parasitación se analizó la cinética de los posibles efectos observados y de ella se calculó la dosis efectiva 50 (DE50), considerada la concentración de VEs capaz de aumentar el porcentaje de células parasitadas en un 50% con respecto a porcentaje de parasitación de las células control no incubadas con las VEs. Para llevar a cabo dichos cálculos se utilizó el software GraphPad Prism v5, con el cual se generó la curva de regresión no lineal equivalente a una ecuación correspondiente a “dosis/efecto”. Esta DE50 se empleó para todos los experimentos siguientes.

3.5. Experimentos de invasión celular

Después de determinar la DE50, se procedió a investigar el efecto de las VEs en la invasión de los tripomastigotes de *T. cruzi* en células Vero y si dicho efecto era reversible en el tiempo tras la incubación.

3.5.1. Efecto de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 en la infección celular

Para realizar esta serie de experimentos, las células Vero fueron cultivadas de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Las células así cultivadas fueron incubadas durante 2 horas con las VEs de las formas tripomastigotas a la dosis DE50 calculada (0.38 µg/mL). Tras realizar la incubación de las VEs con las células, estas fueron infectadas con las formas tripomastigotas en las mismas condiciones que en el apartado anterior, manteniendo una relación 5:1 (parásitos:célula). Las interacciones parásito:célula se realizaron a las 2, 4, 8 y 24 horas de la incubación de las células con las VEs. Los parásitos se mantuvieron en el cultivo durante 4 horas y transcurrido el tiempo de interacción, se retiró el medio de cultivo, los cultivos se lavaron tres veces con MEM sin SFBI y se mantuvieron en cultivo en medio MEM con SFBI más antibióticos hasta cumplir las 24 horas de iniciada la incubación, con el objetivo de estudiar las tasas de infección. Transcurrido este tiempo, los cultivos fueron tratados, fijados, teñidos y analizados como se describió anteriormente, mediante tinciones de Giemsa.

3.5.2. Efecto de los tratamientos térmico y químico/enzimático de las VEs en la interacción parásito-célula

Con el fin de conocer la posible naturaleza química y la posible inactivación térmica de los componentes de las VEs que inducen los efectos observados de la interacción VEs/célula, diferentes alícuotas de las VEs purificadas de los tripomastigotes fueron sometidas a tratamientos térmicos a 50°C, 70°C y 90°C durante 30 minutos. Dichos tratamientos se llevaron a cabo con agitaciones periódicas, en tubos herméticamente cerrados para evitar la evaporación y con ello el aumento de la fuerza iónica que pudiese afectar la estabilidad de las proteínas contenidas en dichas nanopartículas.

Para realizar los tratamientos enzimáticos, diferentes alícuotas de VEs se incubaron durante una hora con las enzimas tripsina (0.5 mg/mL) y

proteínasa K (0.5 mg/mL) a 37°C, tras lo cual fueron lavadas 3 veces por centrifugación a 100000 xg durante 1 hora, con PBS estéril filtrado, para eliminar las enzimas.

Por último, a fin de conocer el papel de la parte glicosilada del glicocálix de las glicoproteínas presentes en la superficie de las VEs y oxidarla para eliminarla, una suspensión de las VEs fue tratada durante 1 hora con una solución de peryodato de sodio (10 mg/mL) a temperatura ambiente, manteniéndose todo el tratamiento en oscuridad. Después del tratamiento y como anteriormente se ha comentado en los tratamientos anteriores, las VEs se lavaron 3 veces por centrifugación a 100000 xg durante 1 hora a 4°C, con PBS estéril filtrado. Una vez tratadas y eliminados los agentes reactivos mediante lavados, las VEs se diluyeron y se agregaron a los medios de cultivo, incubándose con las células como se ha descrito anteriormente. Al cumplirse el tiempo de incubación, las células se lavaron, infectaron y estudiaron como ya ha sido descrito en los apartados anteriores, mediante tinciones de Giemsa.

3.6. Evaluación de la especificidad del efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre células Vero

Con la idea de comprobar que los efectos de las VEs de *T. cruzi* sobre las células Vero son específicos de este parásito y que no se deben a ningún efecto físicoquímico por el proceso de fusión de membranas, se realizaron una serie de experimentos donde la incubación de las células Vero se llevó a cabo con VEs de procedencia diferente a las VEs de *T. cruzi* y la posterior infección con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Pan4, cepa usada en los experimentos llevados a cabo en la mayor parte de esta Tesis. De igual forma, se llevaron a cabo experimentos donde las VEs aisladas de la cepa Pan4 fueron incubadas con las células Vero, sometiéndose posteriormente a la infección con otra cepa de *T. cruzi* de una DTU diferente o con otro parásito intracelular obligado.

3.6.1. Aislamiento de las VEs procedentes de las formas coanomastigotes de *Crithidia mellificae* y de células de ratón NIH/3T3

Para llevar a cabo estos experimentos, se emplearon las formas flageladas coanomastigotes de *Crithidia mellificae*, un parásito kinetoplástido del insecto *Apis mellifera*, formas de desarrollo extracelular, así como la línea celular de fibroblastos de ratón NIH/3T3. El cultivo de los coanomastigotes se realizó en el mismo medio que el empleado en el cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi*, medio LIT suplementado con 10% de SFBI más antibióticos, a 28°C. La línea celular NIH/3T3 se cultivó y subcultivó empleándose los mismos medios y procedimientos descritos para las células Vero.

El aislamiento de las VEs a partir de las formas coanomastigotes de *C. mellificae* se realizó cultivando 1×10^7 parásitos previamente lavados cuatro veces por centrifugación a 300 xg durante 5 minutos, en PBS, en frascos NUNC® de 25 cm² con 10 mL de medio LIT, a 28°C durante 24 horas. En el caso de aislamiento de las VEs de las células NIH/3T3, éstas fueron cultivadas en frascos NUNC® de 75 cm² de superficie, hasta obtenerse una monocapa confluyente de dichas células. En ese momento, las células se lavaron cuatro veces con PBS estéril y se incubaron a 37°C durante 24 horas con medio MEM sin SFBI. Transcurridas 24 horas se colectaron ambos medios de cultivo, los procedentes de los coanomastigotes y los del cultivo de células de ratón y se centrifugaron a 3500 xg durante 15 minutos. Para evaluar la viabilidad de los protozoos y de las células NIH/3T3, se realizó un ensayo de viabilidad con azul tripán, procediéndose a realizar el protocolo descrito para el aislamiento de las VEs anteriormente descrito. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas de las muestras de VEs utilizando el kit comercial micro BCA. La evidencia de la presencia, así como la comprobación de los tamaños de las VEs se llevó a cabo mediante DLS.

3.6.2. Obtención de tripomastigotes metacíclicos de la cepa 4162 de *T. cruzi* (Tc IV) y cultivo de los taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

El proceso de inducción de la metacicloogénesis para la obtención de tripomastigotes metacíclicos de la cepa 4162 de *T. cruzi* se realizó cultivando las formas epimastigotas obtenidas del medio LIT, en medio TAU a 28°C durante dos horas, para después colocarlas en medio TAU3AAG, como ya ha sido descrito.

El cultivo de los taquizoítos de *T. gondii*, un parásito intracelular obligado perteneciente al Filo Apicomplexa se mantuvo mediante pasajes seriados en cultivos de células Vero, en frascos NUNC® de 75 cm² de superficie. Cuando se observó la salida de los taquizoítos de las células a las que infectaron, se colectaron los medios de cultivo de los frascos con los protozoos en suspensión y se centrifugaron a 5000 xg durante 10 minutos. El botón con los parásitos se lavó 3 veces con PBS y se resuspendió en el medio de cultivo para hacer los recuentos en cámara hemocitométrica, ajustar el número de parásitos y emplearlos en la infección de las células.

3.6.3. Experimentos de infección celular después de la incubación de las células con las VEs de *C. mellificae* y de células NIH/3T3

En este caso, se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 3.4, donde 5x10⁴ células Vero se cultivaron en cubreobjetos redondos de 13 mm y se incubaron con las VEs de las formas coanomastigotes de *C. mellificae* y con las VEs de células NIH/3T3 durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron y se infectaron con tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* en una relación 5:1 (parásitos: célula).

En otro experimento, las células Vero se incubaron de la misma forma con VEs de los tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 durante 2 horas y se infectaron posteriormente con los tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa 4162 (Tc IV) o con los taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH en una relación 5:1 (parásitos: célula). Los parásitos se mantuvieron en el cultivo durante 4 horas, tiempo en el que se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron 3 veces y

se agregó el medio MEM con SFBI más antibióticos hasta cumplirse las 24 horas de iniciada la incubación. Las células en los cubreobjetos fueron fijadas y teñidas con el colorante de Giemsa, con el fin de calcular el porcentaje de parasitación y el número de parásitos por célula, contándose al menos 400 células.

3.7. Efecto de las VEs de *T. cruzi* en la permeabilización celular

El efecto de las VEs de *T. cruzi* en la permeabilización celular se determinó de dos formas: evaluando la viabilidad celular al incubar las células con la toxina α -sarcina y mediante el uso de un anticuerpo que reconoce un epítipo del receptor β 2-adrenérgico anclado en la parte intracitoplasmática de las células HL-1.

3.7.1. Ensayos de viabilidad celular

La evaluación del posible efecto de las VEs en la permeabilización celular a macromoléculas fue realizada mediante el uso de la toxina α -sarcina, procedente del hongo *Aspergillus giganteus*. La α -sarcina es una biotoxina de 16.8 kDa que se caracteriza por inhibir la síntesis de proteínas a nivel ribosomal y que, a diferencia de otras toxinas con acción sobre la síntesis proteica, como la toxina diftérica, carece de receptor en la membrana plasmática de las células (Oñaderra et al., 1998b), por lo que sus efectos se centran exclusivamente en aquellas células donde la permeabilidad de la membrana se encuentra alterada (Otero & Carrasco 1987; Castanys et al. 1990; Madan et al., 2005; Azzouz et al., 2012).

En estos ensayos, 5×10^4 células Vero se cultivaron en 2 mL de medio de cultivo en placas NUNC® de 12 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron e incubaron durante 2 horas con las VEs, para después ser lavadas con medio MEM sin SFBI e incubadas con α -sarcina 20 μ M (Sigma Aldrich, EEUU)

durante 4 horas. Después de la incubación con la toxina, las células se lavaron 4 veces con MEM sin SFBI, incubándose con MEM suplementado con SFBI y antibióticos durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la viabilidad de las células mediante tinción con azul tripán 0.4%. En un ensayo en paralelo se incubaron simultáneamente las VEs y la α -sarcina, empleándose las mismas concentraciones descritas anteriormente. Como controles del experimento, se determinó la viabilidad de las células incubadas independientemente con las VEs o con la α -sarcina y las células sin ningún tratamiento, con el objetivo de conocer la mortalidad de los cultivos no tratados.

Para determinar la viabilidad de los cultivos se realizaron recuentos con el colorante vital azul tripán y mediante el uso de MTT (Sigma Aldrich, EEUU). El MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5- difeniltetrazolium bromuro) o azul de tiazol, es una sal de color amarillo en solución al prepararse en medios sin rojo fenol, que se convierte en formazán púrpura cuando se reduce como consecuencia de las deshidrogenasas celulares que cortan el anillo de tetrazolium, insoluble en agua pero soluble en isopropanol u otros solventes. Dicho formazán disuelto se puede medir espectrofotométricamente, dando una absorbancia en función de la concentración del colorante formado (Corral et al., 2014). En este caso, se cultivaron 12.5×10^3 células Vero en placas NUNC® de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU), incubándose como ya se ha descrito en los experimentos anteriores. Transcurridas las 24 horas de incubación, las células se lavaron 3 veces con MEM sin SFBI, incubándose con las VEs y la α -sarcina durante 4 horas. Las células se lavaron 4 veces con MEM sin SFBI y posteriormente se incubaron durante 24 horas con MEM suplementado con SFBI más antibióticos. Después de este tiempo, a cada pocillo se le agregó 40 μ L de MTT, se agitó la placa durante 15 minutos y se incubó a 37°C durante 4 horas en oscuridad. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 200 μ L de DMSO a cada pocillo, agitándose con la pipeta hasta que se disolvieran los cristales de formazán. La lectura de la placa se realizó a 570 nm y 690 nm y el cálculo de absorbancia de cada muestra se

realizó restando la absorbancia obtenida a 690 nm a la absorbancia obtenida a 570 nm.

Los experimentos control también incluyeron a las células incubadas con VEs, α -sarcina o sin tratamiento, además de células incubadas solo con MTT o DMSO.

3.7.2. Detección del epítipo intracitoplasmático del receptor β_2 -adrenérgico mediante microscopía confocal láser como método para evaluar la posible permeabilización celular tras la interacción VEs de *T. cruzi*-células HL-1

Para realizar estos estudios se emplearon cultivos de células de la línea celular HL-1, una línea derivada de cardiomiocitos atriales, la cual mantiene una serie de características tales como sus propiedades morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas *in vitro* (Claycomb et al., 1998). Así, 5×10^4 células HL-1 se cultivaron sobre cubreobjetos redondos de 13 mm, en medio Claycomb suplementado con 10% de SFBI, norepinefrina 0.1 mM, L-glutamina 2 mM y antibióticos. Las células se incubaron durante 24 horas, se lavaron 3 veces con el mismo medio Claycomb sin SFBI y se sometieron durante 2 horas a la incubación con las VEs. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos con las células se lavaron 3 veces en PBS estéril y se fijaron con una solución compuesta por paraformaldehído 2% y glutaraldehído 1% durante 1 hora, capaz de fijar las proteínas celulares sin desestabilizar la bicapa lipídica, lo que impide que los anticuerpos reconozcan antígenos intracitoplasmáticos. Después de la fijación, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS estéril y se bloquearon con una solución de BSA 1% y glicina 0.3 M en PBS ultrafiltrado durante 1 hora. Los cubreobjetos se volvieron a lavar de la misma manera y se incubaron con un anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-receptor β_2 -adrenérgico (Thermo Fisher Scientific, EEUU), en una dilución 1:500 durante 1 hora. Este anticuerpo, como ya se ha indicado, es capaz de reconocer una región de la secuencia comprendida entre los aminoácidos 340 a 413, la cual corresponde con un

epítopo situado en la parte intracelular del receptor. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron 3 veces con PBS filtrado y se incubaron a 37°C, protegido de la luz, con un anticuerpo obtenido en cabra anti-IgGs de conejo conjugado con Alexa Fluor 647 (1:500) (Thermo Fisher Scientific, EEUU), durante 1 hora. Finalmente, las muestras se lavaron 4 veces con PBS filtrado y los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos con el medio de montaje con DAPI Vectashield (Vector Laboratories, EEUU). Las muestras se observaron utilizando un microscopio invertido Leica DM5500B (Leica Microsystems, Alemania).

Como control positivo de permeabilización se emplearon las células de la misma línea celular HL-1 cultivadas y fijadas tal como se describió previamente, pero permeabilizadas con una solución compuesta por el detergente NP-40 (Sigma Aldrich, EEUU). Como controles negativos se emplearon células sin la incubación con las VEs y células HL-1 sin permeabilizar con la solución de NP-40.

3.8. Determinación del movimiento intracelular de calcio provocado por las VEs de *T. cruzi* usando el colorante Fluo4-AM

Un cultivo de células Vero en número similar a las usadas en experimentos anteriores (1×10^5 células) fueron cultivadas durante 24 horas en cámaras rectangulares de 8 pocillos (Ibidi), utilizando dos medios de cultivo diferentes, a fin de poder determinar si ocurría un movimiento intracelular de calcio al incubar las células con las VEs de *T. cruzi* y conocer si dichas concentraciones de Ca^{2+} libre citosólico provenían de los depósitos intracelulares del catión o del medio externo. Antes de realizar los experimentos, las células se cultivaron en medio de cultivo MEM sin rojo fenol (Gibco, EEUU), con el fin de no interferir con la fluorescencia generada por la excitación de la sonda fluorescente en presencia de dicho catión, el cual fue suplementado con 10% de SFBI. En otros casos se empleó medio MEM

sin rojo fenol (Gibco, EEUU) suplementado con 10% de SFBI y 2.5 μM de EDTA como quelante de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . Posterior a las 24 h de incubación, las células se lavaron tres 3 veces con medio MEM sin rojo fenol y medio MEM sin rojo fenol más 2.5 μM de EDTA, respectivamente, se incubaron a 37°C durante 20 minutos en cada medio de cultivo libre de SFBI, incluido un medio de cultivo de composición similar al MEM pero sin iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , a los que se les adicionó la sonda fluorescente Fluo4-AM (Thermo Fisher Scientific, EEUU) a la concentración 40 μM . El Fluo4 es un indicador específico que exhibe un aumento en la fluorescencia al unirse al Ca^{2+} intracelular libre. El colorante presenta un grupo AM (éster de acetometilo) que se libera dentro de la célula al ser cortado por la acción de las esterasas (Martins et al., 2015), lo que impide la salida de la célula de la sonda fluorescente. El posible efecto de las VEs sobre los movimientos de Ca^{2+} se llevaron a cabo sobre aquellas células ya incubadas con el colorante Fluo4-AM, a las que se les retiró el sobrenadante con el exceso de colorante que no entró en las células y se les agregaron las VEs resuspendidas en cada uno de los medios de cultivo antes aludidos, con el objetivo de determinar el origen de los posibles movimientos intracelulares del calcio.

El efecto en la movilización de calcio fue observado cada 5 minutos hasta los 25 minutos, en un microscopio confocal Nikon A1 (Nikon Instruments, Japón) equipado con objetivos de 10x, 20x multi-inmersión, 40x aceite, 60x aceite y 60x agua y con un sistema de incubación de células que las mantuvo a 37°C con un 5% CO_2 . El Fluo4 se excitó a 494-506 nm y la emisión de luz se detectó a 516 nm.

En los experimentos se incluyeron controles basales de fluorescencia en las células antes de la aplicación de las VEs, así como controles positivos para los que se emplearon el ionóforo de calcio A23187 o calimicina (Sigma Aldrich, EEUU), a una concentración 4 μM en medio MEM y el inhibidor de las fosfodiesterasas de AMPc y GMPc, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma Aldrich, EEUU), a 100 μM , diluido en el medio sin calcio. Este último compuesto, como la mayoría de las xantinas, induce la liberación de

calcio de los depósitos intracelulares. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia durante los diferentes tiempos de incubación se realizó utilizando el software “Fiji is just” de ImageJ.

3.9. Observación del efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre el citoesqueleto (filamentos de actina y vimentina) mediante microscopía láser confocal

Para llevar a cabo estos experimentos se partió de cultivos de células Vero mantenidas como se ha descrito previamente. Después de 24 horas, las células fueron lavadas con medio MEM y se incubaron durante diferentes tiempos con la dosis de VEs (DE50) durante 2 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, los cubreobjetos con las células se lavaron 3 veces con PBS estéril y fueron fijados con acetona fría (Scharlab, España) durante 15 minutos a -20°C, con la idea de que la fijación permitiese a su vez la permeabilización de las membranas celulares y dejara accesibles los antígenos intracelulares del citoesqueleto. El proceso de fijación se llevo a cabo en diferentes tiempos de incubación (15, 30 y 120 minutos y 24 horas). Tras la fijación con acetona y con el fin de asegurar la correcta exposición de los antígenos citoplasmáticos, se realizó una segunda permeabilización con una solución de tritón X-100 (Sigma Aldrich, EEUU) al 0.1% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron con un anticuerpo policlonal anti-vimentina producido en conejo (Thermo Fisher Scientific, EEUU) en una dilución 1:300 (a 5 µg/mL) durante 1 hora, lavándose 4 veces con PBS filtrado e incubándose nuevamente a 37°C con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), a una dilución 1:500. Los cubreobjetos se lavaron 4 veces con PBS filtrado y, finalmente, las células fueron incubadas con una solución de faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich, EEUU) durante 30 minutos para poder visualizar de forma conjunta a la actina junto a la vimentina. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS filtrado y agua miliQ

y se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje conteniendo DAPI Vectashield (Vector Laboratories, EEUU). Las muestras se observaron en un microscopio invertido confocal Leica DM5500B (Leica Microsystems, Alemania), obteniéndose imágenes de las preparaciones realizadas a los diferentes tiempos. Como controles del experimento se emplearon células Vero sin la incubación con las VEs a los mismos tiempos que los de los grupos experimentales. Se realizó también un control incubando las células con el último sobrenadante del proceso de purificación de las VEs, posterior a su separación del botón con las vesículas, con la finalidad de evidenciar si los posibles efectos se producían como consecuencia de algún otro producto del secretoma independientemente de las exovesículas y un control de fluorescencia incubando las células solamente con el anticuerpo secundario.

3.10. Efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre el ciclo celular

3.10.1. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos sobre el ciclo celular de la incubación de las células con las VEs del parásito, cultivos de células se sincronizaron y se incubaron durante 2 h con VEs de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*. La sincronización del ciclo celular en la fase S se realizó como ya ha sido descrito, cultivándose las células en medio MEM suplementado con 10% SFBI más antibióticos y timidina 25 mM durante 12 horas (Osuna et al., 1984). Trascurrido el periodo de sincronización, se retiró el medio con timidina y se reemplazó con medio MEM suplementado con 10% de SFBI más antibióticos, tras varios lavados. Después de una hora, las células se lavaron tres veces con MEM y se incubaron con las VEs durante 2 horas, tiempo tras el que se lavaron con medio MEM y se mantuvieron en cultivo durante 8 horas. Transcurridos estos tiempos, los medios de cultivo se eliminaron y las células se despegaron de la placa, en frío, con una solución de EDTA 0.5% en PBS, centrifugándose y lavándose las células tres veces durante 5 minutos a 300 xg. Posteriormente, las células se fijaron en etanol al

70%, se incubaron a 37°C durante 15 minutos con una solución compuesta por 0.2 M fosfato de sodio dibásico y 0.1 M ácido cítrico y se lavaron nuevamente con PBS estéril. Finalmente, las células se tiñeron con una solución de yoduro de propidio (40 mg/mL) y RNAsa (100 mg/mL) durante 30 minutos, de acuerdo con la metodología descrita por Carrasco y colaboradores (2014) (Carrasco et al., 2014) para ser posteriormente procesadas en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, EEUU). Los experimentos se realizaron por triplicado, analizándose los resultados con el software FlowJo v 7.6.5 (Tree Star, Inc., EEUU).

3.10.2. Análisis de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma mediante Western blot

La proteína del retinoblastoma es una proteína que pertenece a una familia proteica esencial en el control de la progresión del ciclo celular en células de mamíferos (Lohez et al., 2003). Junto con la proteína p53, la familia de la proteína del retinoblastoma puede inducir la interrupción del ciclo celular en la fase G1 en respuesta a señales de estrés. El bloqueo en la progresión del ciclo parece estar relacionada con el estado de fosforilación de las proteínas de esta familia, regulado a su vez por la actividad de las kinasas dependientes de ciclina (Lohez et al., 2003). Tras haber realizado una serie de experimentos relacionados con el efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo, se quiso evaluar la existencia de posibles cambios a nivel de la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRB y pRB fosforilada) durante la incubación de las células a diferentes tiempos con las VEs del parásito.

A las 24 horas de realizarse los cultivos celulares en las condiciones antes mencionadas, las células fueron lavadas 3 veces con MEM sin SFBI, incubándose con las VEs de *T. cruzi*, como ya ha sido mencionado, a la dosis DE50 calculada. La incubación se llevó a cabo a tiempos variables de 5, 10, 30 y 60 minutos. Después de cada tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron 2 veces con PBS estéril, se separaron de la

superficie de cultivo mediante el uso de un “cell scraper” y se lisaron con 300 μ L de tampón de lisis RIPA al que se le adicionó un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, Suiza). Tras 15 minutos en dicho tampón y mantenidos a 4°C, los lisados celulares se centrifugaron a 14000 xg durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a nuevos microtubos para ser almacenados a -20°C. Previo a la congelación, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas del lisado celular utilizando el método colorimétrico Bradford (Sigma Aldrich, EEUU), como se describe a continuación.

3.10.2.1. Determinación de proteínas mediante el método colorimétrico Bradford

El método de Bradford consiste en la unión del colorante Coomassie Blue G-250 a las proteínas para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el que presenta el colorante libre (Bradford, 1976). Este método tiene un límite de detección de 1-20 μ g/mL. Para poder llevar a cabo la determinación de la concentración de proteínas en las muestras, se preparó una curva patrón usando como estándar una solución de BSA, como se muestra en la Tabla 3.10.2.1. Los valores de las muestras se extrapolaron de la curva tras llevar a cabo las medidas espectrofotométricamente.

Tabla 3.10.2.1. Volúmenes y reactivos empleados para la preparación de la curva patrón de BSA y cuantificación de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford.

Concentración final de BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de BSA a 0.1 mg/mL (μL)	Volumen de agua (μL)	Volumen del reactivo de Bradford (μL)
0	0	800	200
1	10	790	200
2	20	780	200
4	40	760	200
6	60	740	200
8	80	720	200
10	100	700	200

Para llevar a cabo las medidas de las muestras, se mezclaron 5 μL de cada una de las muestras con 795 μL de agua destilada a las que se añadieron 200 μL del reactivo de Bradford, dicha mezcla fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente. La concentración de proteínas se determinó mediante espectrofotometría, realizándose la lectura a 595 nm en un lector de placas Multiskan® Spectrum (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

3.10.2.2. Análisis de la fosforilación de la proteína pRb mediante Western blot

Después de la cuantificación de las proteínas mediante el método anteriormente descrito, se realizó la separación de dichas proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE, donde se visualizaron las bandas de las proteínas mediante la tinción de una parte del gel cortado longitudinalmente con el colorante azul de Coomassie. Comprobada la calidad de la electroforesis realizada, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas separadas en la electroforesis a membranas de PVDF de 0.2 μm de tamaño de poro (Bio-Rad Laboratories, EEUU), como se describió en las secciones 3.3.4.1, 3.3.4.2 y 3.3.4.3. Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas en tampón de bloqueo, en agitación suave a 4°C durante toda la noche, tras lo

cual se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado, para después incubarse con los anticuerpos primarios anti-pRb (obtenido en oveja) diluido 1:2000 (Cytoskeleton, EEUU) y anti-pRb fosforilado (obtenido en conejo) a una dilución 1:1000 (Cytoskeleton, EEUU) durante toda la noche, a 4°C en agitación suave. Las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa, un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgGs de oveja (1:5000) (Dako Agilent Pathology Solutions, EEUU.) en el caso de las membranas incubadas previamente con el anticuerpo primario anti-pRb y un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgGs de conejo (Dako Agilent Pathology Solutions) en el caso de las membranas incubadas previamente con el anticuerpo anti-pRb fosforilada. La unión de dichos anticuerpos se visualizó utilizando el sustrato Clarity® ECL Western substrate en un aparato de análisis de imágenes ChemiDoc®.

Después de la captura de las imágenes, las membranas se lavaron con una solución ácida a pH 2.3 durante 2 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz y con agitación suave, con el fin de eliminar los anticuerpos unidos y poder reutilizar esas mismas membranas para poder llevar a cabo el control de carga de las muestras. Después de 2 horas de lavado con esta solución, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado para Western blot, volviéndose a bloquear la membrana de la misma manera mencionada anteriormente. El protocolo para el Western blot se realizó de la misma forma anteriormente descrita. Como anticuerpo primario control se empleó un anticuerpo anti-tubulina obtenido en oveja (Cytoskeleton, EEUU) a una dilución 1:500 y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgGs de oveja marcado con peroxidasa, a una dilución 1:5000, diluciones recomendadas por la casa comercial suministradora de los anticuerpos.

3.11. Análisis del efecto de la VEs sobre la apoptosis celular mediante citometría de flujo

Para este experimento, 1×10^6 células Vero se cultivaron en placas NUNC de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU) durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con MEM y se pre incubaron con las VEs durante 2 horas. Posteriormente, a cada pocillo se le agregó una concentración conocida de Taxol. El Taxol o paclitaxel es un agente antineoplásico ampliamente utilizado, el cual, a bajas concentraciones, es un potente inhibidor de la replicación de células eucarióticas. Este fármaco es capaz de bloquear las células en la fase G2/M del ciclo celular y de provocar la apoptosis al inducir la fosforilación de Bcl-2 (Yeung et al., 1999).

Para estos experimentos se emplearon dos concentraciones de Taxol, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la adición del compuesto, se siguieron agregando dosis de VEs cada 8 horas (dado que el efecto observado sobre las células de las VEs fue aproximadamente de 8 h, como se podrá observar en la sección de Resultados), durante las 72 horas que duró el experimento. A este tiempo, se retiraron los sobrenadantes de los pocillos y las células se separaron de la superficie de cultivo mediante el uso de una solución de EDTA 0.5% en PBS, como ya se ha descrito. Las células se lavaron con PBS estéril frío (4°C) y se centrifugaron a 300 xg durante 10 minutos, procesándose los botones obtenidos para la detección de células en necrosis o apoptosis mediante citometría de flujo con 10 μL de “binding buffer” 10X y 1 μL de anexina V-FITC (Trevigen, EEUU), preparados en 81 μL de agua destilada. Las muestras se mezclaron suavemente y se incubaron durante 15 minutos protegidas de la luz, a temperatura ambiente. Inmediatamente antes del análisis, se agregaron 8 μL de yoduro de propidio y 400 μL de “binding buffer” 1X a cada muestra. Las muestras se procesaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, EEUU). El análisis de los resultados se realizó con el software FlowJo v 7.6.5 (Tree Star, Inc., EEUU).

Como controles positivos del experimento se emplearon células incubadas únicamente con el Taxol y como controles negativos se emplearon células sin ningún tipo de tratamiento. Un control de células incubadas solamente con las VEs fue igualmente incluido en el análisis. Como controles de calibración del citómetro de flujo se emplearon células resuspendidas solamente en “binding buffer” 1X, con el fin de determinar la posible autofluorescencia y células tratadas con Taxol, teñidas solamente con anexina V-FITC y por último, células tratadas con Taxol y teñidas solamente con yoduro de propidio, ambas para definir los límites de cada población en el equipo.

3.12. Análisis de la expresión de los genes *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* mediante RT-qPCR en células incubadas con las VEs de *T. cruzi*

La familia de las Rho GTPasas es una familia de 22 proteínas que pertenece a la superfamilia de proteínas Ras (Yeung et al., 1999; Jaffe & Hall, 2005). Las alteraciones en la señalización mediada por estas proteínas conllevan a la transformación celular, anormalidades neurológicas y enfermedades inmunológicas.

El análisis de la expresión de los genes *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* se llevó a cabo mediante una PCR cuantitativa en tiempo real. En este caso, cultivos de 1×10^6 células Vero se incubaron con las VEs durante 15 minutos, 30 minutos y 4 horas. Transcurrido estos diferentes tiempos de incubación, se realizó la extracción de RNA de las células con TriZol (Invitrogen), las muestras purificadas de RNA se trataron con DNAsas libres de RNAsas y se llevó a cabo la retrotranscripción a cDNA como se describirá más adelante. La determinación de los niveles de expresión genética se realizó empleando RT-qPCR, técnica que se realizó siguiendo los lineamientos de la MIQE (“Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments”) publicados por Bustin y colaboradores (Bustin et al., 2009).

3.12.1. Extracción de RNA de las células incubadas con las VEs de *T. cruzi*

Cultivos de células Vero partiendo de 1×10^6 células se prepararon en placas NUNC de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y se incubaron con las VEs de *T. cruzi* durante 15 minutos, 30 minutos y 4 horas, como ya ha sido descrito. Transcurridos los tiempos de incubación de las células con las VEs del parásito, se eliminó el medio de cultivo y se les añadieron 500 μL de TriZol (Thermo Fisher Scientific, EEUU) por pocillo a las monocapas celulares, el cual se incubaron durante al menos 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 μL de cloroformo durante 3 minutos, con el fin de deslipidizar las muestras, realizándose una centrifugación a 12000 xg durante 15 minutos. La fase acuosa obtenida, conteniendo el RNA, se transfirió a un nuevo microtubo al que se agregaron 250 μL de isopropanol. Esta mezcla se incubó durante 10 minutos y se centrifugó nuevamente a 12000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón se resuspendió en 500 μL de etanol 75%, sometiéndose a agitación suave, para después centrifugarse a 7500 xg durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido fue descartado y el botón se dejó secar durante 5 minutos, para posteriormente resuspenderlo en 30 μL de agua libre de RNAsas e incubarlo en un baño a 60°C durante 15 minutos. El RNA obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

Todos los pasos de incubación y las centrifugaciones se llevaron a cabo en frío (4°C). Las muestras de RNA se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU). La pureza del RNA se determinó evaluando el índice A260/A280 de las medidas obtenidas con el Nanodrop, el cual debía mantenerse entre 1.9 y 2.1 para ser considerado como aceptable.

3.12.2. Tratamiento de las muestras de RNA con DNAsa y retrotranscripción a cDNA

Para llevar a cabo la retrotranscripción se utilizó el sistema QuantiTech Reverse Transcription Kit de QIAGEN (Alemania), un kit

comercial con un protocolo rápido para la síntesis de cDNA y eliminación del DNA genómico que pudiera dar lugar a falsos resultados. Para ello, las muestras de RNA y el tampón “gDNA Wipeout buffer” se descongelaron en hielo, mientras que el resto de reactivos se descongeló a temperatura ambiente, se mezclaron y centrifugaron rápidamente para recoger todo el contenido incluido el existente sobre las paredes de los tubos, manteniéndose en hielo hasta su uso.

El primer paso que se realizó fue la eliminación del DNA genómico en cada una de las muestras. Para ello, se preparó una mezcla de 10 μ L de agua libre de RNAsas, 2 μ L del “Wipeout buffer” 7X y 2 μ L del RNA obtenido previamente. Esta mezcla se incubó durante 2 minutos a 42°C colocándose posteriormente en hielo, mientras se preparaba el master mix para la transcripción reversa, el cual consistió en 4 μ L del buffer RT 5X, 1 μ L de la mezcla de primers RT y 1 μ L de la transcriptasa reversa Quantiscript (QIAGEN, Alemania). Los 6 μ L de master mix se agregaron a los 14 μ L de la mezcla de reacción de eliminación del DNA genómico y se incubó durante 15 minutos a 42°C, seguido de 3 minutos a 92°C para inactivar la enzima transcriptasa reversa. La concentración y calidad del cDNA se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher), estudiando la razón obtenida de medir la absorbancia a 260 nm y a 230 nm (A260/A230), la cual debía mantenerse entre 1.8 y 2.0. La presencia de cDNA se confirmó mediante una PCR para amplificar el gen 18S del RNA ribosomal.

3.12.3. Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de la expresión de los genes de las Rho GTPasas *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42*

Para la cuantificación de la expresión de los diferentes genes objeto de este estudio, se utilizaron oligonucleótidos diseñados mediante un análisis de secuencias utilizando la herramienta BLAST, del National Center for Biotechnology Information, excepto en el caso del gen *RhoA*, donde se empleó el par de oligonucleótidos descrito por Wang y colaboradores en 2015 (Wang et al., 2015). Antes de realizar la RT-qPCR, se evaluaron los

oligonucleótidos diseñados mediante una PCR convencional en la que se visualizaron las bandas originadas fruto de la amplificación por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X. En el gel se incluyó un marcador de peso molecular de DNA de 50 a 1000 pb.

La reacción de PCR y el programa de amplificación se muestran en la Tabla 3.13.3.1.

Tabla 3.12.3.1. Reactivos y cantidades empleadas para las reacciones de PCR que amplifican los genes *RhoA*, *Rac1*, *Cdc42*, *GAPDH* y *18S*.

Reactivo	Cantidad (µL)
Agua	5.8
Tampón 5X	2
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTPs	2
Oligonucleótido-F (10 mM)	1.5
Oligonucleótido-R (10 mM)	1.5
Horse power Taq DNA polimerasa	0.2
DNA	5

Las condiciones de PCR empleadas fueron: una incubación inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 62°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C durante 30 segundos. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos. Como control positivo se utilizó DNA de células Vero y como control negativo agua libre de nucleasas en vez del cDNA o DNA.

Las secuencias de las sondas de amplificación empleadas se muestran en la Tabla 3.12.3.2. Como genes normalizadores se emplearon el *GAPDH* y el *18S*.

Tabla 3.12.3.2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de Rho GTPasas. Se incluyen las secuencias de los genes empleados como normalizadores (*GAPDH* y *18S*).

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (pb)
RhoA	F: 5'-TTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTA-3' R: 5'-CACGTTGGGACAGAAATGCTTG-3'	179
Rac1	F: 5'-TGCAAAGTGGTATCCTGAGGTGCG-3' R: 3'-GCGGATAGGTGATGGGAGTCATCAGC-5'	122
Cdc42	F: 5'-CCTCCAGAACCGAAGAAGAGCCG-3' R: 3'-AGTGCATGTGGGTAGGTGCAGGG-3'	178
GAPDH	F: 5'-GCAAGTTCATGGCACCGTGAAG-3' R: 3'-AGGCGTTGCTGACGATCTTGAGGC-3'	239
18S	F: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' R: 3'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	151

Con la confirmación de la amplificación mediante la PCR convencional se procedió a realizar una curva patrón para calcular la eficiencia de cada par de oligonucleótidos, la cual fue incluida en el software del termociclador para calcular los valores relativos de expresión. En este caso, el cDNA se amplificó con el reactivo SsoFast® EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, EEUU), en el termociclador CFX-96 Real Time System (Bio-Rad Laboratories, EEUU). La mezcla de reacción para la RT-qPCR se muestra en la Tabla 3.12.3.3.

Tabla 3.12.3.3. Reactivos y cantidades empleadas en las RT-qPCR.

Reactivo	Cantidad (μL)
SsoFast EvaGreen Supermix	5
Agua	1
Oligonucleótido-F	1
Oligonucleótido-R	1
Muestra de cDNA	1

La cantidad de cDNA empleada para cada reacción fue de 50 ng y las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de calentamiento de 2 minutos

a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos y annealing a 60°C durante 10 segundos. Posteriormente las muestras se calentaron a 95°C durante 30 segundos, seguidas de un paso de 30 segundos a 65°C y una curva de melting desde los 65°C hasta los 95°C (0.05 segundos). Cuando la amplificación terminó, las muestras se mantuvieron a 12°C. Cada muestra se analizó por triplicado.

Las muestras fueron cuantificadas en función de la fórmula del incremento de ΔCT en el cual la proporción del gen = $2^{-(CT_{\text{gen de referencia}} - CT_{\text{gen problema}})}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.13. Fosforilación de la RhoA GTPasa

La mayoría de las Rho GTPasas mantienen un ciclo entre una forma activa unida a GTP y una conformación inactiva unida a GDP, con el fin de regular su habilidad de activar proteínas efectoras y generar las respuestas celulares (Hodge & Ridley, 2016). Como ya se ha mencionado, las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42 participan en diferentes procesos celulares en los que interviene el citoesqueleto, el ciclo celular, y la apoptosis, entre otros. En el caso en concreto de la proteína RhoA, a nivel molecular es capaz de regular la actividad de múltiples factores de transcripción como ROCK, Cdc42 y Rac1 (Berrier & Alahari, 2011), siendo esta proteína la principal implicada en la polimerización de los filamentos de actina. Es por esto que se decidió evaluar el efecto de las VEs en la fosforilación de esta proteína y, por tanto, en la actividad de las proteínas efectoras ROCK1 y ROCK2.

Para este experimento, monocapas de células Vero se sembraron en placas de 6 pocillos (5×10^5) como en los experimentos anteriores y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas, tiempo en el que se lavaron e incubaron con las VEs de los tripomastigotes durante 5, 10, 15 y 30 minutos. Transcurrido cada uno de los tiempos, las células se lavaron con PBS estéril, se lisaron con tampón de lisis RIPA y se cuantificó la concentración de proteínas con el método colorimétrico de Bradford. Así, 60 μg de cada muestra fueron sometidos a una electroforesis SDS-PAGE en geles de

poliacrilamida y a una posterior transferencia a la membrana de PVDF para realizar los Western blots, utilizándose como anticuerpos primarios los anticuerpos anti-RhoA fosforilado (pSer 188) (Sigma Aldrich, EEUU) (1:500), anti-RhoA (1:1000), anti-ROCK1 (Sigma Aldrich, EEUU) (1:1000) y anti-ROCK2 monoclonal (clon 2A4) (Sigma Aldrich, EEUU) (1:1000), los tres primeros producidos en conejo y el último producido en ratón. Se siguió el protocolo descrito en la sección 3.3.4.3 para realizar los Western blots y, posterior al revelado de cada membrana, se lavaron con solución ácida, tras lo que se incubaron con el anticuerpo control de carga, un anticuerpo anti-GAPDH preparado en ratón (Sigma Aldrich, EEUU) (1:5000), continuándose el Western blot como ya se ha descrito. Como controles positivos del experimento se realizó la incubación de las células con trombina (20 μ M) (Sigma Aldrich, EEUU) y con ácido lisofosfatídico (LPA) (40 μ M) (Sigma Aldrich, EEUU), este último agregado a los cultivos celulares mantenidos en medio MEM sin SFBI durante 24 horas previo a su adición, según lo descrito por Shaw y colaboradores y Leve y colaboradores (Shaw et al., 1998; Leve et al., 2011). Se incluyó un control de células sin la incubación con las VEs para cada tiempo.

3.14. Formación *in vitro* de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* y observación de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*, IgGs anti-*T. cruzi* e inmunocomplejos mediante microscopía de fuerza atómica

3.14.1. Producción de anticuerpos policlonales anti-*T. cruzi* para la purificación de las IgGs

La producción de anticuerpos policlonales anti-*T. cruzi* se realizó mediante la inyección intraperitoneal de ratones hembra de 6 semanas de la cepa CD1 con 5 μ g de un lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4, el cual fue sometido a 3 ciclos de congelación/descongelación (-80°C/0°C) y a 2

minutos de sonicación en ciclos de 10 segundos, con 10 segundos de descanso entre ciclos. El lisado del parásito se diluyó en PBS estéril y la primera inmunización se realizó mezclando la solución de proteínas del parásito con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich, EEUU) (200 μ L volumen final). Después de la primera inmunización, se realizaron inmunizaciones con una periodicidad semanal, inyectando el lisado mezclado en una misma proporción de adyuvante pero en estos casos ya bajo la forma de adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich, EEUU), hasta completar 6 semanas. Después de la segunda inmunización, se extrajo sangre de los animales cada 7 días post inyección del antígeno, con el fin de ir evaluando la respuesta de anticuerpos en función del título que presentaban. Finalmente, una semana después de la última inmunización, los animales se anestesiaron con isofluorano (Forane) (Abbot, EEUU) y se sacrificaron por exaguinación mediante punción cardíaca. La sangre se recolectó en tubos BD Microtainer (Beckton Dickinson & Company, EEUU), se dejó coagular durante 15 minutos y se centrifugó a 5000 xg durante 5 minutos, con el fin de obtener el suero. El suero obtenido se almacenó en alícuotas a -20°C , diluidas con glicerol en una proporción 1:1.

Previo a la primera inmunización de los animales con el lisado del parásito, se realizó la extracción de sangre por punción en la vena submandibular, con el fin de obtener el suero pre inmune y emplearlo como control negativo. El título de anticuerpos para el suero de cada animal se obtuvo utilizando la técnica ELISA, en placas Nunc® de 96 pocillos recubiertas con 5 μ g del lisado de tripomastigotes como se describe a continuación.

3.14.2. Determinación del título de anticuerpos mediante ELISA

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado en una fase sólida, empleando anticuerpos marcados con una enzima que, al ser incubada con su sustrato, genera una reacción

colorimétrica en función de la cantidad de enzima inmovilizada en la reacción antígeno-anticuerpo.

Para determinar el título de anticuerpos de los sueros, 5 µg del lisado de tripomastigotes diluidos en tampón carbonato pH 9.6 fueron adsorbidos en los pocillos de placas Nunc® de 96 pocillos. La adsorción del antígeno a la placa se realizó manteniendo la solución del antígeno en tampón carbonato pH 8.2 en los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación constante. Transcurridas las 2 horas, la placa se lavó 3 veces con tampón de lavado compuesto por 0.3% Tween-20 en PBS y a cada pocillo se agregaron 250 µL de una solución de bloqueo compuesta por 2% leche en polvo desnatada y 0.1% Tween-20 en PBS, la cual se incubó a 4°C durante toda la noche, en agitación. La solución de bloqueo fue eliminada mediante 3 lavados con tampón de lavado para añadirse diluciones seriadas de los sueros a ensayar, desde 1/100 hasta 1/25600, preparadas en PBS estéril. La incubación de las diluciones de los sueros se llevó a cabo a 37°C durante dos horas en agitación suave. Posteriormente, la placa se volvió a lavar de la misma manera y se colocó una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas totales de ratón marcado con peroxidasa (Dako Agilent Pathology Solutions, EEUU). La placa con el anticuerpo secundario se incubó durante una hora bajo las mismas condiciones y tras el lavado, se procedió al revelado añadiendo 100 µL de una solución de sustrato de la peroxidasa a cada pocillo, compuesta por 12.5 mL tampón citrato (0.1 M ácido cítrico, 0.1 M citrato de sodio, pH 5), 12.5 mL agua destilada, una pastilla de OPD (Sigma Aldrich, EEUU) y 25 µL de peróxido de hidrógeno. La placa se incubó protegida de la luz a 37°C durante 30 minutos y después se interrumpió la reacción con 50 µL de la solución de parada, compuesta por 3 M HCl en agua destilada. La lectura se realizó a 492 nm, en un lector de placas MultiSkan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, EEUU). El punto de corte del ensayo se realizó calculando la media de la absorbancia del control negativo \pm 3 veces la desviación estándar obtenida.

3.14.3. Obtención de las IgGs a partir del inmunisero en ratón anti-*T. cruzi* y preparación de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi*

Para obtener las IgGs presentes en los inmuniseros obtenidos, se partió de 600 μL del suero de ratón que se cromatografió en una columna HP spin trap de proteína G (GE Healthcare, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para esto, la columna fue centrifugada con el fin de extraer el líquido de almacenamiento que contiene y se equilibró con 600 μL de tampón de acoplamiento. La columna con el tampón fue centrifugada de nuevo y posteriormente a la que se agregaron 600 μL de la muestra de suero que se incubó durante 4 minutos en agitación, con el fin de que las IgGs de la muestra interaccionaran con la proteína G ligada a la sefarosa. Transcurridos 4 minutos, la columna se centrifugó y se lavó dos veces con 600 μL de tampón de acoplamiento para eliminar los restos de las otras inmunoglobulinas no ligadas y el resto de las proteínas del suero y continuar posteriormente con el paso de elución, para el que se agregaron 100 μL de tampón de elución a pH 2.7 que se mezcló agitando e invirtiendo la columna. La columna se colocó en un tubo de 2 mL al que previamente se le había agregado 15 μL de un tampón carbonato a pH alcalino (pH 9.2) para neutralizar el eluido, centrifugándose nuevamente para ya así colectar las IgGs, paso que se repitió con otros 100 μL de tampón de elución. Todas las centrifugaciones se realizaron a 100 xg durante 30 segundos, excepto el paso de la elución que se realizó a 70 xg durante 30 segundos. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit comercial micro BCA ya antes descrito.

Para la formación de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi*, 10 μL de la muestra con las IgGs procedentes del inmunisero anti-*T. cruzi* total con un título de 1/12800 se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación con 5 μL de una muestra de VEs (diluida 1:4 en PBS estéril, con una concentración de proteínas de 6.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 100000 xg durante una hora a 4°C para eliminar las IgGs no unidas y el complejo formado se lavó 3 veces con PBS estéril mediante centrifugación en las mismas condiciones antes descritas.

Finalmente, la muestra se resuspendió en 50 μL de PBS estéril y se almacenó a 4°C para su observación mediante microscopía de fuerza atómica y para ser empleada en los experimentos de biodistribución de las exovesículas en animales y la obtención de imágenes *in vivo* mediante el sistema IVIS (Perkin Elmer, EEUU).

3.14.4. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica es una técnica cada vez más empleada en biología celular, ya que permite evaluar la estructura de las proteínas, la ultraestructura de las organelas y la dinámica de las membranas celulares, entre otras (Schaefer et al., 2002; Kuznetsova et al., 2007; Heinisch et al., 2012). En el estudio de las VEs, esta técnica ha sido empleada para caracterizar estructural y mecánicamente VEs aisladas de diferentes fuentes biológicas como saliva (Sharma et al., 2010) y células cancerosas (Whitehead et al., 2015), así como para realizar comparaciones entre las técnicas de aislamiento y poder observar cómo se altera la estructura y tamaño de las exovesículas aisladas (Woo et al., 2016) o para llevar a cabo análisis funcionales del contenido proteico/enzimático de la membrana externa de las VEs, empleando puntas funcionalizadas con anticuerpos (Sharma et al., 2010; Yuana et al., 2010).

La MFA consiste en colocar una punta fina al final de un cantilever que va contactando con la muestra colocada sobre diferentes soportes, incluidas las láminas de mica moscovita. El escaneo se realiza línea por línea y la altura de la punta se ajusta dependiendo de la retroalimentación del aparato. Esta retroalimentación puede venir de la fuerza ejercida por el cantilever sobre la muestra, de la frecuencia de oscilación de la punta, de la amplitud de oscilación de la punta o de una combinación de las anteriores (Parisse et al., 2017). Al final, lo que revela es información sobre la topografía y propiedades mecánicas de la muestra, pudiendo obtenerse imágenes con una resolución de menos de 1 nm y una amplificación de varios millones de veces.

La preparación de las muestras para la determinación de la topografía se realizó de la siguiente manera: en el caso de las VEs y las IgGs anti-*T. cruzi* purificadas, se colocaron 10 μL de cada una de las muestras directamente sobre láminas de mica moscovita para su adsorción. La concentración de proteínas de las muestras de VEs empleadas fue 1.55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (las muestras se diluyeron 1:4) y en el caso de las IgGs, se empleó una dilución 1:100 de una muestra con 1.82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas. La formación de inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* se realizó incubando 10 μL de VEs con 10 μL de una dilución 1:100 de IgGs a 37 °C durante 1 hora, y los inmunocomplejos formados se lavaron 3 veces con PBS estéril filtrado mediante centrifugaciones a 10000 xg, para después depositar 10 μL sobre la superficie de mica moscovita. De todos los sustratos disponibles para microscopía de fuerza atómica, la mica moscovita es fácilmente escindible y representa el sustrato que se emplea más comúnmente en el caso de análisis de imágenes de DNA y proteínas, además de ser la primera elección para el análisis por MFA de las VEs (Pariisse et al., 2017). De hecho, la interacción electrostática entre la superficie de la mica y las vesículas es suficiente para mantenerlas unidas a la superficie aun cuando se lava con agua ultrapura y se secan en corriente de nitrógeno (Palanisamy et al. 2010). Después del proceso de adsorción de las muestras, las láminas de mica se lavaron 3 veces con agua destilada y se dejaron secar al aire durante 10 minutos. Posteriormente se aplicó un flujo suave de nitrógeno para terminar de secarlas.

Las muestras se analizaron por triplicado utilizando un microscopio Park AFM NX20 (Park Systems, Korea), en la unidad de microscopía de fuerza atómica del Centro de Instrumentación Científica, en la Universidad de Granada. Se realizaron medidas de tamaño utilizando el modo no contacto en el caso de las muestras de VEs e IgGs y se emplearon los modos no contacto y “tapping” para las muestras de inmunocomplejos.

El modo no contacto consiste procurar que la punta del cantilever “flote” sobre la superficie de la muestra a una distancia comprendida entre los 50-150 Å, con el fin de detectar las fuerzas de van der Waals que actúan entre

la punta y la muestra y así construir imágenes topográficas al realizarse el escaneo de la punta sobre la superficie de la muestra (Jalili & Laxminarayana, 2004). Por otra parte, el modo “tapping” se basa en MFA de amplitud modulada, la cual detecta cambios en la amplitud de vibración del cantilever oscilante que la usa como una señal de retroalimentación para generar imágenes de alta resolución (San Paulo & García, 2001). El modo de no contacto se empleó para obtener imágenes de topografía colocando en el equipo cantilevers de silicona con forma piramidal con una constante “spring” de $40 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ y una frecuencia de resonancia de 320 kHz. Las imágenes se adquirieron con una resolución de 256 x 256 píxeles con una tasa de escaneo de 0.5-0.7 Hz. Dichas imágenes se procesaron y analizaron con el software XEI (Park Systems, Korea). Imágenes representativas de cada muestra se obtuvieron al escanear al menos en 3 localizaciones diferentes de 3 muestras diferentes.

Además de las imágenes de topografía para realizar las mediciones, se llevó a cabo la determinación de las propiedades mecánicas tales como la rigidez, el módulo de elasticidad longitudinal o módulo de Young y la adhesión en cada una de las muestras. En este caso, se emplearon sondas NSC-14 ($K: 5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ y frecuencia de resonancia: 160 kHz) y las mediciones se realizaron con el modo “PinPoint”, un modo desarrollado para compensar los errores posicionales entre la información topográfica y la espectroscopía de fuerza, ya que con otros modos como el “tapping”, empleado usualmente cuando se trabaja con muestras biológicas, es muy difícil evitar los errores de posición de topografía y espectroscopía de fuerza debido a la naturaleza de las muestras biológicas (suaves y pegajosas en la mayoría de los casos). El procedimiento para llevar a cabo la medición consiste en tres pasos diferentes: 1) el escaneo XY, que se detiene durante la adquisición; 2) la aproximación de la punta a la superficie, que mide las propiedades mecánicas y se retrae de la superficie unos pocos ms (4 ms), con el fin de alcanzar una fuerza de interacción programada (15 Nn) donde 3) se graba la altura de aproximación y se mantiene la distancia Z. En este procedimiento, la fuerza se mantuvo

constante mientras se realizaron las mediciones de las propiedades, para luego retraer la punta y moverse al siguiente píxel. Los valores nanomecánicos se obtuvieron a partir de las curvas de fuerza-distancia (F-d) después del contacto de la punta con la superficie. Los valores obtenidos se consideraran valores relativos.

3.15. Biodistribución de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* y los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* mediante el sistema de análisis de imágenes IVIS

3.15.1. Preparación y tinción de las muestras de VEs e inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi*

Para este experimento se emplearon muestras de VEs y de inmunocomplejos formados como se describió anteriormente, resuspendidos en PBS. En este caso, muestras con 5 µg de proteína se incubaron con una solución 1 mM del colorante DiR (D12731) (Invitrogen, EEUU) durante 45 minutos a 37°C, protegidas de la luz y mantenidas en agitación. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 100000 xg durante una hora a 4°C, lavándose 3 veces con PBS estéril mediante centrifugaciones en las mismas condiciones antes descritas. El botón con las VEs y/o los inmunocomplejos se resuspendió en 50 µL de PBS estéril inyectándose por vía intravenosa en ratones hembra de 6 semanas de la cepa CD1, a través de la vena marginal de la cola.

Con el fin de darles seguimiento puntual y diario de la localización de las VEs o de los inmunocomplejos inyectados, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Forane) (Abbot, EEUU), analizándose en un equipo con un sistema de análisis de imágenes *in vivo* IVIS Spectrum (Perkin Elmer, EEUU) del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Transcurridas 72 horas, un animal de cada grupo se sacrificó, se les extrajeron los órganos donde se visualizaron la presencia de las vesículas teñidas con el

colorante en el IVIS a la longitud de onda correspondiente a la emisión en el infrarrojo (excitación: 750 nm, emisión 780 nm), a al cual emite el DiR.

El ensayo se realizó por triplicado con 4 animales por grupo más un ratón que se consideró el blanco del experimento, al que se le inyectó solo una solución de PBS estéril tratada con el colorante. Para la localización y movimientos del DiR en dicho animal, el mismo fue tratado y observado bajo el IVIS bajo las mismas condiciones descritas previamente para los ratones inoculados con las VEs o los inmunocomplejos. Como controles del experimento se emplearon grupos de animales inyectados con VEs de células Vero, inmunocomplejos formados por VEs de células Vero con el anticuerpo anti-CD9 (Sigma Aldrich, EEUU), tratados de igual forma a la formación de los inmunocomplejos con las IgGs anti-*T. cruzi*. El CD9 corresponde a una tetraspanina considerada como un marcador presente en los exosomas de las células de mamífero. Otros controles empleados fueron ratones inyectados con las VEs de *T. cruzi* incubadas con un suero pre inmune y ratones inyectados con un “pseudoinmunocomplejo” preparado incubando las VEs con las fracciones Fab de las IgGs anti-*T. cruzi* obtenidas previamente. Para ello, tras la comatografía con la columna de proteína G de las inmunoglobulinas anti-*T. cruzi* de ratón, las IgGs fueron tratadas con papaína, una cisteín proteasa, enzima capaz de cortar a las IgGs en los enlaces disulfuro y así generar de forma separada los fragmentos Fab y Fc. Para este experimento se emplearon 500 μ L de papaína inmovilizada en agarosa (Thermo Fisher Scientific, EEUU), la cual se mezcló con 500 μ L del tampón de digestión al que se agregó cisteína-HCl a una concentración final de 20 mM justo antes del momento de usarse. Para equilibrar el gel se agregó 1 mL de tampón de digestión (descrito en el apartado de soluciones) y se centrifugó a 100 xg durante 30 segundos. El gel con la papaína se resuspendió en 500 μ L del tampón de digestión al que se colocaron 500 μ L de la muestra de IgGs purificadas previamente diluida con 500 μ L del tampón de digestión. La muestra se incubó en agitación con la papaína durante 2 horas a 37°C, agregándose posteriormente 1.5 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, para recoger

el sobrenadante después de una nueva centrifugación a 100 xg durante 30 segundos, reteniéndose en el botón la enzima ligada a la agarosa. El sobrenadante obtenido con las fracciones Fab y Fc se procesó 2 veces por una columna de proteína G, con el fin de obtener fracciones Fab puras en el primer eluido al quedar retenidas las regiones Fc en la proteína G inmovilizada.

La confirmación de la separación de las fracciones se realizó mediante una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida y posteriormente, un Western blot para evidenciar el reconocimiento de las proteínas de las VEs de los tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* por las IgGs obtenidas anti-*T. cruzi*. El reconocimiento de la proteína CD9 presente en las VEs procedentes de las células Vero se llevó a cabo por igual procedimiento mediante un anticuerpo anti-CD9 (Thermo Fisher Scientific, EEUU) empleado en el Western blot, siguiendo el protocolo ya descrito.

El empleo de animales de laboratorio para los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se realizó siguiendo los requerimientos de bioética de la Junta de Andalucía y la Universidad de Granada con número de expediente 12/11/2017/162

3.16. Análisis y comparación del proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*

3.16.1. Preparación de las muestras de VEs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* Pan4

Para los análisis de proteómica se siguió el mismo protocolo de aislamiento de las VEs que se muestra en la Figura 3.3, con algunas modificaciones dependiendo de las formas del parásito. En el caso del aislamiento a partir de tripomastigotes, estos se incubaron en medio MEM sin suero (Queiroz et al., 2016), con el fin de evitar en lo posible la contaminación con otras proteínas que pudieran interferir en los resultados.

En el caso del aislamiento a partir de epimastigotes, 1×10^7 formas flageladas se cultivaron en medio LIT con SFBI hasta que el cultivo alcanzara la fase estacionaria (aproximadamente al quinto día de cultivo). A partir de este momento, se siguió el mismo protocolo de aislamiento de las VEs a partir de epimastigotes descrito en la sección 3.3, con la variante de que los parásitos fueron cultivados en medio LIT sin suero durante 5 horas. Las VEs obtenidas después de la centrifugación diferencial se lavaron 3 veces en PBS frío sin inhibidores de proteasas y el último botón fue resuspendido en 50 μ L de PBS frío. Tras la cuantificación de proteínas con el kit micro BCA, se dejaron precipitar las proteínas a -20°C durante toda la noche, utilizando 150 μ L de acetona mantenida a -20°C . La eliminación de la acetona se realizó tras una centrifugación a 13000 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C . Después de eliminar el sobrenadante, se realizó un lavado de las muestras con 1 mL de acetona fría, retirándose la acetona de las muestras de la misma forma. Finalmente, los tubos se dejaron abiertos y mantenidos en hielo en una corriente de aire y nitrógeno, con el fin de evaporar los restos de acetona. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta que fueron enviadas para su análisis. Cada muestra usada en la secuenciación contenía 40 μg de proteína y se analizaron tres muestras por cada una de las fases biológicas del parásito.

El análisis de las muestras se realizó mediante cromatografía líquida de fase reversa-espectrometría de masas en tándem (RP LC-MS/MS) en modo exclusión dinámica en un equipo LTQOrbitrap-Velos-Pro (Thermo Fisher Scientific, EEUU), en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, en Madrid. Las bases de datos empleadas para la búsqueda fueron UniProt-*Trypanosoma cruzi*_CL Brener, TriTrypDB-*Trypanosoma cruzi*_Sylvio, Uniprot- *Bos taurus* y Uniprot-*Chlorocephalus sabaeus*, utilizándose el algoritmo SEQUEST, a través del software Proteome Discoverer 1.4.

3.16.2. Análisis proteómico de las muestras

Los extractos de proteínas se resuspendieron en 50 μ L de tampón de muestra y se cargaron en un gel para realizar una electroforesis de SDS-PAGE, cuya corrida se detuvo cuando el frente de muestra ingresó unos 3 mm en el gel separador, con el fin de que todo el proteoma se concentrara en la interfase de ambos geles. Las bandas de proteínas no separadas se visualizaron mediante una tinción con azul de Coomassie, se cortaron y se colocaron en tubos de microcentrífuga. Los trozos de gel con las bandas se destiñeron con una solución de acetonitrilo:agua (en proporción 1:1), los enlaces disulfuro se redujeron con DTT 10 mM durante 1 hora a 56°C y los grupos tiol fueron alquilados con iodoacetamida 50 mM durante 1 hora a temperatura ambiente, protegidas de la luz. La digestión se realizó *in situ* con tripsina grado secuenciación (Promega, EEUU), según lo descrito por Schevchenko y colaboradores en 1996 (Shevchenko et al., 1996), con algunas modificaciones. Posteriormente, se eliminó todo el líquido de los trozos de gel empleando acetonitrilo, el cual fue removido y los trozos de gel se secaron para ser tratados con bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.8 más 60 ng/ μ L de tripsina, en una proporción 5:1 proteína:tripsina (v/v). Los tubos con las muestras se mantuvieron en hielo por 2 horas, incubándose a 37°C durante 12 horas, tiempo en el que se detuvo la digestión al agregar ácido trifluoroacético al 1%. Los sobrenadantes se desalaron empleando puntas de pipeta ZipTip C18 (Millipore Corporation, EEUU), puntas de pipeta OMIX C18 (Agilent Technologies, EEUU) o columnas OASIS C18 (Waters, EEUU) hasta el momento del análisis por espectrometría de masas.

Los productos de la digestión desalados se secaron y resuspendieron en 10 μ L de ácido fórmico al 1% y se analizaron mediante RP-LC-MS/MS en un sistema Easy-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas híbrido LTQOrbitrap-Velos-Pro (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Los péptidos se concentraron por cromatografía de fase reversa empleando una precolumna C18 RP de 0.1 mm x 20 mm (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y luego se separaron con una columna C18 RP de 0.075mm x 250 mm (Thermo Fisher

Scientific, EEUU), la cual operaba a 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Los péptidos fueron eluidos mediante un gradiente dual del 5 al 25% de solvente A (ácido fórmico al 0.1% en agua) durante 180 minutos, seguido de un gradiente del 25 al 40% de solvente B (ácido fórmico al 0.1% y 80% de acetonitrilo en agua) durante 240 minutos. Se realizó una ionización por electrospray utilizando una interfase Nanobore emitters Stainless Steel ID 30 μm (Proxeon Biosystems, Dinamarca) y los péptidos se detectaron en escaneos de 400 to 1600 amu (1 μscan), seguido de 15 escaneos MS/MS “data dependent”, empleándose un ancho de aislamiento de 2 u (en unidades de radio masa-carga), energía de colisión normalizada de 35% y exclusión dinámica aplicada en períodos de 30 segundos. Para la identificación de los péptidos se empleó el algoritmo Sequest (Proteome Discoverer 1.4) (Thermo Fisher Scientific, EEUU). La búsqueda se realizó en las bases de datos UniProt-*Trypanosoma cruzi*_CL Brener, TriTrypDB-*Trypanosoma cruzi*_Sylvio, Uniprot- *Bos taurus* y Uniprot-*Chlorocebus sabaues*, considerándose las siguientes restricciones: corte triptico después de Arg y Lys, hasta 2 sitios de corte faltantes y tolerancias de 10 ppm para los iones precursores y 0.8 Da para iones en fragmento MS/MS; la oxidación de Met y la carbamidometilación de Cys fueron permitidas.

3.16.3. Análisis bioinformáticos

Los análisis de enriquecimiento se clasificaron de acuerdo con la ontología génica usando la herramienta de enriquecimiento “trytrip GO Terms” y se incluyó la ontología de la función molecular con un valor de corte $p \geq 0.05$. Los “GO Terms” con valores $p < 1 \times 10^{-5}$ fueron representados como gráficos de dispersión y gráficos interactivos empleándose la herramienta REVIGO (Croacia). Estos análisis fueron realizados por el Dr. Luis Miguel de Pablos Torró, investigador en el Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular de la Universidad de Granada.

3.17. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico se realizó previa comprobación de la normalidad y homocedasticidad de los datos, es decir, si el error cometido por el modelo tiene siempre la misma varianza. Los datos de cuantificación se presentan como la media de tres o más experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Se calcularon las medias y desviaciones estándar en el caso de los tamaños de las VEs obtenidos por NTA y MFA y en todos los recuentos realizados, tanto en los experimentos de invasión como en los de viabilidad celular (experimentos de permeabilización). Se empleó la prueba ANOVA de un factor para detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y las comparaciones múltiples *post hoc* con el test de *Tukey-Kramer* para evidenciar cuáles grupos eran estadísticamente diferentes. En el caso de que los datos no cumplieran con el supuesto de normalidad, se empleó la prueba de *Kruskal-Wallis* y las comparaciones múltiples *post hoc* se realizaron con el test de *Mann-Whitney*, ajustándose los valores *p* obtenidos con la prueba de Bonferroni. Para el experimento de invasión celular con *T. gondii*, se empleó el test de la T de Student. Los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism v5. Valores de $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

3.18. Soluciones, reactivos y medios de cultivo

3.18.1. Cultivo de parásitos, células y aislamiento de las VEs

- LIT (1 L): 4 g cloruro de sodio, 0.4 g cloruro de potasio, 15 g hidrogenofosfato de sodio heptahidratado, 2 g glucosa, 3 g infusión de hígado, 5 g triptona, 2 g hemina. Llevar a 1 L con agua destilada y esterilizar mediante filtración.
- LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBI) (1 L): medio LIT preparado como se describió anteriormente más 100 mL de SFBI filtrado previamente.

- MEM (1 L): 9.53 g Minimum Essential Medium Eagle (Sigma Aldrich, EEUU), 2.2 g carbonato de sodio, 4.4 g HEPES, 0.056 g penicilina, 0.1 g estreptomina, 0.048 g kanamicina, pH 7.2. Llevar a 1 L con agua destilada y esterilizar mediante filtración.
- MEM suplementado con 10% de SFBI (1 L): MEM preparado como se describió anteriormente más 100 mL SBFI filtrado previamente.
- RPMI suplementado con 10% SBFI ultracentrifugado y 25 mM HEPES (1 L): 16.4 g RPMI-1460 medium (Sigma Aldrich, EEUU), 2.2 g carbonato de sodio, 0.134 g penicilina, 0.060 g estreptomina, 0.134 g kanamicina, 100 mL SBFI ultracentrifugado y 5.95 g HEPES, pH 7.4. Llevar a 1 L con agua destilada y esterilizar mediante filtración.
- Claycomb suplementado con 10% de SFBI (100 mL): 87 mL de medio Claycomb (Sigma Aldrich, EEUU), 10 mL de SFBI, 1 mL penicilina/estreptomina (100 U/mL: 100 µg/mL), 1 mL norepinefrina (stock a 10 mM) y 1 mL L-glutamina (stock a 200 mM), pH 7.2. Esterilizar mediante filtración. Suplementar con L-glutamina cada dos semanas. Almacenar protegido de la luz.
- Tripsina-EDTA (400 mL): 0.08 g EDTA y 0.2 g tripsina, pH 7.4. Llevar a 400 mL con agua destilada y esterilizar mediante filtración.
- PBS: 10 mM de fosfato de sodio y 10 mM de fosfato de potasio, pH 7.2. Esterilizar autoclavando 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

3.18.2. Transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos

- Medio TAU: 190 mM de cloruro de sodio, 8 mM de tampón fosfato, 17 mM de cloruro de potasio, 2 mM de cloruro de magnesio y 2 mM de cloruro de calcio, pH: 6. Esterilizar mediante filtración.
- Medio TAU3AAG: medio TAU suplementado con 10 mM de L-prolina, 50 mM de L-glutamato de sodio, 2 mM de L-aspartato de sodio y 10 mM de D-glucosa, pH: 6. Esterilizar mediante filtración.

3.18.3. Tinción de Giemsa

- Tampón de Giemsa: 8 mM hidrogenofosfato monopotásico y 6 mM hidrogenofosfato de sodio, pH 6.8. Preparar una dilución 1:10 del colorante y filtrar en papel de filtro antes de usar.

3.18.4. Geles de agarosa

- Tampón TAE (10X): 0.4 M Tris-acetato, 20 mM EDTA y 11.14 mL ácido acético, pH 8.2 en agua destilada.
- Tampón TAE 1X: 100 mL de tampón TAE 10X y 900 mL de agua destilada.
- Agarosa 2%: 1 g de agarosa en 50 mL de tampón TAE 1X.

3.18.5. Inmunofluorescencia

- Tampón de fijación: 2% formaldehído y 1% glutaraldehído en PBS.
- Tampón de permeabilización: ácido cítrico 10 mM y 10% NP-40 en PBS.
- Tampón de permeabilización (experimentos de citoesqueleto): Tritón X-100 (Sigma) al 0.1% en PBS.
- Tampón de bloqueo: 1% BSA y 0.3 M glicina en PBS.
- Tampón de lavado: PBS filtrado (filtro de 0.22 μ m de tamaño de poro) (Sartorius, Alemania).

3.18.6. Ciclo celular

- Solución de extracción de DNA: 0.2 M fosfato de sodio dibásico y 0.1 M ácido cítrico en agua destilada, pH 7.8.

3.18.7. Tampón de lisis

- Tampón de lisis RIPA: 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM cloruro de sodio, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 2 mM EDTA y 10 mM fluoruro de sodio. Justo antes de la extracción, agregar inhibidores de

proteasas (1 pastilla de cOmplete ULTRA tablets, mini, EASYpack de Roche por cada 10 mL de tampón) y 100 μ L de fenilmetilsulfonil fluoruro (stock a 100 mM). Se puede almacenar congelado a -20°C en alícuotas.

3.18.8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

- Gel concentrador: agua destilada, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% acrilamida/bis-acrilamida, 10% persulfato de amonio y 1% TEMED.
- Gel separador (12%): agua destilada, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 30% acrilamida/bis-acrilamida, 8.8, 10% persulfato de amonio y 1% TEMED.
- Tampón de la muestra: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.2 M EDTA pH 8, 50% glicerol (v/v), 0.01% azul de bromofenol y 0.01% β -mercaptoetanol.
- Tampón de corrido de electroforesis: 0.05 M Tris, 0.384 M glicina y 0.01% SDS en agua destilada.

3.18.9. Soluciones de tinción de geles de poliacrilamida

- Solución de tinción: 0.025% azul de Coomassie (p/v) (Brilliant Blue-250, Sigma Aldrich, EEUU) 40% metanol, 10% ácido acético en agua destilada.
- Solución de desteñido: 10% 2-propanol y 10% ácido acético en agua destilada.

3.18.10. Western blot

- Tampón de bloqueo: 5% leche en polvo desnatada y 0.1% Tween-20 en PBS.
- Tampón de lavado: 0.3% Tween-20 en PBS.
- Solución ácida: 0.01 M Tris y 0.15 M NaCl en agua destilada, pH 2.3.

3.18.11. Técnica inmunoenzimática (ELISA)

- Tampón carbonato: 0.1 M carbonato de sodio y 0.1 M bicarbonato de sodio en agua destilada, pH 9.6.
- Tampón de bloqueo: 2% leche en polvo desnatada, 0.1% Tween-20 en PBS.
- Tampón de lavado: 0.3% Tween-20 en PBS.
- Solución sustrato de la peroxidasa: 12.5 mL tampón citrato (0.1 M ácido cítrico, 0.1 M citrato de sodio, pH 5), 12.5 mL agua destilada, una pastilla de OPD (Sigma Aldrich, EEUU) y 25 μ L de peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich, EEUU).
- Solución de parada: 3 M HCl en agua destilada.

3.18.12. Separación de IgGs mediante columna de proteína G

- Tampón de unión: 20 mM fosfato de sodio en PBS.
- Tampón de elución: 0.1 M glicina-HCl en PBS, pH 2.7.
- Tampón neutralizante: 1 M Tris-HCl en PBS, pH 9.0.

3.18.13. Digestión de las IgGs con papaína

- Tampón de digestión: 20 mM fosfato de sodio, 10 mM EDTA y 20 mM cisteína-HCl en PBS, pH 7.0.

3.19. Control de contaminación de los cultivos celulares por *Mycoplasma* sp.

Para el control de contaminación de los cultivos celulares por *Mycoplasma* sp., se realizaron PCRs de rutina, con el fin de amplificar el gen RNA ribosomal 16S. Las células se tripsinizaron siguiendo el protocolo descrito previamente. Se procesó también un mililitro de medio de cultivo de cada frasco de células. En este caso, los sobrenadantes se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 xg y se conservó el botón.

La extracción de DNA de los botones de células y los sobrenadantes centrifugados se realizó utilizando el “Blood and Cell Culture DNA mini kit” de QIAGEN (Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, muestras tanto de células como de sobrenadantes se centrifugaron a 500 xg y 14000 xg, respectivamente, con el fin de formar un botón, el cual se emplearía para la extracción de DNA. Las muestras se sometieron a un tratamiento con proteinasa K y a un tampón de lisis y se calentaron a 56 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó el etanol y se colocó todo el material en las columnas del kit, con el fin de precipitar el DNA y lavarlo empleando dos tampones de lavado diferentes. Finalmente, el DNA se eluyó en 50 µL de agua libre de nucleasas y se cuantificó utilizando el Nanodrop. La secuencia de los oligonucleótidos empleados fueron: 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3' en el caso de GPO3-F y 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' en el caso de MGSO-R. La mezcla de reacción de PCR se realizó de la misma manera que la mostrada en la Tabla 3 (sección 3.12.3). Las condiciones de PCR empleadas fueron: una incubación inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 57°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos.

La visualización de la banda de 270 pb se realizó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE IX. Como control positivo se utilizó DNA de una muestra respiratoria positiva por *Mycoplasma* sp. (confirmada mediante secuenciación) y como control negativo agua libre de nucleasas en vez del DNA.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Microscopía electrónica de transmisión, “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”

El aislamiento de las VEs por medio del protocolo de centrifugación diferencial se confirmó mediante las medidas y observaciones empleando microscopía electrónica de transmisión, “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”. Tras el aislamiento de las VEs liberadas por 1×10^7 tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* durante 5 horas, a 37 °C y en el medio de cultivo empleado para la liberación de VEs, fue posible cuantificar la secreción de 12 μ g de proteínas mediante el kit comercial micro BCA.

La observación del producto purificado con MET después de la tinción negativa reveló la presencia de VEs con un tamaño comprendido entre los 30 a 100 nm de diámetro (Figura 4.1.1).

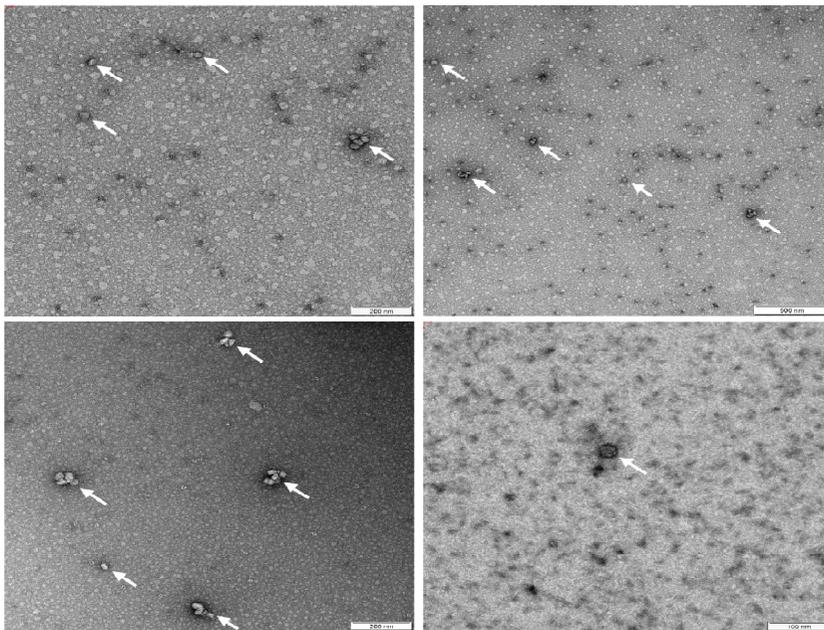


Figura 4.1.1. Observación de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 mediante microscopía electrónica de transmisión. Las VEs están señaladas con flechas blancas.

Con respecto al análisis de partículas llevado a cabo mediante NTA, el tamaño de VEs predominante en las muestras fue 70.7 ± 7.3 nm, con una media de tamaño de 100.8 ± 3.8 nm. La cuantificación de la suspensión de nanopartículas obtenidas en el botón después de la última centrifugación reveló una concentración de aproximadamente $5.0 \times 10^{10} \pm 3.9 \times 10^{09}$ partículas/mL (Figura 4.1.2A), correspondientes a la cantidad de proteína de 12 μ g determinados por la técnica micro BCA. Los análisis llevados a cabo mediante DLS demostraron la presencia de dos poblaciones principales de VEs en las muestras: una población de 23.05 ± 6.96 nm y otra población de 55.74 ± 13.97 nm (Figura 4.1.2B). La riqueza en cantidad de proteínas, tamaño y concentración de nanopartículas se determinó periódicamente en los diferentes aislamientos de VEs llevados a cabo en el transcurso de los experimentos.

Los análisis de DLS realizados a las muestras de VEs aisladas del parásito *Crithidia mellificae* y de la línea celular NIH/3T3, empleadas en los experimentos de evaluación de la especificidad de los efectos de las VEs de *T. cruzi* sobre las células Vero, determinaron también la presencia de dos poblaciones de VEs de diferentes tamaños en cada una de las muestras analizadas. En el caso de las muestras con VEs de *C. mellificae*, se obtuvieron poblaciones de 30.4 ± 2.6 nm y 177.2 ± 97.4 nm (Figura 4.1.2C), mientras que en el caso de las muestras con las VEs de las células NIH/3T3, las poblaciones de VEs identificadas fueron de 39.03 ± 27.70 nm y 182.7 ± 22.2 nm (Figura 4.1.2D).

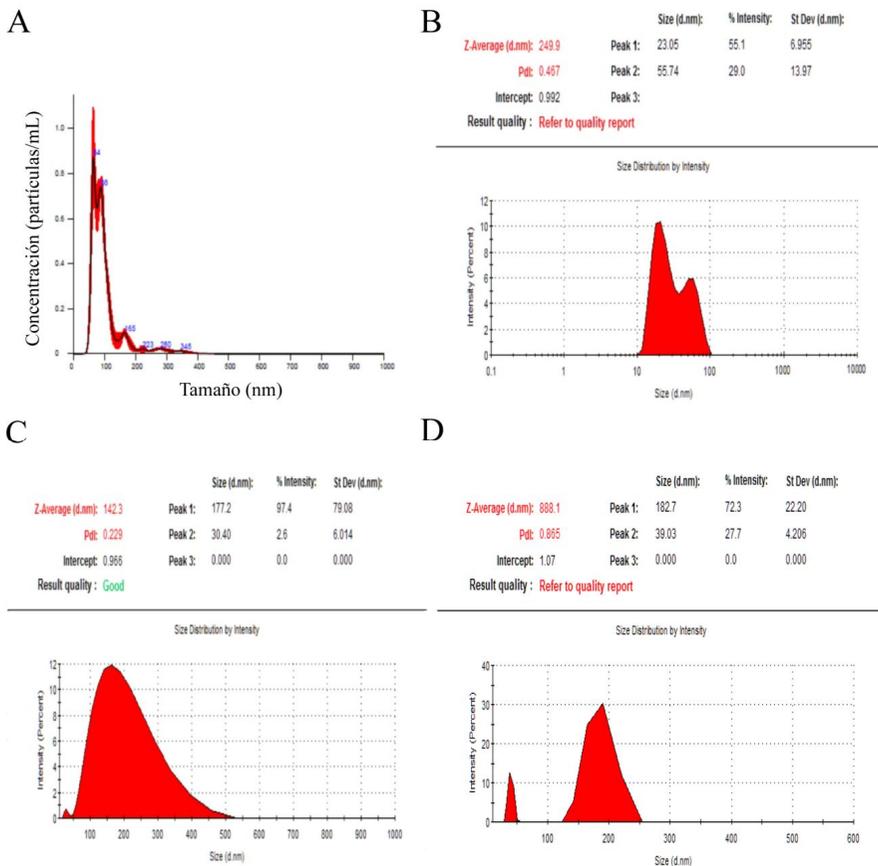


Figura 4.1.2. Cuantificación del tamaño de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 mediante NTA (A) y DLS (B). En estos análisis es posible observar que la mayoría de las VEs de tripomastigotes tienen un tamaño inferior a 100 nm. En la Figura también se muestra la cuantificación de los tamaños de las VEs procedentes de los coanomastigotes del kinetoplástido *C. mellicifcae* (C), así como de las células de ratón de la línea celular NIH/3T3 (D).

4.2. Detección de las proteínas cruzipaína y *trans*-sialidasa (mAb 39) en VEs de *T. cruzi* Pan4 mediante Western blot

En las Figuras 4.2A y 4.2B se demuestra la presencia de las proteínas cruzipaína y *trans*-sialidasa (mAb 39), específicas de *T. cruzi*, tanto en un lisado de tripomastigotes como en las VEs liberadas por tripomastigotes de la cepa Pan4. La detección de dichas proteínas se realizó mediante la incubación

con anticuerpos específicos anti-cruzipaina y anti *trans*-sialidasa (mAb 39), empleando la técnica de Western blot.

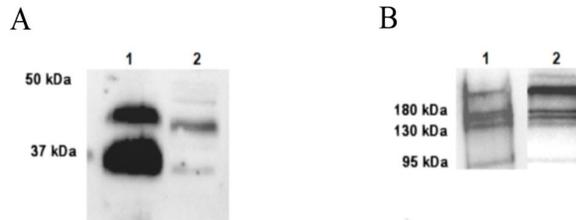


Figura 4.2A. Detección de la proteína cruzipaina en las VEs de *T. cruzi* Pan4 mediante Western blot. Muestras de VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (300 µg de proteína) (1), así como un lisado de tripomastigotes de la misma cepa (90 µg de proteína) (2) fueron sometidas a una electroforesis en SDS-PAGE y las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para realizar el inmunoblot con el anticuerpo primario anti-cruzipaina (obtenido en conejo). La reacción se visualizó utilizando el sustrato Clarity® ECL Western substrate en un aparato de análisis de imágenes ChemiDoc®.

Figura 4.2B. Detección de la proteína *trans*-sialidasa (mAb 39) en un lisado de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (1), así como en las VEs de la misma cepa (2), mediante Western blot. Las muestras fueron procesadas de la misma manera que en el caso de la cruzipaina, con un anticuerpo primario anti *trans*-sialidasa (mAb 39) (obtenido en ratón).

4.3. Optimización de las condiciones de incubación de las células con las VEs de *T. cruzi*

Con el fin de evaluar el efecto de las VEs aisladas a partir de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* en el proceso de invasión celular, diferentes dosis de VEs fueron incubadas con células procedentes de un cultivo semiconfluente de células Vero. Como ha sido descrito en el apartado de Materiales y métodos, el tiempo de incubación fue de 2 horas, tras lo cual los cultivos se lavaron con medio sin suero para eliminar las VEs que no hubiesen interactuado con las células. Tras el último lavado, las células se infectaron con una suspensión de parásitos resuspendidos en MEM sin suero en una proporción 5:1 (parásito: célula). El proceso de infección de los

cultivos se mantuvo durante 5 horas, tiempo en el que se lavaron e incubaron los cultivos en medio MEM enriquecido con 10% de SFBI. Los recuentos se llevaron a cabo a las 24 horas de iniciada la incubación con las VEs, después de la fijación de las células con metanol y la tinción con Giemsa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3, donde se observa que el mayor aumento en la parasitación de las células se alcanzó al incubarlas con una dosis de 0.5 µg/mL de proteínas de las VEs (porcentaje de parasitación: $88.88 \pm 3.73\%$). A partir de esta dosis, los niveles de parasitación obtenidos fueron significativamente menores, pudiendo ser causa de efectos directos sobre las células que mermarían la capacidad de ser parasitadas por *T. cruzi*. Las dos últimas concentraciones analizadas (las concentraciones mayores) mostraron porcentajes de parasitación prácticamente iguales, lo que probaría el efecto negativo de las dosis y que el mismo, al parecer, no es acumulativo.

El análisis estadístico de los porcentajes de parasitación reflejó diferencias significativas entre el valor obtenido de la incubación con 0.5 µg/mL con respecto a los porcentajes obtenidos con el resto de las concentraciones de proteína empleadas. Aun siendo más bajos los porcentajes de parasitación obtenidos al emplear concentraciones de 1.0 µg/mL y 2.5 µg/mL con respecto a la concentración de 0.5 µg/mL, estos mostraron diferencias significativas con respecto al porcentaje de parasitación obtenido en el caso de las células control no incubadas con las VEs.

El análisis de los gráficos de la representación de la dosis vs. el porcentaje de parasitación reveló una cinética no lineal sigmoidea, con la primera fase del gráfico comparable con una cinética equivalente dosis/respuesta, que permitió calcular la dosis efectiva 50, obteniéndose un valor de 0.38 µg/mL. La cinética del análisis usando el programa GraphPad Prism v5 reveló que dicha cinética seguía una ecuación cuya fórmula sería la siguiente:

$$Y=B_{max} * X / (K_d + X) + NS * X + \text{Blanco}$$

donde X: ligando (cantidad de VEs en μg de proteína); Y: máximo de parasitación; Bmax: parasitación máxima de Y, Kd: constante de disociación; Ns: pendiente de la regresión no lineal (X dividido entre los valores de Y) y Blanco: cantidad de unión, en este caso infección, cuando no se han añadido las VEs.

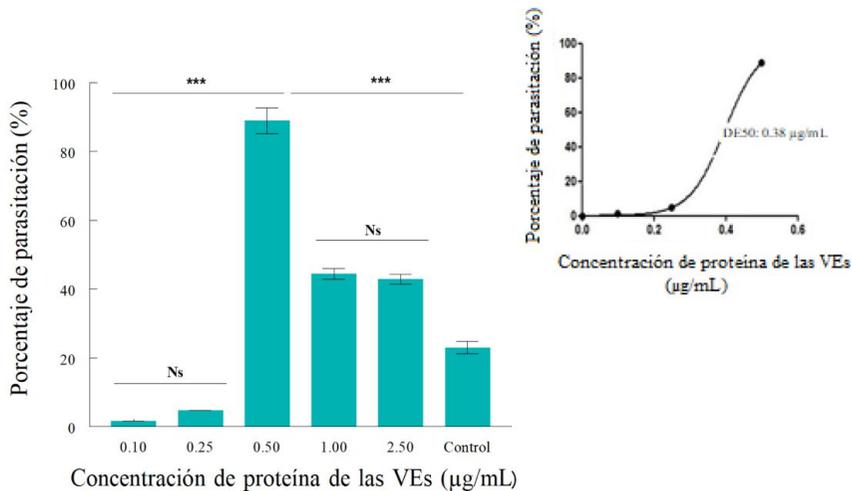


Figura 4.3. Porcentaje de parasitación de células Vero con *T. cruzi* Pan4 después de la incubación de las células con diferentes dosis de VEs. El incremento máximo en el porcentaje de parasitación se presentó cuando se empleó una dosis de 0.50 $\mu\text{g/mL}$ de VEs. La esquina superior derecha de la Figura muestra la DE50 obtenida (0.38 $\mu\text{g/mL}$ de VEs), la cual fue empleada en los experimentos posteriores. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y * significativo ($p < 0.0001$).**

4.4. Efecto de las VEs de *T. cruzi* en la infección celular a través del tiempo

Para evaluar si el efecto de la incubación previa de las células Vero con las VEs de *T. cruzi* Pan4 se mantenía a través del tiempo (específicamente, el incremento en los porcentajes de parasitación) o, por el

contrario, se trataba de un efecto puntual, se incubaron las células durante 2 horas con la DE50 de 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VEs y posteriormente fueron lavadas como en los experimentos anteriores e infectadas a diferentes tiempos post incubación con las VEs. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de parasitación de las células incubadas con las VEs con respecto al control de células no incubadas. Dichas diferencias se mantuvieron hasta las 8 horas post incubación (Figura 4.4A). Los niveles máximos en los porcentajes de parasitación se lograron cuando las células se infectaron 2 y 4 horas después de iniciada la incubación con las VEs. Por el contrario, cuando las células fueron infectadas a las 24 horas de la incubación con las VEs no se observó ningún efecto relativo al incremento de los porcentajes de parasitación (Figura 4.4B).

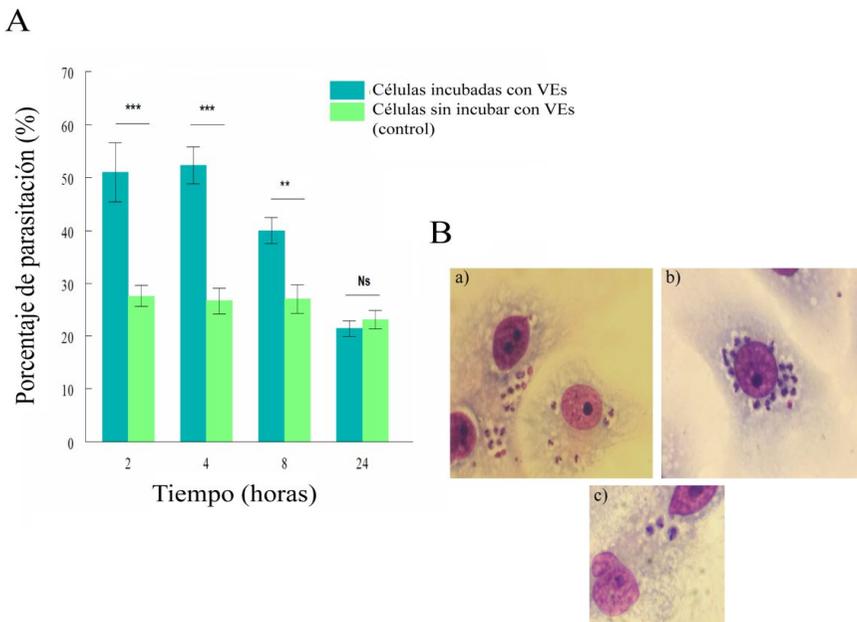


Figura 4.4A. Porcentajes de parasitación obtenidos al infectar células Vero previamente incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 con tripomastigotes de la misma cepa. Las infecciones se realizaron a diferentes tiempos después de iniciada la incubación con las VEs. Los resultados obtenidos muestran que, al infectarse las células 2 y 4 horas después de la incubación con las VEs se obtuvieron los porcentajes de parasitación más elevados. La

infección tras 8 horas de iniciada la incubación con las VEs de *T. cruzi* también mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de células no incubadas con las VEs del parásito. El eje X del gráfico corresponde a los tiempos en los que se infectaron las células con los tripomastigotes, después de la incubación con las VEs. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

Figura 4.4B. Fotografías de las tinciones de Giemsa que ilustran células Vero incubadas con las VEs de *T. cruzi* durante 2 horas e infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 durante 4 horas (a y b). Se incluye control de células infectadas con tripomastigotes a las cuales no se les realizó la incubación previa con las VEs del parásito (c). En esta Figura es posible observar mayores cantidades de amastigotes en las células incubadas previamente con VEs que en las células sin incubar con VEs. Fotografías realizadas con aumento de 100x.

Los índices de parasitación obtenidos en las diferentes infecciones revelaron diferencias estadísticamente significativas. Así, para el caso de las células incubadas con las VEs durante 2 horas e infectadas después de este tiempo, el índice de parasitación fue 2.78 ± 0.55 , un índice que duplicó el de las células control infectadas sin la incubación previa con las VEs (1.33 ± 0.18). A partir de estos experimentos fue posible definir tanto la dosis de VEs en $\mu\text{g/mL}$ ($0.38 \mu\text{g/mL}$) como el tiempo de incubación de las células con las VEs (2 horas).

4.5. Efecto del tratamiento térmico y químico/enzimático de las VEs de *T. cruzi* en la infección de células Vero

Con el fin de evaluar el papel que juegan los componentes de membrana de las VEs en los procesos de adhesión a las membranas celulares y su posterior acción a nivel celular para incrementar la parasitación, se realizaron una serie de experimentos para determinar si los tratamientos térmicos y químicos de las VEs afectaban la capacidad de incrementar los porcentajes de parasitación en las células por la posible inactivación o

desnaturalización de los componentes proteicos (enzimáticos) de dichas VEs. El pretratamiento de las VEs a 50°C, 70°C y 90°C durante 30 minutos y su posterior incubación con los cultivos celulares previo a la infección con los tripomastigotes condujo a que se obtuvieran porcentajes de parasitación similares a los obtenidos en el caso de las células control no incubadas con las VEs (Figura 4.5A). Hay que destacar que los porcentajes de parasitación obtenidos con las diferentes muestras sometidas a calentamiento no mostraron diferencias significativas entre ellos, lo que demostraría que al menos alguno de los componentes de las VEs que participan en las modificaciones celulares ejercidas por las vesículas extracelulares liberadas por los tripomastigotes debe ser termosensible incluso a 50°C durante los 30 minutos que duró el tratamiento térmico, por lo que se podría deducir que dicho componente podría estar involucrado en la adhesión a la membrana celular (tipo lectina) o quizás poseer actividad enzimática.

El tratamiento enzimático con proteinasa K y papaína generó el mismo efecto sobre las VEs, ya que los porcentajes de parasitación de las células incubadas con estas VEs tratadas tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Figura 4.5B). Esto confirmaría la naturaleza proteica de los componentes de la membrana de las VEs, capaces de interactuar con la membrana celular. Por otra parte, el tratamiento de las VEs con peryodato sódico (compuesto capaz de oxidar los componentes azucarados de las glicoproteínas de la membrana de las exovesículas) tampoco produjo una alteración en los niveles de parasitación de las células con respecto a las células control no incubadas con las VEs de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos llevan a suponer que en el proceso de interacción VEs-célula participan una serie de proteínas termosensibles y glicosiladas, donde los azúcares deben interaccionar con lectinas de membrana, facilitando la interacción VEs-célula y el proceso de invasión del parásito.

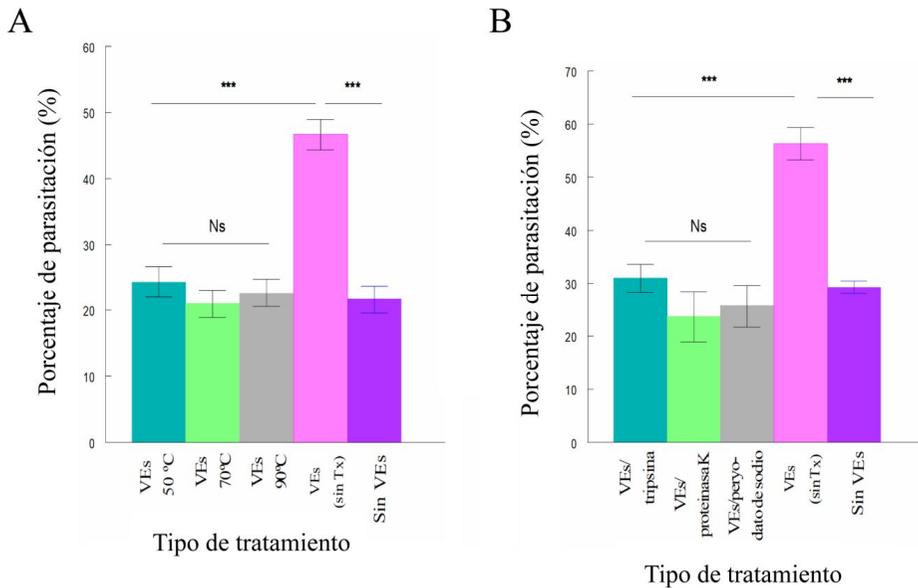


Figura 4.5A. Porcentaje de parasitación de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* sometidas a tratamientos térmicos. Las células Vero fueron incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 previamente sometidas a un tratamiento térmico a diferentes temperaturas durante 30 minutos y posteriormente fueron infectadas con tripomastigotes de la misma cepa de *T. cruzi*. Transcurridas las 24 horas de iniciada la incubación, se realizó el recuento de las células parasitadas. Los resultados muestran que el tratamiento térmico parece “inactivar” a las VEs, de modo que ya no se observa el incremento en los porcentajes de parasitación que se obtiene al incubar las células con las VEs del parásito. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

Figura 4.5B. Porcentaje de parasitación de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* sometidas a diferentes tratamientos. Las células Vero fueron incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 previamente sometidas a un tratamiento con las enzimas tripsina (0.5 mg/mL) y proteinasa K (0.5 mg/mL) o con periyodato de sodio (10 mg/mL) durante una hora y posteriormente fueron infectadas con tripomastigotes de la misma cepa de *T. cruzi*. Transcurridas las 24 horas de iniciada la incubación, se realizó el recuento de las células parasitadas. Los resultados muestran que los porcentajes de células parasitadas son menores cuando las células son incubadas con las VEs sometidas a los tratamientos frente a células incubadas con las VEs del parásito que no fueron tratadas. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación

estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

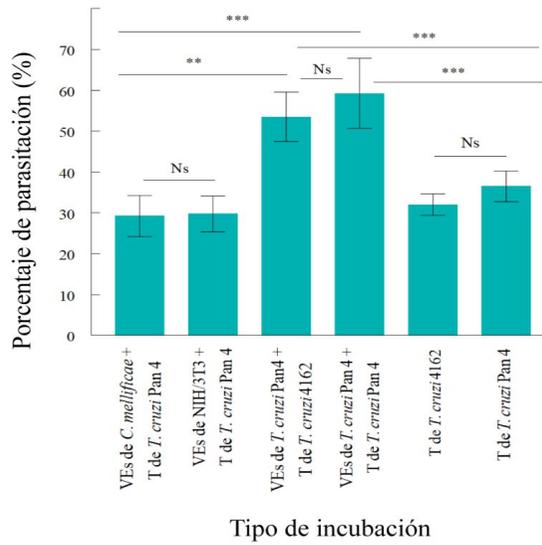
4.6. Evaluación de la especificidad del efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre células Vero

Con el fin de demostrar que los efectos de las VEs de *T. cruzi* sobre las células Vero eran específicos y que los mismos no se debían a ninguna acción físicoquímica por el proceso de fusión de membranas, se realizó la incubación de células Vero con VEs aisladas del parásito extracelular *Crithidia mellificae* y con VEs de la línea celular procedente de ratón NIH/3T3, modelos de exovesículas de un kinetoplástido y de células de mamífero, y la posterior infección con tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*. Una vez realizadas las incubaciones como se ha descrito en los apartados anteriores, se evaluaron los porcentajes de infección celular posterior a la infección con las formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 4.6.1A y 4.6.1B, donde es posible observar que la incubación de las células con las VEs de otros organismos diferentes a *T. cruzi* no generaron el incremento en los porcentajes de parasitación celular obtenido cuando las células se incuban previamente con las VEs de *T. cruzi* para luego ser infectadas con los tripomastigotes. Cuando las células Vero se incubaron con las VEs del kinetoplástido *C. mellificae*, el porcentaje de células infectadas obtenido fue $29.3 \pm 5.0\%$, mientras que cuando se incubaron con las VEs de la línea celular NIH/3T3, el porcentaje obtenido fue $29.8 \pm 4.3\%$. Estos resultados no difirieron con respecto a los de las células Vero infectadas con los tripomastigotes sin ser incubadas previamente con las VEs de la misma cepa del parásito ($36.5 \pm 3.8\%$), considerado como control. De igual manera, los índices de parasitación no variaron estadísticamente entre los tres grupos empleados en los experimentos (1.31 ± 0.08 en el caso de las células incubadas con VEs de *C. mellificae*, 1.79 ± 0.28 en las células incubadas con

VEs de las células NIH/3T3 y 1.54 ± 0.31 en el caso de las células sin la incubación previa con las VEs de *T. cruzi*). Sin embargo, cuando las células se incubaron con VEs de *T. cruzi* Pan4 y se infectaron con tripomastigotes de la misma cepa (control positivo del experimento), el índice de parasitación obtenido fue 2.60 ± 0.14 , un índice que casi duplica los anteriores.

Por otra parte, se quiso evaluar si el efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 en generar esos incrementos en los porcentajes e índices de parasitación eran dependientes de la cepa del parásito empleada, por lo que se incubaron las células Vero con VEs obtenidas de la cepa Pan4 y posteriormente se infectaron con tripomastigotes de la cepa 4162, clasificada como Tc IV, utilizándose la misma proporción de parásitos:célula de los experimentos anteriores. Los resultados aparecen en las mismas Figuras, donde se muestra que el porcentaje de infección de células con esta cepa casi duplica el porcentaje obtenido cuando las células se infectaron sin incubarse previamente con las VEs ($53.5 \pm 6.0\%$ vs. $32 \pm 2.6\%$). Se obtuvo además un índice de parasitación de 2.10 ± 0.14 que resultó estadísticamente diferente al compararlo con el índice de parasitación de las células control sin la incubación previa con las VEs (1.39 ± 0.21). Estos resultados demuestran que los incrementos en los porcentajes de infección celular por *T. cruzi* son, por una parte, dependiente de las VEs de *T. cruzi* y por otra parte, independientes de la cepa de parásito que se utilice para infectar las células.

A



B)

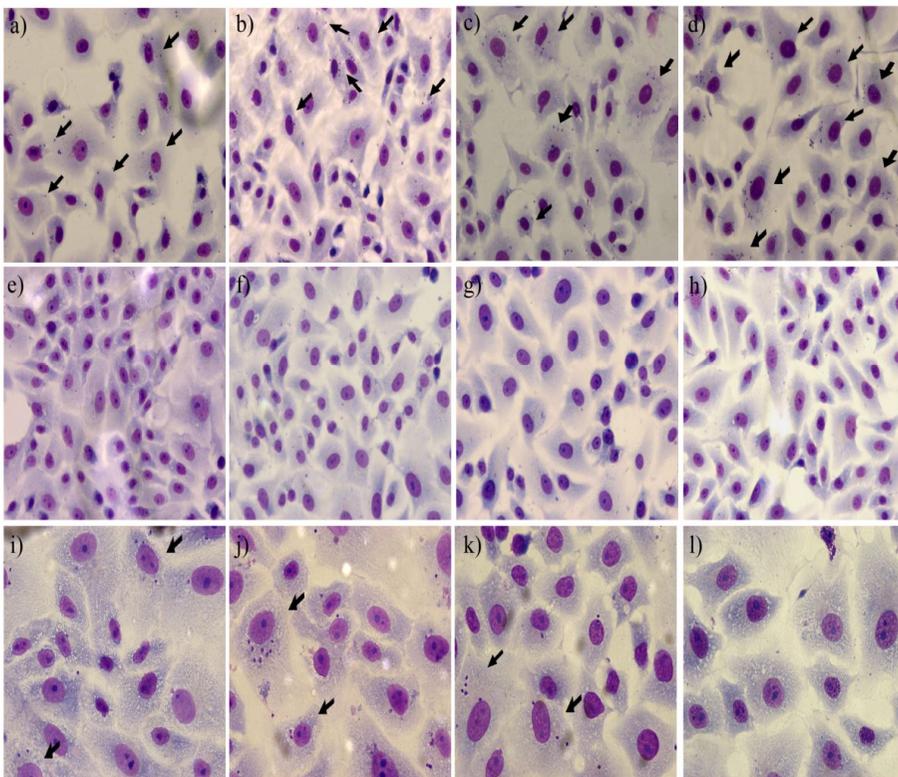


Figura 4.6.1A. Porcentajes de parasitación de células Vero incubadas con VEs de *C. mellificae* y VEs de células NIH/3T3 e infectadas con *T. cruzi* Pan4, así como células Vero

incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectadas con tripomastigotes de la cepa 4162 de *T. cruzi*. En esta Figura se observa que la incubación de las células Vero con VEs de otras fuentes diferentes a *T. cruzi* no generó ningún incremento en los porcentajes de parasitación obtenidos al incubar las células con las VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectar con tripomastigotes de la misma cepa. Por otra parte, se determinó que el porcentaje de parasitación celular es independiente de la cepa empleada para la infección celular, dado que la incubación de las células con las VEs de *T. cruzi* Pan4 y la infección con tripomastigotes de la cepa 4162 de *T. cruzi* (Tc IV) también produjo un incremento en los porcentajes e índices de parasitación. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

Figura 4.6.1B. Fotografías de las tinciones de Giemsa que ilustran células Vero incubadas con las VEs de *C. mellificae* (a) y con las VEs de células NIH/3T3 (b) durante 2 horas e infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 durante 4 horas, además de células Vero incubadas con VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi* durante 2 horas e infectadas con tripomastigotes de las cepas 4162 (c) y Pan4 (d) de *T. cruzi*. Se incluyen los controles de células incubadas solo con VEs de *C. mellificae* (e), VEs de células NIH/3T3 (f), VEs de *T. cruzi* Pan4 (g) y células control (h). Las fotografías se tomaron a 20x para mostrar el efecto general de las diferentes incubaciones sobre el cultivo celular. La Figura contiene fotografías de células Vero incubadas con VEs de *C. mellificae* (i) y VEs de *T. cruzi* Pan4 (j) posteriormente infectadas con tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*, células solamente infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (k) y células solamente incubadas con las VEs de *T. cruzi* Pan4 (l) tomadas a mayor aumento (40x). Algunas células Vero infectadas se ilustran con las flechas negras.

Con el objetivo de ver si el “acondicionamiento celular” ejercido por las VEs de *T. cruzi* influía en las tasas de parasitación de otros organismos de desarrollo intracelular favoreciendo también las tasas de infección, se realizaron algunos experimentos para evaluar los porcentajes de parasitación de las células posteriores a la incubación con las VEs de *T. cruzi* y la infección con otro parásito intracelular no kinetoplástico. Para esto, se emplearon taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*, protozoo Apicomplexa que también posee un ciclo de multiplicación intracelular de forma obligada. Los resultados obtenidos tras llevar a cabo el proceso de pre incubación con las

VES y la posterior infección bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores se muestran en las Figuras 4.6.2A y 4.6.2B, donde se aprecia un ligero aumento en la media de los porcentajes de células infectadas con taquizoítos, previamente incubadas con las VEs de *T. cruzi*, al compararlas con las células sin esa incubación previa ($56.50 \pm 4.80\%$ vs. $46.50 \pm 4.93\%$), resultados que no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

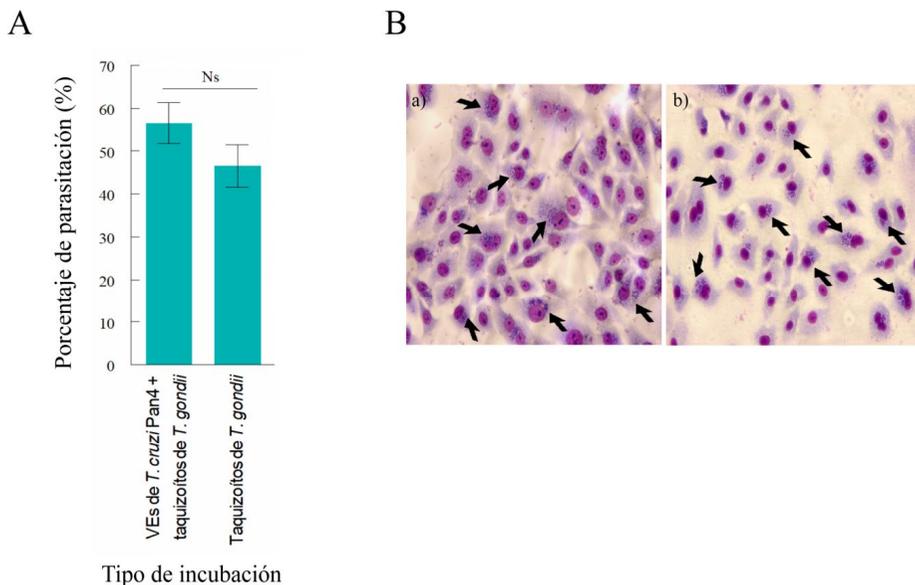


Figura 4.6.2A. Porcentajes de parasitación de las células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectadas con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*. Las células Vero se incubaron durante 2 horas con VEs de *T. cruzi* Pan4, para posteriormente ser infectadas con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*. Los resultados muestran un leve incremento en el porcentaje de parasitación de las células incubadas previamente con las VEs de *T. cruzi* y después infectadas con *T. gondii*, al compararlo con las células infectadas con *T. gondii* sin la incubación previa con las VEs. Sin embargo, el análisis estadístico demostró que las diferencias entre los resultados no se consideran significativas ($p=0,0335$). Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T de Student. Ns: no significativo.

Figura 4.6.2B. Fotografías de las tinciones de Giemsa que ilustran células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 e infectadas con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*. a)

Células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* durante 2 horas e infectadas con taquizoítos de *T. gondii* y b) células Vero infectadas con taquizoítos de *T. gondii* sin la previa incubación con las VEs de *T. cruzi* de la cepa Pan4. Las fotografías fueron tomadas en campos a 20x para mostrar el efecto general de las diferentes incubaciones sobre el cultivo celular. Algunas células Vero infectadas se ilustran con las flechas negras.

4.7. Efecto de las VEs de *T. cruzi* en la permeabilización celular

Con el fin de evaluar la existencia de un posible efecto de las VEs de *T. cruzi* en la permeabilización celular al igual que sucede en algunas infecciones por virus (Fernández Puentes, 1983; Muñoz et al., 1985; Otero & Carrasco, 1987), se realizaron una serie de experimentos que demostrarían este posible efecto sobre las membranas celulares, el cual de alguna forma podría permitir el paso de macromoléculas a través de la misma. Para ello se empleó la α -sarcina, una toxina de aproximadamente 17 kDa, procedente del hongo *Aspergillus giganteus*. Esta toxina actúa a nivel ribosomal inhibiendo la síntesis proteica y es incapaz de entrar a la célula si no está previamente permeabilizada, debido a que carece de receptor en la superficie celular.

Los experimentos se llevaron a cabo bajo dos condiciones: 1) la incubación simultánea de las células con las VEs de *T. cruzi* y la toxina durante 4 horas y 2) la pre incubación de las células con las VEs de *T. cruzi* durante 2 horas y la adición de la toxina a las células durante 4 horas. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular como se describió en el apartado de Materiales y métodos.

Los resultados de ambos experimentos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ya que 24 horas después de realizadas las incubaciones se obtuvo que los cultivos celulares con la incubación simultánea de VEs y α -sarcina mostraron porcentajes de mortalidad de $76.10 \pm 6.81\%$, mientras que los cultivos que fueron sometidos a una pre incubación con las VEs durante 2 horas y la posterior incubación con la toxina durante 4 horas mostraron porcentajes de mortalidad de $82.00 \pm 10.17\%$. Los cultivos

control donde las células fueron incubadas únicamente con la toxina o con las VEs de *T. cruzi* revelaron porcentajes de mortalidad de $26.90 \pm 2.01\%$ y $22.23 \pm 7.73\%$, respectivamente (Figura 4.7.1A), resultados similares a los porcentajes de mortalidad de los cultivos celulares no tratados.

Los resultados anteriores, obtenidos mediante recuentos celulares con la tinción con el colorante azul tripán, fueron confirmados con ensayos de viabilidad celular utilizando MTT, método colorimétrico capaz de evaluar la actividad metabólica celular donde las enzimas oxidorreductasas celulares dependientes de NADH y NADPH son capaces de reducir el azul de tiazol MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromuro) a formazán insoluble, que tiene un color púrpura. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.7.1B, donde es posible observar un porcentaje de viabilidad de $37.36 \pm 15.39\%$ en el caso de las células pre incubadas con las VEs de *T. cruzi* y posteriormente incubadas con la toxina, mientras que los porcentajes obtenidos en el caso de las células incubadas solamente con la toxina o con las VEs fueron $90.10 \pm 7.03\%$ y $95.30 \pm 3.30\%$, respectivamente.

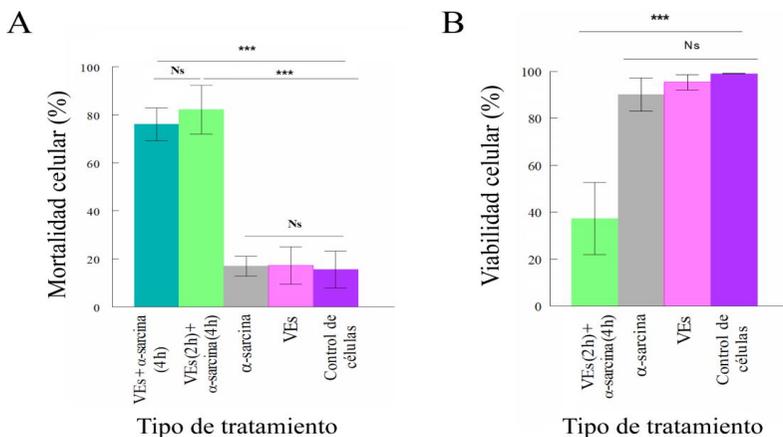


Figura 4.7.1A. Porcentajes de mortalidad celular de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 y tratadas con la toxina α -sarcina, obtenidos mediante la tinción con azul tripán 0.4%. Las células con la incubación simultánea de las VEs y la α -sarcina mostraron porcentajes de mortalidad de $76.10 \pm 6.81\%$, mientras que las células con la pre incubación con VEs y la posterior incubación con la toxina mostraron porcentajes de mortalidad de $82.00 \pm 10.17\%$, diferencias que no resultaron estadísticamente

significativas entre sí, pero fueron significativas con respecto a los controles, los cuales consistieron en cultivos celulares no tratados, células incubadas solamente con las VEs y células incubadas solamente con la α -sarcina. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

Figura 4.7.1B. Porcentajes de viabilidad celular de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 y tratadas con la toxina α -sarcina, obtenidos mediante el ensayo con el reactivo MTT. En este caso, los porcentajes de viabilidad fueron $37.36 \pm 15.39\%$ en el caso de las células incubadas con las VEs de *T. cruzi* y tratadas con la toxina y $90.10 \pm 7.03\%$ y $95.30 \pm 3.30\%$ en las células control incubadas solamente con la toxina o con las VEs, respectivamente. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

En la Figura 4.7.2 se muestran las microfotografías del aspecto de las monocapas de células incubadas con las VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi* y tratadas con la α -sarcina, 24 horas después de iniciada la incubación con las VEs del parásito, así como los controles de células incubadas solamente con la α -sarcina y con las VEs de *T. cruzi*. La destrucción de la monocapa celular en las células incubadas previamente con las VEs del parásito y posteriormente con la toxina es evidente en d).

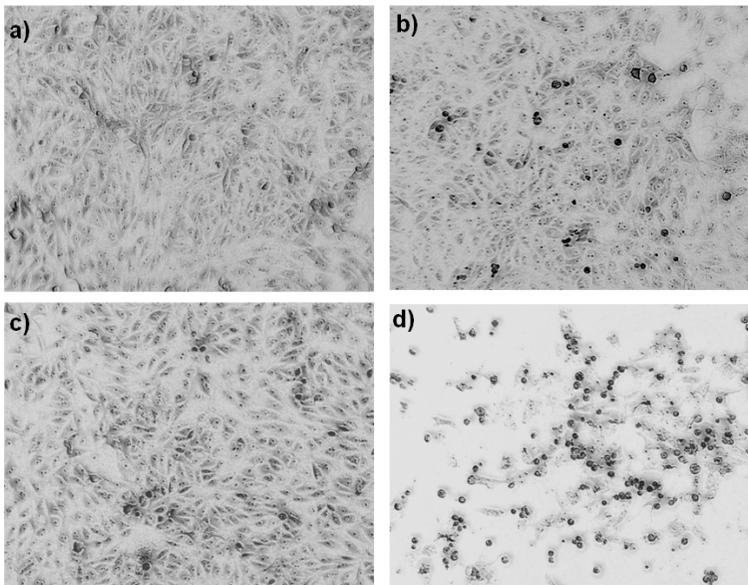


Figura 4.7.2. Monocapas de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi*, la toxina α -sarcosina o ambos. a) Control de células Vero; b) células Vero incubadas sólo con las VEs de *T. cruzi* Pan4 durante 2 horas; c) células Vero incubadas sólo con α -sarcosina (20 μ M) durante 4 horas; d) células Vero incubadas con las VEs de *T. cruzi* Pan4 durante 2 horas y tratadas posteriormente con α -sarcosina (20 μ M) durante 4 horas. Los cultivos celulares se fotografiaron 24 horas después de realizadas las incubaciones. Para evidenciar el efecto general de los diferentes tratamientos sobre los cultivos celulares se muestran fotografías de campos de baja magnificación.

4.8. Detección del receptor β_2 -adrenérgico mediante microscopía confocal láser

Los receptores adrenérgicos o adrenoceptores son un tipo de proteínas integrales de membrana acoplados a proteínas G, capaces de activarse por catecolaminas como la noradrenalina o la epinefrina, blanco de muchos medicamentos como los bloqueadores beta, los agonistas β_2 y los agonistas α_2 que se utilizan para la hipertensión o el asma, a modo de ejemplo. La señalización mediada por estos receptores participa en las respuestas fisiológicas como la relajación del músculo liso y la broncodilatación (Tanaka et al., 2005). Estos receptores, presentes en muchas células, entre ellas los

cardiomiocitos, poseen una parte fuera de la membrana plasmática, una parte insertada en la membrana y una cola intracitoplasmática (Figura 4.8.1). *In vivo* y en condiciones fisiológicas normales, esta cola citoplasmática aparece invisible a los anticuerpos dirigidos contra el receptor, dado que los anticuerpos no son capaces de atravesar la membrana plasmática a menos que las células se hayan permeabilizado previamente o fijado con compuestos que destruyan la integridad de la membrana.

Con el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo situado en la región intracitoplasmática (que corresponde con los aminoácidos 340-413 de la secuencia del receptor, señalado con una flecha en la Figura 4.8.1) fue posible confirmar que las VEs de *T. cruzi* son capaces de modificar la permeabilidad de la membrana celular, permitiéndose el reconocimiento del epítipo por el anticuerpo sin que las células hayan sido tratadas con detergentes ni fijadas con agentes capaces de alterar la membrana, tal como se muestra en la Figura 4.8.2. En el caso de las células que no se incubaron con las VEs, no fue posible demostrar la unión del anticuerpo al epítipo. Una imagen similar a la de las células incubadas con las VEs del parásito se obtuvo solamente en aquellos cultivos celulares permeabilizados con una solución del detergente NP-40 antes de la incubación con el anticuerpo.

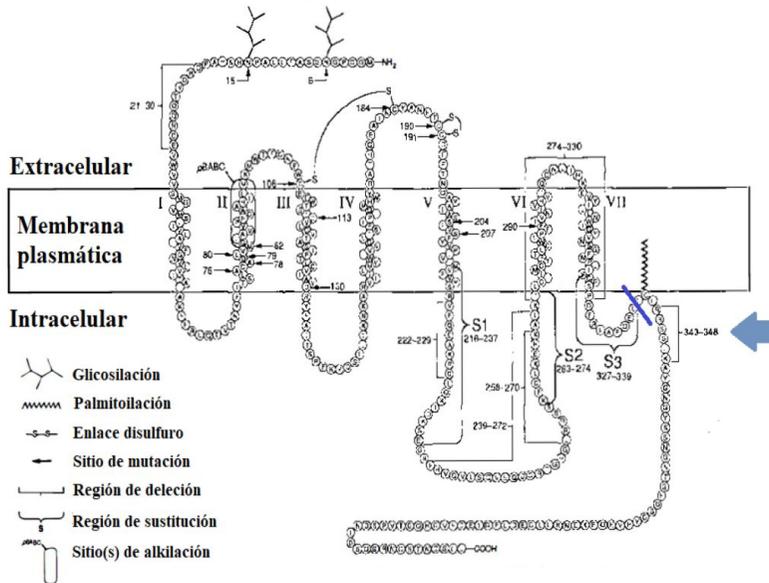


Figura 4.8.1. Representación gráfica de la secuencia de aminoácidos y la posible topografía en la membrana del receptor β_2 -adrenérgico. La flecha azul muestra la región reconocida por el anticuerpo que corresponde a la secuencia del receptor comprendida entre los aminoácidos 340-413 empleado en el experimento. Imagen modificada de Ostrowski y colaboradores (Ostrowski et al., 1992).

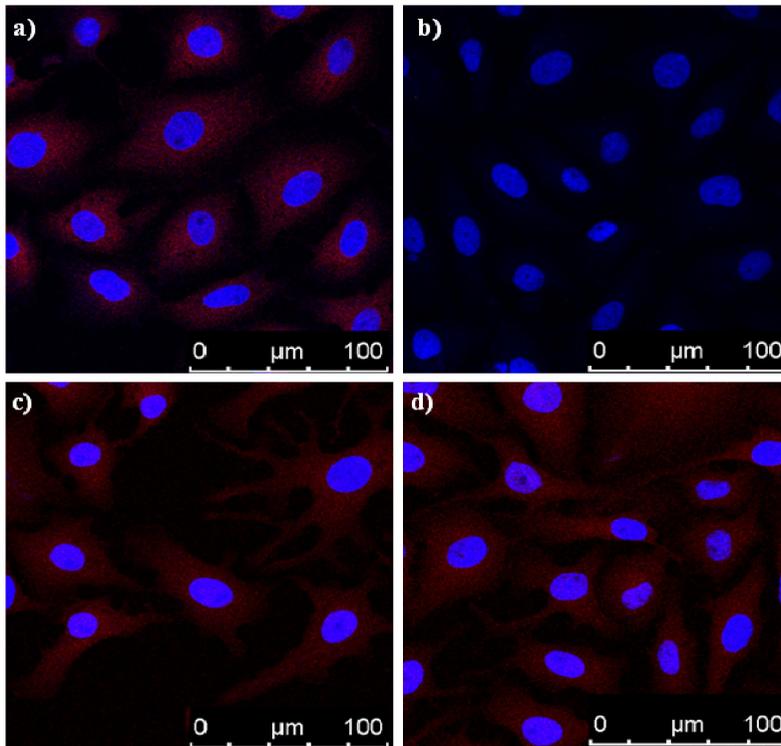


Figura 4.8.2. Permeabilización de la línea celular de cardiomiocitos HL-1 por las VEs de *T. cruzi* Pan4. a) Cardiomiocitos HL-1 incubados con las VEs durante 2 horas, fijados con una solución de paraformaldehído/glutaraldehído durante 2 horas e incubados con una dilución del anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-receptor β_2 -adrenérgico (Thermo Fisher Scientific, EEUU); b) cardiomiocitos HL-1 no incubados con las VEs, fijados de la misma manera e incubados con la misma dilución del anticuerpo empleada en el caso anterior (control negativo); c) cardiomiocitos HL-1 sin incubar con las VEs, fijados y permeabilizados con una solución con NP-40 previo a la incubación con el anticuerpo (control positivo); d) cardiomiocitos HL-1 incubados con las VEs, fijados y posteriormente permeabilizados con la solución con NP-40 antes de la incubación con el anticuerpo (control positivo).

4.9. Derminación de los movimientos de calcio intracelular inducidos por la interacción VEs-células Vero

La inducción de los movimientos de Ca^{2+} tras la interacción VEs-célula se estudió *in vivo* mediante microscopía láser confocal. Los resultados

obtenidos se muestran en las Figuras 4.9A y 4.9B. Los movimientos intracelulares de dicho catión se evaluaron a través del tiempo en células Vero incubadas con las VEs de *T. cruzi* Pan4, incubación realizada empleándose diferentes medios de cultivo (con y sin calcio) con el fin de conocer si el posible incremento de calcio libre citosólico provenía de los depósitos intracelulares o era consecuencia de la apertura de los canales presentes en la membrana, lo que le permitiría la entrada al citoplasma celular. Los resultados obtenidos evidencian que, cuando las células se cultivaron en un medio en presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , los niveles de fluorescencia se incrementaron a los 10 minutos de incubación 3.83 ± 0.62 veces los niveles iniciales de Ca^{2+} presentes en la célula previo a la interacción con las VEs, lo que indicaría la existencia de una entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular al citoplasma de las células. Como control del experimento se incubaron células con el ionóforo de calcio A23187 o calimicina, obteniéndose a los 25 minutos de incubación una imagen con una distribución semejante a la entrada de Ca^{2+} tras la incubación de las células con las VEs pero con un incremento en los niveles de fluorescencia 64.80 veces mayor con respecto al tiempo cero (previo a la incubación con el ionóforo).

Cuando la interacción se realizó en un medio de cultivo similar al MEM carente de Ca^{2+} o Mg^{2+} se produjo igualmente un aumento progresivo en los niveles de fluorescencia. Así, a los 10 minutos de incubación de las VEs con las células se obtuvo un incremento en los niveles de fluorescencia 1.40 ± 0.39 veces con respecto al tiempo cero (previo a la incubación de las células con las VEs). Este aumento en medios carentes de calcio podría corresponder con la movilización de los iones desde los depósitos intracelulares al citoplasma, es decir, desde el retículo endoplasmático, la mitocondria y el núcleo. El incremento en los niveles de fluorescencia obtenido fue 1.69 ± 0.01 veces mayor a los 10 minutos de la interacción en células cultivadas en medio MEM con el quelante de calcio EDTA que el obtenido al tiempo cero de la incubación. Sin embargo, después de este tiempo, la intensidad de fluorescencia comenzó a descender, lo que podría

explicarse como consecuencia de la salida de calcio de los depósitos intracelulares y su agotamiento consecuencia del descenso progresivo al salir a través de la membrana plasmática e ir siendo quelado con el EDTA presente en el medio extracelular. En este punto fue posible observar un cambio en el patrón de distribución de la fluorescencia, con la aparición de un citoplasma con fluorescencia más granulada. El inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), molécula capaz de cargar el citoplasma celular de iones Ca^{2+} movilizándolos desde los depósitos intracelulares, fue empleado como control positivo de la salida de los iones Ca^{2+} de los depósitos intracelulares al citoplasma. El control de células incubado con este compuesto generó un incremento en los niveles de calcio de 2.37 veces a los 10 minutos de incubación con respecto al tiempo cero de iniciado el experimento.

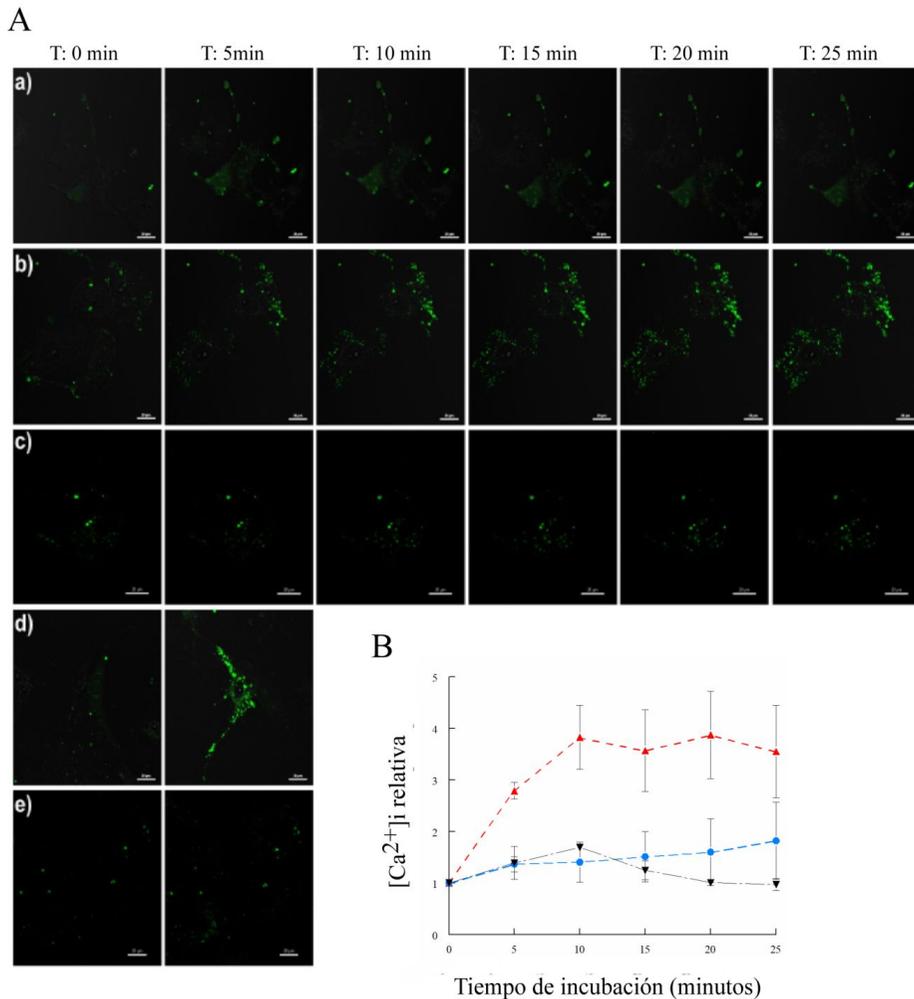


Figura 4.9A. Análisis de la concentración intracelular de Ca^{2+} en células Vero incubadas con las VEs de *T. cruzi* Pan4 mediante microscopía láser confocal. Las células fueron incubadas con el colorante Fluo4-AM durante 20 minutos y posteriormente con VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi*. Se realizó un seguimiento de las células durante 25 minutos con el fin de evaluar la movilización de calcio inducida por las VEs del parásito. a) Células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* en medio MEM (con iones Ca^{2+} y Mg^{2+}), b) células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* en medio sin iones Ca^{2+} y Mg^{2+} y c) células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* en medio MEM con EDTA (2.5 μM). Los resultados sugieren que cuando las células se incuban con las VEs de *T. cruzi* ocurre una movilización de calcio desde el medio extracelular al citoplasma celular, así como desde los depósitos intracelulares de calcio al citoplasma celular. Como controles positivos del experimento se emplearon el ionóforo de calcio A23187, que genera la movilización de calcio desde el

medio extracelular al citoplasma (d) y el IBMX que induce la salida de calcio de los depósitos intracelulares (e).

Figura 4.9B. Seguimiento de la movilización intracelular de calcio en células Vero incubadas con VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi* durante 25 minutos. En el gráfico es posible observar que cuando las células se incubaron en un medio con iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , los niveles de fluorescencia incrementaron progresivamente hasta obtenerse 3.83 ± 0.62 veces más fluorescencia a los 10 minutos (línea roja). En ese mismo tiempo, cuando se analizó la incubación de las VEs en los medios sin calcio se observó que los niveles de fluorescencia de las células incubadas con las VEs fueron 1.40 ± 0.39 veces mayores que los niveles de fluorescencia en el tiempo cero (línea azul). Cuando las células se incubaron con las VEs en el medio MEM con EDTA ($2.5 \mu\text{m}$) se obtuvo un incremento de 1.69 ± 0.01 más fluorescencia; sin embargo, a partir de los 10 minutos de incubación, los niveles de fluorescencia descendieron. En estas células fue posible observar un patrón de fluorescencia más granulado en el citoplasma celular.

4.10. Efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre el citoesqueleto celular mediante microscopía láser confocal

Para estudiar el efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre los filamentos de actina se llevó a cabo la incubación de las células Vero con las VEs del parásito durante diferentes tiempos, evaluándose el efecto de estas exovesículas mediante microscopía confocal, posterior a la tinción de los filamentos de actina con faloidina ligada a fluoresceína y el reconocimiento previo de la vimentina mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-vimentina (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Esta proteína forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular y su función principal es proveer un anclaje para constituir el soporte de los orgánulos intracelulares como la mitocondria y retículo endoplasmático o el propio núcleo, entre otros, por lo que contribuye en mantener la integridad física de la célula junto con los otros filamentos intermedios (Janmey et al., 1991; Guo et al., 2013). Los ensayos realizados permitieron comprobar la existencia de modificaciones a nivel del citoesqueleto de actina como consecuencia del incremento del calcio libre intracelular, y por otra parte, si se inducen alteraciones en la integridad

celular como consecuencia del potencial permeabilizador puesto de manifiesto en los experimentos anteriores.

Los resultados obtenidos muestran que las VEs de *T. cruzi* fueron capaces de inducir una despolimerización de los filamentos de actina desde los 15 minutos de incubación, la cual se mantuvo hasta los 120 minutos post incubación con la VEs (Figura 4.10.1). En estos casos fue evidente la desorganización de los filamentos de actina, pero al mismo tiempo se observó un incremento de la actina reconocida por la faloidina en su forma globular (la denominada actina G), la cual apareció desde los primeros 15 minutos, primer tiempo de observación empleado en los experimentos tras la incubación con las VEs. Con respecto a la vimentina, esta proteína parece retraerse en los lugares del citoplasma donde la actina está desorganizada y concentrarse en aquellos lugares donde la actina G es menos evidente. La morfología celular también cambió después de la incubación con las VEs, observándose proyecciones citoplasmáticas a manera de filópodos (F), que le dan un aspecto dendrítico a las células (Figura 4.10.1). La aparición de los filópodos fue mucho más evidente a los 30 minutos de incubación de las células con las VEs de *T. cruzi*.

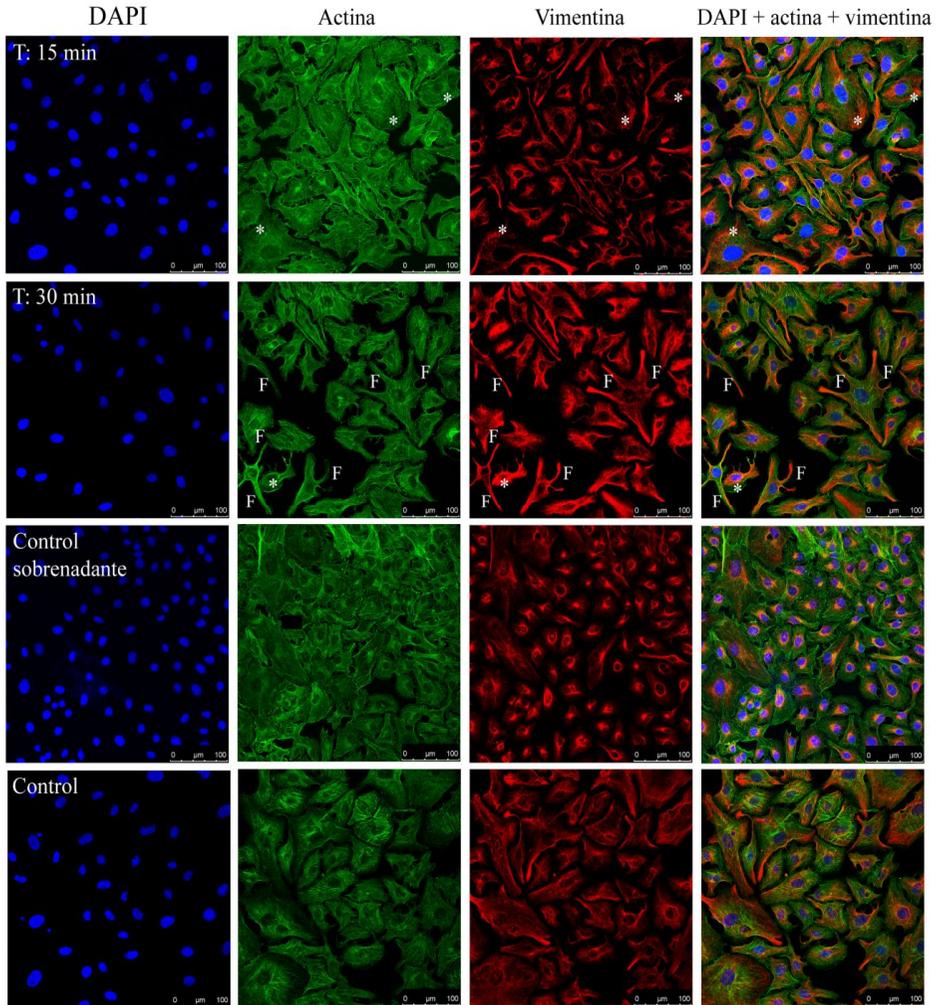


Figura 4.10.1. Despolimerización de los filamentos de actina y formación de filópodos en células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* durante 15 y 30 minutos. En la Figura es posible observar la despolimerización de los filamentos de actina desde los 15 minutos de incubación de las VEs con las células (*), así como la formación de filópodos (F), la cual es más evidente a los 30 minutos de incubación. Como controles del experimento se emplearon células Vero incubadas durante 30 minutos con el sobrenadante colectado del medio de purificación de las VEs, con el fin de determinar si los efectos observados se debían a las VEs del parásito o a componentes no particulados del secretoma presentes en el sobrenadante de la purificación de las VEs. Como controles negativos se usaron células Vero sin tratar, cultivadas y fijadas de igual manera que las que se incubaron con las VEs durante 30 minutos.

La Figura 4.10.2 representa una ampliación de la Figura 4.10.1, donde se puede apreciar de manera más clara la despolimerización de los filamentos de actina y la formación de filópodos en aquellas células incubadas con las VEs de *T. cruzi*.

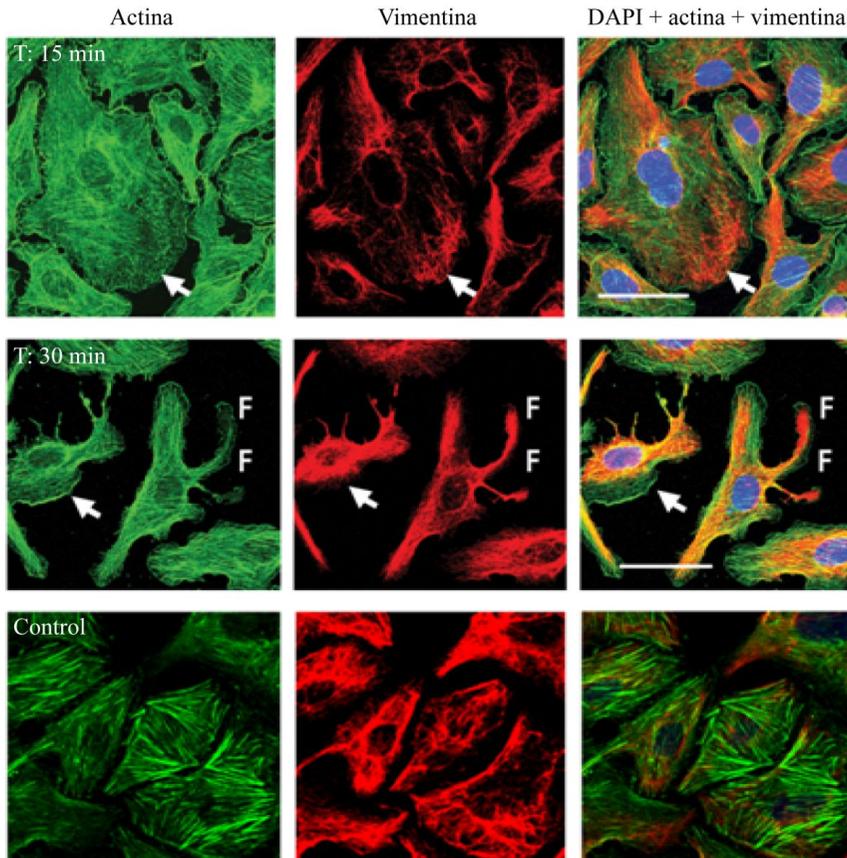


Figura 4.10.2. Amplificación de la imagen de la Figura 4.10.1 donde se observa la despolimerización de los filamentos de actina (flechas blancas) y la formación de filópodos (F) en células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4 durante 15 y 30 minutos. Si bien se aprecia la desorganización de la actina fibrilar en las células incubadas con las VEs del parásito con respecto a las células control, también es posible apreciar la presencia de un cinturón de actina que rodea la parte externa del citoplasma en las células incubadas con las VEs durante 30 minutos en algunas células, en especial en aquellas donde fue más evidente la formación de filópodos (F).

La formación de filópodos se observó aun después de 120 minutos de la incubación de las células con las VEs del parásito (Figura 4.10.3). Sin embargo, los efectos generados en las células como consecuencia de la incubación con las VEs parecen ser reversibles, puesto que a las 24 horas post incubación de las células con las VEs ya no se observaron (Figura 4.10.3). En este tiempo, tanto la organización de los filamentos de actina como la morfología celular fueron similares a las células control no incubadas con las VEs.

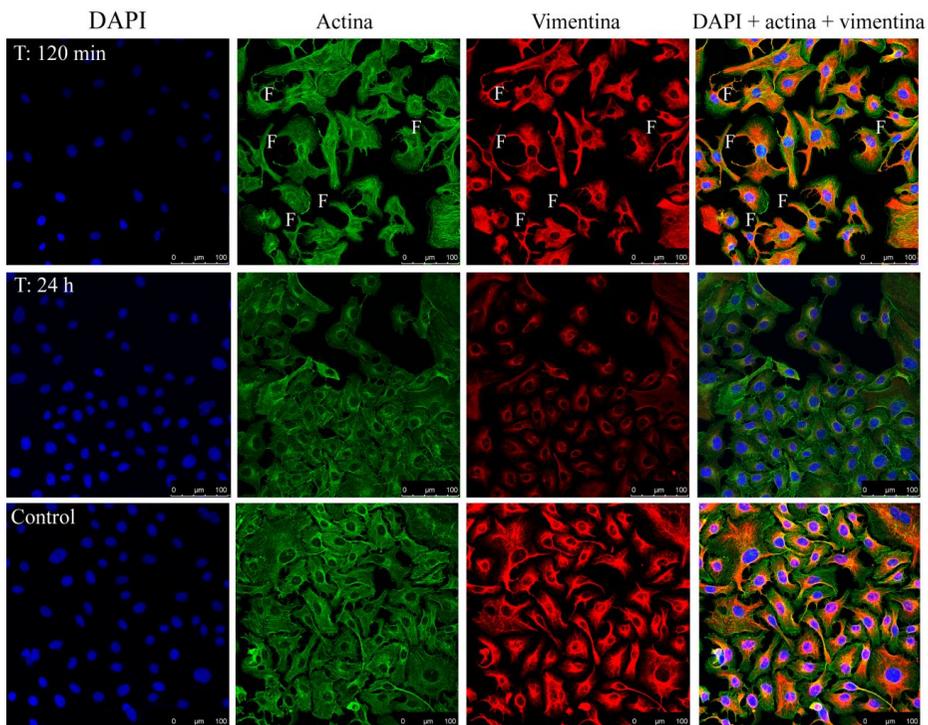


Figura 4.10.3. Efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre los filamentos de actina y vimentina de las células Vero a los 120 minutos y 24 horas post incubación. En la Figura es posible observar que a los 120 minutos de incubación de las células con las VEs aun se aprecia la formación de filópodos. Sin embargo, a las 24 horas post incubación la distribución de los filamentos de actina y la morfología celular resultó similar a las células control no incubadas con las VEs. Como control se emplearon células Vero sin incubar con las VEs, cultivadas y fijadas de igual manera que las que se incubaron con las VEs durante 24 horas.

4.11. Efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre el ciclo celular

Con el fin de evaluar otras modificaciones fisiológicas ejercidas por las VEs de *T. cruzi* sobre las células, se estudió la influencia que ejercen las mismas sobre el ciclo celular de las células con las que interactúan. Para ello, cultivos de células Vero fueron previamente sincronizadas en la fase S del ciclo celular tal y como se describió en el apartado de Materiales y métodos. Una vez alcanzada dicha sincronización, las células se incubaron con las VEs durante 2 horas en las condiciones ya descritas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.11.1., donde se aprecia un incremento en el porcentaje de células en las fases G0/G1 del ciclo celular a las 8 horas de la adición de las VEs a las células Vero, con la consecuente disminución del porcentaje de células en la fase S. Estos resultados sugieren que las VEs del parásito son capaces de inducir una interrupción del ciclo celular, paralizando la mayoría de las células del cultivo incubado con las VEs en esta fase e interrumpiendo el ciclo normal de las células del cultivo.

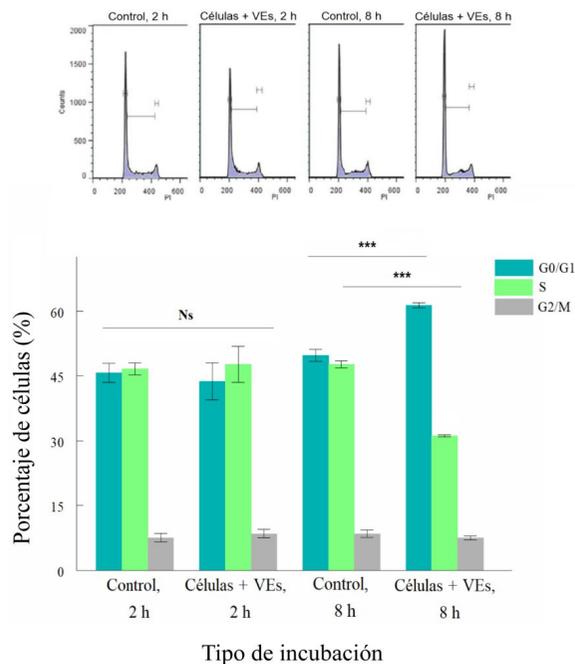
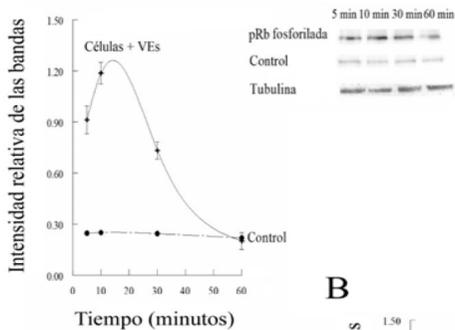


Figura 4.11.1. Efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre el ciclo celular. El porcentaje de células Vero en cada fase del ciclo celular se analizó tras teñir las células con yoduro de

propidio y cuantificar el contenido de DNA mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que a las 2 horas de incubación de las células con las VEs no hay diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular con respecto a las células control no incubadas con las VEs. Sin embargo, al realizar la incubación de las células con las VEs y el análisis a las 8 horas, se obtuvo un porcentaje mayor de células en las fases G0/G1 y un porcentaje menor de células en fase S, mientras que el cultivo control no mostró diferencias significativas entre las células que se encontraban en las fases G0/G1 y en fase S. Lo anterior indicaría una posible interrupción del ciclo celular en las fases G0/G1, correspondientes a las fases previas a la síntesis de DNA celular. Los porcentajes de células en las fases G2/M tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas. La comparación entre los porcentajes de células Vero incubadas con las VEs a las 2 y 8 horas reveló diferencias estadísticamente significativas entre ambos tiempos, encontrándose un mayor número de células en las fases G0/G1 en los cultivos de 8 horas con respecto a los de 2 horas. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes de las diferentes medidas \pm la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

Para poder explicar los resultados obtenidos en los análisis del ciclo celular se evaluaron los niveles de fosforilación de la proteína del retinoblastoma, proteína reguladora del ciclo celular (Takuwa et al., 1993). En las Figuras 4.11.2A y 4.11.2B se observan los resultados de estos análisis en células Vero incubadas con las VEs del parásito y en células Vero sin incubadas con las mismas. En los gráficos se aprecia un aumento en los niveles de la pRb en su estado fosforilado durante los primeros minutos de interacción de las células con las VEs, alcanzándose un estado de fosforilación máxima a los 15 minutos de incubación, para luego ir disminuyendo hasta llegar a valores similares a los de las células control a los 60 minutos de la incubación. En los niveles de la proteína sin fosforilar no se observaron cambios entre los tiempos de incubación empleados en los experimentos.

A



B

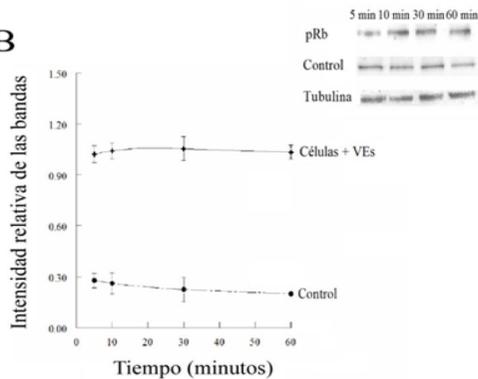


Figura 4.11.2A. Fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) en células Vero incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4. En esta Figura se muestra que a los 15 minutos de la incubación de las células con las VEs se obtuvo un nivel máximo de fosforilación, el cual llega a decaer hasta llegar a niveles similares a los de las células control sin incubar con VEs.

Figura 4.11.2B. Niveles de proteína de retinoblastoma (sin fosforilar) en células incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4. En este caso, no se observaron cambios en los niveles de la proteína al transcurrir el tiempo de incubación con las VEs. Los experimentos y las mediciones se realizaron por triplicado.

4.12. Análisis del efecto de la VEs sobre la apoptosis celular

El efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre la apoptosis en células Vero se evaluó incubándolas con las VEs durante 2 horas, seguido de la adición del agente pro apoptótico Taxol. Después de la adición del Taxol se agregaron dosis de VEs cada 8 horas hasta cumplirse el total de 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se marcaron con anexina V-FITC y yoduro de propidio para la detección fluorescente de las células necróticas y apoptóticas.

El análisis se realizó mediante citometría de flujo en un equipo FACS Calibur, como ya ha sido descrito.

Los resultados se muestran en la Figura 4.12, donde se evidencia que el valor relativo de células que se encuentran tanto en apoptosis temprana como en apoptosis tardía es significativamente más bajo en aquellas células incubadas con las VEs con respecto al control de células tratadas solo con Taxol 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (barras gris y fucsia, respectivamente). Además se observó que, al tratar las células con una concentración mayor de Taxol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), también se obtuvieron valores más bajos de apoptosis temprana en las células tratadas con las VEs y similares a los obtenidos para el caso de la apoptosis tardía.

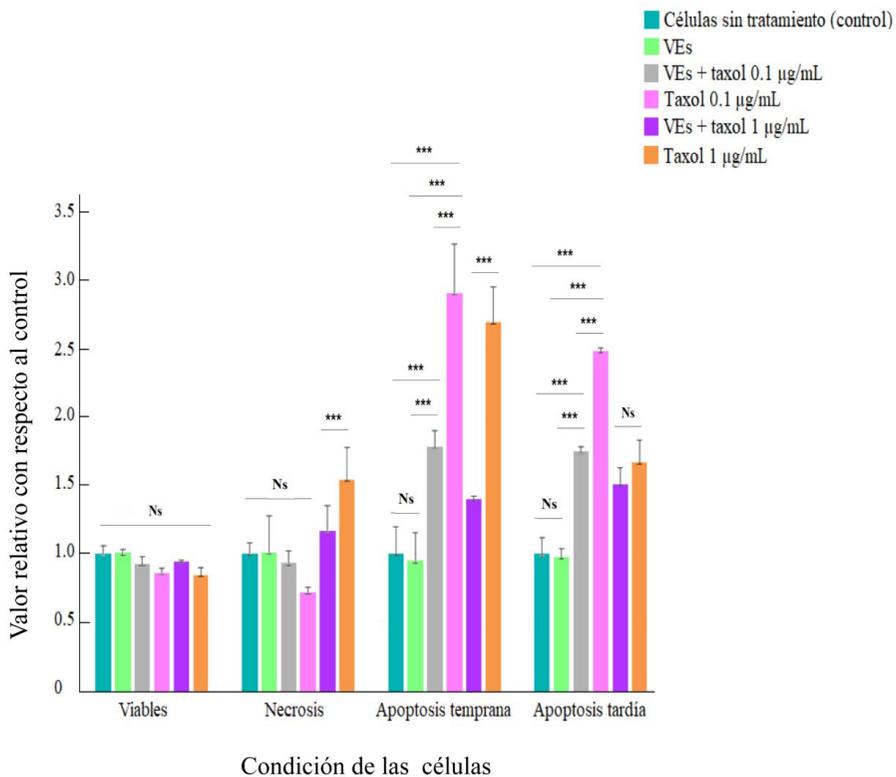


Figura 4.12. Efecto de las VEs de *T. cruzi* Pan4 sobre la apoptosis celular. Cultivos de células Vero se incubaron con VEs de tripomastigotes durante 2 horas y posteriormente se les agregó el inductor de la apoptosis, Taxol, a dos concentraciones diferentes (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A los cultivos celulares se les agregó una dosis de VEs cada 8 horas hasta las 72 horas, tiempo en el que se realizó el análisis mediante citometría de flujo. En

la Figura se observa que el valor relativo de células en apoptosis temprana y tardía es significativamente más bajo en las células incubadas con las VEs, al compararlo con las células tratadas solo con Taxol 0.1 µg/mL, diferencias que resultaron estadísticamente significativas. Sin embargo, al tratar las células con Taxol 1 µg/mL también se obtuvieron valores estadísticamente diferentes en el caso de la apoptosis temprana, no así en el caso de la apoptosis tardía, donde las diferencias entre las células incubadas con las VEs y las no incubadas no presentaron diferencias. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes ± la desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA, con comparaciones múltiples *post hoc* empleando el test de *Tukey-Kramer*, Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

4.13. Análisis de la expresión de los genes *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* en células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* y fosforilación de la RhoA-GTPasa

Al evidenciarse el papel de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* en procesos como la movilización intracelular de calcio, la despolimerización de los filamentos de actina o la interrupción del ciclo celular y la posible protección frente a la apoptosis, se quiso estudiar si los efectos mencionados anteriormente se debían a la acción de las VEs sobre alguna de las vías de señalización intracelular que involucran a las Rho-GTPasas, proteínas capaces de activar un amplio rango de respuestas celulares. Para esto, cultivos de células Vero se incubaron con las VEs de los tripomastigotes durante diferentes tiempos, cuantificándose los niveles de expresión de los genes de las GTPasas *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* mediante RT-qPCR. Como se explicó en el apartado de Materiales y métodos, el RNA extraído de las muestras de células Vero incubadas con las exovesículas y de las células Vero sin incubar con VEs se trató con DNAsa para eliminar la posible contaminación por DNA genómico y los RNAs se retrotranscribieron a cDNA. Para probar que la totalidad de las muestras generó cDNA capaz de amplificarse, se realizó una PCR empleando oligonucleótidos que amplifican el gen 18S del RNA ribosomal (Figura 4.13.1). Cada par de los oligonucleótidos diseñados se evaluó mediante PCR convencionales antes de realizar la RT-qPCR.

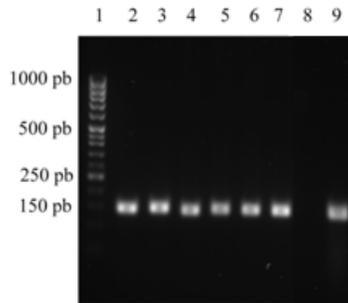


Figura 4.13.1. Fotografía del gel de agarosa al 2% donde se muestra la amplificación del gen 18S del RNA ribosomal a partir de muestras de cDNA de células Vero incubadas con VEs de *T. cruzi* Pan4. 1) Marcador de 1000 pb; 2) células Vero incubadas con VEs durante 15 minutos; 3) control de células Vero a los 15 minutos; 4) células Vero incubadas con VEs durante 30 minutos; 5) control de células Vero a los 30 minutos; 6) células Vero incubadas con VEs durante 4 horas; 7) control de células Vero a las 4 horas; 8) control negativo; 9) control positivo (DNA de células Vero).

Los resultados de los niveles de expresión se muestran en la Figura 4.13.2. Los niveles de expresión de cada gen y cada tiempo se compararon con respecto a un control de células sin incubar con las VEs, normalizándose mediante el empleo de dos genes de referencia (*GAPDH* y *18S*). En la Figura es posible observar una disminución en la expresión de los genes a partir de los 30 minutos post incubación con las VEs del parásito. Así, la expresión de los genes *Rac2* y *Cdc42* fue significativamente más baja que la de las células control sin incubar con las VEs del parásito. Hay que hacer constar que la expresión del gen *RhoA* fue indetectable a los 15 y 30 minutos, incrementándose a las 4 horas aunque con niveles significativamente más bajos que el control de células sin incubar con las VEs.

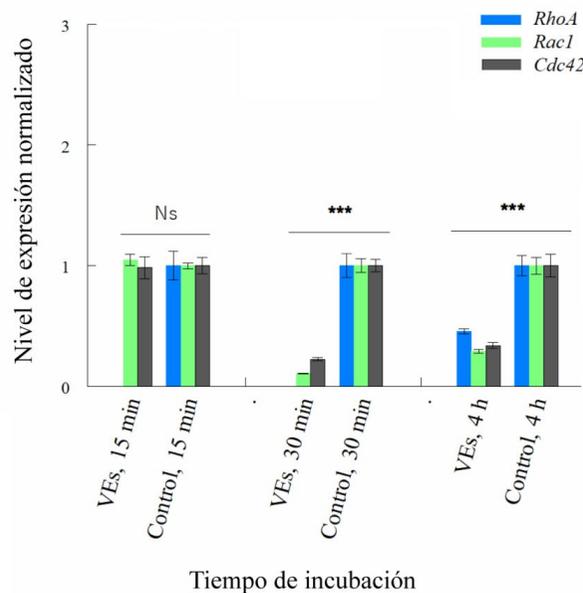


Figura 4.13.2. Niveles de expresión normalizados de los genes que codifican para las Rho GTPasas *RhoA*, *Rac1* y *Cdc42* mediante RT-qPCR en células incubadas con las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* y células control sin incubar con las VEs durante diferentes tiempos. En la Figura se observa una disminución significativa en la expresión de los genes *Rac1* y *Cdc42* en las células incubadas con las VEs durante 30 minutos, mientras que en el caso del gen *RhoA* no se evidencia la expresión a los 15 ni a los 30 minutos de incubación. Esa expresión disminuida con respecto a las células control se mantuvo incluso a las 4 horas de incubación. Los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión de dos genes, *GAPDH* y *18S* del RNA ribosomal. Los valores obtenidos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de la media. Se empleó el test de *Kruskal-Wallis*, con comparaciones *post hoc* con el test de *Mann-Whitney* y se ajustaron los valores p obtenidos con la corrección de Bonferroni. Ns: no significativo, y *** significativo ($p < 0.0001$).

Al analizar estos resultados se decidió evaluar la fosforilación de la GTPasa RhoA, principal enzima involucrada en la movilidad celular por su intervención en la producción de cambios a nivel de citoesqueleto, ciclo celular y apoptosis y cuya expresión no se evidenció en células incubadas con las VEs durante 15 y 30 minutos. Las Figuras 4.13.3A y 4.13.3B muestran los niveles de proteínas RhoA fosforilada (A) y RhoA sin fosforilar (B) en células incubadas con VEs de *T. cruzi*, así como en células incubadas con trombina

(20 μM) y LPA (40 μM), empleadas como control. En la Figura 4.13.3A es posible observar un incremento en los niveles de la proteína RhoA fosforilada entre los 5 y 10 minutos de incubación de las células con las VEs, mientras que en el caso de los controles (trombina y LPA), los niveles más altos observados se presentaron a los 5 minutos, tiempo a partir del cual los niveles de fosforilación de la proteína empezaron a descender. Este resultado se complementa con el obtenido al estudiar los niveles de proteína RhoA sin fosforilar, ya que fue justo a los 10 minutos de incubación de las células con las VEs cuando se observó el descenso en los niveles de esta proteína y, por el contrario, el incremento observado de los niveles de proteína en las células incubadas con trombina y el LPA.

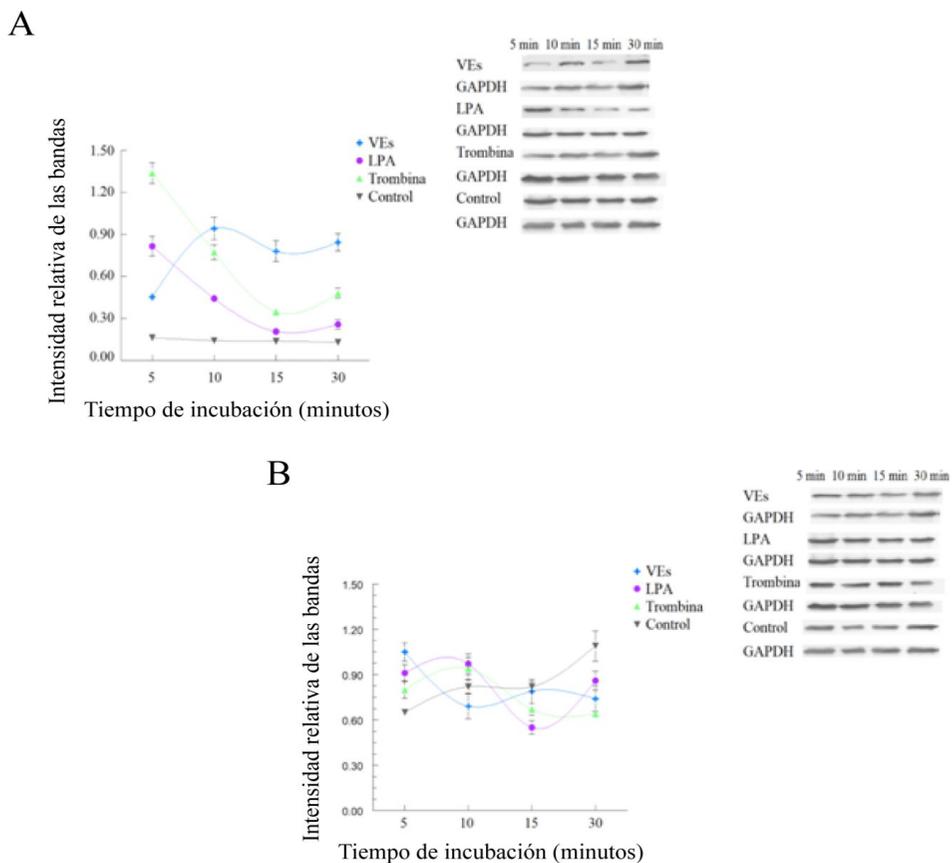


Figura 4.13.3A. Fosforilación de la proteína RhoA en células Vero incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4. En esta Figura se observa un incremento en los niveles

de fosforilación de la proteína RhoA entre los 5 y 10 minutos de incubación de las células con las VEs del parásito. En el caso de las células incubadas con trombina (20 μM) y el LPA (40 μM), los niveles más altos se presentaron a los 5 minutos, tiempo en el empezaron a descender. Los experimentos y las mediciones se realizaron por triplicado.

Figura 4.13.3B. Niveles de proteína de RhoA (sin fosforilar) en células incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4. En este caso, los resultados obtenidos a los 10 minutos fueron opuestos a los resultados obtenidos para la proteína RhoA fosforilada, ya que a este tiempo se observó una disminución en los niveles de la proteína RhoA, mientras que en el caso de las células incubadas con trombina (20 μM) y LPA (40 μM) fue cuando se obtuvieron los niveles más altos de expresión de la proteína. Los experimentos y las mediciones se realizaron por triplicado.

Los niveles de las proteínas efectoras ROCK1 y ROCK2 también fueron analizadas mediante Western blot. Con respecto a los niveles de la proteína ROCK1, las tendencias resultaron similares entre las células incubadas con VEs y las células control (sin incubar con las VEs) y entre las células incubadas con trombina (20 μM) o con LPA (40 μM). Al incubar las células con las VEs se obtuvieron niveles más altos de proteína entre los 5 y 10 minutos, los cuales descendieron hasta llegar a obtenerse el nivel más bajo a los 30 minutos. Por el contrario, la trombina y el LPA produjeron un pequeño incremento a los 15 minutos de incubación (Figura 4.13.4A). Los niveles de expresión de la proteína ROCK2 mostraron una tendencia similar entre los diferentes grupos, los cuales mantuvieron niveles similares de la proteína en todos los tiempos del ensayo, excepto en el caso de las células incubadas con trombina (20 μM) donde se produjo un descenso en los niveles de proteína a lo largo del tiempo de incubación. En ambos casos, es importante destacar que las células incubadas con las VEs mostraron los niveles más bajos de dichas proteínas efectoras. Los resultados se muestran en la Figura 4.13.4B.

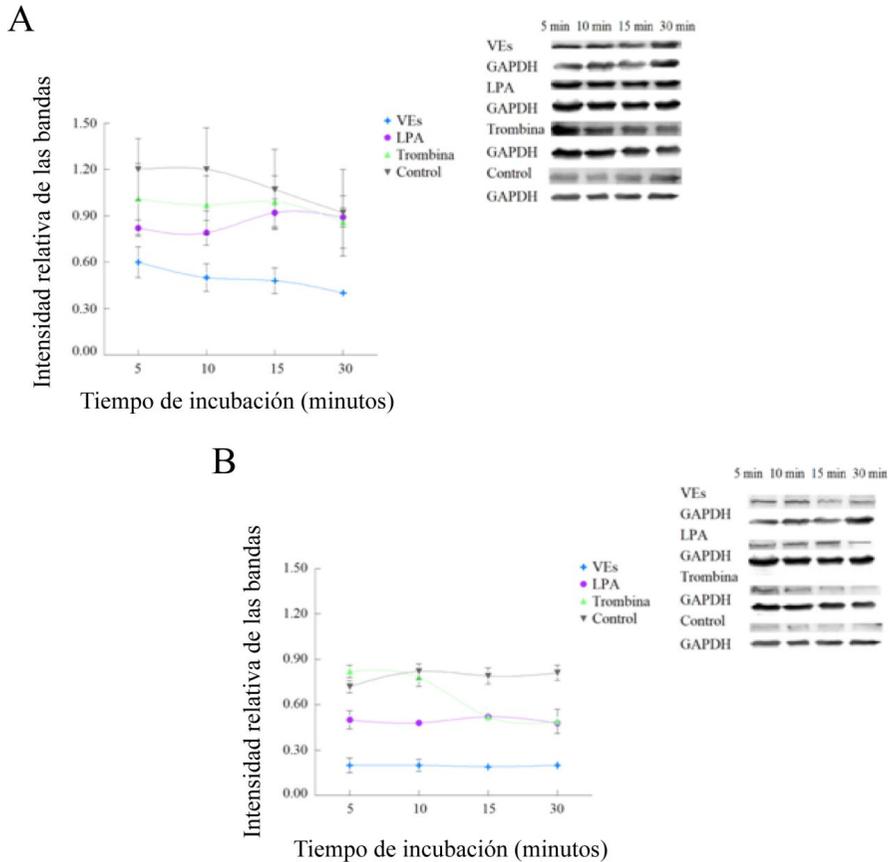


Figura 4.13.4A. Niveles de la proteína efectora ROCK1 en células Vero incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4. En el gráfico es posible observar una tendencia similar entre las células incubadas con VEs y las células control (sin incubar con las VEs) y entre las células incubadas con trombina (20 μ M) y con LPA (40 μ M). En el caso de las células incubadas con las VEs se observó un descenso más acusado en la expresión de la ROCK1, similar al obtenido en el caso de las células control. En las células incubadas con trombina y LPA se produjo un ligero ascenso de los niveles a los 15 minutos (aunque no significativo), hasta llegar a valores semejantes a los de las células control a los 30 minutos de tratamiento. Las células incubadas con las VEs mostraron niveles de expresión menores que el resto de los grupos del experimento en todos los casos.

Figura 4.13.4B. Niveles de la proteína efectora ROCK2 en células incubadas con VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4. En este caso se observó una tendencia similar entre los grupos, los cuales mantuvieron niveles de proteína similares en todos los tiempos, excepto en el caso de las células incubadas con trombina (20 μ M), donde se produjo un descenso en los niveles de expresión de esta proteína.

4.14. Observación de las VEs de *T. cruzi* y de los inmunocomplejos formados por las VEs de *T. cruzi* con IgGs anti-*T. cruzi* mediante microscopía de fuerza atómica (MFA)

En las Figuras 4.14.1 y 4.14.2 se presentan imágenes de topografía (altura, amplitud y señal de error) de las VEs de los tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*, de las IgGs anti *T. cruzi* purificadas mediante cromatografía con una columna HP spin trap de proteína G y de los inmunocomplejos formados al incubar las VEs del parásito con estas IgGs anti-*T. cruzi*. Cada una de las muestras fue sometida a una caracterización estructural, así como a un análisis de propiedades mecánicas, como se muestra en los siguientes apartados.

4.14.1. Caracterización estructural de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4, IgGs de un suero anti-*T. cruzi* y los inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi* empleando microscopía de fuerza atómica

Se realizó un estudio comparativo entre las imágenes de topografía y los histogramas de altura *Z* de las VEs tripomastigotes de *T. cruzi*, así como de las IgGs antes y después de la incubación con las VEs mediante MFA. Las muestras de VEs del parásito y de las IgGs fueron adsorbidas a la mica, para posteriormente realizar la observación de los inmunocomplejos VEs-IgGs formados antes de su depósito sobre el sustrato (Figuras 4.14.1.1 y 4.14.1.2). Las muestras se analizaron empleando el modo no contacto y, en el caso de los inmunocomplejos, se empleó también el modo “tapping” o de amplitud modulada, donde se mantiene constante la amplitud y la punta golpea intermitentemente sobre la superficie.

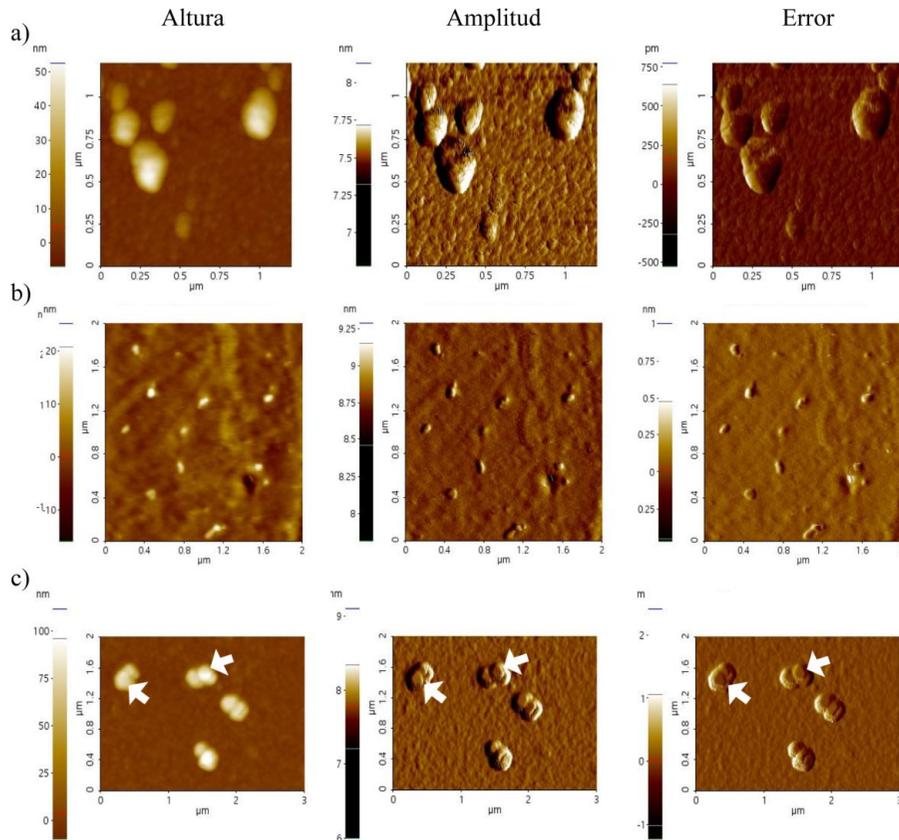


Figura 4.14.1.2. Magnificación de la Figura 4.14.1.1 donde se muestran las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (a), de IgGs anti-*T. cruzi* (b) y de los inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi* (c) empleando MFA. En la Figura se presentan imágenes de la topografía (altura, amplitud y señal de error) para cada muestra. Las flechas blancas indican la presencia de estructuras (en este caso, las IgGs) sobre las VEs de los tripomastigotes.

Las características estructurales de cada muestra se detallan a continuación.

4.14.1.1. VEs de tripomastigotes *T. cruzi* Pan4

Los estudios realizados mediante microscopía electrónica de transmisión, presentados al inicio de este apartado, revelaron que las VEs de los tripomastigotes consisten en estructuras esféricas, sin dar mayor detalle sobre su subestructura. Al realizar el análisis de las imágenes de la altura Z de las VEs en modo no contacto de MFA se obtuvieron partículas bastante

homogéneas de tamaño comprendido entre 20-50 nm (Figura 4.14.1.1.1). Las imágenes de amplitud y topografía (Figura b y Figura c) revelan detalles de la morfología de estas vesículas, con una longitud entre 100 a 200 nm. La Figura 1b permite observar la estructura característica con un centro que presenta una depresión, lo que sugiere que podría existir una densidad heterogénea o quizás los mecanismos de contraste de la imagen podrían afectar el resultado y mostrar este aspecto. La imagen de amplitud evidencia la superficie no homogénea de las exovesículas.

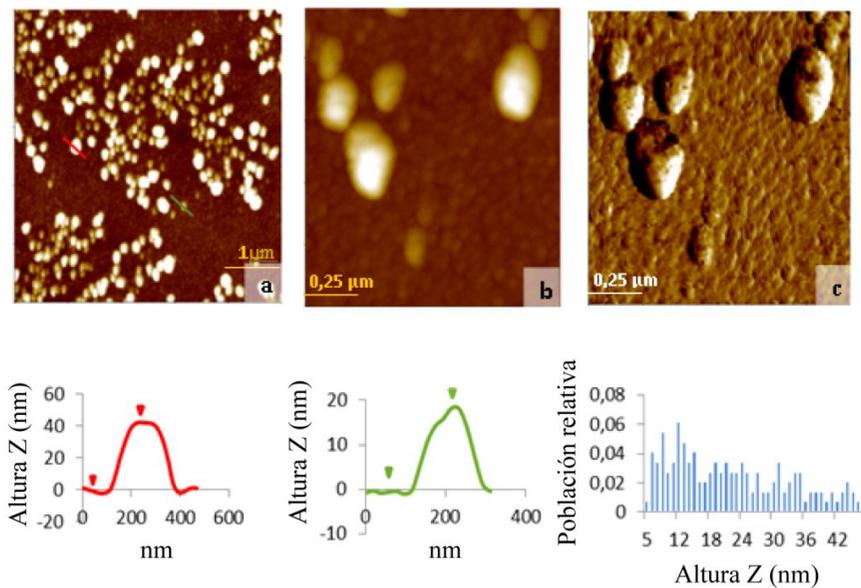


Figura 4.14.1.1.1. Imágenes representativas de las VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud). Se colocaron 10 μL de una muestra de VEs (1.55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas) sobre una superficie de mica. a) Imagen de altura Z, b) magnificación de la imagen a y c) amplitud correspondiente a la imagen b. Los gráficos muestran los perfiles de línea que corresponden a las imágenes de topografía (el perfil de línea rojo corresponde a una altura Z: 40 nm y el perfil de línea verde corresponde a una altura Z: 20 nm). El gráfico de barras muestra la información estadística sobre la frecuencia relativa de cada altura Z (nm).

4.14.1.2. IgGs de ratón anti-*T. cruzi*

En la Figura 4.14.1.2.1 se presentan las imágenes obtenidas en el caso de las IgG anti-*T. cruzi*, necesarias para completar el análisis de los inmunocomplejos que forman con las VEs mediante este tipo de microscopía. Asimismo, se muestra una magnificación de la imagen (Figura 4.14.1.2.1b) y su amplitud (Figura 4.14.1.2.1c). Del análisis de las imágenes se obtuvieron estructuras con un rango de tamaño comprendido entre los 0.6 nm y 18 nm, aunque la mayoría de las imágenes mostraron una altura comprendida en un rango de 3 nm hasta los 13 nm. Como se puede observar en los perfiles de línea verde y roja, la IgG parece tener una altura de 10 nm en la imagen ampliada. Sin embargo, en las muestras absorbidas sobre la mica, se observaron anticuerpos con formas variables, incluidas formas esféricas y formas más o menos irregulares. Esto se resalta particularmente en la imagen de amplitud de la Figura 4.14.1.2.1c.

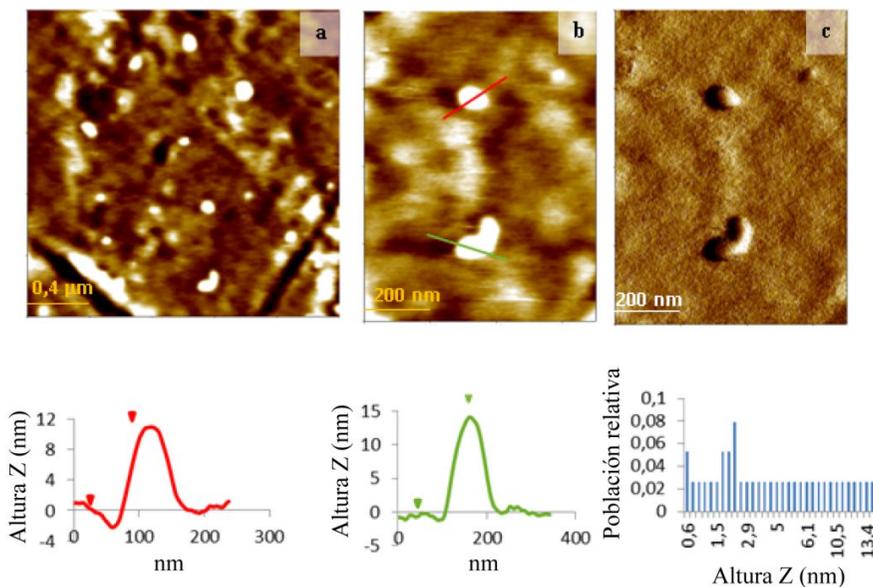


Figura 4.14.1.2.1. Imágenes representativas de las IgGs anti-*T. cruzi* purificadas a través de cromatografía mediante columna con proteína A, estudiadas mediante MFA (topografía y amplitud). a) Imagen de altura Z, b) magnificación de la imagen a y c) amplitud correspondiente a la imagen b. Los gráficos muestran los perfiles de línea que corresponden a las imágenes de topografía (el perfil de línea rojo corresponde a una

altura Z: 11 nm y el perfil de línea verde corresponde a una altura Z: 14 nm). El gráfico de barras muestra la información estadística sobre la frecuencia relativa de cada altura Z (nm).

4.14.1.3. Inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi*

En la Figura 4.14.1.3.1 se muestran las imágenes del modo “tapping” de los inmunocomplejos formados por la incubación de las VEs de *T. cruzi* con las IgGs anti-*T. cruzi*. En las VEs de la Figura se observa una superficie cubierta uniformemente con material que no aparece a cuando las VEs se observaron directamente, antes de la incubación con las IgGs (Figura 4.14.1.1.1).

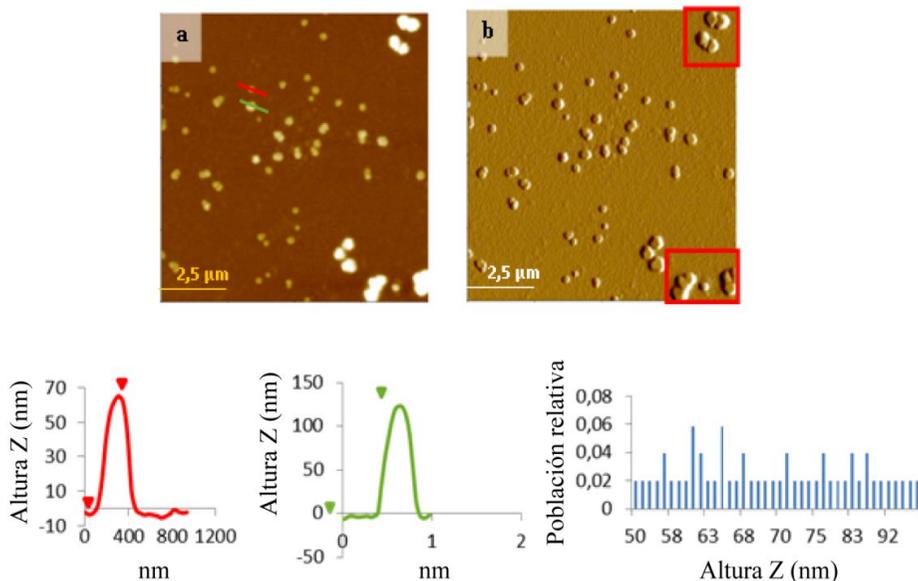


Figura 4.14.1.3.1. Imágenes representativas de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud). Los inmunocomplejos fueron formados mediante la incubación de las VEs con las IgGs anti-*T. cruzi* purificadas como se describió en el apartado de Materiales y métodos. a) Imagen de altura Z y b) imagen de amplitud que corresponde a la imagen de topografía. Los gráficos muestran los perfiles que corresponden a las imágenes de topografía (el perfil de línea rojo corresponde a una altura Z: 60 nm y el perfil de línea verde corresponde a una altura Z: 120 nm). El gráfico de barras muestra la información estadística sobre la frecuencia relativa de la altura Z (nm).

En la Figura 4.14.1.3.2 se observan los mismos inmunocomplejos de la Figura anterior pero analizados mediante el modo no contacto. En este caso, el rango de tamaño es consistente con el rango obtenido en las mediciones anteriores, con los inmunocomplejos individuales distribuidos al azar sobre el sustrato. Además de los inmunocomplejos, se observan unas estructuras más grandes (con dimensiones entre $0.8 \mu\text{m}$ y $1.5 \mu\text{m}$ de longitud) (Figuras 4.14.1.3.2b y 4.14.1.3.2b dentro de los rectángulos rojos). Estas estructuras de mayor tamaño corresponden a la agregación de una o más IgG con una o varias VEs. En general, los inmunocomplejos poseen una estructura globular que varía de tamaño, con un diámetro promedio de entre $0.35 \mu\text{m}$ y $1.35 \mu\text{m}$ de longitud y una altura de 50 nm a 250 nm . La Figura 4.14.1.3.3 muestra una ampliación de una imagen de inmunocomplejos donde los más pequeños presentan una longitud de $0.175 \mu\text{m}$ y una altura de 50 nm , mientras que los más grandes tienen un diámetro de $1.8 \mu\text{m}$ y una altura de 246 nm . En ambos inmunocomplejos es posible confirmar la forma globular que poseen.

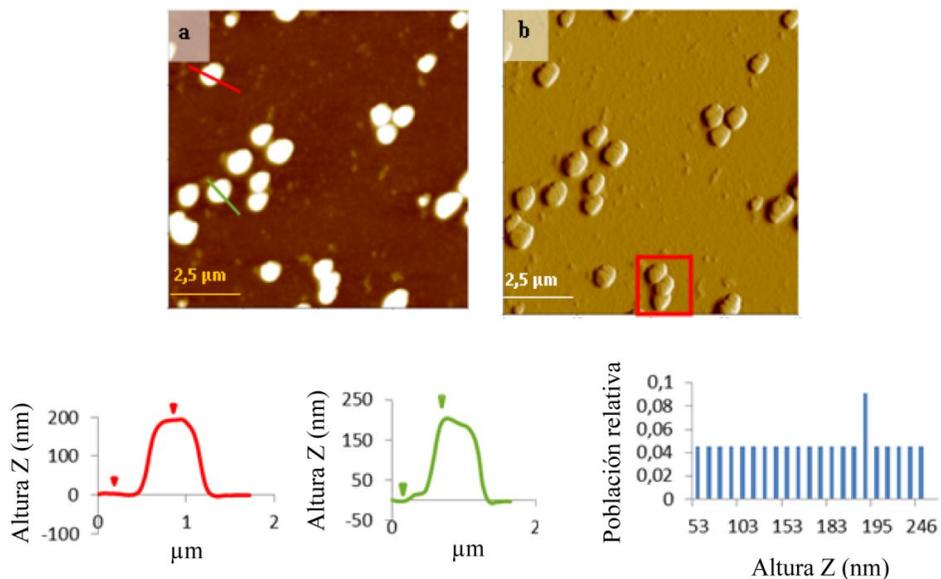


Figura 4.14.1.3.2. Imágenes representativas de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y amplitud). Las muestras se prepararon de la misma forma que la descrita en el pie de la Figura 4.14.1.3.1. a) Imagen de altura Z y b) imagen

de amplitud que corresponde a la imagen de topografía. Los gráficos muestran los perfiles de línea que corresponden a las imágenes de topografía (el perfil de línea rojo corresponde a una altura Z: 180 nm y el perfil de línea verde corresponde a una altura Z: 220 nm). El gráfico de barras muestra la información estadística sobre la frecuencia relativa de la altura Z (nm).

En algunos inmunocomplejos mostrados en la Figura anterior se pudo demostrar la formación de dichos inmunocomplejos como consecuencia de la unión de los anticuerpos a las VEs, evidenciándose el cambio de altura que provoca dicha unión (Figura 4.14.1.3.3.) Se incluye en esta Figura una fotografía de contraste de fase que trata de mostrar de manera más clara la unión VEs-IgGs.

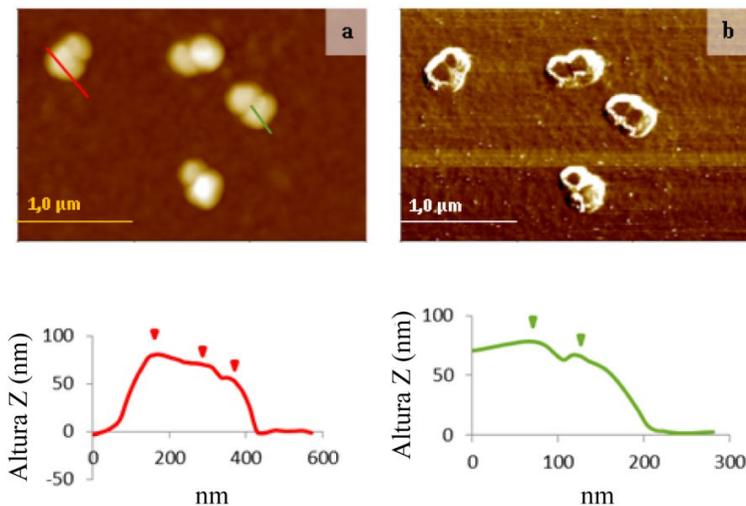


Figura 4.14.1.3.3. Amplificación de las imágenes representativas de la formación de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti *T. cruzi* mediante MFA (topografía y contraste de fase). a) Imagen de altura Z y b) imagen de contraste de fase del inmunocomplejo formado por las VEs y las IgGs. Los gráficos muestran los perfiles de línea que corresponden a las imágenes de la topografía (el perfil de línea rojo corresponde a una altura Z del primer paso: 8.167 nm y del segundo paso: 10.082 nm; el perfil de línea verde corresponde a una altura Z: 11.220 nm).

4.14.2. Resultados del estudio de las propiedades mecánicas de las VEs de los tripomastigotes de *T. cruzi* y los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi*

Además de las mediciones ya descritas sobre las exovesículas, las IgGs y los inmunocomplejos VEs-IgGs, la MFA se utilizó para evaluar algunas de las propiedades biomecánicas de las VEs y los inmunocomplejos mediante espectroscopía de fuerza, una técnica analítica dinámica que permite el estudio de las propiedades de las interacciones de los enlaces, en este caso IgG-antígenos, presentes en las VEs de *T. cruzi*. La preparación de las muestras se realizó como se describió en la sección de Materiales y métodos, empleándose el modo “Pin Point”. La Figura 4.14.2.1 muestra una imagen de altura Z y un mapa nanomecánico donde se ilustra la rigidez, el módulo de Young y el perfil de adhesión de los inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi* (Figura 4.14.2.1a) y las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (Figura 4.14.2.1b).

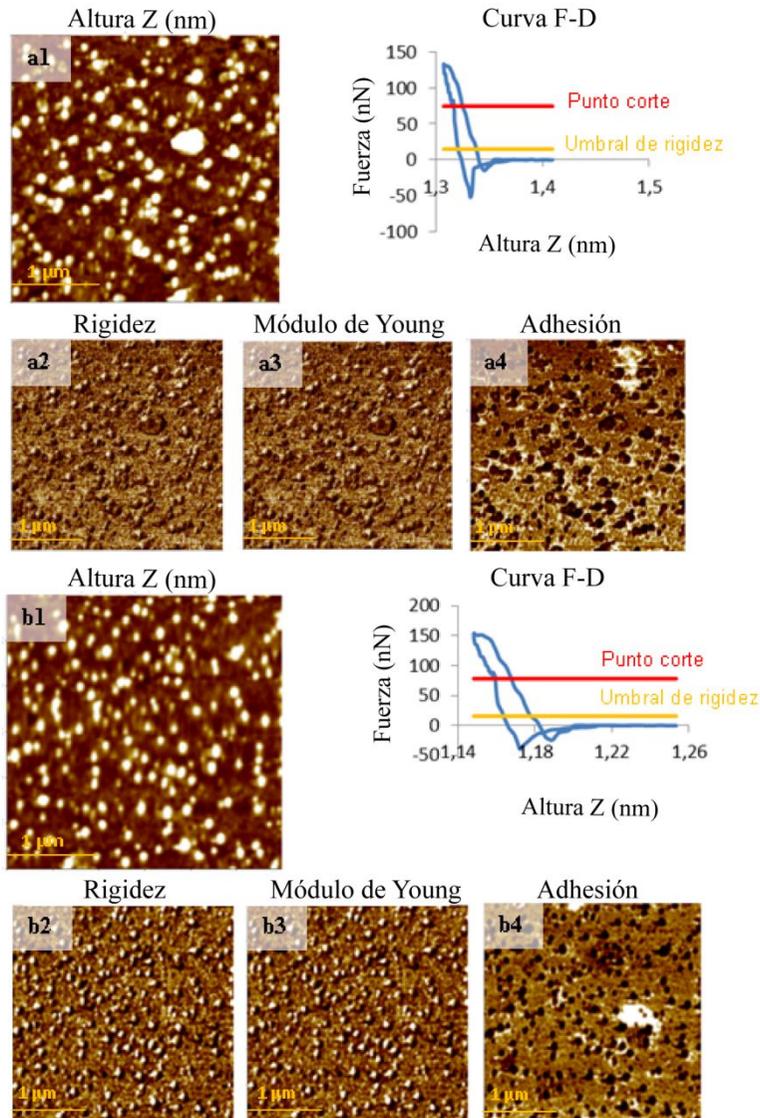


Figura 4.14.2.1. Imágenes de altura Z y mapas nanomecánicos de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* (a) y VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 obtenidos mediante MFA. Se muestra la rigidez, el módulo de Young y el perfil de adhesión.

Los resultados del análisis de las propiedades nanomecánicas se muestran en la Tabla 4.14.2. En el caso de los inmunocomplejos VEs-IgGs se obtuvieron valores más bajos de rigidez y módulo de Young al compararlos con las VEs solas (rigidez: $7.573 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ vs. $13.913 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$; módulo de Young: 0.462 GPa vs. 1.111 GPa). Con respecto a la adhesión, los inmunocomplejos

mostraron valores más altos de adhesión que las de las VEs solas (51.590 nN vs. 39.667 nN). Estos resultados confirmarían la idea de que las propiedades mecánicas de las VEs cambian después de la unión de las IgGs anti-*T. cruzi* a la exovesícula.

Tabla 4.14.2. Propiedades nanomecánicas de VEs de tripomastigotes de *T. cruzi* e inmunocomplejos formados por la VEs-IgGs anti-*T. cruzi*: rigidez, módulo de Young y adhesión (nN).

Muestra	Rigidez ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)	Módulo de Young (GPa)	Adhesión (nN)
VEs	13.913 ± 2.783	1.111 ± 0.218	39.667 ± 7.140
Inmunocomplejos (VEs-IgGs)	7.573 ± 1.515	0.462 ± 0.093	51.590 ± 10.318

4.15. Biostrucción de las VEs de *T. cruzi* y los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* mediante el sistema de análisis de imágenes “*in vivo*” IVIS

Debido a los resultados obtenidos sobre la permeabilización celular y la movilización intracelular de calcio en cultivos celulares incubados con las VEs y dado que por el momento no se conocen las causas de las diferentes patologías de la enfermedad de Chagas, se decidió estudiar la biodistribución de las exovesículas y los inmunocomplejos VEs-IgGs en los diferentes tejidos y órganos de animales susceptibles a una infección con *T. cruzi*. Para ello, después de obtener y purificar las IgGs de sueros de ratones hiperinmunes anti-*T. cruzi* mediante cromatografía de afinidad, las IgGs obtenidas se trataron con papaína con el fin de romperlas y purificar las regiones Fab. Tanto las IgGs como las regiones Fab se incubaron con las exovesículas para formar los complejos y así conocer el papel que podría desempeñar la región Fc de las IgGs en la biodistribución de las VEs al ser inyectadas en los ratones.

Antes de realizar la inyección intravenosa de las VEs y de los inmunocomplejos en los animales, se procedió a comprobar el reconocimiento

de las proteínas de las VEs por las IgGs y si en el proceso de digestión y purificación de las regiones Fab de las IgGs fue exitoso. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.15.1.

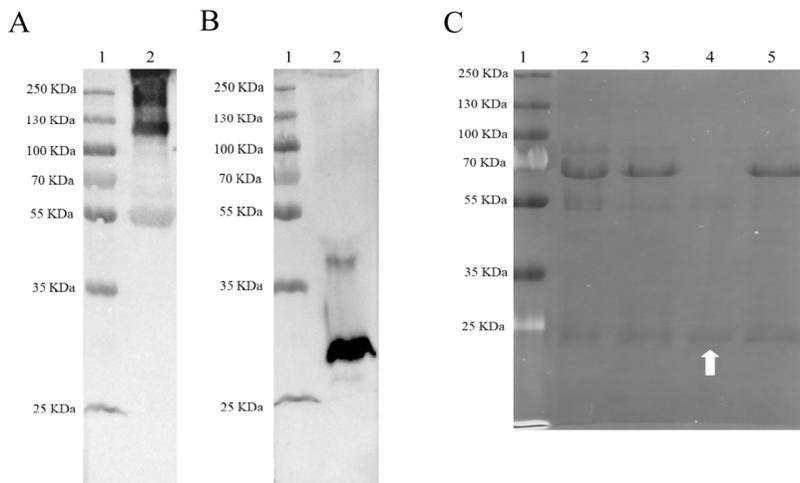


Figura 4.15.1A. Reconocimiento de las proteínas de las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* por las IgGs anti-*T. cruzi* (obtenido en ratón) mediante Western blot. 1) Marcador de peso molecular y 2) muestra de VEs de tripomastigotes (90 µg de proteína).

Figura 4.15.1B. Reconocimiento mediante Western blot del receptor CD9 (24 KDa), específico de los exosomas de mamíferos, en las VEs de células Vero por un anticuerpo anti-CD9 (Sigma Aldrich, USA), empleado como control de biodistribución de inmunocplejos no específicos de *T. cruzi*. 1) Marcador de peso molecular y 2) muestra de VEs de células Vero (90 µg de proteína).

Figura 4.15.1C. Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida que muestra las fracciones de las IgGs tras el tratamiento con la papaína. 1) Marcador de peso molecular, 2) muestra de IgGs tras la purificación a partir de suero de ratón con la columna de proteína G, 3) muestra de las fracciones Fab y Fc tras el tratamiento de la muestra de IgGs con la papaína, 4) fracción Fab obtenida tras la separación de las fracciones Fab y Fc con la columna de proteína G (señalada con flecha blanca) y 5) fracción Fc obtenida tras la separación de las fracciones Fab y Fc con la columna de proteína G.

Los resultados de biodistribución se muestran en la Figura 4.15.2. A los 30 minutos de inyectadas las VEs del parásito, se observó una concentración de las mismas en el hígado de los ratones. Sin embargo, la

presencia de las VEs en este órgano se hizo evidente en todos los animales del experimento a partir de las 24 horas.

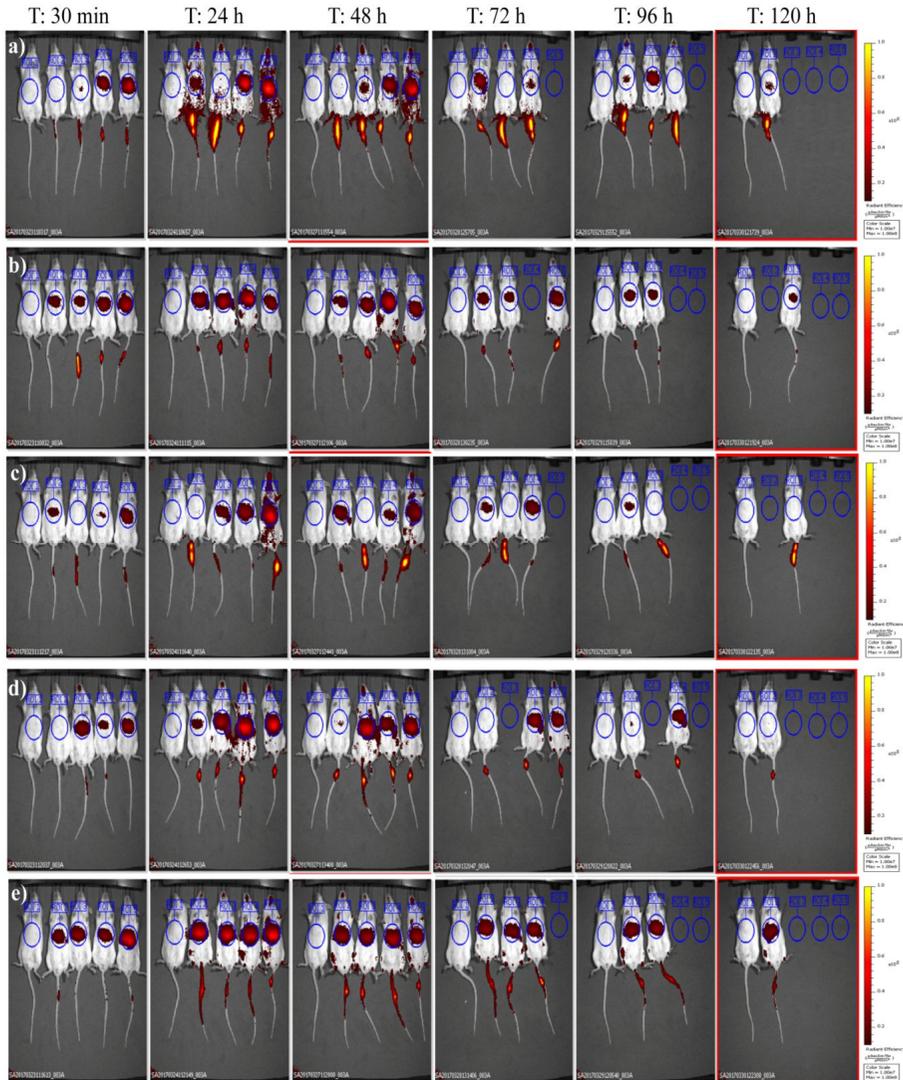


Figura 4.15.2. Distribución de las VEs de *T. cruzi* Pan4 e inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi* teñidos con el colorante DiR mediante IVIS. El seguimiento se realizó desde los 30 minutos hasta las 120 horas de inyectados en los animales. a) VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*, b) inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi*, c) pseudoimmunocomplejo formado por las VEs de *T. cruzi*-fracción Fab de las IgGs obtenidas de la fracción no retenida por la columna de proteína G tras la digestión de las IgGs con papaína, d) inmunocomplejo VEs de células Vero-IgG anti CD9

y e) VEs de los tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* preincubadas con un suero preinmune de ratón. El primer ratón (sin color) corresponde al blanco del ensayo, al cual se le inyectó PBS tratado con el colorante de la misma manera que el resto de las muestras.

Dado que a las 24 horas se observó señal en todos los animales, se sacrificó un animal por grupo a partir de las 72 horas y se realizó la observación *ex vivo* de los órganos. Los resultados se muestran en la Figura 4.15.3.

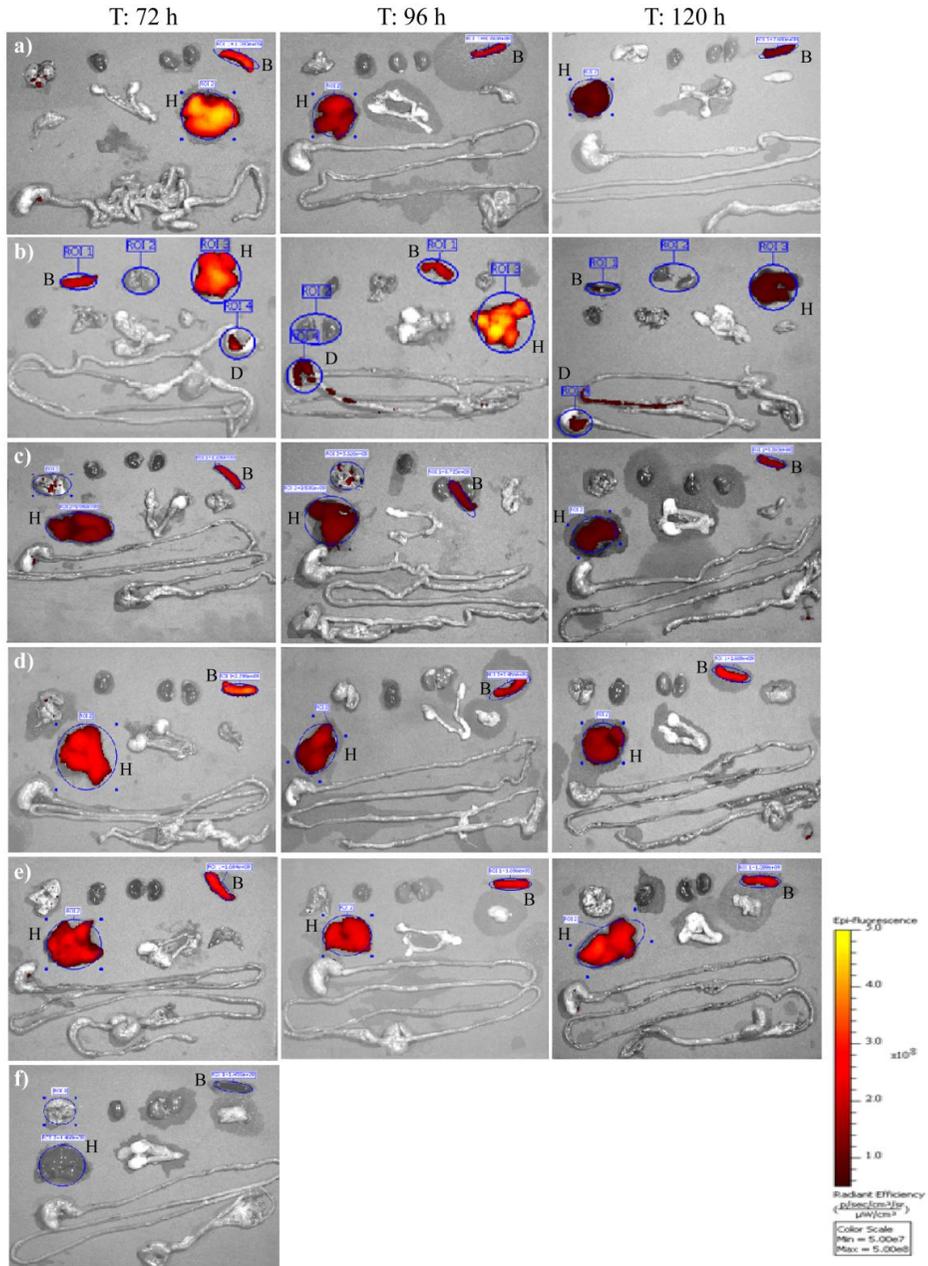


Figura 4.15.3. Observación mediante IVIS de los órganos de los ratones sacrificados a las 72, 96 y 120 horas de inyectados con las VEs e inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs de *T. cruzi* teñidos con el colorante DiR. a) Ratones inyectados con VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*, b) ratones inyectados con los inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs anti-*T. cruzi*, c) ratones inyectados con los pseudoimmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-fracción Fab de las IgGs obtenidas con la columna de proteína, d) ratones inyectados con

los inmunocomplejos VEs de células Vero-IgG anti CD9; e) ratones inyectados con VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* preincubadas con un suero preinmune de ratón, sin la presencia de IgGs específicas para los antígenos del parásito y f) ratón inyectado con PBS sometido al mismo protocolo de tinción con DiR (blanco del ensayo).

El análisis de las imágenes permitió apreciar señal fluorescente principalmente en órganos como el hígado y el bazo, tanto en el caso de las VEs de *T. cruzi* como en el de los controles empleados. Sin embargo, en el caso de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi* fue posible observar señal en otros órganos, llamando la atención su presencia en el estómago e intestino. Debido a esta distribución diferente, se decidió realizar un seguimiento durante 2 tiempos más (140 y 164 horas), con el fin de comprobar la presencia de inmunocomplejos en órganos del aparato digestivo. Los resultados se muestran en la Figura 4.15.4.

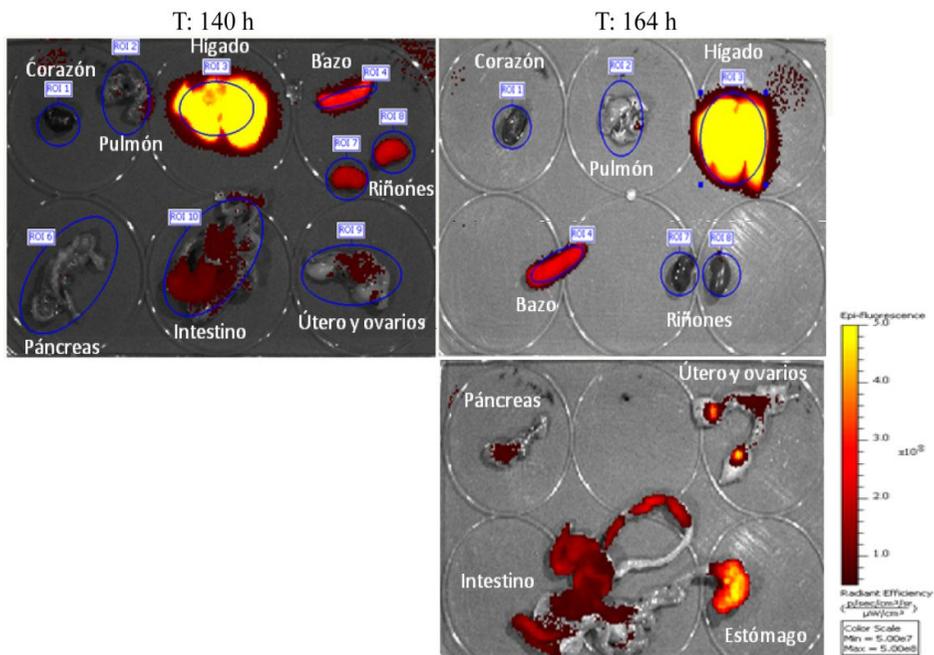


Figura 4.15.4. Observación de los órganos de los ratones sacrificados a las 140 y 164 horas de inyectados con las VEs e inmunocomplejos VEs de *T. cruzi*-IgGs de *T. cruzi* teñidos con el colorante DiR, mediante IVIS. En estas imágenes es posible observar la presencia de dichos inmunocomplejos en diferentes órganos además del hígado y del bazo, como sucede

en el caso de las VEs. Es importante resaltar la presencia de los inmunocomplejos en el estómago e intestino de los animales sacrificados.

4.16. Análisis y comparación del proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* Pan4

Previo al análisis comparativo de la composición de proteínas de las VEs procedentes de tripomastigotes y epimastigotes del parásito, se realizó la confirmación de la presencia de las VEs en las muestras purificadas por medio de MFA. El resultado se muestra en la Figura 4.16.1.

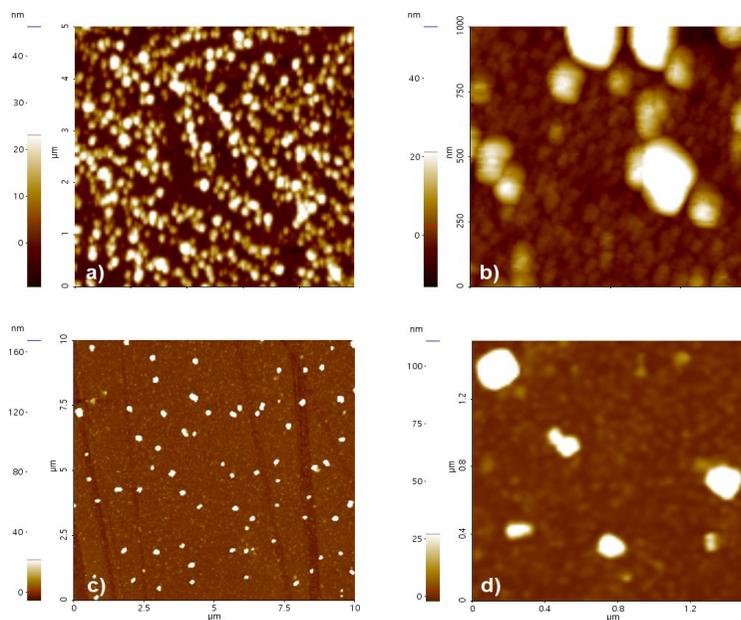


Figura 4.16.1. Observación de las VEs de tripomastigotes (a, b) y epimastigotes (c, d) de la cepa Pan4 de *T. cruzi* mediante MFA. Se presentan las imágenes de altura Z. b) y d) corresponden a magnificaciones de las imágenes a) y c), respectivamente.

La comparación del proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 reveló que las exovesículas de ambas formas evolutivas presentan 274 proteínas en común y que las VEs procedentes de los tripomastigotes superan en cantidad de proteínas a las VEs de las formas

epimastigotas (Figura 4.16.2). Así, 254 proteínas (66%) fueron específicas de las VEs de los tripomastigotes mientras que 141 proteínas (26.7%) resultaron específicas de las VEs secretadas por los epimastigotes.

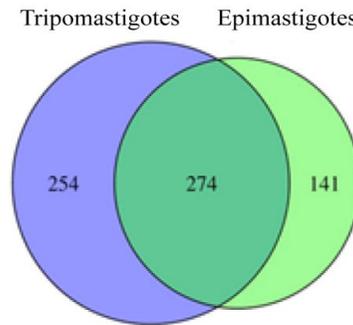


Figura 4.16.2. Diagrama de Venn donde se compara el proteoma de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*. Los resultados demuestran que las VEs de ambas formas del parásito comparten un total de 274 proteínas.

Los estudios comparativos de la naturaleza de las proteínas encontradas muestran una mayor carga proteica de proteínas específicas de la superficie de la membrana en las VEs procedentes de las formas tripomastigotas en relación con las existentes en las formas epimastigotas. Así, el 23% de las proteínas presentes en las VEs de tripomastigotes se identificaron como miembros de las familias multigénicas de las proteínas de superficie, mientras que solo el 9.2% del proteoma de las VEs de epimastigotes fueron proteínas pertenecientes a estas familias antes mencionadas (Figura 4.16.3). Entre estas proteínas de superficie, cabe destacar la presencia de *trans*-sialidasas en las VEs de los tripomastigotes, las cuales representaron el 22% de toda la carga proteica de dichas exovesículas. Se determinó la existencia de proteínas procedentes de otras familias multigénicas como la DGF-1, la cual se encontró exclusivamente en las VEs de los epimastigotes, representando 2% de su contenido proteico, por lo que

quizás podría ser considerada un marcador de las exovesículas de estas formas del parásito.

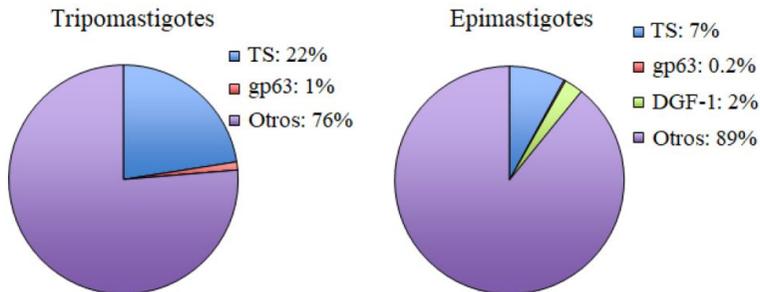


Figura 4.16.3. Proteínas de superficie presentes en las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*. Los gráficos ilustran las diferencias en la cantidad de proteínas de superficie presente en las VEs de ambas formas del parásito, donde las VEs de las formas tripomastigotes contienen un 23% de proteínas ligadas a superficie mientras que las VEs de las epimastigotes solo contienen un 9.2% de las mismas. Se destaca además la presencia de *trans*-sialidasas en especial en las VEs de las formas tripomastigotas y de DGF-1 únicamente presente en las VEs de los epimastigotes.

La clasificación de las *trans*-sialidasas obtenidas empleando el sistema de clasificación propuesto por Freitas y colaboradores (2011) (Freitas et al., 2011) reveló la gran cantidad y variabilidad de estas proteínas en las VEs de las formas tripomastigotas, obteniéndose un total de 121 *trans*-sialidasas pertenecientes a todos los grupos (desde el grupo I hasta el VIII) (Figura 4.16.4). En el caso de las *trans*-sialidasas en las VEs obtenidas a partir de los cultivos de las formas epimastigotas, estas fueron mucho menos abundantes, identificándose un total de 33 proteínas y todas ellas pertenecientes a grupo II .

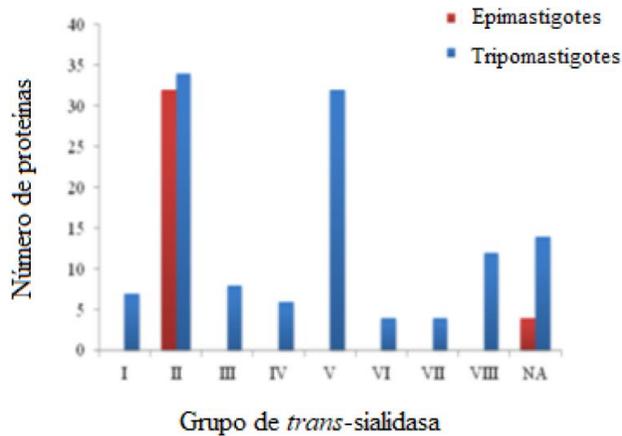
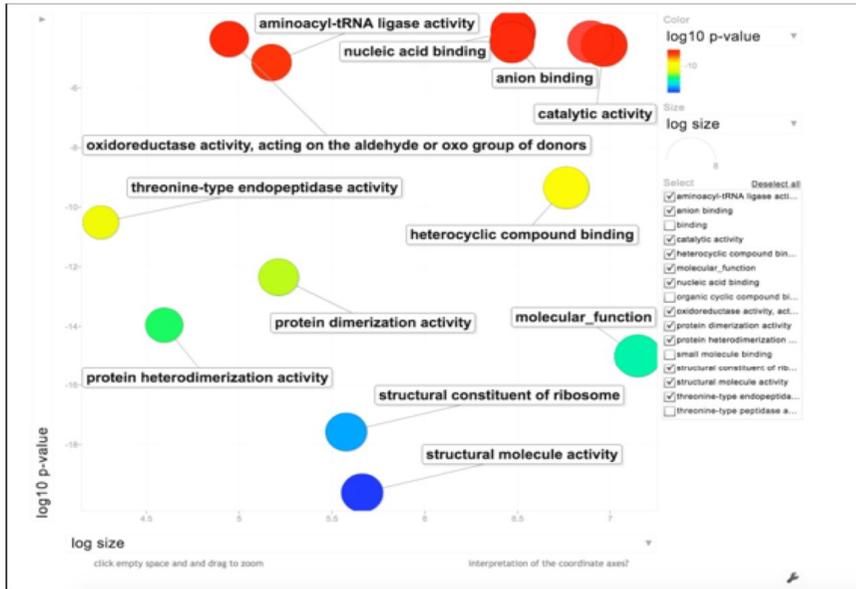


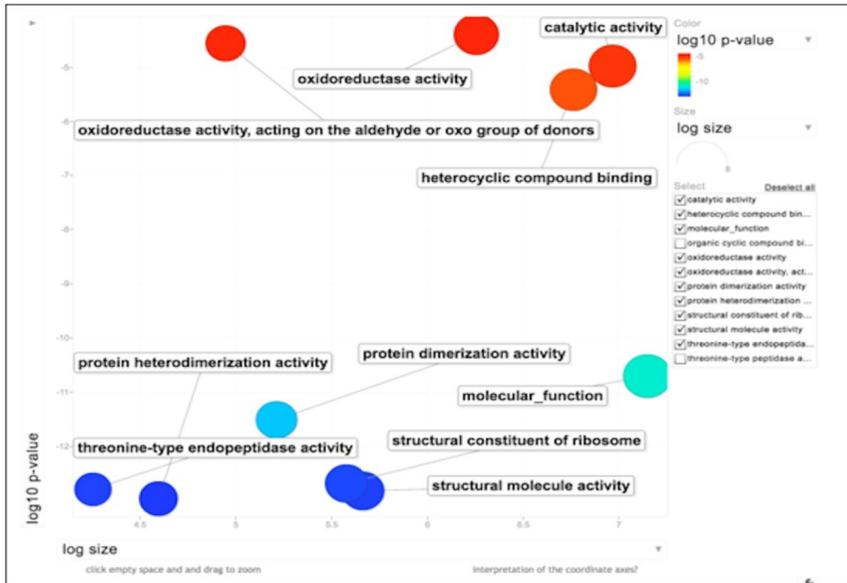
Figura 4.16.4. Clasificación de las *trans*-sialidasas de las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi* según el grupo al que pertenecen. En el caso de las VEs de tripomastigotes, se obtuvieron *trans*-sialidasas de todos los grupos, mientras que en el caso de las VEs de epimastigotes, solo se obtuvieron *trans*-sialidasas del grupo II. Clasificación propuesta por Freitas y colaboradores (2011).

Por último y relacionado con el “carga” de proteínas de las VEs en función de su actividad enzimática, se realizó un análisis GO term de ontología génica con $p \leq 0.05$, en el que se obtuvieron patrones similares en muchas de las actividades enzimáticas de las VEs ambas fases del parásito, destacando aquellos enriquecimientos de actividad peptidasa tipo-treonina peptidasa (GO: 0070003), constituyentes estructurales ribosomales (GO: 003735) y actividad aminoacil-tRNA ligasa (GO:0004812) (Figura 4.16.5). De igual forma, el análisis mostró un enriquecimiento diferencial en las proteínas de unión a ácidos nucleicos y a nucleosidos fosforilados (GO: 0003676 y GO: 19012), las cuales participan de forma importante en determinados procesos metabólicos tales como la glicólisis, traducción, señalización y degradación de proteínas.

A
Tripomastigotes

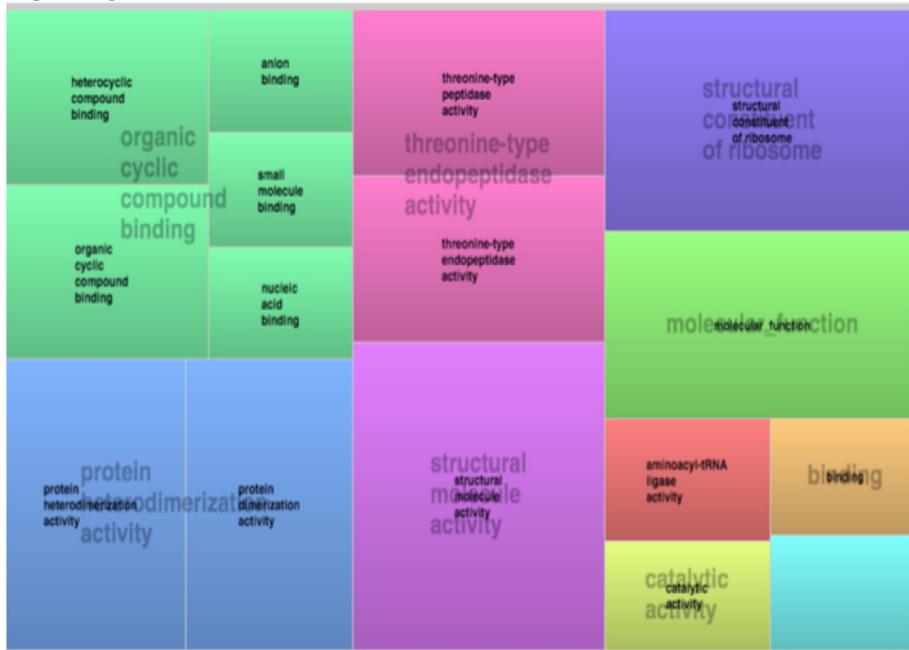


Epimastigotes



B

Tripomastigotes



Epimastigotes



Figura 4.16.5A. Análisis “GO term” de ontología génica que muestra las posibles funciones y los procesos biológicos en los que intervienen las proteínas contenidas en las

VEs de las formas tripomastigotas y epimastigotas de la cepa Pan4 de *T. cruzi*. Se muestra la función molecular de las proteínas obtenidas al comparar las mismas con la base de datos de la cepa CL Brener Esmeraldo de *T. cruzi*, depositada en la base de datos TriTrypDB. El análisis se representa con un gráfico de dispersión con valores obtenidos con $p < 0.05$.

Figura 4.16.5B. “Tree map” del análisis “GO term” de ontología génica que muestra las posibles funciones y los procesos biológicos de las proteínas contenidas en las VEs de tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*. Los valores que se representan son los obtenidos con $p < 0.05$.

Los resultados de todos los análisis proteómicos realizados se presentan en la sección de Anexos de esta Tesis.

5. Discusión

5. Discusión

Todas las células vivas liberan al medio externo una serie de moléculas además de los catabolitos, que junto con una serie de macromoléculas, son capaces de modular el medio extracelular donde se desarrollan y que les permite llevar a cabo diferentes procesos como la digestión externa para absorber nutrientes, modular y escapar del sistema inmune o condicionar el medio tisular donde se van a implantar como células en procesos de metástasis o de migración celular. Estos productos liberados por los organismos constituyen lo que se denomina secretoma. Algunos de dichos productos aparecen englobados por membranas lipídicas, formando vesículas extracelulares o exovesículas.

Las vesículas extracelulares son vesículas lipídicas liberadas por cualquier tipo celular. Hoy día, se considera que estas vesículas conforman la mayor parte del secretoma celular y actúan como mecanismo de comunicación entre las células (Zhang et al., 2018) o como transportadores de información genética, además de poseer funciones de modulación celular e inmunológica. Las exovesículas contienen lípidos provenientes de las membranas celulares con una composición rica en fosfolípidos y colesterol similar a la de los dominios “raft” de las membranas plasmáticas (de Gassart et al., 2003; Skotland et al., 2017), además de moléculas proteicas de unión a las membranas, que, en el caso de las VEs de mamíferos, incluye a las integrinas y las tetraspaninas (Paolillo & Schinelli, 2017), así como diversas enzimas como proteasas y glicosidasas (Sanderson et al., 2019) y ácidos nucleicos (Sanderson et al., 2019).

Como se comentó en la introducción, dependiendo tanto del tamaño como de su biogénesis y composición, estas vesículas se clasifican en cuerpos apoptóticos de 1 a 5 μm (Kerr et al., 1972; Théry et al., 2001), ectosomas mayores de 100 nm y hasta 1 μm y provenientes directamente de la membrana plasmática por “herniación” de la misma (Raposo & Stoorvogel, 2013;

Marcilla et al., 2014) y exosomas de origen endocítico, procedentes de los cuerpos multivesiculares y de tamaño comprendido entre 30 a 100 nm (van der Pol et al., 2012; Schorey et al., 2015). En el año 2018 se describió otra categoría conocida como los exómeros, nanopartículas proteicas no recubiertas de membrana de tamaño más pequeño (aproximadamente de unos 35 nm) (Zhang & Lyden, 2019).

Las diferencias y similitudes entre las diferentes vesículas extracelulares fueron resumidas y publicadas por Cocucci y Meldolesi en 2015 (Cocucci & Meldolesi, 2015). La presencia de estas exovesículas en organismos parásitos fue revisada en 2014 por Marcilla y colaboradores (Marcilla et al., 2014) y más recientemente y haciéndose especial énfasis en la presencia y el papel de dichas exovesículas de *Trypanosoma cruzi* por de Pablos y colaboradores en 2018, donde se indica que el modo de acción de estas vesículas puede ser endocrino, actuando en células o tejidos distantes al lugar de la producción de las vesículas, paracrino actuando sobre células vecinas, yuxtacrino actuando en las células adyacentes al lugar de la liberación y ayudando a la creación de nichos o autocrino, actuando sobre las mismas células que las liberan, con el fin de producir una serie de efectos sobre los receptores a los que estimulan (de Pablos et al., 2018).

Como ha sido mencionado, el contenido de las VEs incluye proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, proteínas de reconocimiento y adhesión, lípidos y ácidos nucleicos. La importancia del estudio de las VEs radica en su participación activa en la comunicación intercelular, incremento de la parasitación y en el establecimiento de patógenos en el hospedador por la modulación de la respuesta inmune (Théry, 2011; Marcilla et al., 2014; de Pablos et al., 2018; Zhang et al., 2018). Por ejemplo, se ha descrito que los exosomas de *T. cruzi* podrían considerarse una forma alternativa de secreción de proteínas, que participan en la presentación antigénica y en la evasión de la respuesta inmune (de Pablos et al., 2016). Además, tanto los exosomas como los ectosomas transfieren RNA biológicamente activo, citoquinas, factores de

crecimiento y metaloproteasas, lo cual los incluye como posibles candidatos para ser empleados como biomarcadores de la enfermedad (Schorey & Bhatnagar, 2008; Théry, 2011), si bien la funcionalidad de estas sustancias transportadas a nivel celular permanece, en gran parte desconocida para el caso de *T. cruzi*. También se ha comprobado la participación de las VEs en los procesos de inflamación, metástasis, angiogénesis o crecimiento tumoral, así como en el intercambio de información genética y en la adhesión celular (van der Pol et al., 2012).

Trypanosoma cruzi posee un ciclo intracelular obligado en el hospedador vertebrado, donde las formas amastigotas se van a multiplicar dentro de células nucleadas. A diferencia de otros protozoos kinetoplástidos intracelulares como *Leishmania* sp., este parásito va a desarrollar las formas amastigotas tanto en células fagocíticas como en células no fagocíticas. Una vez en el citoplasma celular, el parásito escapa del fagosoma formado por invaginación de la membrana celular que lo envolvió para llegar hasta el interior celular y, tras quedar libre en el citoplasma mediante un proceso activo, se va a multiplicar activamente, donde se transformará en formas tripomastigotas capaces de salir de la célula para invadir nuevas células o pasar al torrente sanguíneo para completar el ciclo en el triatomino vector. *T. cruzi* es capaz de invadir tanto células fagocíticas como no fagocíticas por un proceso de interiorización mediante una endocitosis inducida, proceso en el que participa tanto el parásito como la célula hospedadora y cuyo mecanismo de entrada ha sido ampliamente estudiado (Burleigh & Andrews, 1995; Andrade & Andrews, 2005; Yoshida & Cortez, 2008; de Souza et al., 2010).

El propósito principal de esta Tesis Doctoral fue comprobar la participación y el efecto de las VEs de la cepa Pan4 de *T. cruzi* en ciertos eventos que anteceden el proceso de invasión celular por parte de los tripomastigotes del parásito, así como determinar las modificaciones biológicas que ejercen dichas exovesículas a nivel de la célula hospedadora. Estudios previos realizados por otros autores con respecto a la producción y

liberación de las VEs de *T. cruzi* se han llevado a cabo con VEs procedentes de otras cepas diferentes a la empleada en esta Tesis (Y, DM28c, Sylvio X10/6, CL-Brener, Colombiana, CL-14 y Yu Yu) (Goncalves et al. 1991; Trocoli Torrecilhas et al., 2009; Cestari et al., 2012; Bayer Santos et al., 2013; Garcia Silva et al., 2014a; Neves et al., 2014; Nogueira et al., 2015) o con VEs liberadas por las formas epimastigotas, formas no infectivas del parásito. Los experimentos expuestos en esta Tesis se realizaron con las VEs procedentes de las formas infectivas, tripomastigotes, dado que se considera que deben ser las exovesículas que tienen que ser estudiadas si se quieren llevar a cabo investigaciones relacionadas con la parasitación en el hospedador vertebrado.

La presencia de VEs en *T. cruzi* fue descrita por primera vez en 1979 por da Silveira y colaboradores (da Silveira et al., 1979), mediante estudios de microscopía electrónica usando criofractura sobre las formas epimastigotas del parásito. En estos estudios se comprobó la liberación al medio de diferentes tipos de vesículas. Posteriormente, en 1991 Gonçalves y colaboradores (Gonçalves et al., 1991), encontraron que las formas tripomastigotas de *T. cruzi* liberaban antígenos en forma de vesículas de 20 a 80 nm al medio de cultivo. En 2016 se publicó la purificación mediante centrifugación diferencial de VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 en el laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral, donde se describía como las exovesículas procedentes de esas formas del parásito transportan proteínas MASPs inmaduras, al detectarse en ellas la región C terminal y el péptido señal de las proteínas pertenecientes a esta familia multigénica (de Pablos et al., 2016; Diaz Lozano et al., 2017).

Siguiendo la metodología de aislamiento mediante centrifugación diferencial, se obtuvieron las VEs de los tripomastigotes y se comprobó la purificación de las mismas mediante diversas técnicas, entre ellas microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fuerza atómica, “nanoparticle tracking analysis” y “dynamic light scattering”, donde se evidenció y

confirmó no solo el tamaño y la forma de las vesículas purificadas, sino la presencia de poblaciones homogéneas de dichas VEs. De los resultados obtenidos es posible afirmar que el rendimiento obtenido, medido en función de la cantidad de proteína de la fracción purificada en las VEs secretadas por los tripanomastigotes de la cepa Pan4 fue mayor que la descrita por otros autores con respecto a la cantidad de proteínas obtenidas con otras cepas o formas biológicas del parásito. De hecho, la concentración de proteínas de las VEs de tripomastigotes de la cepa Pan4 fue 10^4 veces mayor con respecto a la concentración de proteínas de las VEs obtenidas de las formas epimastigotes de la cepa DM28c usada por Garcia Silva (Garcia Silva et al., 2014a) y 41.67 veces mayor con respecto a las VEs procedentes de tripomastigotes de la cepa Y empleada en los trabajos de Trocoli Torrecilhas (Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Así, en este trabajo se demostró que, usando la cepa Pan4 y el sistema de purificación mediante centrifugación diferencial, fue posible obtener 12 μg de proteína tras la incubación de 1×10^7 tripomastigotes mantenidos a 37°C durante 5 horas en el medio de cultivo de liberación de VEs, un medio tamponado con HEPES con el fin de evitar la acidificación del medio y que esto promueva la transformación de las formas tripomastigotas a formas “amastigote-like” *in vitro* (Sanchez Moreno et al., 1995).

Posterior a la purificación de las VEs de la cepa Pan 4 se decidió comprobar si las exovesículas purificadas ejercían un comportamiento semejante al descrito por Trocoli Torrecilhas y colaboradores en 2009 y Cestari y colaboradores en 2012, quienes reportaron incrementos en las tasas de parasitación de las células previamente incubadas con VEs del parásito. Para ello y con el fin de evaluar la relación entre la dosis de las exovesículas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y la inducción del incremento en los porcentajes de parasitación celular, los cultivos fueron incubados durante 2 horas en medio libre de suero con concentraciones crecientes de VEs (desde $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ hasta $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$). Después de la incubación y de eliminar mediante lavados aquellas VEs que no hubiesen interactuado con las células, los cultivos celulares fueron

infectados durante 4 horas con las formas tripomastigotas. Ramirez y colaboradores emplearon dosis de 50 ng/mL de VEs en las interacciones y un tiempo de 3 horas, llevando a cabo la interacción de las VEs-células en presencia de las formas infectantes del parásito (Ramirez et al., 2016), por lo que los efectos observados podrían ser atribuibles a efectos de las VEs sobre los propios parásitos, sobre las células o sobre ambos, lo que no ocurre en los experimentos de esta Tesis Doctoral, dado que los cultivos fueron lavados tras la interacción con las VEs para eliminar todas aquellas vesículas del parásito que no hubiesen interactuado con las membranas celulares. Esto significa que lo que los efectos generados en las células son únicamente atribuibles a la acción de las VEs.

De los resultados obtenidos se comprobó la existencia de una relación dosis respuesta donde no se evidencia un aumento lineal de la parasitación en función de la dosis de las VEs. Al emplearse una dosis de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ se alcanzó un máximo de $88.88 \pm 3.73\%$ de células parasitadas y a partir de esta dosis los niveles de parasitación decrecieron, sin obtenerse variaciones en la parasitación aun incrementando la dosis de las VEs. Lo anterior sugiere que, una vez alcanzada la dosis máxima efectiva y al no modificarse los niveles de parasitación con dosis mayores, esto sea como consecuencia quizás de la saturación de los receptores o que se lograron los máximos efectos directos sobre las membranas celulares a la dosis de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. El estudio del incremento de la parasitación en función de la dosis de VEs en el medio de cultivo mostró una cinética no lineal, sigmoidea, correspondiente con un modelo dosis/respuesta, cinética con una ecuación cuya fórmula se describió en el apartado de Resultados y de la que se obtuvo una dosis de 0.38 $\mu\text{g/mL}$ capaz de inducir unos efectos equiparables al 50% en las células incubadas con las VEs, durante un tiempo de interacción VEs:célula de 2 horas. Esta dosis fue empleada en los todos los experimentos posteriores de interacción VEs:célula ya que permite observar los efectos celulares evitando la sobresaturación de la respuesta y con esto, optimizar las condiciones. Por otra

parte, los resultados muestran que el efecto ejercido por las VEs sobre las células es temporal y reversible, dado que el efecto que se obtiene bajo las condiciones experimentales descritas en esta Tesis dura aproximadamente unas 8 horas, ya que a las 24 horas post incubación de las células con las VEs se obtuvieron tasas de parasitación similares a las células control no incubadas con las VEs. Lo anterior probaría que los efectos de las VEs afectan los mecanismos celulares involucrados en el proceso de internalización del parásito en la célula hospedadora sin afectar la viabilidad celular, lo que podría corresponder con los efectos que debe ejercer el secretoma de las formas infectantes del parásito para acondicionar a las células antes de ser parasitadas *in vivo*. Según Garcia Silva y colaboradores, si el papel de las VEs es el de facilitar la entrada de los parásitos a las células, no sería necesario que el efecto de los mismos se mantenga en el tiempo, ya que, una vez alcanzada la infección, los mismos parásitos inducirían el estímulo suficiente para continuar con el proceso infeccioso (Garcia Silva et al., 2014b).

En concordancia con lo expuesto por los autores anteriores, se podría postular que la liberación de las VEs por parte de las formas del parásito durante el proceso de interacción parásito:célula se incrementa durante el tiempo de adhesión y reconocimiento de la célula por parte del parásito y que dicha estimulación para la liberación de las VEs sucedería tanto en las formas tripomastigotas como en las células que están siendo infectadas (Ramirez et al., 2016). Así, las exovesículas ejercerían su acción de una forma directa sobre la célula con la que el parásito interactúa así como en las células vecinas mediante una acción de tipo paracrina, para así crear los nichos tisulares de infección por *T. cruzi* descritos en las infecciones por el parásito (Lewis et al., 2015).

En el año 1990, Castanys y colaboradores describieron un incremento en la secreción de una glicoproteína producida por las formas metacíclicas (TcPP64) que intervenía en el proceso de entrada del parásito en la célula cuando estas formas interaccionaban con la membrana celular o con lectinas

como la lectina de germen de trigo (WGL), capaz de aglutinar la N-acetil-D-glucosamina (Castanys et al., 1990). Posiblemente, un mecanismo similar de interacción membrana celular/membrana flagelar induzca el estrés necesario tanto en la célula como en el parásito para estimular la liberación de exovesículas por parte de ambos, el parásito y la célula hospedadora (Castanys et al., 1990). Curiosamente y como ha sido descrito por otros autores, las exovesículas del parásito son capaces de fusionarse de forma metabólicamente activa, con las exovesículas procedentes de la célula y así permitir la transferencia de componentes de las vesículas del parásito a las propias VEs de las células del hospedador y potenciar el acondicionamiento de nuevos tejidos, evitando el reconocimiento antigénico de las VEs del parásito por parte del sistema inmune del hospedador y a su vez generar los efectos de las VEs del parásito en las células por parte de las VEs “híbridas” (Ramirez et al., 2016).

A pesar de que con el tiempo se ha caracterizado mejor el contenido de las exovesículas de *T. cruzi* y con esto, el vertido del contenido al interior celular (al menos de forma teórica), existen pocos trabajos sobre la interacción de las VEs parasitarias con las células y aun menos estudios sobre las posibles alteraciones que ejercen sobre la célula receptora. Trocoli Torrecilhas y colaboradores (2009) comprobaron que las VEs contactan y se fusionan con las membranas celulares, permitiendo la entrada de estas vesículas (y su contenido) al citoplasma celular. Estos autores, al hacer interaccionar VEs del parásito marcados fluorescentemente con células de mamíferos, observaron fluorescencia en los citoplasmas entre los 5 y 15 minutos de la adición de las VEs de *T. cruzi* teñidas (Trocoli Torrecilhas et al., 2009). De igual forma y empleando un ensayo de hibridación fluorescente *in situ*, Garcia Silva y colaboradores emplearon dosis muy bajas de VEs (160 ng/mL) para evitar el exceso de fluorescencia en el citoplasma celular y observaron que las vesículas son internalizadas por las células (Garcia Silva et al., 2014a). En este mismo estudio, los autores determinaron que a los 30 minutos de

incubación de las VEs con las células aparecía una fluorescencia difusa en la célula, la cual se tornaría en un patrón granular a las 2 horas de incubación, lo que comprueba la interacción de las VEs con las membranas celulares y el vertido y acumulación de su contenido a nivel citoplasmático. Previamente, Cestari y colaboradores describieron que la incubación de las células durante 30 minutos con las VEs procedentes de tripomastigotes de la cepa Sylvio X10/6 (DTU I) era capaces de inducir un incremento en los porcentajes de parasitación (Cestari et al., 2012) comparable al observado en los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral. En el presente trabajo y con base en estos estudios previos se fijó un tiempo de incubación de las VEs con las células de 2 horas para realizar los experimentos relativos a la infección y los llevados a cabo sobre las alteraciones fisiológicas celulares inducidas por las VEs del parásito. Sin embargo, algunos de los efectos de las VEs en las células se observaron desde los 5 minutos de interacción VEs:célula, como se describirá más adelante. Esto significa que las condiciones de incubación y la concentración de las VEs a emplear, así como el tiempo de incubación va a depender de los diferentes grupos de investigación interesados en el tema y no necesariamente corresponden con las condiciones naturales de la infección por las formas tripomastigotas del parásito.

El proceso de invasión celular de *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiado. A la fecha, se conocen algunos de los mecanismos implicados en el acondicionamiento de la célula hospedadora para inducir la endocitosis de los tripomastigotes en células no fagocíticas y se sabe que en dicho proceso participan tanto mecanismos específicos del parásito como de la célula (Hall et al., 1991; Osuna et al., 1993; Rosestolato et al., 2002; Ferreira et al., 2006; de Souza et al., 2010; Watanabe Costa et al., 2016). Entre los mecanismos ejercidos por el parásito que facilitan su entrada a las células se encuentra la liberación de las VEs capaces de favorecer la parasitación, con el consecuente aumento de la carga parasitaria, como ha sido comentado (Trocoli Torrecilhas et al., 2009; Ramirez et al., 2016; Lovo Martins et al., 2018; Retana Moreira

et al., 2019). Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral evidencian porcentajes de infección 3.5 veces mayores en células Vero, no fagocíticas, pre incubadas con VEs del parásito, con respecto a células infectadas con las formas tripomastigotas sin la incubación previa con las VEs. De igual forma, los cultivos pre incubados con las VEs del parásito mostraron índices de parasitación (número de parásitos/célula) que duplicaron los índices de parasitación de las células infectadas sin pre incubar con las VEs, resultados que concuerdan con los obtenidos por Trocoli Torrecilhas y colaboradores, donde describen que los tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y fueron capaces de invadir 5 veces más células cuando éstas fueron incubadas con las VEs del parásito (Trocoli Torrecilhas et al., 2009).

La producción de VEs por parte de células en el proceso de infección fue descrito en por Cestari y colaboradores en células linfoides (Cestari et al., 2012). Estos autores describieron una estimulación en la producción de VEs por parte de las células THP-1 (una línea celular de monocitos) al incubar las células con las formas infectantes de la cepa Silvio X10/6, comprobando que las VEs secretadas por estas células también fueron capaces de incrementar la invasión celular de *T. cruzi*. La posible explicación de este fenómeno viene dada por la producción simultánea de VEs por las células en presencia de las formas tripomastigotas del parásito y por la fusión de las VEs de las células con las vesículas del parásito comentada anteriormente (Ramirez et al., 2016), lo que supondría el transporte de componentes de superficie de las VEs del parásito en las exovesículas “híbridas” resultantes de la fusión y llevaría a una acción a nivel celular similar a la de las VEs del parásito sobre las nuevas células con las que interaccionan, al transportar los componentes de las exovesículas propias del parásito y que podrían corresponder con algunas de las enzimas específicas del parásito como se comentará más adelante.

Como parte de los resultados publicados de esta Tesis (Retana Moreira et al., 2019) y con base en la cinética dosis/efecto de parasitación obtenida, se puede afirmar que el incremento en los porcentajes de

parasitación es dosis dependiente y específica para *Trypanosoma cruzi* y es independiente de la DTU empleada, ya que el incremento en la parasitación ocurrió tanto al infectar las células con la cepa Pan4 (Tc Ia + 1d) como con la cepa 4162 (Tc IV), resultados que también concuerdan con lo observado por Cestari y colaboradores, quienes indicaron que el incremento en la invasión celular es dependiente de dosis y no específica de la cepa del parásito ni de la línea celular empleada (Cestari et al., 2012). Cuando se emplearon VEs de otro tripanosomátido (*Crithidia mellificae*) o de una línea celular de ratón (NIH/3T3) en vez de las VEs de los tripanomastigotes de *T. cruzi* y se infectaron las células con tripomastigotes de la cepa Pan4, no se observó el aumento en las tasas de parasitación obtenido previamente, lo que indicaría que el efecto es específico e involucra alguno de los componentes que portan las VEs de *T. cruzi* y que no se debe a un efecto fisicoquímico producto de las posibles alteraciones de la funcionalidad de la membrana celular tras la fusión de las partículas lipídicas que constituyen las VEs, ni de los componentes que llevan las VEs de las células o de *C. mellificae*.

De igual manera, el efecto de las VEs de los tripomastigotes sobre la parasitación de las células debe ser considerado específico para la entrada de *T. cruzi*, dado que las células pre incubadas con las VEs de las formas tripomastigotas e infectadas con otro protozoo de desarrollo intracelular obligado (*Toxoplasma gondii*) generó un ligero incremento en los porcentajes de células parasitadas, el cual no resultó estadísticamente significativo al compararlo con las células control sin pre incubar con las VEs de *T. cruzi* e infectadas con los taquizoítos de *T. gondii*. Esto confirmaría que el mecanismo de entrada a la célula que emplea este protozoo es diferente al que emplea *T. cruzi*. De hecho, la invasión de *T. gondii* está acompañada de la secreción sucesiva de una serie de proteínas provenientes de diferentes orgánulos submicroscópicos del taquizoíto. Así, cuando los taquizoítos contactan con la célula, los micronemas secretan proteínas que facilitan la adhesión, las roptrias liberan proteínas que contribuyen con la formación de la

vacuola y los gránulos densos secretan proteínas que participan en la modificación del compartimiento intracelular donde se ubicará el parásito (Håkansson et al., 2001). Además, la entrada parece depender de los movimientos de “gliding” generados por la miosina y los filamentos de actina del protozoo (Wetzel et al., 2003). De hecho, el silenciamiento del gen que codifica para la miosina del parásito (TgMyoA) da como resultado la inmovilidad del protozoo y la incapacidad de invadir las células (Meissner et al., 2002). Por el contrario, no se han observado cambios perceptibles en el citoesqueleto de la célula durante el proceso de invasión, por lo que el citoesqueleto celular parece no ser esencial en el proceso de entrada de *Toxoplasma gondii* en la célula (Hiroshi Morisaki et al., 1995), a diferencia de lo que ocurre en *T. cruzi* donde el tratamiento de las células con citocalasina B y la subsecuente despolimerización de los filamentos de actina inhibe la entrada de los tripomastigotes al citoplasma celular (Santos Barrias et al., 2013).

Se debe considerar que durante el proceso de interacción de las VEs del parásito con la membrana plasmática de la célula sucede una primera fase de reconocimiento y contacto VEs:célula, a través de la cual las VEs parasitarias se unen a receptores de la membrana plasmática, permitiendo de este modo la interacción membrana-membrana para su posterior internalización al citoplasma celular. Se podría suponer que el reconocimiento de los azúcares existentes en el glicocáliz de la célula por parte de las VEs o de los azúcares que recubren la exovesículas juega un papel importante en la interacción VEs:célula, mediante un mecanismo de reconocimiento y unión por lectinas. En los resultados de esta Tesis Doctoral, el tratamiento de las VEs con peryodato de sodio, capaz de oxidar los azúcares del glicocáliz de la vesícula, redujo las tasas de infección celular a niveles comparables al de las células control no incubadas con las VEs del parásito. En experimentos previos de nuestro grupo de investigación (no presentados en esta Tesis), se comprobó que la interacción VEs:célula es un proceso metabólicamente

activo dependiente de temperatura, dado que cuando la interacción se realizó a 4°C y tras eliminar las VEs mediante lavados, las tasas de infección en las células pre incubadas con las VEs permanecieron similares a las células control no incubadas con las VEs, de lo que se deduce que, además del reconocimiento y unión por lectinas deben existir otros mecanismos moleculares dependientes de temperatura, como los procesos mediados por enzimas. Por esta razón, se realizaron una serie de tratamientos que pudiesen confirmar la participación de dichos procesos. Así, después del tratamiento térmico de las VEs a temperaturas de 50°C, 70°C y 90°C durante 30 minutos y su posterior interacción con las células, no se observó el incremento en las tasas de parasitación descritos previamente, quizás porque el tratamiento térmico generó una posible inactivación enzimática en las VEs. Como cabía esperar tras el tratamiento térmico, se obtuvieron tasas de parasitación similares entre las células incubadas con las VEs sometidas a los tratamientos térmicos y los cultivos sin incubar con las VEs del parásito, lo que confirmaría la existencia de enzimas presentes en las VEs, posiblemente involucradas en el proceso de acondicionamiento celular para la entrada del parásito. Un resultado similar de inactivación de los efectos de las VEs sobre los porcentajes de parasitación se obtuvo cuando las vesículas se trataron con proteasas.

Durante los procesos de adhesión e invasión de los tripomastigotes en las células participan un serie de moléculas glicosiladas (glicoproteínas y glicolípidos) presentes en la superficie de las formas tripomastigotas del parásito, entre ellas las mucinas, las *trans*-sialidasas, las MASPs y la familia de proteínas gp85 (de Souza et al., 2010). Muchas de estas proteínas glicosiladas han sido detectadas en los análisis proteómicos realizados en las muestras de VEs de *T. cruzi* (Bayer Santos et al., 2013; Brossas et al., 2017) y en los análisis proteómicos expuestos en los resultados de esta Tesis Doctoral. Dentro de estas proteínas se encuadran algunas con gran importancia biológica para el parásito, como las *trans*-sialidasas TS/SAPA, Tc85, gp82,

gp90, CRP (Frasch, 2000), la cisteín proteasa cruzipaina (Parodi et al., 1995), la metaloproteasa gp63, las MASPs (de Pablos & Osuna, 2012), así como mucinas (Buscaglia et al., 2004). Dado que algunas de estas glicoproteínas se encuentran también en las VEs, podrían ser responsables de la unión específica a la membrana plasmática celular, lo que explicaría la inhibición del efecto potenciador de la parasitación al ser reducidos los carbohidratos de las mismas por el tratamiento con peryodato de sodio. Por otra parte, algunas de estas glicoproteínas tienen actividades enzimáticas esenciales para la interacción de los tripomastigotes infectantes con las células en el proceso de invasión y posiblemente en la interacción de las VEs con la membrana plasmática, siendo quizás responsables de los efectos observados. La cruzipaina gp57/51 de *T. cruzi* es una glicoproteína descrita por Cazzulo y colaboradores en 1990, la cual tiene actividad cisteín proteasa y participa en la interacción entre los tripomastigotes con las células al actuar sobre el kininógeno y generar moléculas de kinina, reconocidas por los receptores celulares de bradikinina B2 (Cazzulo et al., 1990), lo que conlleva a la entrada de calcio mediada por IP3 (Andrade et al., 2012; Maeda et al., 2014). La glicoproteína gp63, perteneciente al complejo de las metaloproteasas de zinc (Cuevas et al., 2003), aparece unida a las membranas del parásito y posiblemente en las de las VEs mediante un anclaje GPI, participando en la unión e invasión del parásito a las células. Lo mismo debe ocurrir con otras glicoproteínas de superficie presentes en las VEs como las mucinas y las MASPs (de Pablos et al., 2011). Las *trans*-sialidasas, presentes tanto en la membrana de los tripomastigotes como de las VEs, constituyen las proteínas más abundantes en las VEs y aparecen ancladas de igual manera mediante dominios GPI (Schenkman et al., 1992). Como ha sido comentado, estas enzimas transfieren α -2,3-sialico de los glicoconjugados de la célula hospedadora, uniéndolo a los residuos de β -galactosa de las mucinas del parásito, facilitando con ello su adhesión a la membrana celular (Buscaglia et al., 2006; Yoshida, 2006) y siendo posiblemente uno de los grupos de enzimas

responsables en los fenómenos que llevan a cabo las VEs de los tripomastigotes sobre las células. La Tc85 es el miembro mejor estudiado dentro de este grupo de proteínas (Marroquin Quelopana et al., 2004), una familia proteica con 1430 genes (El Sayed et al., 2005) que comprende proteínas con pesos moleculares entre los 60 y más de 200 kDa.

En el presente trabajo de Tesis, al realizar la comparación proteómica del contenido de las VEs de los tripomastigotes y los epimastigotes de la cepa Pan4 se obtuvo una mayor cantidad de *trans*-sialidasas en las VEs de los tripomastigotes. De hecho, se identificaron 121 *trans*-sialidasas pertenecientes a los ocho grupos, lo que constituye el 22% frente al 7% en las VEs de los epimastigotes, donde se identificaron 33 proteínas pertenecientes solamente al grupo II según la clasificación propuesta por Freitas colaboradores en 2011 (Freitas et al., 2011). Otras investigaciones donde se ha analizado el contenido proteico del cargo de las VEs de *T. cruzi* han sido publicadas en los últimos años (Bayer Santos et al., 2013; Ribeiro et al., 2018). En la primera de ellas se llevó a cabo un estudio comparativo entre las diferentes vesículas secretadas por los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos, identificándose un total de 345 proteínas secretadas por las formas epimastigotas y 265 proteínas secretadas por las formas metacíclicas, compartiéndose 243 proteínas entre las VEs de ambas formas del parásito. En esta Tesis, los resultados obtenidos evidencian la presencia de un número similar de proteínas comunes entre las VEs de epimastigotes y las de los tripomastigotes derivados de cultivo celular (274 proteínas) pero, a diferencia de lo previamente publicado, el análisis de las VEs de los tripomastigotes indica que se supera el número de proteínas identificadas previamente en las VEs de los tripomastigotes (528 proteínas frente a 415 proteínas), diferencias que podrían deberse a que no ha sido empleado el mismo protocolo de aislamiento y purificación de las exovesículas ni el mismo medio de cultivo para la obtención de las VEs de las formas epimastigotas, lo cual podría influenciar tanto los niveles de producción de las VEs como el contenido de las mismas. Por otra parte, en el

caso de los resultados presentados en esta Tesis, las formas de infección de células usadas en la liberación de las VEs fueron tripomastigotes derivados de cultivo celular, formas “sanguíneas”, mientras que Bayer Santos y colaboradores en 2013 emplearon tripomastigotes metacíclicos (Bayer Santos et al., 2013). Diferencias en los análisis entre vesículas de ambos tipos de tripomastigotes ya fueron descritas por Brunoro y colaboradores en 2015 (Brunoro et al., 2015). Además, es importante tomar en cuenta las cepas del parásito empleadas a la hora de realizar los estudios comparativos del número de proteínas incluidas en las VEs. Así, Ribeiro y colaboradores (2018) confirmaron las diferencias en el cargo de *trans*-sialidasas y glicoproteínas tipo mucina en las VEs de los tripomastigotes la cepa YuYu (DTU I), en comparación con los de la cepa Y (DTU II) y sugieren que las diferencias cualitativas y cuantitativas en las proteínas de las VEs de diferentes cepas podrían correlacionarse con la infectividad y virulencia a la hora de realizar la interacción hospedador-parásito.

Se ha descrito que la infección de algunos tipos de virus conduce a un mecanismo de permeabilización celular, donde la membrana de la célula que está siendo infectada permite la entrada de macromoléculas, algunas de ellas de elevado peso molecular como la α -sarcina, toxina de 16.8 kDa (Fernandez Puentes, 1983; Muñoz et al., 1985; Otero & Carrasco, 1987). La α -sarcina es una ribonucleasa secretada por *Aspergillus giganteus*, capaz de inhibir la síntesis de proteínas de las células eucariotas al cortar catalíticamente un enlace fosfodiéster en un motivo bien definido dentro de la estructura de rRNA de la subunidad mayor del ribosoma, lo cual lo hace irreconocible ante los factores de elongación y con esto se bloquea la síntesis proteica (Narayanan et al., 2005). A diferencia de otras toxinas que afectan la síntesis de proteínas como es el caso de la toxina diftérica (Cieplak et al., 1987), la α -sarcina carece de un receptor de membrana que promueva su internalización vía endocitosis (Muñoz et al., 1985; Olmo et al., 2001). Durante el proceso de permeabilización inducido por los virus, se requiere de la participación del

enzima fosfolipasa C presente en la membrana plasmática (Otero & Carrasco, 1988). Dicha enzima ha sido encontrada en la membrana de las formas tripomastigotas (Norris & Schrimpf, 1994; Furuya et al., 2000), aunque no ha sido identificada en los análisis proteómicos de las exovesículas del parásito (Bayer Santos et al., 2013; Brossas et al., 2017). La fosfolipasa C ha sido considerada como un factor de virulencia de *T. cruzi* (Belaunzarán et al., 2013), relacionado con la activación de las *trans*-sialidasas (Rosenberg et al., 1991), enzimas antes mencionadas como muy abundantes en los análisis proteómicos de las VEs y consideradas también como uno de los factores de virulencia de *T. cruzi*. La fosfolipasa C escindiría los fosfolípidos justo antes del grupo fosfato, lo que le permitiría a la α -sarcina ligarse a los lípidos, permitiendo su captación por la célula a través de los endosomas ácidos (Oñaderra et al., 1998; Alford et al., 2009).

El único trabajo acerca de la permeabilización celular ejercida por *T. cruzi* es el de Castanys y colaboradores en 1990, donde los autores encontraron que las formas metacíclicas del parásito secretan una glicoproteína capaz de favorecer la permeabilización celular, facilitando la entrada de macromoléculas como la α -sarcina. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral demuestran que las VEs de tripomastigotes también son capaces de permeabilizar las líneas celulares Vero así como a las células de origen cardiomiocítico HL-1. El estudio de viabilidad celular mediante azul tripán en los cultivos de células incubados con la α -sarcina mostraron niveles de mortalidad del $16.90 \pm 4.11\%$ a las 24 horas, similar al de las células incubadas solo con las VEs, las cuales presentaron una mortalidad de $17.23 \pm 7.70\%$. Estos porcentajes fueron similares a los de los cultivos control no incubados con las VEs ni con la toxina ($15.56 \pm 7.67\%$). Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con la toxina después de la incubación con las VEs o de forma simultánea, es decir, células incubadas con las VEs y la α -sarcina simultáneamente, se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 82.00 ± 10.17 y $76.10 \pm 6.81\%$, respectivamente. Al realizar la confirmación de los

resultados utilizando para el ensayo de viabilidad celular MTT, los porcentajes de mortalidad fueron 62.64% en el caso de las células previamente incubadas con VEs y 9.90% en el caso de las células incubadas solamente con la α sarcina. Esto confirmaría que, a pesar de no poseer receptor en la membrana, la α -sarcina fue capaz de acceder al citoplasma celular y matar a las células por inhibición en la síntesis proteica a las 24 post tratamiento y que el acceso de la toxina a las células se produjo por la permeabilización de la membrana celular generada por las VEs del parásito.

Con el fin de comprobar este proceso de permeabilización en un modelo celular más específico, se realizaron experimentos empleándose la línea celular HL-1, una línea de células procedente de cardiomiocitos de ratón, células que al menos teóricamente se ven afectadas por los efectos patológicos de la enfermedad de Chagas. Los cardiomiocitos fueron incubados con las VEs de *T. cruzi* y se evaluó la posible permeabilización de las membranas mediante el uso de un anticuerpo monoclonal frente a un epítipo de la región intracitoplasmática del receptor β 2-adrenérgico, localizado entre los aminoácidos 340-413 de la secuencia. Este receptor es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, los cuales están asociados directamente a uno de sus efectores finales, el canal de calcio (V) 1.2. En estos experimentos se observó fluorescencia en el citoplasma de las células previamente incubadas con VEs y no en las células control no incubadas con las VEs empleadas como control negativo. Los cultivos sin incubar con las VEs solamente mostraron fluorescencia cuando se permeabilizaron con el detergente NP-40 (control positivo), mientras que en las células no permeabilizadas el anticuerpo no fue capaz de unirse al epítipo ya que no se encontraba accesible a las IgGs. Esta permeabilización podría ser el resultado de cambios en la membrana celular que permiten la entrada directa de la toxina y los anticuerpos al citoplasma o pudo haber sucedido tras una desorganización transitoria de la membrana, capaz de exponer antígenos presentes en el interior de la célula.

La presencia de autoanticuerpos dirigidos contra los receptores β -adrenérgicos en el suero de pacientes chagásicos ha sido descrita en la patología de la enfermedad cardíaca chagásica, relacionándose con la elevada frecuencia de los bloqueos auriculoventriculares que muestra los enfermos crónicos cardíacos (Sterin Borda et al., 1982; Borda et al., 1984; Pascual et al., 1986; Escobar et al., 2006). El origen de la aparición de estos autoanticuerpos podría deberse a la exposición de los epítomos citoplasmáticos de estos receptores posterior a la permeabilización de la membrana y ocultos al sistema inmune durante la maduración inmunológica, aunque algunos autores han relacionado su presencia con el reconocimiento de partes expuestas en la membrana debido a una reacción cruzada con las proteínas ribosomales ácidas del parásito P0 (Labovsky et al., 2007). Quizás sea necesario plantear estudios sobre el reconocimiento de los epítomos citoplasmáticos del receptor β -adrenérgico por parte de autoanticuerpos, con el fin de confirmar la hipótesis de que la permeabilización de las células cardíacas por las VEs del parásito podría llevar a la exposición de esta región del receptor al sistema inmune y promover la producción de autoanticuerpos.

Como ha sido comentado anteriormente, los procesos de reconocimiento e invasión de los tripomastigotes a la célula hospedadora involucran una serie de moléculas presentes en la superficie de ambos, el parásito y la célula, con el fin de llevar a cabo mecanismos típicos de reconocimiento receptor-ligando que permitan la adhesión y la inducción de los procesos de endocitosis que facilitan la entrada del parásito al interior de la célula. Entre estos eventos se encuentran la elevación de los niveles de calcio intracelular, debido a la movilización de estos iones desde los depósitos intracelulares del catión (como el retículo endoplasmático y la mitocondria) (Osuna et al., 1990; Docampo & Moreno, 1996; Burleigh & Andrews, 1998; Garzoni et al., 2003; Yoshida, 2006) o por medio de la activación de las bombas y canales de calcio que facilitan la entrada del catión desde el exterior celular. Este incremento en los niveles intracelulares de calcio conlleva a un

incremento de los niveles celulares de AMPc (Rodríguez et al., 1999), lo que a su vez facilita la liberación de las VEs tanto por parte de la célula como posiblemente en el parásito y su posterior fusión con la membrana plasmática (Glebov et al., 2015). En los resultados presentados en esta Tesis, la interacción de las VEs de las formas tripomastigotas de *T. cruzi* con las células indujo en las mismas un incremento en los niveles de calcio citoplasmático desde los primeros 5 minutos de incubación, en cultivos mantenidos en medios con y sin calcio (Figura 4.9). El patrón de fluorescencia observado se asemeja a los controles de células incubadas con el ionóforo de calcio A23187 (Williams & Fay, 1990), compuesto que permite la entrada masiva de calcio a las células desde el medio extracelular y con IBMX, compuesto empleado como control de la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares (Ratto et al., 1988). Algunas de las proteínas con actividad enzimática presentes en las VEs podrían desencadenar señales que aumenten la concentración de calcio intracelular al interactuar con las membranas celulares, mediante la participación directa o indirecta del IP₃, segundo mensajero que induce la salida de calcio desde el retículo endoplasmático (Mikoshiya, 2007). La fosfolipasa A₂ (Peppelenbosch et al., 1992), detectada en el “carga” de las VEs y la fosfolipasa C (Thompson & Shuttleworth, 2011), presente en las membranas del parásito, también podrían estar involucradas en esa movilización de calcio. Por otra parte, se ha descrito que las formas tripomastigotas secretan un factor de estructura desconocida, capaz de provocar una movilización de calcio mediada por IP₃ (Rodríguez et al., 1995) y ser responsable de la activación de otra enzima citoplasmática presente en los tripomastigotes, la oligopeptidasa B. La OPB, una hidrolasa de serina que activa a un agonista de calcio que podría ser exportado y reconocido por algún receptor de la célula blanco, seguido de la activación de la PLC y la producción de IP₃ (Caler et al., 1998). De manera similar, la denominada TSSA, una proteína polimórfica tipo mucina que se une a la célula blanco y esta unión desencadena mecanismos de señalización

intracelular mediados por calcio (Cánepa et al., 2012) también es parte del contenido de las VEs (Bayer Santos et al., 2013). TcSMP es otra familia de proteínas glicosiladas capaces de incrementar la concentración de calcio intracelular cuando son reconocidas por la célula y están presentes tanto en tripomastigotes como en las VEs secretadas por los mismos (Martins et al., 2015).

Uno de los efectos del incremento de calcio a nivel celular es la inducción de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana plasmática por la activación de las enzimas escramblasa y flopsa, por lo que los fosfolípidos fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la bicapa lipídica quedan expuestos en la cara externa de la membrana y contribuyen a la liberación de exovesículas (Yáñez Mó et al., 2015) debido a la activación de proteasas dependientes de calcio como las calpaínas (Farzamfar et al., 2019). La exposición de los fosfolípidos aniónicos al contacto con las VEs favorece las propiedades fusogénicas de las mismas, lo cual constituye un prerrequisito para la liberación del contenido de las vesículas al interior celular. Esto podría significar que los altos niveles de calcio intracelular y los cambios en la distribución de los fosfolípidos podrían explicar la permeabilización en la membrana celular después del tratamiento con las VEs de *T. cruzi*, donde se permitió la entrada de la toxina de aproximadamente 17 kDa. Además, los aumentos en los niveles de calcio intracelular podrían desencadenar una mayor liberación de VEs en las células expuestas al parásito (Pap et al., 2009; Cestari et al., 2012; Wyllie & Ramírez., 2017), ya que se ha visto que el calcio provoca una respuesta fuerte de liberación de VEs en otras líneas celulares (Savina et al., 2003; Emmanouilidou et al., 2010).

Los iones de calcio también contribuyen con la reorganización del citoesqueleto, indirectamente a través de la activación de determinadas proteínas citoplasmáticas como la calpaína y gelsolina o directamente mediante las proteínas reguladoras del citoesqueleto dependientes de Ca^{2+} como la miosina II y la L-plastina (Babich & Burkhardt, 2013). La calpaína y

gelsolina son las encargadas de cortar la red de proteínas del citoesqueleto de actina, lo que permite la formación de yemas en la membrana celular y la eliminación de las proteínas del “capping” al final de los filamentos de actina (Gremm & Wegner, 2000; Piccin et al., 2007).

La funcionalidad del citoesqueleto celular en el proceso de invasión de los tripomastigotes ha sido ampliamente estudiada y mediante el empleo de sustancias como citocalasina B y latrunculina, se ha demostrado que ocurre una disrupción de los filamentos de actina y vimentina al momento de la invasión celular con tripomastigotes (Low et al., 1992; Carvalho et al., 1999). Estos fármacos son capaces de alterar la estructura y funciones del citoesqueleto y con esto la entrada del parásito en células no fagocíticas (Osuna et al., 1993; Rosestolato et al., 2002; Woolsey & Burleigh, 2004), a diferencia de lo anteriormente comentando para *T. gondii*, donde el citoesqueleto celular no parece participar en el proceso de entrada del parásito a la célula. También, ha sido descrito que el aumento de Ca^{2+} intracelular conduce a una reorganización rápida y transitoria de los microfilamentos de la célula hospedadora, entre los que se encuentra la despolimerización del citoesqueleto de actina, necesaria durante el proceso de entrada de las formas tripomastigotas a la célula hospedadora (Dorta et al., 1995; Rodríguez et al., 1996; Martins et al., 2011).

Estudiando los cambios en la expresión génica causada por las VEs de las formas epimastigotas de la cepa DM28c de *T. cruzi* en células de mamíferos, Garcia Silva y colaboradores (2014b) observaron variaciones en el perfil del transcriptoma de las células al ser incubadas con las VEs del parásito, especialmente en la expresión de proteínas que forman parte del citoesqueleto y la matriz extracelular (Garcia Silva et al., 2014b). De hecho, la regulación del citoesqueleto de actina de las células es una de las vías identificadas que se afectan por la incubación con las VEs (Garcia Silva et al., 2014b). Al observar los resultados de los experimentos de movilización de calcio en esta Tesis y ver que desde los primeros 5 minutos ocurre un aumento

en la fluorescencia en el citoplasma de las células Vero incubadas con las VEs, se podría sospechar que la movilización de calcio podría afectar directamente al citoesqueleto de actina, como ocurre cuando el parásito empieza a invadir la célula. El estudio del efecto de las VEs de *T. cruzi* sobre los filamentos de actina evidenció una clara despolimerización desde el primer tiempo de la observación (15 minutos) de incubadas las células con las VEs, efecto que se mantuvo en el tiempo hasta las 2 horas de iniciada la incubación. Por otra parte, se observó que la despolimerización de la actina es reversible, ya que a las 24 horas de incubación de las células con las VEs ya no se observa (Figuras 4.10.1, 4.10.2 y 4.10.3). El estudio de la distribución y apariencia de la vimentina mostró una concentración de la misma bajo la apariencia de una masa fibrilar en las áreas donde la actina se encontraba despolimerizada (actina G) y una apariencia difusa en las áreas donde estaba polimerizada como filamentos (actina F). Esta proteína es una de las proteínas mayoritarias del citoesqueleto, forma parte de los filamentos intermedios, ancla y sostiene orgánulos citosólicos como el núcleo o el aparato de Golgi y además podría estar implicada en los movimientos de los lisosomas hacia la parte de la membrana celular donde invade el parásito (Babich & Burkhardt, 2013; Walker et al., 2014; Borges et al., 2016).

Ferreira y colaboradores (2006) encontraron que diferentes cepas de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* son capaces de invadir las células hospedadoras a través de mecanismos dependientes e independientes del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, la invasión celular por las formas metacíclicas de la cepa CL, mediada principalmente por la molécula de superficie gp82, está asociada con el “desensamblaje” de la actina F, mientras que la invasión de la cepa G, mediada por gp35/50, depende al parecer, del reclutamiento de la actina de la célula (Cortez et al., 2006; Ferreira et al., 2006). Esto significa que el comportamiento de los filamentos de actina va a depender de las moléculas de superficie a través de las cuales se asocia el

parásito con la membrana de la célula, desencadenándose diferentes vías de transducción de señales.

Las alteraciones en el citoesqueleto también tienen un impacto en la progresión del ciclo celular. Se conoce que la progresión del ciclo celular estimulada por factores de crecimiento también depende del anclaje de la célula a la matriz extracelular y de los cambios en la estructura del citoesqueleto y forma de la célula dependientes de la matriz extra celular (Assoian & Zhu, 1997). La participación del citoesqueleto en el ciclo celular y, por tanto, en la síntesis de macromoléculas por la célula fue descrita en 1995 por Iwig y colaboradores, quienes demostraron en células epiteliales quiescentes que la disrupción del citoesqueleto con citocalasina D producía una inhibición en la síntesis de DNA, RNA y proteínas y mantuvo a las células en la fase G1 del ciclo, impidiendo que entraran en la fase S del ciclo celular incluso al estimularlas con suero. Estos autores concluyeron que los efectos sobre el ciclo celular y el anclaje de las células al sustrato eran debidos, en parte, a la organización del citoesqueleto y que tanto la expresión dependiente de adhesión de la ciclina D y la fosforilación de la pRb estaban mediadas por el citoesqueleto (Iwig et al., 1995). Del estudio de las modificaciones fisiológicas celulares inducidas al incubar células Vero con las VEs de *T. cruzi* se demostró una interrupción del ciclo celular en las fases G0/G1 a las 8 horas después de la adición de las VEs a las células. Aunque no existen publicaciones sobre la relación directa entre ciclo celular y la parasitación por *T. cruzi*, se ha publicado información que demuestra que en cultivos celulares infectados por *T. cruzi*, las tasas de división celular son más bajas que en aquellos cultivos no infectados con el parásito (Meyer & de Oliveira, 1942; Rubio, 1956; Dvorak & Hyde, 1973) y que los mismos se infectan más eficientemente con las formas tripomastigotas cuando las células están sincronizadas en la fase S del ciclo celular (Osuna et al., 1984). Esto confirmaría la relación de la invasión del parásito con la fase del ciclo celular y que las VEs, al bloquear el ciclo en la fase G0/G1 de forma temporal,

facilitarían la invasión de los tripomastigotes, favoreciendo el aumento en los porcentajes de células infectadas ya comentado.

La interrupción del ciclo celular en la fase G0/G1 podría ser consecuencia indirecta de la elevación del calcio intracelular debido a la interacción de las VEs con las células, ya que este catión actúa como un segundo mensajero en el control del ciclo celular, además de que el complejo calcio-calmodulina es responsable de la activación del complejo relacionado directamente con el ciclo celular CDK4/ciclina D1, encargado de regular la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, inhibidora de la síntesis del DNA (Takuwa et al., 1993). De hecho, la participación de los altos niveles de calcio en el bloqueo del ciclo celular ya fue descrito por Wu y colaboradores (2006), quienes demostraron que la capsaicina, un compuesto natural con propiedades anticancerosas (Mori et al., 2006), era capaz de bloquear el ciclo celular en las fases G0/G1, efecto que fue revertido con BAPTA, un quelante del calcio intracelular. Por otra parte, en el proceso de regulación del ciclo celular están implicadas las redes de actina nucleadas por el complejo Arp2/3, que participan en los eventos de señalización necesarios para la progresión del ciclo celular en células no transformadas (Dang & Gautreau, 2012; Wu et al., 2012). En este caso, Wu y colaboradores demostraron la incapacidad del complejo Arp2/3 de actuar por sí mismo como sensor para iniciar la fase S del ciclo celular, como sí ocurre con los filamentos de actina. Este complejo molecular está formado por siete subunidades, dos de las cuales están relacionadas con las proteínas Arp2 y Arp3 (Suraneni et al., 2012; Wu et al., 2012). Así, los filamentos de actina ramificados están nucleados por el complejo Arp2/3 y son necesarios para la progresión del ciclo celular, ya que se ha demostrado que el uso de la citocalasina B en dosis muy bajas detiene el ciclo celular en las fases G0/G1, mientras que los inhibidores que actúan sobre la polimerización de la tubulina detienen el ciclo celular en la fase G2/M antes de la citocinesis (Maness & Walsh, 1982; Rubtsova et al., 1998; Lohez et al., 2003). Por último y retomando la importancia del calcio en la

alteración del ciclo, en el citoplasma celular existen una serie de “sensores de calcio”, tales como la proteína STIM1, una proteína transmembrana del retículo endoplasmático que se activa por el descenso en los niveles de calcio y está implicada en la progresión hacia la mitosis. Posterior a su activación, la STIM1 interactúa con una proteína de membrana plasmática, la proteína ORAI1, capaz de activar los canales de calcio, permitiendo así la entrada del catión (Mukherjee & Brooks, 2014). Al parecer, las células que carecen de esta proteína podrían tener una interrupción del ciclo en las fases G0/G1, lo cual indicaría que se requiere de esta proteína para que las células progresen hacia la fase de síntesis de DNA (Sundivakkam et al., 2012).

La interrupción del ciclo celular en las fases G0/G1 producido por las VEs de *T. cruzi* también podría ser causado por la expresión del gen p21 que codifica a una proteína inhibidora de la quinasa, la CDKN1A, capaz de inhibir directamente la actividad de las enzimas de los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4, con la subsecuente disminución de los niveles de proteína del retinoblastoma fosforilada (pRb) (Guo et al., 2009). De los resultados obtenidos se puede evidenciar la fosforilación de esta proteína desde los primeros minutos de la interacción de la célula con las VEs (Figura 4.11.2A). Sin embargo, a los 60 minutos de iniciada la incubación, los niveles de fosforilación de la proteína fueron similares a los de las células control no incubadas con las VEs.

Otro de los efectos observados al incubar las células Vero con las VEs de *T. cruzi* fue la generación de un efector “protector” en las células frente a apoptosis. Al emplear el agente antineoplásico y pro apoptótico Taxol o paclitaxel, un compuesto estabilizante de los microtúbulos, se genera una interrupción del ciclo celular en la fase G2/M y la muerte celular por apoptosis (Bacus et al., 2001). En los resultados presentados en la Figura 4.12 se demuestra que tanto el valor relativo de células en apoptosis temprana como en apoptosis tardía es significativamente más bajo en las células incubadas con las VEs y tratadas con el fármaco con respecto al control de

células tratadas solo con Taxol (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), antineoplásico capaz de inhibir la replicación de líneas celulares eucarióticas a concentraciones muy bajas e inducir la fosforilación de la proteína Bcl2, seguido de apoptosis en diferentes líneas celulares (Yeung et al., 1999). Además, al tratar las células con una concentración mayor de Taxol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), los valores relativos de apoptosis temprana y de necrosis difirieron significativamente en ambos grupos, no así los valores de apoptosis tardía. Al probar la citotoxicidad del Taxol en líneas celulares de cáncer de mama, Yeung y colaboradores (1999) observaron que, al emplear concentraciones bajas de Taxol, éste estabiliza los microtúbulos en las fases G2/M y las células con el ciclo bloqueado en esa fase mueren por apoptosis. Sin embargo, al emplear concentraciones más altas de Taxol, se estabilizan los microtúbulos independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células y se inhibe la progresión del ciclo a la fase S, lo que llevaría a la muerte celular por necrosis (Yeung et al., 1999). Esto quizás explicaría los valores relativos más altos de muerte celular por necrosis en células tratadas con Taxol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y evidenciaría también un efecto protector de las VEs frente a la necrosis celular al emplearse la misma concentración del fármaco.

Como ha sido mencionado, el Taxol como agente antineoplásico es capaz de inhibir la proliferación celular e inducir la fosforilación de la proteína Bcl2, provocando la apoptosis (Yeung et al., 1999), además de participar en la activación de las proteínas de la vía de la ERK como la p38 MAP quinasa (Bacus et al., 2001). La vía MAPK/ERK (también conocida como la vía Ras-Raf-MEK-ERK) constituye un sistema de comunicación de señales que regula tanto la transcripción como la transducción, cuya señal comienza con la unión de un receptor de la superficie celular a su ligando y termina generándose una respuesta proteica que da lugar a algún cambio en la célula, como puede ser incluso la división celular.

El efecto protector de los exosomas frente a la apoptosis ya ha sido comprobado *in vitro* (Sun et al., 2016; Crompton et al., 2017; Han & Rhee,

2018). Sun y colaboradores (2016) demostraron que los exosomas de células mesenquimales de cordón umbilical humano eran capaces de incrementar la viabilidad celular inhibiendo la apoptosis, comprobando que se producía una disminución de la expresión de las proteínas Bax, la caspasa 3 escindida y la proteína PARP escindida, lo que llevaría a prevenir y/o proteger a las células ováricas de la muerte celular por apoptosis. En 2017, Crompot y colaboradores describieron una disminución de la apoptosis espontánea de células leucémicas B, así como un incremento en la quimioresistencia a diferentes fármacos inductores de apoptosis, incluidas la fludarabina, ibrutinib, idelalisib y el venetoclax, después de la incubación durante 24 horas con VEs de células de la médula ósea (Crompton et al., 2017). Finalmente, en 2018, Han y colaboradores demostraron que exosomas derivados de células de ovario de hámster (CHO) eran capaces de inhibir la apoptosis en esa misma línea celular cuando se suplementaba el medio de cultivo con dichas VEs. Estos mismos autores observaron que después del tratamiento con factores pro apoptóticos como la estaurosporina, las células incubadas con los exosomas mostraron una mayor actividad biológica y viabilidad con respecto a las células no incubadas con los mismos (Han & Rhee, 2018).

Después de comprobar los efectos que las VEs de las formas tripomastigotas de *T. cruzi* ejercen sobre las células, entre ellos el aumento de los niveles de Ca^{2+} libre en el citoplasma, la interrupción del ciclo celular en las fases G0/G1 y los efectos a nivel de citoesqueleto, en particular la despolimerización de los filamentos de actina, se quiso evaluar si entre dichos efectos estarían involucradas las proteínas Rho-GTPasas. En otros modelos biológicos ya ha sido comprobada la participación de estas proteínas en la reorganización del citoesqueleto, la progresión del ciclo celular y la regulación de la expresión génica, entre otros (Lorenzano Menna et al., 2010). Las Rho GTPasas constituyen una familia dentro de la superfamilia de las pequeñas GTPasas (20-25 kDa) (Lorenzano Menna et al., 2010), relacionadas con las proteínas Ras y presentes en todas las células eucarióticas (Jaffe &

Hall, 2005) ya que se consideran conectores entre los receptores de membrana y el citoesqueleto de actina (van den Broeke et al., 2014). En mamíferos se han descrito 22 genes que codifican para estas proteínas: 3 isoformas de Rho (A, B y C), 3 isoformas de Rac (1, 2 y 3), Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3, RhoG, Tc10, TCL, RhoH/TTF, Chp, Wrch1, Rif, RhoBTB1, RhoBTB2, Miro-1 y Miro-2 (Aspenström et al., 2004; Jaffe & Hall, 2005; van den Broeke et al., 2014). Estas proteínas actúan de forma similar a otras GTPasas reguladoras, por lo que se les considera como “interruptores” moleculares entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP, actividad que es controlada por factores como los GEF (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) que catalizan el intercambio del GDP por GTP y así activan el “switch”, proteínas GAP (proteínas activadoras de las GTPasas) que estimulan la actividad intrínseca GTPasa e inactivan dicho “switch” e inhibidores GDI (inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina) que parecen ser los encargados de bloquear la activación espontánea de las GTPasas (Jaffe & Hall, 2005). De tal modo, es en la forma unida a GTP en la que dichas proteínas realizan su función reguladora, a través de interacciones específicas con proteínas efectoras entre las que se encuentran la serina/treonina quinasas, quinasas de lípidos, lipasas, oxidasas y las proteínas estructurales (“scaffold proteins”) (Jaffe & Hall, 2005), como las del citoesqueleto celular.

Como ha sido descrito, la activación de RhoA, Rac o Cdc42 lleva al ensamblaje de los filamentos contráctiles de actina/miosina, de los lamelopodios y los filópodos protrusivos ricos en actina. De esta forma, cada GTPasa controla vías de transducción de señales intracelulares que llevan a la polimerización y la organización consiguiente de los filamentos de actina (Jaffe & Hall, 2005). Además, las proteínas Rho, Rac y Cdc42 también afectan la transcripción genética a través de vías de transducción de señales en las que no aparece implicado el citoesqueleto de actina, participando fundamentalmente en el metabolismo de lípidos y en la generación de

especies reactivas de oxígeno (Jaffe & Hall, 2005). Con respecto al ciclo celular, se conoce que estas GTPasas participan en la activación de las quinasas dependientes de ciclina durante la fase G1 y en la organización del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos durante la fase de mitosis. Por otra parte, su inhibición bloquea la progresión de la fase G1 en muchos tipos de células eucariotas, mecanismos que son dependientes del tipo celular (Jaffe & Hall, 2005; Lorenzano Menna et al., 2010). Los cambios morfológicos inducidos en el citoesqueleto y consecuentemente en la morfología celular (formación de filópodos) por las formas activas de esta familia de GTPasas incluyen el incremento de la polimerización de los filamentos de actina y el agrupamiento de las integrinas (Lorenzano Menna et al., 2010). Así, la adhesión celular mediada por integrinas dispararía la fosforilación de tirosinas, el flujo de iones y el metabolismo de lípidos que podrían afectar la expresión genética, la progresión del ciclo o la apoptosis celular (Lorenzano Menna et al., 2010). Alteraciones en la señalización mediada por las Rho GTPasas contribuyen a la transformación celular y el desarrollo de anomalías neurológicas y enfermedades inmunológicas (Hodge & Ridley, 2016).

En esta Tesis Doctoral se realizó un análisis de la expresión de genes de las 3 principales Rho-GTPasas (RhoA, Rac1 y Cdc42) en aquellas células incubadas con VEs de *T. cruzi*, proteínas involucradas en los cambios en el citoesqueleto celular y consideradas como las mejor caracterizadas dentro de la familia (van den Broeke et al., 2014). Así, se evaluaron los niveles de expresión de estos 3 genes a diferentes tiempos de la incubación de las células con las VEs mediante RT-qPCR y se obtuvieron unos niveles de expresión normalizados mucho más bajos a los 30 minutos y a las 4 horas de iniciado el contacto de las VEs con las células (Figura 4.13.2) que en el caso de las células no incubadas con las VEs. Resulta interesante resaltar que para el gen *RhoA* no se detectaron RNAs específicos a los 15 y 30 minutos de incubación con las VEs, lo que denota la falta de expresión del gen que codifica para esa

proteína a esos tiempos. La represión de la vía de señalización de las Rho/Rho kinasas en células infectadas con *T. cruzi* ya fue publicada por Mott y colaboradores en 2010, donde se evidenció una reducción dependiente del tiempo de la fosforilación de la Thr853 en la MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1), indicativa de la inhibición de la RhoA (Mott et al., 2010) posiblemente a través de la activación de la vía de señalización de AMPc/PKA, la cual se ha visto que inhibe la actividad de dicha proteína directamente al fosforilarla sobre el residuo de Ser188 (Lang et al., 1996) y a través de la fosforilación competitiva de MYPT1 en el residuo de Ser695 (Mott et al., 2010). La inhibición de RhoA tras dicha fosforilación se logra al intensificarse la interacción con la proteína inhibidora RhoGDI, lo que lleva a la desaparición de la RhoA (e incluso de Cdc42) de la membrana plasmática (Forget et al., 2002; Ellerbroek et al., 2003).

En el caso de la interacción de las exovesículas de las formas epimastigotas de la cepa DM28c con células, en un estudio publicado de transcriptómica de las células HeLa usadas en el experimento, Garcia Silva y colaboradores describieron la existencia de cambios en la expresión génica donde las vesículas secretadas por esta forma del parásito ejercen modificaciones en la expresión principalmente de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, la matriz extracelular, vías relacionadas con la respuesta inmune y las Rho-GTPasas (Garcia Silva et al., 2014b). En este estudio se determinó que las vías de señalización que involucran estas GTPasas se mantuvieron inactivas tanto a las 6 como a las 24 horas de iniciada la incubación de las células con las VEs del parásito, resultados que podrían justificar los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, aunque haría falta un estudio similar empleándose las VEs de las formas infectivas de la cepa Pan4, el cual se encuentra en fase de realización.

Dado que, de las tres GTPasas analizadas mediante RT-qPCR, la proteína RhoA es la principal involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina, se realizaron análisis de los niveles de fosforilación de esta proteína

mediante Western blot, con el fin de evidenciar una posible inhibición de la enzima que lleva a los resultados obtenidos sobre el citoesqueleto y el ciclo celular. Al incubar las células con VEs del parásito durante diferentes tiempos fue posible observar un incremento en la cantidad de proteína fosforilada desde los 10 minutos de la incubación, fosforilación que fue disminuyendo con el paso del tiempo pero nunca llegó a mostrar un nivel similar al de las células control sin incubar con las VEs. Como controles positivos de los experimentos se realizó la incubación con trombina y con ácido lisofosfatídico, los cuales produjeron niveles de fosforilación superiores a los controles de las células sin tratar desde los primeros 5 minutos de incubación. Para ambas sustancias está descrito que interactúan con la RhoA, con la consecuente disrupción de la función de barrera de las células endoteliales, mostrando una mayor actividad la trombina y que se acompaña a una reorganización del citoesqueleto de actina cuando se emplea el LPA (van Nieuw Amerongen et al., 2011). La determinación de los niveles de las proteínas efectoras ROCK1 y ROCK2 (proteínas serin-treonin kinasas), analizados también mediante Western blot, revelaron cantidades menores de proteína en las células incubadas con las VEs, con respecto a los de las células incubadas con los controles positivos y al control de células no tratadas. Estas proteínas son consideradas importantes reguladoras del crecimiento celular, la motilidad celular, de la migración, metabolismo celular y apoptosis mediado por el ensamblaje del citoesqueleto de actina y de la contracción celular (Riento & Ridley, 2003).

En mayoría de los estudios llevados a cabo con VEs, los investigadores se han enfocado principalmente en determinar aspectos biológicos, dándose poca atención a sus propiedades biofísicas como la carga de superficie y sus propiedades mecánicas. Quizás el pequeño tamaño de las vesículas es una limitante para el estudio microscópico de las mismas, ya que no es posible obtener información estructural detallada (Parisse et al., 2017). Recientemente, la microscopía de fuerza atómica constituye una herramienta

esencial para resolver este tipo de inconvenientes derivados del tamaño de las partículas. En la microscopía de fuerza atómica, una punta fina colocada en el extremo de un soporte a modo de viga horizontal denominado cantilever, barre la muestra depositada sobre un sustrato de mica, realizándose un escaneo línea a línea sobre la superficie de la muestra y registrando las fuerzas de la interacción entre la punta y la muestra cuando se encuentran muy próximas. Dado que estos parámetros de interacción decaen rápidamente con la distancia (volviéndose indetectables), se hace necesario que la separación entre la punta y la muestra sea del orden o inferior al nanómetro, lo que proporciona una altísima resolución del barrido. Con el fin de evitar errores en la distancia entre la punta y la propia muestra, el ajuste de la altura de la punta se va realizando de acuerdo con la propia retroalimentación que genera el equipo, la cual va a depender de la fuerza ejercida sobre el cantilever por la superficie, la frecuencia de la oscilación de la punta, la amplitud de la oscilación de la punta o una combinación de todos estos factores (Parisse et al., 2017). Al final, lo que se obtiene es una información mecánica y de la topografía de la muestra a estudiar.

En biología, la MFA ha brindado información sobre aspectos relacionados con la estructura de las proteínas, la ultraestructura de las organelas, la dinámica de las membranas celulares, entre otras (Schafer et al., 2002; Heinisch et al., 2012). En el caso de las VEs, esta ha sido empleada para caracterizar estructural y mecánicamente vesículas de diferentes orígenes, tal como los exosomas de saliva (Sharma et al., 2010) y de células cancerosas (Cross et al., 2008; Xiao et al., 2013; Whitehead et al., 2015), así como para comparar la forma en la que los diferentes métodos de aislamiento y purificación alteran su estructura o tamaño (Woo et al., 2016). La MFA también se ha empleado en experimentos de reconocimiento molecular para llevar a cabo análisis funcionales del contenido proteico de la membrana externa de los exosomas, al emplearse puntas funcionalizadas con anticuerpos específicos de diferentes proteínas (Yuana et al., 2010; Sharma et al., 2011).

Aun así, se estima que menos del 10% de los trabajos publicados con VEs ha incluido el uso de esta metodología (Gardiner et al., 2016). Con respecto al uso de la MFA para llevar a cabo estudios de las interacciones parásito-hospedador, existe muy poca información sobre la caracterización de las VEs y su papel en la comunicación célula-célula.

Como se ha comentado, el pequeño tamaño de las VEs ha llevado a que se empleen diversas técnicas para la caracterización de sus poblaciones. Dicha caracterización incluye análisis morfológicos, los cuales se realizan casi exclusivamente empleando microscopía electrónica de transmisión con técnicas de tinción negativa o mediante cortes de las exovesículas por ultramicrotomía, excluyéndose así la posibilidad de obtener información bioquímica y mecánica adicional (Sharma et al., 2010), salvo aquellos estudios llevados a cabo mediante inmunoquímica. Otras técnicas como el NTA, el DLS y la citometría de flujo se emplean con frecuencia, pero con todas sus limitaciones. Por ejemplo, en el caso del NTA, una dilución apropiada de la muestra es esencial para llevar a cabo las medidas, lo cual podría ser problemático si el volumen de la muestra es limitado (Szatanek et al., 2017), por lo que el principal “obstáculo” sería encontrar el factor de dilución correcto para que la cámara del equipo pueda registrar todas las vesículas presentes en la muestra, sin que las vesículas más grandes enmascaren a las más pequeñas (Szatanek et al., 2017). Algo similar ocurre con el DLS, ya que el método es menos preciso si se cuenta con suspensiones polidispersas, con partículas de varios tamaños, dado que el perfil de tamaño estaría influenciado por las partículas más grandes que dispersan más luz, que es lo que al final se mide. Finalmente, la citometría de flujo se considera de muy baja sensibilidad y resolución ya que detecta partículas de más de 500 nm, aunque algunos equipos de sensibilidad mejorada llegan a determinar partículas/cuentas de 200 nm (Szatanek et al., 2017), estando aún muy lejos de la resolución necesaria para partículas de 30 a 100 nm de rango en el que se sitúan los exosomas. En el mejor de los casos, se ha propuesto el uso de

otras partículas funcionalizadas más grandes capaces de unir a los exosomas, método que limita de manera importante tanto su estudio como su purificación. Por todas estas razones, la MFA es una herramienta muy útil y eficiente que permite la observación de la topografía tridimensional de las partículas individuales, la cual podría revelar variaciones en la morfología, rugosidad y cantidad de las vesículas aisladas, así como de las propiedades mecánicas o incluso puede ser útil en algunos estudios para determinar su composición.

En este trabajo se ha incluido el análisis mediante MFA de las VEs de los tripomastigotes de *T. cruzi*, así como el estudio de las IgGs anti *T. cruzi* purificadas mediante una columna de proteína G y de los inmunocomplejos que se forman al incubar las VEs de *T. cruzi* con las IgGs específicas contra el parásito, con el fin de realizar una caracterización morfológica y de las propiedades nanomecánicas de las mismas. En la bibliografía consultada existen estudios de otros autores donde se ha realizado la caracterización de VEs empleando MFA. Por ejemplo y como ya se ha indicado, Sharma y colaboradores estudiaron las nanovesículas de la saliva ya que consideran que podrían ser empleadas como biomarcadores de cáncer oral (Sharma et al., 2010). En este trabajo, los autores describen los exosomas como estructuras de superficie no homogénea, atribuible esta heterogeneidad superficial a la presencia de proteínas y/o mRNA englobados por la membrana lipídica de las exovesículas (Sharma et al., 2010). Este resultado concuerda con las observaciones mostradas en la Figura 4.14.1.1.1, donde se presenta la morfología y superficie de las VEs de *T. cruzi*. En 2013, Regev Rudzki y colaboradores visualizaron eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* empleando MFA y observaron vesículas de aproximadamente 120 nm de diámetro alrededor de los parásitos, además de muchas protuberancias en los eritrocitos, lo cual les llevó a sugerir que estas vesículas podrían estar en proceso de ser liberadas desde los eritrocitos (Regev Rudzki et al., 2013). Además, al analizar el medio de cultivo de las células infectadas, estos autores

describieron unas estructuras de 10 a 100 nm de amplitud y de una altura promedio de 5 nm, consistente con un depósito de agregados de proteínas y correlacionaron la cantidad de vesículas liberadas con la frecuencia de transferencia de algunos plásmidos empleados en sus experimentos, lo que les permitió concluir que las VEs funcionaban como mediadores de la comunicación intercelular entre los eritrocitos infectados (Regev Rudzki et al., 2013). En 2016, Woo y colaboradores confirmaron la forma globular de las VEs al realizar mediciones de MFA en líquido, forma que se esperaría deben tener bajo condiciones nativas (Woo et al., 2016). En este trabajo de Tesis, todas las mediciones se llevaron a cabo en celdas de aire, comparándose los resultados obtenidos con unas muestras analizadas en líquido y como en el caso de Woo y colaboradores, no se observaron diferencias significativas con respecto a la distribución de tamaño o de la forma al realizar ambos tipos de mediciones. Aun así, es importante considerar que, tanto el tamaño como las propiedades de las VEs varían dependiendo del tipo celular que las secreta y de la técnica de aislamiento que se emplee. Aun en un mismo tipo celular es posible detectar subpoblaciones de exosomas con composiciones moleculares y propiedades biológicas diferentes (Willms et al., 2016). Los resultados obtenidos también permiten comprobar la integridad, pureza y tamaño de las vesículas obtenidas mediante centrifugación diferencial, método que se eligió para el aislamiento de las VEs en esta Tesis ya que se considera el estándar de oro para la purificación de los exosomas (Li et al., 2017).

Las imágenes de las IgGs de los sueros anti-*T. cruzi* revelaron moléculas con una altura media de 3 a 13 nm, evidenciándose algunas diferencias entre las formas esféricas y las irregulares de las inmunoglobulinas tal como lo describen Berkvist y colaboradores (Bergkvist et al., 1998). Ouergui y colaboradores realizaron un estudio comparativo sobre la topografía y los histogramas de altura de los anticuerpos antes y después de su incubación con antígenos para formar inmunocomplejos (Ouergui et al.,

1999), de forma similar al realizado en esta Tesis y en dicho estudio, ellos describen una altura promedio de aproximadamente 2.5 nm para el caso de las IgGs anti-conejo empleadas, valor significativamente más bajo que el valor teórico (4 nm), lo que podría reflejar las diferentes orientaciones que pueden presentar las IgGs. En este mismo estudio se destaca la presencia de agregados de las propias IgGs, de 85 a 150 nm de amplitud (Ouerghi et al., 1999), quizás como consecuencia de las condiciones de fuerza iónica de las soluciones donde se encontraban dichas inmunoglobulinas (Thompson et al., 2016). La escasa presencia de carbohidratos en las IgGs en la región Fc (Lee & Im, 2017) podría explicar la adsorción de las inmunoglobulinas sobre la mica de tal forma que no se observen las tres subunidades del anticuerpo. Los carbohidratos son los responsables de orientar la molécula hacia la superficie, dando como resultado una forma asimétrica/elíptica en los análisis mediante MFA. Sin embargo, como las IgGs están cargadas positivamente en la región Fc (por la presencia de muchas argininas y lisinas al final esta región), estos deben unirse por fuerzas electrostáticas a la mica y muestran un patrón asimétrico que les daría esa forma elíptica que se observa (Klein & Bjorkman, 2010).

Cuando se realizaron las mediciones de los inmunocomplejos formados con las VEs se obtuvieron complejos de mayor amplitud, con una distribución aleatoria sobre el sustrato y con variaciones en los valores de altura, junto con otras estructuras más grandes que consistían en agregados de IgGs. En los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 4.14.1.3.1 se observa tanto la distribución al azar como la presencia de esas estructuras más grandes similares a lo reportado en la bibliografía (Ouerghi et al., 1999), donde se evidencia la agregación de una o más IgGs con una o varias VEs. La formación del inmunocomplejo es más evidente en las imágenes de topografía y fase de la Figura 4.14.1.3.3, donde se muestra el cambio de altura provocado por la unión de la inmunoglobulina a la vesícula, ya que, de no haberse producido dicha unión, los histogramas de los inmunocomplejos referentes a

la altura hubiesen sido idénticos a los de las VEs solas, adsorbidas sobre la mica.

La determinación de las propiedades biomecánicas de las vesículas es importante ya que se ha visto que pueden tener un papel en la exocitosis y en el transporte intercelular (Sharma et al., 2010). La cuantificación de estas propiedades en las membranas de células vivas ha sido realizada previamente, en especial en estudios relacionados con cáncer (Cross et al., 2008; Xiao et al., 2013; Whitehead et al., 2015). Por ejemplo, en el año 2008, Cross et al., publicaron que las células metastásicas eran menos rígidas y menos adhesivas que las células de pacientes sanos (Cross et al., 2008). En el año 2013, Xiao y colaboradores describieron que las células epiteliales pequeñas humanas de las vías respiratorias, eran más rígidas y adhesivas que la línea de células cancerosas A549 y que el tratamiento de estas células con fármacos anticancerosos producía una alteración de estas propiedades biomecánicas, alterándose los valores (Xiao et al., 2013). Finalmente y con respecto a las VEs, Whitehead y colaboradores demostraron que la rigidez y la adhesión de las vesículas derivadas de las células cancerosas eran en promedio de un orden de magnitud menor que las vesículas secretadas por células no cancerosas (Whitehead et al., 2015). En esta Tesis Doctoral, los análisis nanomecánicos de las VEs de *T.cruzi* y de los inmunocomplejos revelaron valores menores de rigidez y de elasticidad longitudinal (módulo de Young) en los inmunocomplejos al compararlos con las VEs, mientras que los valores de adhesión mostrados por los inmunocomplejos fueron mayores (Tabla 4.14.2).

La presencia de inmunocomplejos en el suero de pacientes crónicos con la enfermedad de Chagas fue descrita ya en la década de los 80s (Corral et al., 1987; Mosca & Cedillos, 1988; Costa et al., 1991; Petray et al., 1992) y a pesar de que no existen suficientes estudios que evidencien la función de estos complejos en la patología de la enfermedad, se supone que contribuyen con las manifestaciones chagásicas típicas de la enfermedad durante la fase

crónica. Estos inmunocomplejos se forman al unirse las inmunoglobulinas con antígenos secretados del parásito, incluidas las exovesículas (Díaz Lozano et al., 2017). En el año 2016 fue publicado el perfil proteómico de los inmunocomplejos circulantes en el suero de pacientes en fase crónica de la enfermedad (Ohyama et al., 2016) donde se describió que estos inmunocomplejos aparentemente se forman con antígenos proteicos que pertenecen a las grandes familias de proteínas de superficie del parásito, implicadas en los procesos de adhesión e invasión del parásito a las células hospedadoras (Díaz Lozano et al., 2017). De la caracterización proteómica de estos inmunocomplejos, 39 de los antígenos de *T. cruzi* pertenecen a las *trans*-sialidasas, gp63 y MASPs (Ohyama et al., 2016). Estos mismos autores sugieren la posible asociación entre la composición de los inmunocomplejos y las manifestaciones de la fase crónica de la enfermedad, ya que detectaron dos proteínas de funcionalidad desconocida en los inmunocomplejos circulantes de pacientes con manifestaciones gastrointestinales. La formación de estos inmunocomplejos con las VEs del parásito podría promover la captura de las vesículas a través de los receptores Fc de las células del sistema inmune con dichos receptores, lo que modularía la respuesta inmune contra el parásito y así se promovería la supervivencia del parásito en el hospedador. Las diferencias en las propiedades mecánicas de los inmunocomplejos (menor rigidez y elasticidad longitudinal) con respecto a las VEs, así como su mayor capacidad de adhesión, podrían favorecer la interacción de los mismos con las células inmunes, estimulando la opsonización de las VEs y con esto, permitiendo el acceso al citoplasma celular y la producción de exosomas “híbridos”, resultado de la fusión de exovesículas célula:parásito descrita por Ramirez y colaboradores (Ramirez et al., 2016).

Los resultados obtenidos con respecto a las diferencias en las propiedades mecánicas de las VEs y de los inmunocomplejos VEs-IgGs podrían estar relacionados con su biodistribución en los diferentes órganos de los ratones CD1, cepa susceptible a soportar la parasitación por *T. cruzi*, tras

su inoculación por la vía intravenosa. Así, el seguimiento realizado mediante IVIS permitió determinar la presencia de los inmunocomplejos en órganos como el hígado y el bazo, donde se concentraron la mayoría de vesículas tras su inoculación. Esta localización es previsible debido a la funcionalidad de tales órganos, los cuales permiten la filtración y eliminación de partículas celulares y microorganismos por parte de un sistema fagocítico donde participan las células de Kupffer y los macrófagos esplénicos. En un estudio realizado por Smyth y colaboradores se demostró una captación más lenta de las VEs procedentes de tumores por parte de las células del sistema reticuloendotelial (SRE) en ratones con un sistema inmune deficiente en el sistema de complemento (cepa NOD.CB17-Prkdcscid/J), por lo que los autores sugirieron que el sistema inmune contribuye, al menos en parte, en la eliminación de los exosomas derivados de tumores, proceso dependiente de la opsonización mediada por el complemento y no por la opsonización mediada por los anticuerpos (Smyth et al., 2015). Quizás la rápida captación de las VEs por el SRE sugeriría que la función primaria de las VEs no es la comunicación con células distantes del punto de origen sino posiblemente una función paracrina al intercambiar información con células vecinas del punto de liberación de dichas VEs y con las células del sistema inmune, puesto que las VEs están involucradas en muchos procesos inmunoreguladores, incluida la exposición a las células NK, a macrófagos y a las células dendríticas, estas últimas células presentadoras de antígenos, con la transferencia de moléculas antigénicas para permitir la activación de células T específicas (Théry et al., 2009; Robbins & Morelli 2014; Smyth et al., 2015).

En una revisión publicada por Morishita y colaboradores sobre la farmacocinética de los exosomas, los autores indicaron que los macrófagos son las células que primero captan activamente los exosomas administrados de manera exógena (Morishita et al., 2017). Además, en un estudio realizado con el fin de evaluar esta capacidad de los macrófagos para eliminar exosomas exógenos, Imai y colaboradores postularon que, si se piensa en el

empleo de exosomas para la liberación selectiva de proteínas o de algún otro compuesto que artificialmente se les introduzca, sería necesario que dichos exosomas sean capaces de escapar al reconocimiento por las células del sistema inmune, ya que demostraron que la eliminación de los exosomas exógenos depende de estas células (Imai et al., 2015). Esto podría justificar en parte que, al inyectar los inmunocomplejos formados por las VEs de *T. cruzi* con IgGs anti-*T. cruzi*, se observe fluorescencia en otros órganos además del hígado y del bazo, quizás porque al llevar anticuerpos unidos en su superficie se podría promover la captura de las vesículas a través de receptores Fc presentes en los macrófagos tisulares de estos órganos. Todo esto demuestra que el estudio de la farmacocinética de los exosomas es fundamental para poder dilucidar el papel biológico de las mismas e incluso desarrollar terapias basadas en estas vesículas (Imai et al., 2015).

La acumulación de los exosomas en hígado y bazo y la captación por parte de los macrófagos esplénicos y células de Kupffer no debe ser consecuencia exclusiva del mayor flujo sanguíneo existente en estos órganos. En estudios llevados a cabo en ratones, otros autores comprobaron que los macrófagos que capturan a los exosomas se encuentran en la zona marginal del bazo y en los macrófagos de la pulpa roja de este órgano y que en la captura de la VEs participa la sialoadhesina (CD169 o Siglec-1) (Saunderson et al., 2014), receptor localizado en los macrófagos del seno subcapsular de la medula del bazo, así como en los macrófagos metalófilos de las zonas marginales del mismo órgano. Sin embargo, los mismos autores indicaron que, si bien las células de Kupffer también ligan a los exosomas inyectados por vía intravenosa, las células de Kupffer (que también expresan CD169) son capaces de captarlos a un nivel más bajo que los macrófagos esplénicos quizás por el hecho de mostrar niveles de expresión de CD169 menores que los de las células monocíticas esplénicas, por lo que la acumulación y captación por parte del hígado, altamente eficiente mostrada en los experimentos de esta

Tesis, podría deberse a otro mecanismo en el que tal vez intervengan los receptores Fc de las inmunoglobulinas cuando se forma el inmunocomplejo.

El tropismo de los exosomas de origen tumoral por algunos órganos ya ha sido descrito, considerándosele multifactorial y vendría determinado por una combinación de los constituyentes de superficie de los exosomas, más allá de la presencia de una sola molécula de superficie, como pudieran ser las integrinas, la Hsp70 o las tetraspaninas (Wen et al., 2016; Lima & Möller, 2018). Además, la especificidad de los exosomas tumorales por algún órgano dependerá en gran medida de la expresión de los diferentes marcadores de superficie relacionados con su origen (Hoshino et al., 2015).

Las lectinas de unión a las inmunoglobulinas a través de ácido siálico son moléculas expresadas en una gran variedad de células linfoides, leucocitos y células estromales que permiten la unión al ácido siálico. Estas últimas células, también conocidas como células madre estromales, son células multipotenciales originadas a partir de la capa germinal mesodermal, con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células que van a expresar el receptor CD169, siendo este el primer miembro identificado de la familia de lectinas denominada “Siglec”, receptor que posee 17 dominios similares al que poseen las inmunoglobulinas que tienen ácido siálico.

El ácido siálico está presente en el glicocáliz que recubre la superficie de las células de mamífero y en muchas de las proteínas secretadas por ellas y como ya ha sido descrito en esta Tesis, en el proteoma de las VEs de las formas tripomastigotas de *T. cruzi* se ha determinado la presencia de hasta 121 *trans*-sialidasas, enzimas capaces de captar el ácido siálico de las proteínas sialiladas de las células y transferirlo a las galactosas presentes en el glicocáliz del parásito. Las 121 *trans*-sialidasas, presentes en las exovesículas de las formas infectivas, corresponden a los ocho diferentes grupos en los que Freitas y colaboradores clasificaron a dichas enzimas en el año 2011 y constituyen el 22% de toda la carga proteica de las VEs, por lo que la función biológica que deben ejercer los exosomas del parásito debe ser fundamental

para la supervivencia del parásito dentro del hospedador y deben participar en las diversas manifestaciones patológicas generadas durante el curso de la enfermedad de Chagas. Como también ha sido mencionado, la función de estas enzimas es capturar el ácido siálico de las glicoproteínas de superficie de la membrana de las células o de las proteínas glicosiladas que interaccionan con ellas y transferirlo a los residuos galactosa del glicocáliz de la superficie del parásito o de las VEs, con el fin de sialilar sus membranas y participar en la adhesión a las células y con esto iniciar la entrada al citoplasma. Dado que a partir del residuo Asn297 de la región Fc de las IgG1 e IgG2 se presenta una zona glicosilada, en la cual aparece como azúcar terminal bien la galactosa o el ácido siálico (Wuhrer et al., 2007), pudiera ser que el ácido siálico actúe como sustrato de las *trans*-sialidasas presentes en las VEs del parásito al formarse el inmunocomplejo. Esto daría como resultado la pérdida del ácido siálico del Fc de las IgGs y la unión del azúcar a la α -galactosa de las MASPs o de las otras glicoproteínas presentes en las VEs del parásito, lo que, por una parte, alteraría las regiones Fc de las inmunoglobulinas que forman el inmunocomplejo y, por otra parte, favorecería la unión de las VEs de *T. cruzi* sialiladas a los receptores CD169, con lo que atraerían los complejos VEs-IgGs para su posterior fusión de los exosomas con las membranas celulares. La presencia de este receptor ha sido descrita en todas las células derivadas de monocitos y macrófagos residentes, presentes en todos los órganos, incluidos los del aparato digestivo (Niess et al., 2005). Sin embargo, debido a la baja afinidad que muestra el receptor CD169 por el ácido siálico (de orden milimolar), solo aquellas partículas que se encuentren fuertemente sialiladas serán capaces de unirse fuertemente a los macrófagos CD169. La presencia de este receptor o de receptores específicos para la región Fc de las inmunoglobulinas podría ser la explicación de la presencia de los inmunocomplejos en el aparato digestivo de los ratones y de la ausencia mostrada por las VEs en los órganos del aparato digestivo y otros órganos, al inyectarse bajo la forma de “pseudoinmunocomplejo”, generados solamente

con las regiones Fab de las IgGs, lo que imposibilitaría tanto la unión al receptor Fc antes mencionado debido a la ausencia de la región Fc en el “falso” inmunocomplejo y a la posible sialilación de las VEs, dada la ausencia de ácido siálico en las Fab. Por otra parte, la relativa baja afinidad que muestra el CD169 por el ácido siálico podría explicar el tiempo necesario (a partir de 72 horas) para la aparición de los inmunocomplejos en órganos diferentes al bazo e hígado, mostrado en el apartado de resultados.

De toda la información presentada en esta Tesis Doctoral, se debe resaltar el papel de las vesículas extracelulares liberadas por las formas tripomastigotas de *T. cruzi* en la supervivencia y mantenimiento del parásito en el hospedador mamífero, siendo capaces de alterar las condiciones fisiológicas y bioquímicas de las células con las que interactúan, preparando así el nicho para nuevas infecciones. Posiblemente estas exovesículas sean capaces de inmunomodular la respuesta del hospedador al interactuar con células de origen inmune y contribuir de forma significativa con las “patías” desarrolladas en la fase crónica de la enfermedad.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

1. El aislamiento mediante ultrafiltración y centrifugación diferencial empleado en esta Tesis Doctoral, da como resultado la purificación de vesículas celulares o exovesículas secretadas por las formas tripanomastigotas infectivas del parásito *Trypanosoma cruzi*, de tamaño inferior a 200 nm y forma homogénea, compatibles mediante los métodos de caracterización con exosomas derivados de dichas formas infectantes. Los niveles de secreción de proteínas a través de VEs, en las condiciones seguidas en este trabajo y por la cepa de *T. cruzi* TcI empleada, dan valores por esta vía de secreción no clásica superiores cuantitativamente a la producida por otras cepas descritas en la bibliografía.
2. Los análisis de la presencia de proteínas específicas de *T. cruzi* en las VEs secretadas por las formas tripomastigotas infectivas mediante técnicas inmunoquímicas muestran que dichas exovesículas portan tanto cisteín proteasas como la cruzipaina como los complejos enzimáticos capaces de transferir ácido sialico a sus glicoproteínas, las *trans*-sialidasas, características de este parásito, lo que permite que dichos complejos enzimáticos puedan ser considerados como marcadores de los exosomas liberados por *T. cruzi*.
3. Los análisis comparativos del proteoma en las exovesículas de las formas tripomastigotas y epimastigotas de la cepa Pan4 de *T. cruzi* revelan diferencias importantes con respecto a la cantidad y el “carga” de proteínas que portan. Así, las VEs de los tripomastigotes parecen contener una mayor cantidad de proteínas

en comparación con las VEs de los epimastigotes. Cabe destacar que, en las VEs de los tripomastigotes, el 23% de las proteínas presentes se identifican como miembros de familias multigénicas vs. 9.2% en el caso de las VEs de los epimastigotes. Como se ha mencionado anteriormente, resulta interesante la gran cantidad y variabilidad de las *trans*-sialidasas en las VEs de las formas tripomastigotas, ya que se obtienen 121 proteínas de este tipo pertenecientes a todos los grupos (I - VIII), mientras que en el caso de los epimastigotes, se obtienen solo 33 proteínas pertenecientes únicamente al grupo II. Esto permite especular sobre la importancia biológica que dichas enzimas poseen en la interacción de las VEs con sus blancos en el hospedador.

4. Las VEs de la cepa de *T. cruzi* empleada en esta Tesis Doctoral son capaces de incrementar tanto los porcentajes de parasitación celular como los índices de parasitación, al ser pre incubados los cultivos celulares con las exovesículas previo al proceso de infección con tripomastigotes. La inducción del incremento es temporal y específico para este parásito, así como independiente de la cepa. Por otra parte, los componentes de membrana de las VEs de *T. cruzi* deben participar en los procesos de reconocimiento y adhesión a las membranas celulares, dado que los tratamientos térmicos y químicos/enzimáticos de las exovesículas evitan los efectos sobre las células ejercidos por las VEs. Por esta razón, se deduce que deben participar, por una parte en el reconocimiento de azúcares del glicocáliz de las VEs como con acciones vinculadas con una actividad enzimática presente en las VEs. Los efectos de la interacción VEs:célula siguen una cinética dosis respuesta, donde una vez alcanzado su máximo, los efectos celulares referidos al incremento en la capacidad de inducción de la parasitación decae, lo que permitió calcular la

dosis efectiva 50 para estudiar los efectos celulares inducidos por las VEs del parásito.

5. Las VEs de los tripomastigotes infectivos de la cepa Pan 4 de *T. cruzi* son capaces de inducir una serie de alteraciones fisiológicas de forma temporal sobre los cultivos celulares con los que interactúan y de alguna manera favorecerían la parasitación celular, produciendo:

- La permeabilización de las membranas celulares, entre las que se incluyen células de una línea de cardiomiocitos, lo que permite el reconocimiento de epítomos intracitoplasmáticos de los receptores β adrenérgicos por parte de anticuerpos.
- El aumento intracelular de Ca^{2+} libre proveniente de los depósitos intracelulares, así como del medio extracelular.
- La desorganización del citoesqueleto celular, con especial referencia a los filamentos de actina.
- La interrupción del ciclo celular en las fases G0/G1.
- Un efecto “protector” frente a los inductores de la apoptosis, tanto en la fase temprana como en la fase tardía.

En la generación de dichos cambios fisiológicos está involucrada la fosforilación de la proteína de retinoblastoma y las proteínas Rho-GTPasas, cuya expresión parece alterarse al incubar las células con las VEs del parásito, lo cual abre posibles vías de estudio que permitan disminuir los efectos de las exovesículas sobre dichas vías de señalización en las que estas Rho-GTPasas están implicadas y con ello evitar los efectos celulares y la facilitación de la parasitación intracelular por las formas infectantes del parásito.

6. El estudio de las exovesículas de *T. cruzi* mediante microscopía de fuerza atómica, así como de los inmunocomplejos VEs-IgGs

anti-*T. cruzi* que se forman, permitió conocer tanto sus características estructurales como sus propiedades mecánicas. En el caso de los inmunocomplejos, éstos mostraron poseer una mayor adhesión y menor rigidez que las exovesículas purificadas. Quizás el reconocimiento de las moléculas de inmunoglobulina G adheridas a las membranas de las exovesículas por parte del cantilever del equipo podría enmascarar las propiedades de las membranas lipídicas de las propias exovesículas.

7. La biodistribución *in vivo* de las exovesículas y de los inmunocomplejos VEs-IgGs anti-*T. cruzi*, tras la inoculación en un modelo de ratón, mostraron diferencias en la distribución en los órganos de los animales inoculados. Mientras que las exovesículas purificadas, procedentes de *T. cruzi*, los “pseudoinmunocomplejos” formados por las fracciones Fab de las IgGs y las VEs de *T. cruzi* o inmunocomplejos formados con las VEs procedentes de cultivos de células de mamíferos unidas a IgGs anti-CD9 se acumulan en el hígado y bazo, los inmunocomplejos formados por la IgGs específicas y las VEs del parásito inicialmente se asocian con los órganos anteriormente descritos, pero posteriormente se visualizan en otros órganos como los del tracto digestivo, facilitando posiblemente el contacto y la acción de las VEs de *T. cruzi* con las células de los plexos nerviosos. Esto quizás podría relacionarse con la falta de innervación y tono del aparato digestivo, lo que contribuiría a las “patías chagásicas” de la fase crónica de esta enfermedad.

7. Bibliografia

7. Bibliografía

1. Alford, S. C., Pearson, J. D., Carette, A., Ingham, R. J. & Howard, P. L. (2009). Alpha-sarcin catalytic activity is not required for cytotoxicity. *BMC Biochemistry*, 10(1), p. 9. doi: 10.1186/1471-2091-10-9.
2. Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P. & Dimier Poisson, I. (2004). *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and Immunity*, 72(7), pp. 4127–37. doi: 10.1128/iai.72.7.4127-4137.2004.
3. Alves, C. R., Albuquerque Cunha, J. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., Nogueira, N. F., Bourguignon, S. C., et al. (2007) *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 116(1), pp. 44–52. doi: 10.1016/j.exppara.2006.11.012.
4. Alves, M. J., Abuin, G., Kuwajima, V. Y. & Colli, W. (1986). Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 21(1), pp. 75–82.
5. de Andrade, A. L., Zicker, F., de Oliveira, R. M., Almeida Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L. R., et al. (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, 348(9039), pp. 1407–1413.
6. Andrade, L. O. & Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*–

- host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), pp. 819-823.
7. Andrade, D., Serra, R., Svensjö, E., Lima, A. P. C., Ramos, E. S., Fortes, F. S., et al. (2012). *Trypanosoma cruzi* invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *British Journal of Pharmacology*, 165(5), pp. 1333–1347. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01609.x.
 8. Andreu, Z. & Yáñez M6, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 5, p. 442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
 9. Angelot, F., Seill6s, E., Biichl6, S., Berda, Y., Gaugler, B., Plumas, J., et al. (2009). Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica*, 94(11), pp. 1502–1512. doi: 10.3324/haematol.2009.010934.
 10. Aparicio, I. M., Scharfstein, J. & Lima, A. P. C. A. (2004). A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infection and Immunity*, 72(10), pp. 5892–5902. doi: 10.1128/iai.72.10.5892-5902.2004.
 11. Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Saavedra, M., Araya, E., Solari, A., et al. (2015). *Trypanosoma cruzi* burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy. *Parasitology Research*, 114, pp. 3007–3018. doi: 10.1007/s00436-015-4503-2.

12. Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Solari, A., Sánchez, G., Mundaca, K., et al. (2005). Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99(8), pp. 733–741. doi: 10.1179/136485905X75403.
13. Aspenström, P., Fransson, A. & Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system, *Biochemical Journal*, 15(377), pp. 327-337.
14. Assoian, R. K. & Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), pp. 93–98. doi: 10.1016/S0955-0674(97)80157-3.
15. Atayde, V. D., Hassani, K., da Silva Lira Filho, A., Borges, A. R., Adhikari, A., Martel, C., et al. (2016). *Leishmania* exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. *Cellular Immunology*, 309, pp. 7–18. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.013.
16. Atayde, V. D., da Silva Lira Filho, A., Chaparro, V., Zimmermann, A., Martel, C., Jaramillo, M., et al. (2019). Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. *Nature Microbiology*, 4(4), pp. 714–723. doi: 10.1038/s41564-018-0352-y.
17. Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streit, J., Buikstra, J., Guhl, F., et al. (2004). A 9,000-year record of Chagas disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), pp. 2034–2039.

18. Augustine, S. A. J., Kleshchenko, Y. Y., Nde, P. N., Pratap, S., Ager, E. A., Burns, J. M., et al. (2006). Molecular cloning of a *Trypanosoma cruzi* cell surface casein kinase II substrate, Tc-1, involved in cellular infection. *Infection and Immunity*, 74(7), pp. 3922–3929. doi: 10.1128/IAI.00045-06.
19. Babich, A. & Burkhardt, J. K. (2013). Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunological Reviews*, 256(1), pp. 80–94. doi: 10.1111/imr.12123.
20. Bacus, S. S., Gudkov, A. V, Lowe, M., Lyass, L., Yung, Y., Komarov, A. P., et al. (2001). Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene*, 20(2), pp. 147–155. doi: 10.1038/sj.onc.1204062.
21. Baida, R. C. P., Santos, M. R. M., Carmo, M. S., Yoshida, N., Ferreira, D., Ferreira, A. T., et al. (2006). Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. *Infection and Immunity*, 74(3), pp. 1537–1546. doi: 10.1128/iai.74.3.1537-1546.2006.
22. Barbosa, H. S., de Nazareth, M. & de Meirelles, S. L. (1992). Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCAI- and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 78(5), pp. 404–409. doi: 10.1007/BF00931696.
23. Barclay, J. J., Morosi, L. G., Vanrell, M. C., Trejo, E. C., Romano, P. S. & Carrillo, C. (2011). *Trypanosoma cruzi* coexpressing ornithine decarboxylase and green fluorescence proteins as a tool to study the

- role of polyamines in Chagas disease pathology. *Enzyme Research*, p. 657460. doi: 10.4061/2011/657460.
24. Barrias, E. S., Dutra, J. M. F., de Souza, W. & Carvalho, T. M. U. (2007). Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), pp. 828–834. doi: 10.1016/J.BBRC.2007.09.068.
25. Barteneva, N. S., Maltsev, N. & Vorobjev, I. A. (2013). Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, p. 49. doi: 10.3389/fcimb.2013.00049.
26. Bastida, E., Ordinas, A., Escolar, G. & Jamieson, G. A. (1984). Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. *Blood*, 64(1), pp. 177–184.
27. Bautista López, N. L., Ndao, M., Camargo, F. V., Nara, T., Annoura, T., Hardie, D. B., et al. (2017). Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(3), pp. 744–758. doi: 10.1128/jcm.01649-16.
28. Bayer Santos, E., Aguilar Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela Ramirez, A., et al. (2013). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, 12(2), pp. 883–897. doi: 10.1021/pr300947g.

29. Bayer Santos, E., Lima, F. M., Ruiz, J. C., Almeida, I. C. & da Silveira, J. F. (2014). Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(2), pp. 71–74. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.02.004.
30. Beatty, W. L., Ullrich, H. J. & Russell, D. G. (2001). Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event., *European Journal of Cell Biology*, 80(1), pp. 31–40. doi: 10.1078/0171-9335-00131.
31. Beauvillain, C., Juste, M. O., Dion, S., Pierre, J. & Dimier Poisson, I. (2009). Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*, 27(11), pp. 1750–1757. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.022.
32. Beauvillain, C., Ruiz, S., Guiton, R., Bout, D. & Dimier Poisson, I. (2007). A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes and Infection*, 9(14–15), pp. 1614–22. doi: 10.1016/j.micinf.2007.07.002.
33. van Beers, E. J., Schaap, M. C. L., Berckmans, R. J., Nieuwland, R., Sturk, A., van Doormaal, F. F., et al. (2009). Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*, 94(11), pp. 1513–1519. doi: 10.3324/haematol.2009.008938.
34. Belaunzarán, M. L., Wilkowsky, S. E., Lammel, E. M., Giménez, G., Bott, E., Barbieri, M. A., et al. (2013). Phospholipase A1: A novel

- virulence factor in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 187(2), pp. 77–86. doi: 10.1016/j.molbiolpara.2012.12.004.
35. Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Cazzulo, J. J. & Goñi, F. (2003). Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(1), pp. 23–29.
36. Bergkvist, M., Carlsson, J., Karlsson, T. & Oscarsson, S. (1998). TM-AFM threshold analysis of macromolecular orientation: a study of the orientation of IgG and IgE on mica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(2), pp. 475–481. doi: 10.1006/jcis.1998.5630.
37. Berrier, A. L. & Alahari, S. K. (2011). Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Frontiers in Bioscience*, 1(16): 2561-2571.
38. Bhatnagar, S. & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory., *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35), pp. 25779–25789. doi: 10.1074/jbc.M702277200.
39. Bilyy, R. O., Shkandina, T., Tomin, A., Muñoz, L. E., Franz, S., Antonyuk, V., et al. (2012). Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(1), pp. 496–503. doi: 10.1074/jbc.M111.273144.
40. Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st Century: a public

- health success or an emerging threat? *Parasite*, 21, p. 11. doi: 10.1051/parasite/2014012.
41. Borda, E., Pascual, J., Cossio, P., de la Vega, M., Arana, R. & Sterin Borda, L. (1984) A circulating IgG in Chagas disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clinical and Experimental Immunology*. 57(3), pp. 679–686.
42. Borges, B. C., Uehara, I. A., Dias, L. O. S., Brígido, P. C., da Silva, C. V & Silva, M. J. B. (2016). Mechanisms of infectivity and evasion derived from microvesicles cargo produced by *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6, p. 161. doi: 10.3389/fcimb.2016.00161.
43. Borges, B. C., Uehara, I. A., Dias, L. O. S., Brígido, P. C., da Silva, C. V, Silva, M. J. B., et al. (2016). Mechanisms of infectivity and evasion derived from microvesicles cargo produced by *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, p. 161. doi: 10.3389/fcimb.2016.00161.
44. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
45. Braga, M. S., Lauria Pires, L., Argañaraz, E. R., Nascimento, R. J. & Teixeira, A. R. (2000). Persistent infections in chronic Chagas disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42(3):157-161.
46. van den Broeke, C., Jacob, T. & Favoreel, H. W. (2014). Rho'ing in

- and out of cells: viral interactions with Rho GTPase signaling. *Small GTPases*, 5, p. e28318. doi: 10.4161/sgtp.28318.
47. Brossas, J. Y., Gulin, J. E. N., Bisio, M. M. C., Chapelle, M., Marinach Patrice, C., Bordessoules, M., et al. (2017). Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. *PLoS One*, 12(10), p. e0185504. doi: 10.1371/journal.pone.0185504.
48. Brunoro, G. V. F., Caminha, M. A., Ferreira, A. T. da S., Leprevost, F. da V., Carvalho, P. C., Perales, J., et al. (2015). Reevaluating the *Trypanosoma cruzi* proteomic map: the shotgun description of bloodstream trypomastigotes. *Journal of Proteomics*, 115, pp. 58–65. doi: 10.1016/j.jprot.2014.12.003.
49. Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., et al. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms6488.
50. Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), pp. 175–200. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.001135.
51. Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. (1998). Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Microbiology*, 1(4), pp. 461–465. doi: 10.1016/S1369-5274(98)80066-0.
52. Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C. C. & di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat

- diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), pp. 229–236. doi: 10.1038/nrmicro1351.
53. Buscaglia, C. A., Campo, V. A., di Noia, J. M., Torrecilhas, A. C. T., de Marchi, C. R., Ferguson, M. A. J., et al. (2004). The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16), pp. 15860–15869. doi: 10.1074/jbc.M314051200.
54. Buschow, S. I., van Balkom, B. W. M., Aalberts, M., Heck, A. J. R., Wauben, M. & Stoorvogel, W. (2010). MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunology and Cell biology*, 88(8), pp. 851–856. doi: 10.1038/icb.2010.64.
55. Buschow, S. I., Nolte-‘t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., et al. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, 10(10), pp. 1528–1542. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x.
56. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
57. del Cacho, E., Gallego, M., Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Quilez, J., Lillehoj, E. P., et al. (2011). Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC)

- and DC-derived exosomes. *Vaccine*, 29(21), pp. 3818–3825. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.03.022.
58. Cai, H., Reinisch, K. & Ferro Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental Cell*, 12, pp. 671–682. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.005.
59. Caler, E. V, Morty, R. E., Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. (2000). Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 68(12), pp. 6602–6610.
60. Caler, E. V, Vaena de Avalos, S., Haynes, P. A., Andrews, N. W. & Burleigh, B. A. (1998). Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *The EMBO Journal*, 17(17), pp. 4975–4986. doi: 10.1093/emboj/17.17.4975.
61. Campbell, T. D., Khan, M., Huang, M.-B., Bond, V. C. & Powell, M. D. (2008). HIV-1 Nef protein is secreted into vesicles that can fuse with target cells and virions. *Ethnicity & Disease*, 18(2 Suppl 2), pp. S2-14–19.
62. Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procópio, D. O., et al. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of Immunology*, 167(1), pp. 416–423.
63. Cánepa, G. E., Degese, M. S., Budu, A., Garcia, C. R. S. & Buscaglia, C. A. (2012). Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *The*

- Biochemical Journal*, 444(2), pp. 211–218. doi: 10.1042/bj20120074.
64. Carrasco, E., Álvarez, P. J., Melguizo, C., Prados, J., Álvarez Manzaneda, E., Chahboun, R., et al. (2014). Novel merosesquiterpene exerts a potent antitumor activity against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.03.071.
65. Carvalho, T. M., Ferreira, A. G., Coimbra, E. S., Rosestolato, C. T. & de Souza, W. (1999). Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 31(3), pp. 325–333.
66. Castanys, S., Gamarro, F., Ruiz Pérez, L. M. & Osuna, A. (1990). Purification of a glycoprotein excreted by *Trypanosoma cruzi* to increase the permeability of the host-cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166(2), pp. 736–742. doi: 10.1016/0006-291X(90)90871-J.
67. Castillo Riquelme, M., Guhl, F., Turriago, B., Pinto, N., Rosas, F., Martínez, M. F., et al. (2008). The costs of preventing and treating chagas disease in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(11), p. e336. doi: 10.1371/journal.pntd.0000336.
68. Castro, C., Macêdo, V., Rezende, J. M. & Prata, A. (1994). Longitudinal radiologic study of the esophagus, in an endemic area of Chagas disease, in a period of 13 years. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27(4), pp. 227–233.
69. Castro, D. P., Seabra, S. H., Garcia, E. S., de Souza, W. & Azambuja,

- P. (2007). *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Experimental parasitology*, 117(2), pp. 201–207. doi: 10.1016/j.exppara.2007.04.014.
70. Cazzulo, J. J., Cazzulo Franke, M. C., Martínez, J. & Franke de Cazzulo, B. M. (1990). Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1037(2), pp. 186–191. doi: 10.1016/0167-4838(90)90166-D.
71. Cestari, I., Ansa Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M. & Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *Journal of Immunology*, 188(4), pp. 1942–1952. doi: 10.4049/jimmunol.1102053.
72. Chacon Heszele, M. F., Choi, S. Y., Zuo, X., Baek, J. I., Ward, C. & Lipschutz, J. H. (2014). The exocyst and regulatory GTPases in urinary exosomes. *Physiological Reports*, 2(8). doi: 10.14814/phy2.12116.
73. Chagas, C. (1909a). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), pp. 159–218. doi: 10.1590/S0074-02761909000200008.
74. Chagas, C (1909b). Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung. *Archiv für Schiff- und Tropenhygiene*, 13: pp. 120–122.
75. Chargaff, E. & West, R. (1946). The biological significance of the

- thromboplastic protein of blood. *The Journal of Biological Chemistry*, 166(1), pp. 189–197.
76. Chedid, J., Rossi, N., Duarte, E. C. & Gurgel Gonçalves, R. (2015). Factors associated with the occurrence of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in rural localities of Central-West Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), pp. 192–200. doi: 10.1590/0074-02760140395.
77. Chen, W., Wang, J., Shao, C., Liu, S., Yu, Y., Wang, Q. et al. (2006). Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. *European Journal of Immunology*, 36(6), pp. 1598–1607. doi: 10.1002/eji.200535501.
78. Chowdhury, I., Koo, S., Gupta, S., Liang, L. Y., Bahar, B., Barrientos, N., et al. (2017). Gene expression profiling and functional characterization of macrophages in response to circulatory microparticles produced during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. *Journal of Innate Immunity*, 9(2), pp. 203–216. doi: 10.1159/000451055.Gene.
79. Chugh, P. E., Sin, S. H., Ozgur, S., Henry, D. H., Menezes, P., Griffith, J., et al. (2013). Systemically circulating viral and tumor-derived microRNAs in KSHV-associated malignancies. *PLoS Pathogens*, 9(7), p. e1003484. doi: 10.1371/journal.ppat.1003484.
80. Cieplak, W., Gaudin, H. M. & Eidels, L. (1987). Diphtheria toxin receptor. Identification of specific diphtheria toxin-binding proteins on the surface of Vero and BS-C-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(27), pp. 13246–13253.

81. Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., et al. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Cell Biology*, 95, pp. 2979–2984.
82. Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M. D. & Hallett, M. B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB Journal*: 18(9), pp. 977–979. doi: 10.1096/fj.03-1094fje.
83. Cocucci, E. & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), pp. 364–372. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004.
84. Colli, W. (1993). *Trans*-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB Journal*, 7(13), pp. 1257–1264.
85. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, pp. 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
86. del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. & López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 106(5), pp. 1604–1611. doi: 10.1182/blood-2004-03-1095.
87. Contreras, V. T., Araujo Jorge, T., Bonaldo, M. C., Thomaz, N., S, B. H., de Nazareth S L Meirelles, M. & Goldenberg, S. (1988). Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after

- metacyclogenesis in chemically defined media. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(1), pp. 123–133.
88. Corral, M. J., González Sánchez, E., Cuquerella, M. & Alunda, J. M. (2014). *In vitro* synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), pp. 1596–1602. doi: 10.1128/AAC.00710-13.
89. Corral, R., Freilij, H. & Grinstein, S. (1987). Specific circulating immune complexes in acute Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 29(1), pp. 26–32.
90. Cortez, M., Atayde, V. & Yoshida, N. (2006). Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*, 8(6), pp. 1502–1512. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.007.
91. Costa, R. S., Monteiro, R. C., Lehuen, A., Jaskowicz, M., Noël, L. H. & Droz, D. (1991). Immune complex-mediated glomerulopathy in experimental Chagas disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 58(1), pp. 102–114. doi: 10.1016/0090-1229(91)90152-Z.
92. Coura, J. R. & Borges Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115(1–2), pp. 5–13. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008.
93. Coura, J. R. & Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(n7301_suppl), pp. S6–S7. doi: 10.1038/nature09221.

94. Crompot, E., van Damme, M., Pieters, K., Vermeersch, M., Perez Morga, D., Mineur, P., et al. (2017). Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica*, 102(9), pp. 1594–1604. doi: 10.3324/haematol.2016.163337.
95. Cross, S. E., Jin, Y. S., Tondre, J., Wong, R., Rao, J. & Gimzewski, J. K. (2008). AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 19(38), p. 384003. doi: 10.1088/0957-4484/19/38/384003.
96. Cuevas, I. C., Cazzulo, J. J. & Sánchez, D. O. (2003). Gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infection and Immunity*, 71(10), pp. 5739–5749. doi: 10.1128/iai.71.10.5739-5749.2003.
97. Cura, C. I., Mejía Jaramillo, A. M., Duffy, T., Burgos, J. M., Rodriguero, M., Cardinal, M. V, et al. (2010). *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographic regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. *International Journal of Parasitology*, 40(14), pp. 1599–1607. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.06.006.
98. Dalton, A. J. (1975). Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus-like” particles. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(5), pp. 1137–1148.
99. Dang, I. & Gautreau, A. (2012). Evidence for a cell cycle checkpoint

- that senses branched actin in the lamellipodium. *BioEssays*, 34(12), pp. 1021–1024. doi: 10.1002/bies.201200119.
100. Delcayre, A. & Le Pecq, J. B. (2006). Exosomes as novel therapeutic nanodevices. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 8(1), pp. 31–38.
101. Deolindo, P., Evans Osses, I. & Ramirez, M. I. (2013). Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), pp. 252–257. doi: 10.1042/BST20120217.
102. Devhare, P. B. & Ray, R. B. (2017). A novel role of exosomes in the vaccination approach. *Annals of Translational Medicine*, 5(1), p. 23. doi: 10.21037/atm.2016.12.75.
103. Díaz Lozano, I. M., de Pablos, L. M., Longhi, S. A., Zago, M. P., Schijman, A. G. & Osuna, A. (2017). Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASPs N-terminal region. *Scientific Reports*, 7, p. 44451. doi: 10.1038/srep44451.
104. Docampo, R. & Moreno, S. N. J. (1996). The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitology Today*, 12(2), pp. 61–65. doi: 10.1016/0169-4758(96)80656-9.
105. Dorta, M. L., Ferreira, A. T., Oshiro, M. E. M. & Yoshida, N. (1995). Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73(1–2), pp. 285–289. doi: 10.1016/0166-6851(94)00123-5.

106. Dvorak, H. F., Quay, S. C., Orenstein, N. S., Dvorak, A. M., Hahn, P., Bitzer, A. M., et al. (1981). Tumor shedding and coagulation. *Science*, 212(4497), pp. 923–924.
107. Dvorak, J. A. & Hyde, T. P. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Experimental Parasitology*, 34(2), pp. 268–283.
108. Edgar, J. R. (2016). Q & A: What are exosomes, exactly?. *BMC Biology*, 14(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12915-016-0268-z.
109. Ellerbroek, S. M., Wennerberg, K. & Burridge, K. (2003). Serine phosphorylation negatively regulates RhoA *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), pp. 19023–19031. doi: 10.1074/jbc.M213066200.
110. Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., et al. (2010). Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of Neuroscience*, 30(20), pp. 6838–6851. doi: 10.1523/jneurosci.5699-09.2010.
111. Escobar, A. L., Fernández Gómez, R., Peter, J. C., Mobini, R., Hoebeke, J. & Mijares, A. (2006). IgGs and Mabs against the β 2-adrenoreceptor block A-V conduction in mouse hearts: a possible role in the pathogenesis of ventricular arrhythmias. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 40(6), pp. 829–837. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.03.430.
112. Evans Osses, I., Mojoli, A., Monguió Tortajada, M., Marcilla, A.,

- Aran, V., Amorim, M., et al. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response *in vitro*. *European Journal of Cell Biology*, 96(2), pp. 131–142. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.01.005.
113. Farzamfar, S., Hasanpour, A., Nazeri, N., Razavi, H., Salehi, M., Shafei, S., et al. (2019). Extracellular micro/nanovesicles rescue kidney from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Cellular Physiology*. doi: 10.1002/jcp.27998.
114. Favoreto, S., Dorta, M. L. & Yoshida, N. (1998). *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Experimental Parasitology*, 89(2), pp. 188–194. doi: 10.1006/expr.1998.4285.
115. Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., et al. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11(5), pp. 675–687. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x.
116. Fernandes, A. B., Neira, I., Ferreira, A. T. & Mortara, R. A. (2006). Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitology Research*, 100(1), pp. 59–68. doi: 10.1007/s00436-006-0236-6.
117. Fernandes, A. & Mortara, R. A. (2004). Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. *Microbes and Infection*, 6(5), pp. 460–467. doi: 10.1016/j.micinf.2004.01.009.

118. Fernandes, L. R., Rocha, V. B., Carregari, V. C., Urbani, A. & Palmisano, G. (2017). A perspective on extracellular vesicles proteomics. *Frontiers in Chemistry*, 5, p. 102. doi: 10.3389/fchem.2017.00102.
119. Fernandes, M. C., Cortez, M., Geraldo Yoneyama, K. A., Straus, A. H., Yoshida, N. & Mortara, R. A. (2007). Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *International Journal for Parasitology*, 37(13), pp. 1431–1441. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.025.
120. Fernandes, M. C., Flannery, A. R., Andrews, N. & Mortara, R. A. (2013). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 15(6), pp. 977–991. doi: 10.1111/cmi.12090.
121. Fernandez Calero, T., Garcia Silva, R., Pena, A., Robello, C., Persson, H., Rovira, C., et al. (2015). Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 199(1–2), pp. 19–28. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.03.003.
122. Fernández Puentes, C. (1983). Permeability to alpha sarcin in virus-infected cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 50(2), pp. 185–191.
123. Ferrão, P. M., d’Avila Levy, C. M., Araujo Jorge, T. C., Degraive, W. M., Gonçalves, A. da S., Garzoni, L. R., et al. (2015). Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during *T. cruzi* invasion. *PLoS One*, 10(5), p. e0124832. doi: 10.1371/journal.pone.0124832.

124. Ferreira, D., Cortez, M., Atayde, V. D. & Yoshida, N. (2006). Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infection and Immunity*, 74(10), pp. 5522–5528. doi: 10.1128/IAI.00518-06.
125. Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., et al. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), pp. 9683–9688. doi: 10.1073/pnas.0308413101.
126. Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M. et al. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 3), pp.447-458. doi: 10.1242/jcs.074088.
127. Forget, M. A., Desrosiers, R. R., Gingras, D. & Béliveau, R. (2002) Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochemical Journal*. 15:361(Pt 2): 243-254.
128. Fox, J. E., Austin, C. D., Boyles, J. K. & Steffen, P. K. (1990). Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 111(2), pp. 483–493.
129. Frasch, A. C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 16(7), pp. 282–286. doi: 10.1016/S0169-4758(00)01698-7.
130. Freitas, L. M., dos Santos, S. L., Rodrigues Luiz, G. F., Mendes, T. A.

- O., Rodrigues, T. S., Gazzinelli, R. T., et al. (2011). Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the *trans*-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*, 6(10), p. e25914. doi: 10.1371/journal.pone.0025914.
131. Furuya, T., Kashuba, C., Docampo, R. & Moreno, S. N. (2000). A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9), pp. 6428–6438. doi: 10.1074/jbc.275.9.6428.
132. Galvao, C., Carcavallo, R., Rocha, D. D. S. & Jurgberg, J. (2016). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202, pp. 1–36. doi: 10.11646/zootaxa.202.1.1.
133. Garcia Silva, M. R., Cabrera Cabrera, F., das Neves, R. F. C., Souto Padrón, T., de Souza, W. & Cayota, A. (2014a). Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. *BioMed Research International*, p. 305239. doi: 10.1155/2014/305239.
134. Garcia Silva, M. R., Cura das Neves, R. F., Cabrera Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., et al. (2014b). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, 113(1), pp. 285–304. doi: 10.1007/s00436-013-3655-1.
135. Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A., Whitten, M. M., Gonzalez, M. S. &

- Azambuja, P. (2007). Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 53(1), pp. 11–21. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.10.006.
136. Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M. et al. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5, p.32945. doi: 10.3402/jev.v5.32945.
137. Garzoni, L. R., Masuda, M. O., Capella, M. M., Lopes, A. G. & Meirelles, M. de N. S. L. de (2003). Characterization of [Ca²⁺]_i responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), pp. 487–493. doi: 10.1590/S0074-02762003000400010.
138. Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M. J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*, 115(1–2), pp. 22–27. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019.
139. de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 102(13), pp. 4336–4344. doi: 10.1182/blood-2003-03-0871.
140. Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J. C. & Schifferli, J. A. (2003). Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental Cell Research*, 285(2), pp. 243–257.
141. Giri, P. K. & Schorey, J. S. (2008). Exosomes derived from *M. Bovis*

- BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*, 3(6), p. e2461. doi: 10.1371/journal.pone.0002461.
142. Glebov, K., Löchner, M., Jabs, R., Lau, T., Merkel, O., Schloss, P. et al. (2015). Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia*. 2015; 63, pp.626-634.
143. Gonçalves, M. F., Umezawa, E. S., Katzin, A. M., de Souza, W., Alves, M. J., Zingales, B., et al. (1991). *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Experimental Parasitology*, 72(1), pp. 43–53.
144. Gonzales Perdomo, M., Romero, P. & Goldenberg, S. (1988). Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Experimental Parasitology*, 66(2), pp. 205–212. doi: 10.1016/0014-4894(88)90092-6.
145. Grellier, P., Vendeville, S., Joyeau, R., Bastos, I. M. D., Drobecq, H., Frappier, F., et al. (2001). *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 47078–47086. doi: 10.1074/jbc.M106017200.
146. Gremm, D. & Wegner, A. (2000). Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein. *European Journal of Biochemistry*, 267(14), pp. 4339–4345. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01463.x.
147. Guo, M., Ehrlicher, A. J., Mahammad, S., Fabich, H., Jensen, M. H., Moore, J. R. et al. (2013). The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic. mechanics. *Biophysical Journal*, 105(7), pp

- 1562–1568. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.037.
148. Guo, R. W., Wang, H., Gao, P., Li, M. Q., Zeng, C. Y., Yu, Y., et al. (2009). An essential role for stromal interaction molecule 1 in neointima formation following arterial injury. *Cardiovascular Research*, 81(4), pp. 660–668. doi: 10.1093/cvr/cvn338.
149. Håkansson, S., Charron, A. J. & Sibley, L. D. (2001). *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO Journal*, 20(12), pp. 3132–3144. doi: 10.1093/emboj/20.12.3132.
150. Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K. & Keski Oja, J. (2008). Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(5), pp. 1211–1218. doi: 10.1002/jcb.21923.
151. Hall, B. F., Furtado, G. C. & Joiner, K. A. (1991). 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*, 147(12), pp. 4313–4121.
152. Hall, B. S. & Pereira, M. A. (2000). Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infection and Immunity*, 68(4), pp. 2077–2081.
153. Han, S. & Rhee, W. J. (2018). Inhibition of apoptosis using exosomes in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), pp. 1331–1339. doi: 10.1002/bit.26549.

154. Han, Z. C., Takahashi, T. & Li, Z. (2019). Introduction of perinatal tissue-derived stem cells. *Perinatal Stem Cells*, pp. 1–7. doi: 10.1007/978-981-13-2703-2_1.
155. Harrington, J. M., Gartrell, A., Kieft, R., Nakayasu, E. S., Szempruch, A. J., Sykes, S. E., et al. (2016). Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell*, 164(1–2), pp. 246–257. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.051.
156. Hegmans, J. P. J. J., Bard, M. P. L., Hemmes, A., Luider, T. M., Kleijmeer, M. J., Prins, J. B., et al. (2004). Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *The American Journal of Pathology*, 164(5), pp. 1807–1815. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63739-X.
157. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94(11), pp. 3791–3799.
158. Heinisch, J., Lipke, P. N., Beaussart, A., El Kirat Chatel, S., Dupres, V., Alsteens, D., et al. (2012). Atomic force microscopy-looking at mechanosensors on the cell surface. *Journal of Cell Science*, 125, pp. 4189–4195. doi: 10.1242/jcs.106005.
159. Hiroshi Morisaki, J., Heuser, J. & Sibley, L. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science*, 108, pp. 2457–2464.
160. Hodge, R. G. & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and

- their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(8), pp. 496–510. doi: 10.1038/nrm.2016.67.
161. Hoshino, A., Costa Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A. & Tesic Mark, M. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), pp. 329–335. doi: 10.1038/nature15756.
162. Hotez, P. J., Dumonteil, E., W.Colburn, L., Serpa, J. A., Bezek, S., Edwards, M. S., et al. (2012). Chagas disease: “the new HIV/AIDS of the Americas”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), p. e1498. doi: 10.1371/journal.pntd.0001498.
163. Hu, G., Gong, A. Y., Roth, A. L., Huang, B. Q., Ward, H. D., Zhu, G., et al. (2013). Release of luminal exosomes contributes to TLR4-mediated epithelial antimicrobial defense. *PLoS Pathogens*, 9(4), p. e1003261. doi: 10.1371/journal.ppat.1003261.
164. Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C. & Freyssinet, J. M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*, 20(1), pp. 22–27. doi: 10.1152/physiol.00029.2004.
165. Imai, T., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Kato, K., Morishita, M., Yamashita, T. et al. (2015). Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), p. 26238. doi: 10.3402/jev.v4.26238.
166. Iwig, M., Czeslick, E., Müller, A., Gruner, M., Spindler, M. & Glaesser, D. (1995). Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton. *European Journal of Cell Biology*,

- 67(2), pp. 145–157.
167. Jaffe, A. B. & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), pp. 247–269. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
168. Jaiswal, R. & Sedger, L. M. (2019). Intercellular vesicular transfer by exosomes, microparticles and oncosomes - implications for cancer biology and treatments. *Frontiers in Oncology*, 9, p. 125. doi: 10.3389/fonc.2019.00125.
169. Jalili, N. & Laxminarayana, K. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics*, 14(8), pp. 907–945. doi: 10.1016/j.mechatronics.2004.04.005.
170. Janmey, P. A., Euteneuer, U. & Schliwa, M. (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *Journal of Cell Biology*, 113, pp. 155–160.
171. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, 262(19), pp. 9412–2940.
172. Kalra, H., Drummen, G. P. C. & Mathivanan, S. (2016). Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). doi: 10.3390/ijms17020170.
173. Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M. & Emr, S. D. (2003). Vps27

- recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of Cell Biology*, 162(3), pp. 413–423. doi: 10.1083/jcb.200302136.
174. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–257.
175. Kim, S. H., Bianco, N., Menon, R., Lechman, E. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E. et al. (2006). Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Molecular Therapy*, 13(2), pp. 289–300. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.09.015.
176. Klein, J. S. & Bjorkman, P. J. (2010). Few and far between: how HIV may be evading antibody avidity. *PLoS Pathogens*, 6(5), p. e1000908. doi: 10.1371/journal.ppat.1000908.
177. Kleshchenko, Y. Y., Moody, T. N., Furtak, V. A., Ochieng, J., Lima, M. F. & Villalta, F. (2004). Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infection and Immunity*, 72(11), pp. 6717–6721. doi: 10.1128/iai.72.11.6717-6721.2004.
178. Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A. & Zhdanov, R. I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8), pp. 824–833. doi: 10.1016/j.micron.2007.06.011.
179. Labovsky, V., Smulski, C. R., Gómez, K., Levy, G. & Levin, M. J. (2007). Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with

- chronic Chagas heart disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 148(3), pp. 440–449. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03381.x.
180. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
181. Lang, P., Gesbert, F., Delespine Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. & Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes *The EMBO Journal*, 15(3):510–519.
182. Lannes Vieira, J., de Araújo Jorge, T. C., de Nazaré Correia Soeiro, M., Gadelha, P. & Corrêa Oliveira, R. (2010). The centennial of the discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(6), pp. 4–7. doi: 10.1371/journal.pntd.0000645.
183. Lee, B. Y., Bacon, K. M., Botacci, M. E. & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infectious Diseases*, 13(4), pp. 241–248. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70002-1.
184. Lee, H. S. & Im, W. (2017). Effects of N-Glycan composition on structure and dynamics of IgG1 Fc and their implications for antibody engineering. *Scientific Reports*, 7, p. 12659. doi: 10.1038/s41598-017-12830-5.
185. Leve, F., Guimarães, T., Marcondes, C., Gonçalves, L., Bastos, R., Vieira Rabello, S., et al. (2011). Molecular and cellular pharmacology

- lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 671, pp. 7–17. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.09.006.
186. Lewis, M. D., Francisco, A. F., Taylor, M. C. & Kelly, J. M. (2015). A new experimental model for assessing drug efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection based on highly sensitive in vivo imaging. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), pp. 36–43. doi: 10.1177/1087057114552623.
187. Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S. & Nussenzweig, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(2), pp. 649–659.
188. Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V. & Andrews, N. W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(2), pp. 401-413.
189. Li, P., Kaslan, M., Han Lee, S., Yao, J. & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 7(3), pp. 789–804. doi: 10.7150/thno.18133.
190. Lima, L. & Möller, A. (2018). Biodistribution of cancer-derived exosomes. 1ª edición. Academic Press, pp: 175-186.
191. Livak, K. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25, 402–408. doi: oi:10.1006/meth.2001.1262.

192. Lohez, O. D., Reynaud, C., Borel, F., Andreassen, P. R. & Margolis, R. L. (2003). Arrest of mammalian fibroblasts in G1 in response to actin inhibition is dependent on retinoblastoma pocket proteins but not on p53. *The Journal of Cell Biology*, 161(1), pp. 67–77. doi: 10.1083/jcb.200208140.
193. Lorenzano Menna, P., Cardama, G., Comin, M., Alonso, D. & Gómez, D. (2010). Rho GTPasas como blancos terapéuticos relevantes en cáncer y otras enfermedades humanas. *Medicina*, 70, pp. 555–564.
194. Lovo Martins, M. I., Malvezi, A. D., Zanluqui, N. G., Lucchetti, B. F. C., Tatakihara, V. L. H., Mörking, P. A., et al. (2018). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and elicit lipid body formation and PGE2 production in murine macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9, p. 896. doi: 10.3389/fimmu.2018.00896.
195. Low, H. P., Paulin, J. J. & Keith, C. H. (1992). *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. *The Journal of Protozoology*, 39(4), pp. 463–470.
196. Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., et al. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(6), pp. 753–770. doi: 10.1007/s00281-012-0351-7.
197. MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A. & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 15(5), pp. 825–835.

198. Madan, V., Sanz, M. A. & Carrasco, L. (2005). Requirement of the vesicular system for membrane permeabilization by Sindbis virus. *Virology*, 332(1), pp. 307–315. doi: 10.1016/j.virol.2004.11.001.
199. Maeda, F. Y., Cortez, C., Izidoro, M. A., Juliano, L. & Yoshida, N. (2014). Fibronectin-degrading activity of *Trypanosoma cruzi* cysteine proteinase plays a role in host cell invasion. *Infection and Immunity*, 82(12), pp. 5166–5174. doi: 10.1128/iai.02022-14.
200. Maganto Garcia, E., Punzon, C., Terhorst, C. & Fresno, M. (2008). Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. *Traffic*, 9(8), pp. 1299–1315. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00760.x.
201. Magdesian, M. H., Tonelli, R. R., Fessel, M. R., Silveira, M. S., Schumacher, R. I., Linden, R., et al. (2007). A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Cell Research*, 313(1), pp. 210–218. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.10.008.
202. Malik, L. H., Singh, G. D. & Amsterdam, E. A. (2015). The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease. *Clinical Cardiology*, 38(9), pp. 565–569. doi: 10.1002/clc.22421.
203. Malvern Panalytical. (2018). Disponible en: <https://www.malvernpanalytical.com>
204. Maness, P. F. & Walsh, R. C. (1982). Dihydrocytochalasin B disorganizes actin cytoarchitecture and inhibits initiation of DNA

- synthesis in 3T3 cells. *Cell*, 30(1), pp. 253–262. doi: 10.1016/0092-8674(82)90031-9.
205. Mantel, P. Y., Hoang, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., et al. (2013). Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host & Microbe*, 13(5), pp. 521–534. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.009.
206. Mantel, P. Y. & Marti, M. (2015). The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, 16(3), pp. 344–354. doi: 10.1111/cmi.12259.
207. Marcilla, A., Martin Jaular, L., Trelis, M., de Menezes Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., et al. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, p. 25040. doi: 10.3402/jev.v3.25040.
208. Marroquin Quelopana, M., Oyama, S., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Juliano, M. A., Juliano, L., et al. (2004). Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein and mapping the laminin-binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(2), pp. 612–618. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.068.
209. Martin Jaular, L., Nakayasu, E. S., Ferrer, M., Almeida, I. C. & del Portillo, H. A. (2011). Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PloS One*, 6(10), p. e26588. doi: 10.1371/journal.pone.0026588.
210. Martin, S., Tesse, A., Hugel, B., Martínez, M. C., Morel, O., Freyssinet, J. M. et al. (2004). Shed membrane particles from T

- lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation*, 109(13), pp. 1653–1659. doi: 10.1161/01.cir.0000124065.31211.6E.
211. Martínez de Lizarrondo, S., Roncal, C., Calvayrac, O., Rodríguez, C., Varo, N., Purroy, A., L et al. (2012). Synergistic effect of thrombin and CD40 ligand on endothelial matrix metalloproteinase-10 expression and microparticle generation *in vitro* and *in vivo*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(6), pp. 1477–1487. doi: 10.1161/atvbaha.112.248773.
212. Martins, N. O., Souza, R. T. de, Cordero, E. M., Maldonado, D. C., Cortez, C., Marini, M. M., et al. (2015). Molecular characterization of a novel family of *Trypanosoma cruzi* surface membrane proteins (TcSMP) involved in mammalian host cell invasion. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), p. e0004216. doi: 10.1371/journal.pntd.0004216.
213. Martins, R. M., Alves, R. M., Macedo, S. & Yoshida, N. (2011). Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Cellular Microbiology*, 13(7), pp. 943–954. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01590.x.
214. Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., et al. (2004). Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *European Journal of Immunology*, 34(10), pp. 2834–2842. doi: 10.1002/eji.200424887.
215. Meissner, M., Schlüter, D. & Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion.

- Science*, 298(5594), pp. 837–840. doi: 10.1126/science.1074553.
216. Melo, M. F., Moreira, O. C., Tenório, P., Lorena, V., Lorena Rezende, I., Júnior, W. O., et al. (2015). Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasites and Vectors*, 8(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s13071-015-0770-0.
217. Meneghelli, U. G., de Godoy, R. A., Macedo, J. F., de Oliveira, R. B., Troncon, L. E. & Dantas, R. O. (1982). Basal motility of dilated and non-dilated sigmoid colon and rectum in Chagas disease. *Arquivos de Gastroenterologia*, 19(3), pp. 127–132.
218. Merten, M., Pakala, R., Thiagarajan, P. & Benedict, C. R. (1999). Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation*, 99(19), pp. 2577–2582.
219. Meyer, H. & de Oliveira, X. (1942). Observados sobre as divisões mitóticas em células parasitadas. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 14, pp. 289–291.
220. Mezouar, S., Darbousset, R., Dignat George, F., Panicot Dubois, L. & Dubois, C. (2015). Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis *in vivo*. *International Journal of Cancer*, 136(2), pp. 462–475. doi: 10.1002/ijc.28997.
221. Mikoshiba, K. (2007). IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *Journal of Neurochemistry*, 102(5), pp. 1426–

1446. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04825.x.
222. Möbius, W., Ohno Iwashita, Y., van Donselaar, E. G., Oorschot, V. M. J., Shimada, Y., Fujimoto, T., et al. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(1), pp. 43–55. doi: 10.1177/002215540205000105.
223. Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L. G., Karlsson, J. M., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), pp. 756–766. doi: 10.1182/blood-2011-02-338004.
224. Moody, T. N., Ochieng, J. & Villalta, F. (2000). Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Letters*, 470(3), pp. 305–308.
225. Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), pp. 3257–3266. doi: 10.1182/blood-2004-03-0824.
226. Mori, A., Lehmann, S., O’Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J. C., Pervan, M., et al. (2006). Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(6), pp. 3222–3229. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0087.
227. Morishita, M., Takahashi, Y., Nishikawa, M. & Takakura, Y. (2017). Pharmacokinetics of exosomes-an important factor for elucidating the biological roles of exosomes and for the development of exosome-

- based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 106(9), pp. 2265-2269. doi: 10.1016/j.xphs.2017.02.030.
228. Mortara, R. A. (1991). *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Experimental Parasitology*, 73(1), pp. 1-14.
229. Mortara, R. A., Andreoli, W. K., Fernandes, M. C. D. C., da Silva, C. V., Fernandes, A. B., L'Abbate, C., et al. (2008). Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcellular Biochemistry*, 47, pp. 101–109.
230. Mosca, W. & Cedillos, R. (1988). Autoantibodies and immunocomplexes in Chagas disease. *Acta Científica Venezolana*, 39(4), pp. 363–367.
231. Mott, A., Lenormand, G., Costales, J., Fredberg, J. J. & Barbara, A. (2010). Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cellular Physiology*, 218(2), pp. 315–322. doi: 10.1002/jcp.21606.
232. Mucci, J., Risso, M. G., Leguizamon, M. S., Frasc, A. C. C. & Campetella, O. (2006). The *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cellular Microbiology*, 8(7), pp. 1086–1095. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00689.x.
233. Mukherjee, S. & Brooks, W. H. (2014). Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(10), pp. 2307–2314. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.019.

234. Muñoz, A., Castrillo, J. L. & Carrasco, L. (1985). Modification of membrane permeability during Semliki Forest virus infection. *Virology*, 146(2), pp. 203–212.
235. Muralidharan Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavier, P., Raposo, G. et al. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current Biology*. 19(22), pp. 1875–1885. doi: 10.1016/j.cub.2009.09.059.
236. Muralidharan Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A. & D'Souza Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science*, 123(10), pp. 1603–1611. doi: 10.1242/jcs.064386.
237. Myriam, H. L., Bahamonde, M. I., García, A., Tassara, R., Urarte, E., Contreras, M. C., et al. (2005). *Trypanosoma cruzi* transplacental infection in Chile: diagnosis, treatment and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(2), pp. 46–48.
238. Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R. & Yoshiyama, H. (2013). Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *Journal of Virology*, 87(18), pp. 10334-10347. doi: 10.1128/JVI.01310-13.
239. Náquira, C. (2014). Urbanization of Chagas disease in Peru: experiences in prevention and control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2), pp. 343–347.
240. Narayanan, A., Iordanskiy, S., Das, R., Van Duyne, R., Santos, S., Jaworski, E., et al. (2013). Exosomes derived from HIV-1-infected cells

- contain trans-activation response element RNA. *The Journal of biological chemistry*, 288(27), pp. 20014–20033. doi: 10.1074/jbc.M112.438895.
241. Nde, P. N., Lima, M. F., Johnson, C. A., Pratap, S. & Villalta, F. (2012). Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. *Frontiers in Immunology*, 3, p. 337. doi: 10.3389/fimmu.2012.00337.
242. Nde, P. N., Simmons, K. J., Kleshchenko, Y. Y., Pratap, S., Lima, M. F. & Villalta, F. (2006). Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*, 74(3), pp. 1643–1638. doi: 10.1128/iai.74.3.1643-1648.2006.
243. Neira, I., Silva, F. A., Cortez, M. & Yoshida, N. (2003). Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 71(1), pp. 557–561.
244. del Nery, E., Juliano, M. A., Lima, A. P., Scharfstein, J. & Juliano, L. (1997). Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41), pp. 25713–25718.
245. Neves, R. F. C., Fernandes, A. C. S., Meyer Fernandes, J. R. & Souto Padrón, T. (2014). *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitology Research*, 113(8), pp. 2961–2972. doi: 10.1007/s00436-014-3958-x.
246. Neves Santos, F. L., Vieira de Souza, W., da Silva Barros, M.,

- Nakazawa, M., Krieger, M. A. & de Miranda Gomes, Y. (2016). Chronic Chagas disease diagnosis: a comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), pp. 1034–1039. doi: 10.4269/ajtmh.15-0820.
247. Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., et al. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 307(5707), pp. 254–258. doi: 10.1126/science.1102901.
248. van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A. & van Hinsbergh, V. W. M. (2011). Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(12). doi: 10.1161/01.atv.20.12.e127.
249. Nogueira, P. M., Ribeiro, K., O Silveira, A. C., Campos, J. H., Martins Filho, O. A., Bela, S. R., et al. (2015). Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles*, (4), p. 28734. doi: 10.3402/jev.v4.28734.
250. Nolan, S., Dixon, R., Norman, K., Hellewell, P. & Ridger, V. (2008). Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *The American Journal of Pathology*, 172(1), pp. 265–273. doi: 10.2353/ajpath.2008.070069.
251. Norris, K. A. & Schrimpf, J. E. (1994). Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 62(1), pp. 236–243.

252. Ohyama, K., Huy, N. T., Yoshimi, H., Kishikawa, N., Nishizawa, J. E., Roca, Y., et al. (2016). Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease. *Parasite Immunology*, 38(10), pp. 609–617. doi: 10.1111/pim.12341.
253. Oliveira, D. L., Freire de Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L. & Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infection and Immunity*, 78(4), pp. 1601–1609. doi: 10.1128/iai.01171-09.
254. Olmo, N., Turnay, J., de Buitrago, G. G., de Silanes, I. L., Gavilanes, J. G. & Lizarbe, M. A. (2001). Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. *European Journal of Biochemistry*, 268(7), pp. 2113–2123. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02086.x.
255. Oñaderra, M., Mancheño, J. M., Lacadena, J., de los Rios, V., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., et al. (1998). Oligomerization of the cytotoxin alpha-sarcin associated with phospholipid membranes. *Molecular Membrane Biology*, 15(3), pp. 141–144. doi: 10.3109/09687689809074525.
256. Ortega Barria, E. & Pereira, M. E. (1991). A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*, 67(2), pp. 411–421.
257. Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992). Mutagenesis of the beta2-adrenergic receptor: how structure elucidates function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32(1), pp. 167–183. doi: 10.1146/annurev.pa.32.040192.001123.

258. Osuna, A., Castanys, S., Rodriguez Cabezas, M. N. & Gamarro, F. (1990). *Trypanosoma cruzi*: calcium ion movement during internalization in host HeLa cells. *International Journal for Parasitology*, 20(5), pp. 673–676. doi: 10.1016/0020-7519(90)90126-8.
259. Osuna, A., Jiménez, A. & Lozano, J. (1979). Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Iberoamericana de Parasitología*, 39, pp. 129–133.
260. Osuna, A., Ortega, G., Gamarro, F., Castanys, S. & Mascaro, M. C. (1984). Some factors affecting the *in vitro* invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 14(3), pp. 253–257. doi: 10.1016/0020-7519(84)90076-6.
261. Osuna, A., Rodriguez Cabezas, N., Boy, M., Castanys, S. & Gamarro, F. (1993). The invasion mechanism of the metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in nonphagocytic host cells. *Biological Research*, 26(1–2), pp. 19–26.
262. Otero, M. J. & Carrasco, L. (1987). Control of membrane permeability in animal cells by divalent cations. *Experimental Cell Research*, 169(2), pp. 531–542.
263. Otero, M. J. & Carrasco, L. (1988). Exogenous phospholipase C permeabilizes mammalian cells to proteins. *Experimental Cell Research*, 177(1), pp. 154–161. doi: 10.1016/0014-4827(88)90033-X.
264. Ouaiissi, M. A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Gras Masse, H. & Tartar, A. (1986). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science*,

- 234(4776), pp. 603–607.
265. Ouerghi, O., Touhami, A., Othmane, A., Ouada, H. Ben, Martelet, C., et al. (1999). Investigating specific antigen/antibody binding with the atomic force microscope. *Biomolecular Engineering*, 19(2–6), pp. 183–188.
266. de Pablos, L. M., Díaz Lozano, I. M., Jercic, M. I., Quinzada, M., Giménez, M. J., Calabuig, E., et al. (2016). The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific Reports*, 6, p. 27293. doi: 10.1038/srep27293.
267. de Pablos, L. M., González, G. G., Solano Parada, J., Seco Hidalgo, V., Díaz Lozano, I. M., Gómez Samblás, et al. (2011). Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 79(10), pp. 3993–4001. doi: 10.1128/iai.05329-11.
268. de Pablos, L. M. & Osuna, A. (2012). Conserved regions as markers of different patterns of expression and distribution of the mucin-associated surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 80(1), pp. 169–174. doi: 10.1128/iai.05859-11.
269. de Pablos, L. M., Retana Moreira, L. & Osuna, A. (2018). Extracellular vesicles in Chagas disease: a new passenger for an old disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 1190. doi: 10.3389/fimmu.2018.00090.
270. Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J. & Wong, D. T. (2010). Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*, 5(1), p. e8577. doi:

10.1371/journal.pone.0008577.

271. Panepinto, J., Komperda, K., Frases, S., Park, Y. D., Djordjevic, J. T., Casadevall, A., et al. (2009). Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 71(5), pp. 1165–1676. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06588.x.
272. Paolillo, M. & Schinelli, S. (2017). Integrins and exosomes, a dangerous liaison in cancer progression. *Cancers*, 9(12), p. 95. doi: 10.3390/cancers9080095.
273. Pap, E., Pállinger, É., Pásztói, M. & Falus, A. (2009). Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflammation Research*, 58(1), pp. 1–8. doi: 10.1007/s00011-008-8210-7.
274. Parisse, P., Rago, I., Ulloa Severino, L., Perissinotto, F., Ambrosetti, E., Paoletti, P., et al. (2017). Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *European Biophysics Journal*, 46(8), pp. 813–820. doi: 10.1007/s00249-017-1252-4.
275. Parodi, A. J., Labriola, C. & Cazzulo, J. J. (1995). The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 69(2), pp. 247–255. doi: 10.1016/0166-6851(94)00213-7.
276. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., de Milito, A., et al. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp. 34211–34222. doi: 10.1074/jbc.M109.041152.

277. Pascual, J., Borda, E., Cossio, P., Arana, R. & Sterin Borda, L. (1986). Modification of sarcolemmal enzymes by chagasic IgG and its effect of cardiac contractility. *Biochemical Pharmacology*, 35(21), pp. 3839–3845. doi: 10.1016/0006-2952(86)90673-8.
278. Pêche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S. & Cuturi, M. C. (2003). Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*, 76(10), pp. 1503–1510. doi: 10.1097/01.TP.0000092494.75313.38.
279. Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., et al. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), pp. 6328–6333. doi: 10.1073/pnas.0914843107.
280. Peppelenbosch, M. P., Tertoolen, L. G. J., den Hertog, J. & de Laat, S. W. (1992). Epidermal growth factor activates calcium channels by phospholipase A25-lipoxygenase-mediated leukotriene C4 production. *Cell*, 69(2), pp. 295–303. doi: 10.1016/0092-8674(92)90410-E.
281. Perez, C. J., Lymbery, A. J. & Thompson, R. C. A. (2015). Reactivation of Chagas disease: implications for global health. *Trends in Parasitology*, 31(11), pp. 595–603. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.006.
282. Petray, P., Bonardello, N., Clark, R., Agranatti, M., Corral, R. & Grinstein, S. (1992). Evaluation of an ELISA technique for detection of antigens and circulating immune complexes of *Trypanosoma cruzi* by a field study in an endemic zone of Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 34(2), pp. 141–147.

283. Piccin, A., Murphy, W. G. & Smith, O. P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews*, 21(3), pp. 157–171. doi: 10.1016/j.blre.2006.09.001.
284. Pisitkun, T., Johnstone, R. & Knepper, M. A. (2006). Discovery of urinary biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(10), pp. 1760–1771. doi: 10.1074/mcp.R600004-mcp200.
285. Plazolles, N., Humbert, J. M., Vachot, L., Verrier, B., Hocke, C. & Halary, F. (2011). Pivotal advance: the promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(3), pp. 329–342. doi: 10.1189/jlb.0710386.
286. Pluskota, E., Woody, N. M., Szpak, D., Ballantyne, C. M., Soloviev, D. A., Simon, D. I., et al. (2008). Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 112(6), pp. 2327–2335. doi: 10.1182/blood-2007-12-127183.
287. Podbilewicz, B. (2014). Virus and cell fusion mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), pp. 111–139. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122422.
288. van der Pol, E., Boing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), pp. 676–705. doi: 10.1124/pr.112.005983.
289. Portela Lindoso, A. & Shikanai Yasuda, M. (2003). Chronic Chagas disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain

- reaction. *Revista de Saúde Pública*, 37(1), pp. 107–115.
290. Prata, A. (1994). Chagas disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 8(1), pp. 61–76.
291. Procópio, D. O., Barros, H. C. & Mortara, R. A. (1999). Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Cellular Biology*. 78(12), p. 911-924.
292. Queiroz, R. M. L., Ricart, C. A. O., Machado, M. O., Bastos, I. M. D., Santana, J. M. de, Sousa, M. V., et al. (2016). Insight into the exoproteome of the tissue-derived trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Chemistry*, 4, p. 42. doi: 10.3389/fchem.2016.00042.
293. Ramírez, J. C., Cura, C. I, da Cruz Moreira, O., Lages Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., et al. (2015). Analytical validation of quantitative Real-Time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *Journal of Molecular Diagnosis*, 17(5), pp. 605–615. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
294. Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., et al. (2016). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 19(4), p. e12672. doi: 10.1111/cmi.12672.
295. Ramirez, M. I., Ruiz, R. C., Araya, J. E., da Silveira, J. F. & Yoshida, N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell

- invasion. *Infection and Immunity*, 61(9), pp. 3636–3641.
296. Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.
297. Rassi, A., Rassi, A. J. & Rassi G. (2000). Acute Chagas Disease. En Brener, Z., Andrade, Z. A. & Barral Netto, M. (Eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Brasil. 2ª edición. pp.231–245.
298. Rassi, A., Rassi, A. & Marin Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), pp. 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
299. Ratto, G. M., Payne, R., Owen, W. G. & Tsien, R. Y. (1988). The concentration of cytosolic free calcium in vertebrate rod outer segments measured with fura-2. *The Journal of Neuroscience*, 8(9), pp. 3240–3246. doi: 10.1523/jneurosci.08-09-03240.1988.
300. Regev Rudzki, N., Wilson, D. W., Carvalho, T. G., Sisqueira, X., Coleman, B. M., Rug, M., et al. (2013). Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*, 153, pp. 1120–1133. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.029.
301. Retana Moreira, L., Rodríguez Serrano, F. & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi*: induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), p. e0007163. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>.

302. Ribeiro, K. S., Vasconcellos, C. I., Soares, R. P., Mendes, M. T., Ellis, C. C., Aguilera Flores, M., et al. (2018). Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), p. 1463779. doi: 10.1080/20013078.2018.1463779.
303. Riento, K. & Ridley, A. J. (2003). ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), pp. 446–456. doi: 10.1038/nrm1128.
304. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), pp. 195–208. doi: 10.1038/nri3622.
305. Roberts, D. J. (2018). Hematologic aspects of parasitic diseases. *Hematology*, pp. 2278–2303.e6. doi: 10.1016/B978-0-323-35762-3.00158-X.
306. Rodrigues Coura, J. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(I), pp. 113–122.
307. Rodrigues Coura, J. (2015). The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), pp. 277–282. doi: 10.1590/0074-0276140362.
308. Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. et al. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components

- associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), pp. 58–67. doi: 10.1128/ec.00370-07.
309. Rodríguez, A., Martínez, I., Chung, A., Berlot, C. H. & Andrews, N. W. (1999). cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(24), pp. 16754–16759. doi: 10.1074/jbc.274.24.16754.
310. Rodríguez, A., Rioult, M. G., Ora, A. & Andrews, N. W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *The Journal of Cell Biology*, 129(5), pp. 1263–1273.
311. Rodríguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A. & Andrews, N. W. (1996). Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *The Journal of Cell Biology*, 134(2), pp. 349–362.
312. Romano, P. S., Arboit, M. A., Vázquez, C. L. & Colombo, M. I. (2009). The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy*, 5(1), pp. 6–18.
313. Romano, P. S., Cueto, J. A., Casassa, A. F., Vanrell, M. C., Gottlieb, R. A. & Colombo, M. I. (2012). Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life*, 64(5), pp. 387–396. doi: 10.1002/iub.1019.
314. Rosenberg, I., Prioli, R. P., Ortega Barria, E. & Pereira, M. E. A. (1991). Stage-specific phospholipase C-mediated release of

- Trypanosoma cruzi* neuraminidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46(2), pp. 303–305. doi: 10.1016/0166-6851(91)90054-A.
315. Rosestolato, C. T. F., Dutra, J. M. F., de Souza, W. & de Carvalho, T. M. U. (2002). Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function*, 27(2), pp. 91–98. doi: 10.1247/csf.27.91.
316. Rozmyslowicz, T., Majka, M., Kijowski, J., Murphy, S. L., Conover, D. O., Poncz, M., et al. (2003). Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*, 17(1), pp. 33–42. doi: 10.1097/01.aids.0000042948.95433.3d.
317. Rubio, M. (1956). Mitosis en células parasitadas por *Trypanosoma cruzi*. Estudio en animales de laboratorio. *Biológica Santiago*, 22, pp. 51–56.
318. Rubtsova, S., Kondratov, R., Kopnin, P., Chumakov, P., Kopnin, B. & Vasiliev, J. (1998). Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Letters*, 430(3), pp. 353–357. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00692-9.
319. Sales, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa Oliveira, R., et al. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), pp. 1289–1303. doi: 10.4269/ajtmh.16-0761.

320. Salvatella, R. & Schofield, C. J. (2003). Enfermedad de Chagas. Iniciativas para su control en Latinoamérica. *Biomedicina*, 1(2), pp. 36–46.
321. San Paulo, A. & García, R. (2001). Tip-surface forces, amplitude, and energy dissipation in amplitude-modulation (tapping mode) force microscopy. *Physcal Review B*, 64(193411). doi: 10.1103/physrevb.64.193411.
322. Sanchez Moreno, M., Fernandez Becerra, M. C., Castilla Calvente, J. J. & Osuna, A. (1995). Metabolic studies by ¹H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by “*in vitro*” culture. *FEMS Microbiology Letters*, 133(1–2), pp. 119–125. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07871.x.
323. Sanderson, R. D., Bandari, S. K. & Vlodaysky, I. (2019). Proteases and glycosidases on the surface of exosomes: newly discovered mechanisms for extracellular remodeling. *Matrix Biology*, 75–76, pp. 160–169. doi: 10.1016/j.matbio.2017.10.007.
324. Santana, J. M., Grellier, P., Schrével, J. & Teixeira, A. R. (1997). A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *The Biochemical journal*, 325 (Pt 1), pp. 129–137.
325. Santos Barrias, E., Ulisses de Carvalho, T. M., de Souza, W. & Malchiodi, E. L. (2013) *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*, 4, p186. doi: 10.3389/fimmu.2013.00186.
326. dos Santos, M. A., Teixeira, F. B., Moreira, H. H. T., Rodrigues, A.

- A., Machado, F. C., Clemente, T. M., et al. (2015). A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *Scientific Reports*, 4(1), p. 4259. doi: 10.1038/srep04259.
327. Saunderson, S. C., Dunn, A. C., Crocker, P. R. & McLellan, A. D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*, 123(2), pp. 208–216. doi: 10.1182/blood-2013-03-489732.
328. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp. 20083–20090. doi: 10.1074/jbc.M301642200.
329. El Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), pp. 409–415. doi: 10.1126/science.1112631.
330. Schaefer, A. W., Kabir, N. & Forscher, P. (2002). Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *The Journal of Cell Biology*, 158(1), pp. 139–152. doi: 10.1083/jcb.200203038.
331. Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M. M., Lima, A. P., Morrot, A., et al. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(9), pp. 1289–1300.
332. Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L. & Nussenzweig, V. (1992).

- Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *The Journal of Experimental Medicine*, 175, pp. 567–575.
333. Schmunis, G. A. & Yadon, Z. E. (2007). The globalization of Chagas Disease. *ISBT Science Series*, 2(1), pp. 6-11. doi: 10.1111/j.1751-2824.2007.00052.x.
334. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), pp. 871–881. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.
335. Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P. & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), pp. 24–43. doi: 10.15252/embr.201439363.
336. Semenovitch, I., Lupi, O. & Almeida, J. P. (2017). Trypanosomiasis. *Tropical Dermatology*, pp. 31–41. doi: 10.1016/B978-0-323-29634-2.00004-3.
337. Sharma, S., Rasool, H. I., Palanisamy, V., Mathisen, C., Schmidt, M., Wong, D. T., et al. (2010). Structural-mechanical characterization of nanoparticles-exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM and force spectroscopy. *ACS Nano*, 4(4), pp. 1921–1926. doi: 10.1021/nn901824n.
338. Shaw, R. J., Henry, M., Solomon, F. & Jacks, T. (1998). RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 9(4), pp. 403–419.

339. Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T. & Rosania, G. R. (2003). Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Research*, 63(15), pp. 4331–4337.
340. Shet, A. S., Aras, O., Gupta, K., Hass, M. J., Rausch, D. J., Saba, N., et al. (2003). Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 102(7), pp. 2678–2683. doi: 10.1182/blood-2003-03-0693.
341. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), pp. 850–858. doi: 10.1021/ac950914h.
342. da Silva, C. V., Kawashita, S. Y., Probst, C. M., Dallagiovanna, B., Cruz, M. C., da Silva, E. A., et al. (2009). Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes and Infection*, 11(5), pp. 563–570. doi: 10.1016/j.micinf.2009.03.007.
343. da Silveira, J., Abrahamsohn, P. & Colli, W. (1979). Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 550(2), pp. 222–232.
344. Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., et al. (2010a). *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *Journal of Immunology*, 185(9), pp. 5011–5022. doi: 10.4049/jimmunol.1000541.

345. Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., et al. (2010b). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 6), pp. 842–852. doi: 10.1242/jcs.056465.
346. Silverman, J. M. & Reiner, N. E. (2011). Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology*, 13(1), pp. 1–9. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x.
347. Simons, M. & Raposo, G. (2009). Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), pp. 575–581. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007.
348. Sims, P. J., Faioni, E. M., Wiedmer, T. & Shattil, S. J. (1988). Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(34), pp. 18205–18212.
349. Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N. H., Kirkbride, K. C., Grega Larson, N. E., Seiki, M., et al. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *Journal of Cell Biology*, 214(2), pp. 197–213. doi: 10.1083/jcb.201601025.
350. Siqueira Batista, R., Gomes, A. P., de Almeida Oliveira, M. G., Santana, L. A., Geller, M., de Freitas Santos, R., et al. (2014). Biology of *Trypanosoma cruzi*: an update. *Infectio*, 16(1), pp. 45–58. doi: 10.1016/s0123-9392(12)70057-7.

351. Skotland, T., Sandvig, K. & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, pp. 30–41. doi: 10.1016/j.plipres.2017.03.001.
352. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), pp. 76–85.
353. Smyth, T., Kullberg, M., Malik, N., Smith Jones, P., Graner, M. W., Anchordoquy, T. J. et al. (2015). Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release*, 199, pp. 145–155. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.013
354. de Souza, W., de Carvalho, T. M. U. & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010, pp. 1–18. doi: 10.1155/2010/295394.
355. Sterin Borda, L., Fink, S., Diez, C., Cossio, P. & DeBracco, M. D. (1982). Beta-adrenergic effect of antibodies from chagasic patients and normal human lymphocytes on isolated rat atria. *Clinical and Experimental Immunology*, 50(3), pp. 534–540.
356. Sun, L., Li, D., Song, K., Wei, J., Yao, S., Li, Z., et al. (2016). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis *in vitro*. *Scientific Reports*, 7, p. 2552. doi: 10.1038/s41598-017-02786-x.
357. Sundivakkam, P. C., Freichel, M., Singh, V., Yuan, J. P., Vogel, S. M., Flockerzi, V., et al. (2012). The Ca(2+) sensor stromal interaction

- molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca(2+) entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Molecular Pharmacology*, 81(4), pp. 510–526. doi: 10.1124/mol.111.074658.
358. Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Durnin, M., Hanein, D. & Li, R. (2012). The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 197(2), pp. 239–251. doi: 10.1083/jcb.201112113.
359. Szatanek, R., Baj Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M. & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), pp. 1153–1171. doi: 10.3390/ijms18061153.
360. Takuwa, N., Zhou, W., Kumada, M. & Takuwa, Y. (1993). Ca²⁺-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(1), pp. 138–145.
361. Tan, H. & Andrews, N. W. (2002). Don't bother to knock the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*, 18(10), pp. 427–428.
362. Tanaka, Y., Horinouchi, T. & Koike, K. (2005). New insights into β -adrenoreceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(7), pp. 503–514. doi: 10.1111/j.1440-1681.2005.04222.x.
363. Tanowitz, H. B., Brosnan, C., Guastamacchio, D., Baron, G.,

- Raventos Suarez, C., Bornstein, M., et al. (1982). Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(6), pp. 1090–1097.
364. Tarleton, R. L. (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), pp. 430–434. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.003.
365. Taverna, S., Flugy, A., Saieva, L., Kohn, E. C., Santoro, A., Meraviglia, S., et al. (2012). Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 130(9), pp. 2033–2043. doi: 10.1002/ijc.26217.
366. Taylor, M. P., Koyuncu, O. O. & Enquist, L. W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), pp. 427–439. doi: 10.1038/nrmicro2574.
367. Teixeira, A., Nitz, N., Guimaro, M., Gomes, C. & Santos Buch, C. (2006). Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*, 82, pp. 788–798. doi: 10.1097/01.jaa.0000547749.92933.6a.
368. Teixeira, A. R. L., Teixeira, G., Mactdo, V. & Prata, A. (1978). Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas disease. *Journal of Clinical Investigation*, 62, pp. 1132–1141.
369. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H. & de Souza, W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), p. e1749. doi: 10.1371/journal.pntd.0001749.

370. Temme, S., Eis Hübinger, A. M., McLellan, A. D. & Koch, N. (2010). The herpes simplex virus-1 encoded glycoprotein B diverts HLA-DR into the exosome pathway. *Journal of Immunology*, 184(1), pp. 236–243. doi: 10.4049/jimmunol.0902192.
371. Teo, H., Perisic, O., González, B. & Williams, R. L. (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Developmental Cell*, 7(4), pp. 559–569. doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.003.
372. Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *Biology Reports*, 3, pp. 1–8. doi: 10.3410/B3-15.
373. Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., et al. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology*, 166(12), pp. 7309–7318.
374. Thompson, J. L. & Shuttleworth, T. J. (2011). Orai channel-dependent activation of phospholipase C- δ : a novel mechanism for the effects of calcium entry on calcium oscillations. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 21), pp. 5057–5069. doi: 10.1113/jphysiol.2011.214437.
375. Thompson, R. W., Latypov, R. F., Wang, Y., Lomakin, A., Meyer, J. A., Vunnum, S., et al. (2016). Evaluation of effects of pH and ionic strength on colloidal stability of IgG solutions by PEG-induced liquid-liquid phase separation. *The Journal of Chemical Physics*, 145(18), p. 185101. doi: 10.1063/1.4966708.

376. Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y. & Hu, F. H. (2014). Exosome Uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(32), pp. 22258-22267. doi: 10.1074/jbc.M114.588046.
377. Todeschini, A. R., Nunes, M. P., Pires, R. S., Lopes, M. F., Previato, J. O., Mendonça Previato, L., et al. (2002). Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal *trans*-sialidase: involvement of CD43 signaling. *Journal of Immunology*, 168(10), pp. 5192–5198.
378. Todorov, A. G., Andrade, D., Pesquero, J. B., Araujo, R. D. C., Bader, M., Stewart, J., et al. (2003). *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *The FASEB Journal*, 17(1), pp. 73–75. doi: 10.1096/fj.02-0477fje.
379. Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L. C., Vandekerckhove, F. & Nussenzweig, V. (1994). Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *Journal of Immunology*, 153(7), pp. 3141–3147.
380. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., et al. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), pp. 1244–1247. doi: 10.1126/science.1153124.
381. Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N. & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 645(1), pp. 63–70.

382. Trelis, M., Sotillo, J., Minguez, M. T., Valero, M. L., Bernal, D., Cortés, A., et al. (2012). Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*, 7(9), p. e45974. doi: 10.1371/journal.pone.0045974.
383. Tribulatti, M. V., Mucci, J., Van Rooijen, N., Leguizamón, M. S. & Campetella, O. (2005). The *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infection and Immunity*, 73(1), pp. 201–207. doi: 10.1128/iai.73.1.201-207.2005.
384. Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., et al. (2009). *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, 11(1), pp. 29–39. doi: 10.1016/j.micinf.2008.10.003.
385. Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., et al. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *PLoS Pathogens*, 9(7), p. e1003482. doi: 10.1371/journal.ppat.1003482.
386. Uno, K., Homma, S., Satoh, T., Nakanishi, K., Abe, D., Matsumoto, K., et al. (2007). Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 96(2), pp. 290–295. doi: 10.1038/sj.bjc.6603552.
387. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and

- microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), pp. 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
388. Valenzuela, L., Sepulveda, S. & Cabrera, G. (2013). Moléculas de adhesión involucradas en el proceso de invasión de *Trypanosoma cruzi* a células hospederas. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 72, pp. 105–117.
389. Vanwijk, M. J., Svedas, E., Boer, K., Nieuwland, R., Vanbavel, E. & Kublickiene, K. R. (2002). Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(6), pp. 1686–1693.
390. Vidal, M., Mangeat, P. & Hoekstra, D. (1997). Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 1), pp. 1867–1877.
391. Villalta, F., Smith, C. M., Burns, J. M., Chaudhuri, G. & Lima, M. F. (1996). Fab' fragments of a mAb to a member of family 2 of trans-sialidases of *Trypanosoma cruzi* block trypanosome invasion of host cells and neutralize infection by passive immunization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 797, pp. 242–245.
392. Villalta, F., Smith, C. M., Ruiz Ruano, A. & Lima, M. F. (2001). A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. *FEBS Letters*, 505(3), pp. 383–388.
393. Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E.

- & Satoskar, A. R. (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), pp. 1245–1263. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1.
394. Wang, X., Jiang, W., Kang, J., Liu, Q. & Nie, M. (2015). Knockdown of RhoA expression alters ovarian cancer biological behavior *in vitro* and in nude mice. *Oncology Reports* 34(2), pp. 891–899. doi: 10.3892/or.2015.4009.
395. Watanabe Costa, R., da Silveira, J. F. & Bahia, D. (2016). Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Frontiers in Microbiology*, 7, p. 388. doi: 10.3389/fmicb.2016.00388.
396. Weinkauff, C. & Pereiraperrin, M. (2009). *Trypanosoma cruzi* promotes neuronal and glial cell survival through the neurotrophic receptor TrkC. *Infection and Immunity*, 77(4), pp. 1368–1375. doi: 10.1128/iai.01450-08.
397. Wenn, S. W., Sceneay, J., Goncalves Lima, L., Wong, C. S. F., Becker, M., Krumeich, S. et al. (2016). The biodistribution and immune suppressive effects of breast cancer-derived exosomes. *Cancer Research*, 76(23), pp. 6816–6827.
398. Wetzel, D. M., Håkansson, S., Hu, K., Roos, D. & Sibley, L. D. (2003). Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Molecular Biology of the Cell*, 14(2), pp. 396–406. doi: 10.1091/mbc.e02-08-0458.
399. Whitehead, B., Wu, L., Hvam, M. L., Aslan, H., Dong, M., Dyrskjøt, L., et al. (2015). Tumour exosomes display differential mechanical and

- complement activation properties dependent on malignant state: implications in endothelial leakiness. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, p. 29685. doi: 10.3402/jev.v4.29685.
400. Williams, D. & Fay, F. (1990). Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium*, 11(2–3), pp. 75–83. doi: 10.1016/0143-4160(90)90061-X.
401. Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J. A. & Vader, P. (2018). Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Frontiers in Immunology*, 9, p. 738. doi: 10.3389/fimmu.2018.00738.
402. Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K. E. M., Sadik, M., et al. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 6(1), p. 22519. doi: 10.1038/srep22519.
403. Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), pp. 269–288.
404. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, 7(3), pp. 297–303. doi: 10.1038/85438.
405. Woo, J., Sharma, S. & Gimzewski, J. (2016). The role of isolation methods on a nanoscale surface structure and its effect on the size of exosomes. *Journal of Circulating Biomarkers*, 5, p. 11. doi: 10.5772/64148.

406. Woolsey, A. M. & Burleigh, B. A. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cellular Microbiology*, 6(9), pp. 829–838. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00405.x.
407. Woolsey, A. M., Sunwoo, L., Petersen, C. A., Brachmann, S. M., Cantley, L. C. & Burleigh, B. A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of Cell Science*, 116(17), pp. 3611–3622. doi: 10.1242/jcs.00666.
408. World Health Organization (WHO) (2016). WHO: weekly epidemiological record relevé épidémiologique hebdomadaire. *World Health organization Geneva*, 2004(13), pp. 169–180. doi: 10.1186/1750-9378-2-15.Voir.
409. World Health Organization (WHO) (2017). Chagas Disease. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
410. Wu, C., Asokan, S. B., Berginski, M. E., Haynes, E. M., Sharpless, N. E., Griffith, J. D., et al. (2012). Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell*, 148(5), pp. 973–987. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.034.
411. Wu, C. C., Lin, J. P., Yang, J. S., Chou, S. T., Chen, S. C., Lin, Y.T., et al. (2006). Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca²⁺ productions and caspase-3 activation. *Mutation Research*, 601(1-2), pp. 71-82.

412. Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T. M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., et al. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp. 10963–10972. doi: 10.1074/jbc.M207550200.
413. Wuhrer, M., Stam, J. C., van de Geijn, F. E., Koeleman, C. A. M., Verrips, C. T., Dolhain, R. J. E. M., et al. (2007). Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics*, 7(22), pp. 4070–4081. doi: 10.1002/pmic.200700289.
414. Wyllie, M. P. & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathogens and Disease*, 75(7). doi: 10.1093/femspd/ftx077.
415. Xiao, L., Tang, M., Li, Q. & Zhou, A. (2013). Non-invasive detection of biomechanical and biochemical responses of human lung cells to short time chemotherapy exposure using AFM and confocal Raman spectroscopy. *Analytical Methods*, 5(4), pp. 874–879. doi: 10.1039/c2ay25951f.
416. Yáñez Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, p. 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
417. Yao, Y., Chen, L., Wei, W., Deng, X., Ma, L. & Hao, S. (2013). Tumor cell-derived exosome-targeted dendritic cells stimulate stronger

- CD8⁺ CTL responses and antitumor immunities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(1), pp. 60–65. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.058.
418. Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L. & Matthews, K. R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), pp. 4414–4420.
419. Yeo, S. C. L., Xu, L., Ren, J., Boulton, V. J., Wagle, M. D., Liu, C., et al. (2003). Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 19), pp. 3957–3970. doi: 10.1242/jcs.00751.
420. Yeung, T. K., Germond, C., Chen, X. & Wang, Z. (1999). The mode of action of Taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263(2), pp. 398–404. doi: 10.1006/bbrc.1999.1375.
421. Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1), pp. 87–111. doi: 10.1590/S0001-37652006000100010.
422. Yoshida, N. (2009). Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, pp. 101–107.
423. Yoshida, N. & Cortez, M. (2008). *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcellular Biochemistry*, 47, pp. 82–91.

424. Yoshida, N., Favoreto, S., Ferreira, A. T. & Manque, P. M. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(3), pp. 269–278.
425. Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), pp. 942–946. doi: 10.1038/nature09076.
426. Yuana, Y., Oosterkamp, T. H., Bahatyrova, S., Ashcroft, B., Garcia Rodriguez, P., Bertina, R. M., et al. (2010). Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(2), pp. 315–323. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x.
427. Zanforlin, T., Bayer Santos, E., Cortez, C., Almeida, I. C., Yoshida, N. & da Silveira, J. F. (2013). Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* SAP proteins with host-cell lysosome exocytosis-inducing activity required for parasite invasion. *PLoS One*, 8(12), p. e83864. doi: 10.1371/journal.pone.0083864.
428. Zhang, H. & Lyden, D. (2019). Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nature Protocols*, 14(4), pp. 1027–1053. doi: 10.1038/s41596-019-0126-x.
429. Zhang, W., Jiang, X., Bao, J., Wang, Y., Liu, H. & Tang, L. (2018). Exosomes in pathogen infections: a bridge to deliver molecules and link functions. *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2014.00339.

430. Zulantay, I. A., Arribada C, A., Honores, P. P., Sánchez, G. P., Solari, A. I., Ortiz, S. Z., et al. (2005). La mejoría electrocardiográfica con el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, es independiente de la persistencia de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Médica de Chile*, 133, pp. 1153–1160.
431. Zulantay, I., Apt, W., Gil, L. C., Rocha, C., Mundaca, K., Solari, A., et al. (2007). The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(8), pp. 673–679. doi: 10.1179/136485907X241415.
432. Zylbersztejn, K. & Galli, T. (2011). Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS Journal*, 278(23), pp. 4497–4505. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08168.x.

8. Anexos

Anexo 1

Resultados de los análisis proteómicos realizados en muestras de VEs de las fases tripomastigote y epimastigote de *T. cruzi*.