



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



Universidad de Granada  
Instituto de Biotecnología  
Departamento de Parasitología

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de  
Sistemas

Papel inmunomodulador de las exovesículas de  
*Trypanosoma cruzi* en la enfermedad de Chagas

Memoria presentada por:  
Alexa Cecilia Prescilla Ledezma  
Lcda. En Tecnología Médica  
Para optar al título de Doctor

Director  
Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Marzo, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Alexa Prescilla Ledezma  
ISBN: 978-84-1306-870-1  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/68557>

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Parasitología Molecular del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada y ha sido financiada con una beca de Doctorado de Excelencia otorgada por la Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT) y el Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU), del Gobierno de Panamá., financiado. También recibió apoyo financiero por la Fundación Ramón Areces (Ref. RARECES2018), y el proyecto Titulado “Diálogo Intercelular e Interactoma: Implicaciones Patológicas”. Del Instituto Carlos III, Ministerio de Sanidad, Gobierno de España a través del programa ERANet con los proyectos de Investigación en Prevención de la Enfermedad Congénita de Chagas: Marcadores parasitológicos, placentarios e inmunológicos”. ELAC2014 / HID-0328” e “Investigación en prevención de la Enfermedad Congénita de Chagas: Marcadores parasitológicos, placentarios e inmunológicos” ERANet17 / HLH- 0142 (Cochaco), e “Interactoma de las exovesículas de *T. cruzi* y de los inmunocomplejos que forman con las células del hospedador; Implicaciones en la patología de la Enfermedad de Chagas ", y proyecto PGC2018-099424-B-I00 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de España.

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

- 2017. XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP). Santiago de Chile, Chile. Diciembre, 2017.

Título de la conferencia: “Expression of mucine-associated surface proteins (MASPs) specific to *Trypanosoma cruzi*.”

- XXI Annual Linz Winter Workshop “Advances in single-molecule research & nanoscience. Linz, Austria. Febrero, 2019.

Título de póster: “Visualizing the cellular uptake of extracellular vesicles (EVs) of *T. cruzi* using AFM”

Título del poster: “Nanomechanical properties of extracellular vesicles (EVs) and immune complexes of *Trypanosoma cruzi*”.

- XXI Congreso de la Sociedad Española de Parasitología celebrado en Pontevedra, España los días 3, 4 y 5 de julio de 2019.

Título del poster: “Visualizing the cellular uptake of extracellular vesicles (EVs) of *Trypanosoma cruzi* using AFM.

Título del poster: “Nanomechanical properties of extracellular vesicles (EVs) and immune complexes EVs-IgGs of *Trypanosoma cruzi*”.

- XXV Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología. Celebrado del 24-27 de noviembre 2019, Panamá.

Título del poster: “Unidades Discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* encontrada en pacientes con enfermedad de Chagas procedentes de hospitales públicos y de una comunidad endémica rural en Panamá”

Título del póster: “Vesículas extracelulares de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*: desde su aislamiento hasta la evaluación de su efecto sobre cultivo celular”

- Reunión científica: la Ciencia en la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA), celebrada el 15 de octubre de 2020. Pamplona. (Online).

Título de la conferencia: “Estudio de diferentes UDTs de *Trypanosoma cruzi* encontradas en pacientes con enfermedad de Chagas procedentes de Panamá.”

- Jornada de Colaboración Científica Virtual. “Actualización en Investigación de Enfermedades Infecciosas” del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio en la Salud, Panamá. 2 de diciembre 2020.

Título de la conferencia: “Unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* encontradas en pacientes con enfermedad de Chagas procedentes de áreas urbanas y de una comunidad rural endémica de Panamá”.

**Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en el siguiente artículo científico:**

Ledezma, Alexa Prescilla, Roberto Blandón, Alejandro G. Schijman, Alejandro Benatar, Azael Saldaña, and Antonio Osuna. 2020. “Mixed Infections by Different *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units among Chagas Disease Patients in an Endemic Community in Panama” edited by L. H. Carvalho. *PLoS ONE* 15(11 November):e0241921.

**Manuscritos en proceso de publicación:**

- Cellular uptake of extracellular vesicles (EVs) of *Trypanosoma cruzi*.

Prescilla-Ledezma, A., Retana Moreira, L. , Linares, F., Osuna, A\*.

- Molecular Recognition between exovesículas and antibodies the *Trypanosoma cruzi*: from biology to nanotechnology with AFM.

Prescilla-Ledezma A., Ortega M., Santoyo F., Linares, F\*., Osuna A\*.

- Biochemical and biophysical properties of the exosomes of the infective and non-infective forms of *T. cruzi*.

Lisette Retana Moreira, Luis Miguel de Pablos\*, Fátima Linares, Alexa Prescilla-Ledezma, Cornet-Gomez A, Ana Karina Ibarrola Vannucci1 and Antonio Osuna.



## **Agradecimientos**

En este apartado intentaré expresar mi eterno agradecimiento a todas y cada una de las personas que, de una manera u otra, han aportado un granito de arena en la consecución de este proyecto.

Agradezco en primer lugar a Dios Todopoderoso, que me ha llevado de su mano y guiado a lo largo de este camino, mostrándome su gran amor y misericordia.

Agradezco al Dr. Antonio Osuna, por brindarme la oportunidad de hacer el doctorado bajo su dirección y asesoramiento. Gracias Antonio, por transmitirme tu pasión y amor por la ciencia y la investigación. Por siempre buscar alternativas a pesar de las dificultades que se puedan presentar, por el optimismo que te caracteriza y siempre estar dispuesto a dar la milla extra en beneficio y éxito de los proyectos.

Agradezco a la Dra, Susana Vílchez por sus acertadas recomendaciones y respaldo desde el primer momento que inicie este camino científico.

Agradezco a el Dr. Luis Miguel De Pablos, por su disposición, colaboración y motivación al trabajo en equipo.

Agradezco a Dra. Mercedes Gómez Samblas, Mer, gracias por toda tu paciencia y respaldo, pero sobre todo, por nunca abandonarme en mi Odisea con las interleucinas.

Agradezco de forma muy especial a Lisssett Retana, por enseñarme a trabajar con los exosomas y a querer los parásitos.

Agradezco a Albert, tu sentido del humor marca la diferencia cada día y tu gran corazón te hace una persona maravillosa, nunca cambies Albertako.

Agradezco a mi querida compatriota y colega Gloria González. La disponibilidad y colaboración personificada. Vamos .... Gloria que si se puede.



Agradezco a Ana Karina por su gran simpatía, cordial recibimiento en mi llegada al laboratorio y su excelente don de enseñar.

Agradezco a Alberto (Nene), por compartir cada día de experimentación con energía, vitalidad y buen sentido del humor, contagiándonos a todos. ¡Hala Madrid!

Agradezco a Jennifer por su disposición a ayudar en todo momento y sus palabras de ánimo y motivación.

Agradezco a Lina María, que en su fugaz paso por el laboratorio, me ha regalado una amistad sincera, marcada por el trabajo en equipo, camaradería y buena vibra.

Agradezco a Jessica (Jesiquiña), por sus dulces palabras de ánimo que siempre llegaban en el momento justo y ayudarme en mis desaciertos informáticos.

Agradezco a dos personitas, que a pesar de su corta estancia en el laboratorio, hemos cultivado una bonita amistad hasta el día de hoy (Katalina y Lianet), gracias chicas por mantener la comunicación y constantes conversaciones de apoyo. Las quiero mucho.

Agradezco a mi hermanito hondureño, Claudio Samir, digno ejemplo de resiliencia, determinación e inspiración.

Agradezco de forma muy especial a Carlos y Encarna, por su gran labor y disposición para que el trabajo en el laboratorio se desarrolle en óptimas condiciones, por su constante interés y motivación para finalizar el doctorado.

Agradezco a todas y cada una de las personas con las que compartí en el Laboratorio Internacional, como cariñosamente le llamamos, por la convergencia de muchas nacionalidades y culturas que permitió enriquecer la mente y el corazón. (Miguel, Juancho, Romina, Noelia, los chicos de grado y master).

Agradezco al todo el personal del Centro de instrumentación Científica (CIC) que con gran profesionalidad y dedicación me enseñaron y compartieron sus conocimientos durante estos 4 años de doctorado, en especial a las Dras. Fátima Linares y Ana María Santos. Gracias chicas por sus valiosos y sensatos consejos, las caminatas a la Alhambra y las galletas de mantequilla.

Hago un paréntesis para agradecer de forma muy especial a Dios, por poner en mi camino a personas que dejan huella, que enseñan a amar la vida, a agradecer la salud y que impregnan con positividad y optimismo cada día a pesar de las dificultades. Gracias Fátima por tu amistad, eres simplemente extraordinaria.

El Traslado de Panamá a España no hubiese sido posible sin el respaldo y colaboración de todas las personas que desde que se concibió el proyecto del doctorado en Granada estuvieron, a mi lado:

Agradezco al Dr. Azael Saldaña, excelente investigador, docente y amigo quien ha respaldado y guiado mi proyecto de Chagas tanto en campo como en el laboratorio, de forma presencial y en la distancia a lo largo de estos 4 años. Gracias Azael por tu Fé, confianza y palabras de motivación, que aun en las dificultades, no pierdes el sentido de humor y me haces reír con tus peculiares correos.

Agradezco a todos mis amigos y colaboradores del departamento de Microbiología, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, en especial a la Dra. Nora de Moreno, por avalar y apoyar mi formación y a la Dra. María Mireya Muños, por su respaldo tanto como jefa del departamento, como en las giras a las Margaritas de Chepo.

Agradezco al Servicio de Cardiología del Hospital Santo Tomás, en especial al Dr. Roberto Blandón (Q. E. P. D), por su gran entusiasmo y total colaboración.

Agradezco a todo el personal del Hospital de Especialidades Pediátricas, CSS, en especial a la Lcda. Sonia Aguilar, por respaldarme en todo momento en esta aventura.

Agradezco a todo el personal de los hospitales tanto de la CSS como del MINSA que me facilitaron los tramites y exámenes con los pacientes asegurados y no asegurados.

Agradezco a todos mis amigos y familiares que a través de las diferentes vías de comunicación a lo largo de toda mi estancia en España, me han transmitido todo su cariño, respaldo y preocupación durante el doctorado, pero sobre todo en los días difíciles de pandemia.

Por último pero no menos importante agradezco a mi familia, que siempre me ha animado a perseguir mis sueños y anhelos.

Agradezco a María Elena Quezada y Carlos González, por su confianza, colaboración y respaldo en mi decisión de trasladarme a España a realizar mis estudios.

A mis hermanos Anabel y José Domingo, por su paciencia y convertirse en el arco que impulsa y dirige la flecha de mis sueños. Ana, eres la mejor hermana del mundo.

Agradezco a mis sobrinos José Domingo, Carlos Alexander y Marlenys, quienes son la inocencia, la alegría y las risas de mi casa.

Agradezco a mis ángeles en el cielo, Alexander y Papá, (Q.E.P.D)

Agradezco a mi madre, Silvia, quien es el motor, el norte y que impulsa y orienta cada uno de mis pasos. Gracias madre, por tu infinito amor, oraciones y paciencia.

Gracias Graná ...te llevo tatuada en el corazón  
copetines ... copetines...

## Resumen

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana identificada en 1909 por Carlos Chagas, es una de las 10 enfermedades más olvidadas y desatendidas que afectan a las poblaciones pobres en las Américas. Con 8 a 10 millones de personas ya infectadas y hasta 120 millones de personas en riesgo de infección, se ha extendido a Europa, Estados Unidos, Canadá y Japón. Esta parasitosis es causada por *T. cruzi*, un hemoparásito, protozoo flagelado que es transmitido por la picadura de un chinche triatomino, que en sus heces contiene el parásito, aunque existen otras diversas vías de transmisión.

Actualmente, se reconocen seis unidades de tipificación discreta (DTU), TcI a TcVI, además de TcBat. Las correlaciones entre DTU / distribución geográfica / especies hospedadoras y patogenicidad siguen generando controversias.

La infección con *T. cruzi* es una de las principales causas de enfermedad cardíaca en todo el mundo en donde se han descrito dos fases, la aguda y la crónica. La patogenia de la miocardiopatía chagásica crónica (CCC) es un tema de debate en la actualidad, pero la persistencia del parásito, los mecanismos autoinmunes, la disfunción autonómica y las alteraciones microcirculatorias se han propuesto como las principales causas fisiopatológicas de la enfermedad.

En la actualidad, en el diagnóstico, los métodos serológicos más utilizados son el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). Sin embargo, todos presentan ciertos inconvenientes con respecto a su reproducibilidad, fiabilidad, especificidad y sensibilidad que, a su vez, afectan al diagnóstico en general.

En nuestros ensayos serológicos , encontramos que los sueros de los pacientes chagásicos crónicos poseen mayor reactividad a las proteínas totales procedentes de los extractos del parásito, así como a los antígenos procedentes, de los inmunocomplejos circulantes, o de las EVs de las formas tripomastigote de *T. cruzi*, que con los antígenos de los test comerciales empleadas.

Los métodos moleculares constituyen una alternativa para el diagnóstico de la EC. Sin embargo la reproducibilidad y el rendimiento general de los métodos basados en PCR se ven significativamente afectados por las fluctuaciones en la parasitemia que caracterizan la fase crónica de la EC y por los métodos empleados para la detección.

Desde los primero estudios en 1930, se ha descrito que las manifestaciones clínicas más comunes en casos confirmados de Cardiopatía Chagastica en Panamá son arritmia cardíaca, cardiomegalia, disfunción de la conducción nerviosa, fiebre y adenitis cervical y submaxilar, con una parasitemia corta y una fase crónica benigna en comparación con la documentada en América del Sur. Algunas investigaciones sugieren que las diferentes manifestaciones clínicas entre Panamá y los países de América del Sur podrían ser el resultado de la divergencia genética geográfica entre las cepas de *T. cruzi*, o debido a diferencias en las respuestas inmunitarias humanas. En este sentido estudios científicos en Panamá han confirmado la existencia de una cepa de *T. cruzi* TcI.

En nuestro trabajo de investigación hemos encontrado que a parte de la TcI, ya descrita, existe una población mixta (Tc II, Tc V y Tc VI), que convergen en la comunidad estudiada.

Se ha descrito que durante la infección por *T. cruzi* tanto el parásito como las células hospedadoras liberan exovesículas (EVs) y que las EVs del parásito, al menos, confieren protección contra el ataque del complemento facilitando la invasión de *T. cruzi* a las células de mamíferos. Las EVs han sido asociadas a la inmunomodulación y a la supresión de las respuestas inmunitarias activas de las células T. También se ha propuesto que las proteínas del parásito secretadas en estas EVs están implicadas en la invasión de los tejidos.

En el seguimiento de la biodistribución de EVs en los diferentes órganos de ratones CD1 a lo largo del tiempo, inoculados con EVs con dos tratamientos térmicos (sin tratar térmicamente y tratadas a 80°C) y con EVs libres y unidas a IgG formando inmunocomplejos, observamos que a las 24 horas hubo aumento de la fluorescencia, en ambos grupos de ratones en diferentes órganos, pero con mayor aumento en el de EVs no tratadas térmicamente. En cuanto a los órganos donde encontramos mayor captación de fluorescencia por los tejidos fue donde existe la mayor concentración de macrófagos tisulares, primeramente el hígado, luego en el bazo y finalmente a los 4 días se observó la aparición de fluorescencia en el aparato digestivo.

Durante el inicio de la infección en la EC, el sistema inmunológico innato juega un papel importante en el control de la replicación y diseminación del parásito en los tejidos del huésped (hígado y bazo), con la participación de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 y de células inmunes como macrófagos, NK y células dendríticas que favorecen en el establecimiento de las respuestas inmune. Las citocinas producidas durante la infección por *T. cruzi* (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  TGF- $\beta$  e IL-10) son capaces de inducir o regular la producción de quimiocinas en macrófagos y potencialmente en los miocitos cardíacos infectados.

En este sentido hemos estudiado como la respuesta inmune levantada por las diferentes preparaciones, difieren tanto con el tipos de inóculo (EVs, EVs tratada térmicamente y sus respectivos inmunocomplejos) como en el órgano donde se acumulan (hígado o bazo) en relación con el tiempo. Los hallazgos de este estudio refuerzan el concepto de que un delicado equilibrio entre las citocinas reguladoras e inflamatorias representa un elemento clave en el establecimiento de las distintas formas de la EC crónica, ya sea en modelos experimentales murinos como humanos.

La evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las EVs, como el tamaño, la forma, la carga superficial, la densidad y la elasticidad, es necesaria para determinar sus interacciones biológicas. De manera que la determinación precisa de estas propiedades se ha hecho de forma rutinaria durante todo el proceso de experimentación. Cada metodología utilizada aportó información imprescindible en nuestra experimentación ya que los diversos métodos son útiles dependiendo de los objetivos trazados. La información tanto del tamaño (DLS) como el contenido (Western Blot), ha complementado los hallazgos confirmados por las técnicas microscópicas (confocal, SEM, TEM, y AFM), y los estudios mediante inmunquímica.

En consecuencia, con el fin de comprobar la adhesión de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* y las interacciones con la superficie de las células, se estudio la captación de EVs en células Vero y macrófago a través de diversas microscopias, encontrado que la célula puede utilizar varias vías de internalización, que puede ser las dependiente de clatrina, caveolina o cualquier otra dependiendo del tamaño de la EVs y el tipo de célula.





## Índice general

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes de la Enfermedad de Chagas.....	3
1.2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	5
1.3 Enfermedad de Chagas en países no endémicos .....	6
1.4 Enfermedad de Chagas en Panamá.....	10
1.5 Agente etiológico.....	14
1.5.1 El parásito.....	14
1.5.2. Etapas de <i>T. cruzi</i> .....	14
1.5.3. Ciclo de vida.....	17
1.6 Vectores de la Enfermedad de Chagas.....	19
1.7 Reservorios.....	22
1.8 Vías de transmisión de la Enfermedad de Chagas.....	23
1.9 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas	26
1.9.1. Fase Aguda.....	26
1.9.2. Fase indeterminada.....	27
1.9.3. Fase Crónica.....	28
1.9.3.1. Formas digestivas.....	30
1.10. Inmunomodulación de la respuesta inmune de <i>T. cruzi</i> en la enfermedad de Chagas.....	33
1.11. Linajes de <i>T. cruzi</i> .....	37
1.12. Diagnóstico.....	41
1.12.1. Diagnóstico Serológico.....	42
1.12.2. Diagnóstico Molecular.....	45
1.13. Tratamiento.....	47
1.14. Generalidades de la Exovesículas (EVs).....	48

1.14.1. Biogénesis de las EVs.....	51
1.14.2. Contenido de EVs (Carga).....	53
1.14.3. Aislamiento y caracterización de EVs.....	54
1.14.4. EVs en parásitos.....	57
1.14.5. EVs de <i>T. cruzi</i> .....	59
1.15. Estudio de la interacción EV-célula.....	63
<b>2. Justificación y Objetivos.....</b>	<b>69</b>
2.1. Justificación.....	71
2.1. Objetivo General.....	74
2.2. Objetivos específicos.....	75
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>77</b>
3.1. Estudio de muestras de pacientes chagásicos crónicos de Panamá.....	79
3.1.1. Consideraciones éticas para la obtención y análisis de muestras de pacientes chagásicos crónicos	79
3.1.2. Población y muestra.....	80
3.1.3. Estudio Serológico.....	81
3.1.3.1. Prueba Rápida SD Chagas Ab.....	82
3.1.3.2. ELISA Chagatest.....	84
3.1.3.3. Western blot.....	85
3.1.4. Ensayos moleculares.....	87
3.1.4.1. Extracción de ADN.....	88
3.1.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de <i>T. cruzi</i> .....	89
3.1.4.3. Genotipado de <i>T. cruzi</i> mediante ensayos de PCR para la determinación de UDTs.....	91

3.2. Cultivos de células, parásitos y aislamiento y purificación de exovesículas (EVs) de <i>T. cruzi</i> Pan 4...	93
3.2.1. Cultivo de células Vero.....	94
3.2.2. Tripsinización para subcultivos de células Vero	95
3.2.3. Sincronización del ciclo celular de células Vero	95
3.2.4. Cultivo de células RAW 264.7.....	96
3.2.5. Inactivación del suero fetal bovino (SBF) utilizado en cultivos.....	96
3.2.6. Control de contaminación de cultivos celulares por <i>Mycoplasma sp.</i> a través de ensayos de PCR... ..	97
3.2.7. Cultivo de parásitos.....	99
3.2.7.1. Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	99
3.2.7.2. Metacicloogénesis in vitro de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	99
3.2.7.3. Infección de células Vero con tripomastigotes metacíclicos de <i>T. cruzi</i> .....	100
3.2.8. Aislamiento de exovesículas (EVs) de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	101
3.2.9. Purificación de EVs de <i>T. cruzi</i> .....	102
3.3. Modelo animal.....	105
3.3.1. Obtención de lisado de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> para inmunización de animales.....	105
3.3.2. Cuantificación de la concentración de .....	
proteínas a través del kit comercial de Micro BCA™	106

3.3.3. Inmunización de animales de experimentación para la obtención de inmunosuero frente a lisado de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	107
3.3.4. Valoración de los títulos de anti <i>T. cruzi</i> y anti-EVs en sueros de ratas y ratones inmunizados mediante técnica de ELISA.....	110
3.3.5. Purificación de inmunosueros a través de columnas de afinidad para Ig G.....	112
3.3.6. Adsorción de anticuerpo primario (rata Wistar) para estudios inmunoquímicos.....	113
3.3.7. Diálisis y liofilizado de inmunosueros.....	113
3.4 Estudio de la respuesta inmune ante <i>T. cruzi</i> en sueros chagásicos crónicos de pacientes de Panamá.....	114
3.4.1. Determinación de títulos de anti <i>T. cruzi</i> en suero de pacientes chagásicos frente a lisado de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> de la cepa Pan4, a través de ensayos de ELISA.....	114
3.4.2. Aislamiento y purificación de EVs y disociación de inmunocomplejos a partir de sueros chagásicos panameños.....	115
3.4.3 Determinación de títulos de anticuerpos anti-EVs disociadas a partir sueros de pacientes chagásicos panameños mediante ELISA.....	118
3.4.4. Isotipificación de inmunoglobulinas en sueros chagásicos panameños mediante ensayos de ELISA.....	119

3.4.5. Determinación de títulos de anti-EVs de <i>T. cruzi</i> en sueros de pacientes chagásicos panameños a través de ensayos de ELISA.....	121
3.4.6. Reconocimiento de antígenos de <i>T. cruzi</i> en las EVs circulantes procedentes de pacientes chagásicos a través de Western Blot.....	121
3.4.6.1 Preparación de muestras.....	122
3.4.6.2. Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.....	122
3.4.6.3. Western Blot.....	123
3.5. Ensayos de biodistribución y localización de las EVs e inmunocomplejos (EVs- IgGs) de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> en órganos de ratón.....	127
3.5.1 Preparación de EVs e inmunocomplejos (EVs-IgGs) para ensayo de biodistribución y localización.....	127
3.5.2. Marcaje de EVs y de inmunocomplejos (EVs- IgGs) con colorante lipofílico (DiR).....	128
3.5.3. Biodistribución de EVs de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> e inmunocomplejos (EVs-IgGs) anti- <i>T. cruzi</i> mediante el sistema de análisis de imágenes IVIS en ratones CD1.....	130
3.6. Cuantificación de la expresión de interleucinas en muestras de hígado y bazo de ratones CD1 inoculados con EVs e inmunocomplejos (EVs-IgG) de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	133

3.6.1. Extracción de RNA de hígado y bazo de ratones CD1.....	133
3.6.2. Verificación de la calidad del RNA extraído de diferentes muestras de tejidos mediante electroforesis en gel desnaturalizante.....	134
3.6.3. Eliminación del DNA genómico e inactivación de la Enzima DNasa 1.....	135
3.6.4. Retrotranscripción del RNA.....	135
3.6.5. Determinación de los niveles de expresión de genes de interleucinas a través de RT-qPCR.....	136
3.7. Caracterización de EVs de <i>T. cruzi</i> . ....	139
3.7.1 Dynamic Light Scattering (DLS).....	139
3.7.2 Caracterización de EVs de <i>T. cruzi</i> a través de la detección de las proteínas cruzipaína y trans-sialidasa mediante ensayos de Western Blot.....	139
3.7.2.1. Preparación de muestras.....	140
3.7.3 Caracterización microscópica de la interacción EVs de <i>T. cruzi</i> -célula.....	141
3.7.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)..	141
3.7.3.1.1. Preparación de muestras para el estudio de la interacción célula- EVs mediante SEM.....	142
3.7.3.1.2. Inmunomarcaje.....	143
3.7.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	143

3.7.3.2.1. Preparación de muestra para el estudio de la interacción célula- EVs mediante TEM.....	144
3.7.3.2.2. Inmunomarcaje.....	145
3.7.3.2.3. Inmunomarcado con doble anticuerpo en la interacción célula-EVs.....	146
3.7.3.2.4. Preparación de muestras para tinción negativa de EVs de <i>T. cruzi</i> .....	148
3.7.3.3. Microscopia Confocal.....	149
3.7.3.3.1. Marcaje <i>in vitro</i> de EVs.....	149
3.7.3.3.2. Preparación de muestras para la interacción célula Vero-EVs mediante microscopia láser confocal.....	150
3.7.3.3.3. Preparación de cortes semifinos (Células Vero-EVs).....	153
3.7.3.3.4. Inmunomarcaje de cortes semifinos (células Vero- EVs).....	154
3.7.3.3.5. Captura de imágenes y análisis de resultados.....	155
3.7.3.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	155
3.7.3.4.1. Preparación de muestras para la internalización de EVs de <i>T. cruzi</i> Pan4 por células Vero.....	156
3.7.3.4.2. Reconocimiento Molecular.....	157
3.7.3.4.2.1. Funcionalización de puntas para AFM.....	157

3.7.3.4.2.2. Formación de Inmunocomplejo de EVs-anti- <i>trans</i> -sialidasa para análisis por AFM.....	159
3.7.3.4.2.3 Preparación de muestra de inmunocomplejo (EVs-Ig).....	160
3.7.3.4.3. Captura de imágenes y análisis de resultados.....	161
3.8 Análisis Estadístico.....	162
3.9. Medios de cultivos, tampones, soluciones y reactivos	162
<b>4. Resultados.....</b>	<b>171</b>
4.1. Caracterización de muestras de pacientes chagásicos crónicos de Panamá.....	173
4.1.1. Población y muestras.....	173
4.1.2 Características sociodemográfica de la población estudiada.....	174
4.1.3 Diagnóstico Serológico de los sueros de pacientes chagásicos panameños.....	177
4.1.3.1 Diagnóstico a través de Western Blot	177
4.1.3.2 Diagnóstico a través de ELISA...	179
4.1.3.3 Diagnóstico a través de pruebas rápidas.....	181
4.1.4 Diagnóstico Molecular.....	183
4.1.4.1. PCR Convencional.....	184
4.1.4.2. Genotipado de <i>T. cruzi</i> mediante ensayos de PCR para la determinación de unidades discretas de tipificación (UDT)....	185



4.1.5. Diagnóstico clínico.....	187
4.1.6 Evaluación de la respuesta inmune de sueros de pacientes chagásicos de Panamá a través de ensayos de ELISA con fracciones del parásito y componentes de los sueros.....	188
4.1.6.1. Determinación de títulos de anti <i>-T. cruzi</i> en suero de pacientes chagásicos frente a lisado de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> de la cepa Pan4, a través de ensayos de ELISA.....	189
4.1.6.2. Determinación de respuesta inmune en EVs de los sueros de pacientes chagásicos frente a inmunosuero anti- <i>T. cruzi</i> Pan4, obtenido en rata Wistar a través de ensayos de ELISA.....	190
4.1.6.3. Tipificación de las inmunoglobulinas en sueros de pacientes chagásicos crónicos a través de ensayos de ELISA.....	194
4.1.6.4. Determinación de respuesta inmune de los sueros de los pacientes chagásicos frente a EVs liberadas por tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> Pan4, a través de ensayos de ELISA.....	194
4.1.7. Detección de antígenos presentes en las EVs de tripomastigotes y reconocimiento de inmunoglobulinas formadoras de inmunocomplejos circulantes en sueros de pacientes chagásicos crónicos.....	196
4.2. Estudio de la biodistribución en ratones CD1 inoculados con EVs de <i>T. cruzi</i> e ICs (EVs-IgGs).....	203

4.3. Determinación de la expresión de interleucinas por PCR cuantitativa en tiempo real en órganos de ratón CD1.....	212
4.4. Caracterización de EVs de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> ... ..	227
4.4.1 Dinamic Light Scattering (DLS).....	227
4.4.2 Identificación de proteínas de <i>T. cruzi</i> a través de Western Blot.....	228
4.4.3 Caracterización de EVs de <i>T. cruzi</i> a través de microscopía (SEM, TEM y AFM).....	232
4.5 Estudio microscópicos de la interacción EVs- célula.....	236
4.5.1 Estudio de la interacción de las EVs con célula Vero, inmunolocalización de tripomastigote de <i>T. cruzi</i> y observación Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	236
4.5.2. Interacción EVs de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> Pan4 con células fagocítica a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	243
4.5.3. Inmunolocalización y estudio de la interacción de EVs-célula a través de microscopia laser confocal...	253
4.5.4. Estudio de la Interacción EV-células receptoras a través de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)....	267
4.5.5. Estudio de reconocimiento molecular a través de AFM.....	277

<b>5. Discusión.....</b>	<b>283</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>343</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>353</b>

## Lista de Abreviaturas

ABPM:	Antígeno de bajo peso molecular.
ADN:	Ácido ribonucleico
AFM:	“Atomic Force Microscope” (Microscopía de Fuerza Atómica)
ALIX:	Proteína X que interactúa con el gen 2 ligado a la apoptosis, del inglés apoptosis-linked gene 2-interacting protein X
APS:	Persulfato de amonio
ARN:	Ácido ribonucleico
ATP:	Adenosina trifosfato
Au:	Oro
BCA:	Ácido bicinconínico
BSA:	“Bovine serum albumin” (albúmina sérica bovina)
cDNA:	“Complementary DNA” (ADN complementario)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :	Diclorometano
CIBM:	Centro de Instrumentación Biomédica de la Universidad de Granada
CIC:	Centro de Instrumentación Científica.
CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono
CzP:	Cruzapaína
CP:	Cisteína proteasa
CRA:	Antígeno recombinante citoplasmático
DAB:	Diaminobencidina.
DAPI:	“4,6-diamino-2-phenylindole” (4,6-diamino-2-fenilindol)
DLS:	“Dynamic light scattering” (dispersión dinámica de luz)
DMEM:	<b>Dulbecco’s</b> Modified Eagle’s Medium

DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	“Desoxiribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DO:	Densidad óptica
DTT:	Dithiothreitol
EC:	Enfermedad de Chagas
ECG:	Electrocardiograma
EDTA:	“Ethylenediaminetetraacetic acid” (ácido etilendiaminotetraacético)
ELISA:	“Enzyme-linked immunosorbent assay” (ensayo por inmunoabsorción asociado a enzimas)
EMC:	Endocitosis mediada por clatrina.
ESCRT:	Complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte, del inglés endosomal sorting complexes required for transport.
ESE:	Endosoma de clasificación temprana, del inglés early-sorting endosome
EVs:	Vesículas extracelulares o exovesículas
FEVI:	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
FRA:	Antígeno recombinante flagelar.
GEB:	“guanidine-EDTA-blood” (sangre en EDTA con guanidina)
GFP:	Proteína fluorescente verde
GP:	Glicoproteína
GPI:	glicosilfosfatidilinositol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> Omq:	Agua ultra pura.

HAI:	ensayos de hemaglutinación indirecta
HCl:	“Hydrochloric acid” (ácido clorhídrico)
HRP:	“HorseRadish Peroxidase” (Peroxidasa de rábano picante)
IC:	Inmunocomplejo
ICC:	Insuficiencia cardiaca congénita
IFA:	Inmunofluorescencia
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
IL:	Interleucina
ILV:	Vesículas intraluminales, del inglés intraluminal vesicles
Iv:	Intravenosa
IVIS:	“In vivo imaging system” (sistema de imágenes in vivo)
KCl:	Cloruro de potasio
kDNA:	ADN de cinetoplasto.
LIT:	“Liver Infusion Tryptose” (Infusión Hígado-triptosa)
LSE:	Endosoma de clasificación tardía, del inglés late-sorting endosomes
MAPS:	Superfamilia de proteínas asociadas a mucinas
MEM:	“Minimum essential media” (medio esencial mínimo)
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro de magnesio
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad.
Micro BCA Reactivo A (MA):	Tampón alcalino de tartrato-carbonato
Micro BCA Reactivo B (MB):	Solución de ácido bicínico
Micro BCA Reactivo C (MC):	Solución de sulfato de cobre
mM:	MiliMolar.
MVS:	Cuerpo multivesicular, del inglés multivesicular bodies
NaCl:	Cloruro de sodio
NaN <sub>3</sub> :	Azida de sodio

NCM:	Modo de no contacto
NiCl:	Cloruro de Níquel
NO:	Óxido nítrico
NSF:	del inglés soluble <i>N</i> -ethylmaleimide–sensitive factor (NSF) attachment protein receptor
NTA:	“Nanoparticle tracking analysis” (análisis de rastreo de nanopartículas)
NTD:	Por sus siglas en inglés Enfermedades tropicales desatendidas.
OPD:	“o-phenylenediamine dihydrochloride” (o-fenilendiamino
OPS:	Organización Panamericana de la salud.
PA28b:	Proteína activadora del proteasoma
Pb:	Pares de bases
PBS:	Phosphate-buffered saline
PCR:	“Polymerase chain reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEG:	Polietilenglicol
PLAO:	Personas de origen Latinoamericana
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
RAW:	
RIPA:	Radioinmunoprecipitación
RLT:	Lysis buffer (Tampón de lisis)
RNA:	“Ribonucleic acid” (ácido ribonucleico)
RNasas:	Enzimas que degradan el ARN
ROI:	Region of interest (región de interés)
RPE:	Wash buffer (Tampón de lavado con etanol)
RW1:	Wash buffer 1 (Tampón de lavado)
SD:	Standard Diagnostics

SDS-PAGE: Dodecilsulfato Sódico, electroforesis en gel de poliacrilamida

SDS: “Sodium docecyl sulfate” (dodecil sulfato sódico)

SEM: Scanning electron microscopy ( Microscopía electrónica de barrido)

SFBI: Suero fetal bobino inactivado.

SL-IR (Spliced-Leader Intergenic Region).

SNARE: Receptor de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble.

SPM: Microscopía de Sonda Local o Campo Próximo

SPM: “Scanning probe microscopy” (Microscopia de sonda de barrido)

SRE: Sistema reticuloendotelial

ST: El segmento **ST** y la onda **T** reflejan la recuperación eléctrica de las células, a la **que** también llamamos repolarización en el ECG.

STM: Microscopio de Efecto Túnel

*T. cruzi*: Trypanosoma cruzi

TAE: Tris-acetato-EDTA

TAP1: Transportador asociado con presentación de antígeno

TAU: Triatomine artificial urine (Medium)

Tc1: *Trypanosoma cruzi* linaje 1

TEM: Transmission electron microscopy (Microscopía electrónica de Transmisión)

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina

TESA: Antígenos excreción- secreción de tripomastigotes

TMB: Tetrametilbencidina

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa



TR- qPCR:	“Real time quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa en tiempo real)
TSPAN:	Tetraspanina
UDT:	Unidades discretas de Tipificación
UV:	Ultravioleta
v/v:	Volumen/volumen
WR:	Solución diluyente
Mg:	Microgramos
Mg:	Microgramos
ml:	Microlitros
$\mu$ M:	Micromolar

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

---

## 1. Introducción.

### 1.1 Antecedentes de la Enfermedad de Chagas.

La Enfermedad de Chagas (EC), también conocida como tripanosomiasis americana, fue descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (Chagas and Chagas 1909).

La EC es una infección parasitaria crónica sistémica causada por *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario transmitido principalmente a través del contacto con las heces infectadas de chinchesvi triatomíneos hematófagos, que en las zonas endémicas infecta a los seres humanos y los animales (Dias, Silveira, and Schofield 2002; Moncayo 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la tripanosomiasis americana, o EC, como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas que han persistido en las sociedades más pobres y marginadas que viven principalmente en regiones tropicales y subtropicales de las Américas. (Álvarez-Hernández et al. 2018). A pesar del hecho de que han pasado más de 100 años desde el descubrimiento de la EC, la investigación realizada hasta la fecha con respecto a esta enfermedad parasitaria y especialmente los métodos de tratamiento relacionados con ella, todavía se consideran insuficientes (Kowalska, Kowalski, and Torres 2011).

Con la excepción de un grupo minoritario de investigadores que estudian *T. cruzi* y el número aún menor de médicos que podrían reconocer las complicaciones que causa, la EC es desconocida o mal entendida (Tarleton 2016). Las personas con infección por *T. cruzi* en pocas ocasiones son identificadas antes de tener una enfermedad clínica que compromete su vida, por lo que casi nunca reciben tratamiento y aunque la infección es con

frecuencia aguda y fatal, en raras ocasiones se resuelve por completo (Tarleton 2016; Tarleton et al. 2007).

La infección por *T. cruzi* y la EC están plagadas de diagnósticos deficientes, opciones de tratamiento inadecuadas y la ausencia de vacunas (Tarleton 2016; Tarleton et al. 2007). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de alternativas para el tratamiento de la enfermedad y desarrollo de fármacos para la infección (Bustamante and Tarleton 2014).

La EC representa la primera causa de lesiones cardíacas en adultos jóvenes y económicamente productivos en los países endémicos de América Latina (Moncayo and Silveira 2017).

En los siete países más australes de América, la enfermedad causa la pérdida de aproximadamente 752,000 días hábiles debido a muertes prematuras y una productividad de US \$ 1,200 millones. La carga mundial anual estimada de enfermedad es de \$ 627,46 millones en costos de atención médica y 806,170 años de vida ajustados por discapacidad ; el 10% de esta carga afecta a países no endémicos (Conteh, Engels, and Molyneux 2010; Lee et al. 2013; Pérez-Molina and Molina 2018)

Gracias a un programa multinacional coordinado en los países del Cono Sur, la transmisión de la EC por vectores y por transfusión de sangre se ha interrumpido en Uruguay en 1997, en Chile en 1999 y en Brasil en 2006, por lo que la incidencia de nuevas infecciones por *T. cruzi* en todo el continente ha disminuido en un 70% (Martinez et al. 2019; Moncayo and Silveira 2017).

## 1.2. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

En la actualidad la EC ya no se limita exclusivamente a las regiones rurales empobrecidas de América Latina, ya que se ha transformado en un problema de salud global que afecta a personas de todo el mundo, tanto en países endémicos como no endémicos, y pone a 100 millones de personas en riesgo de contraer la infección (Dopico et al. 2019).

La EC, endémica de América Latina, a menudo pasa desapercibida, pero se estima que 7 millones de personas actualmente están infectadas con una mortalidad anual de 22,000 personas en las Américas (Cordero-Montoya et al. 2019).

En 1980 se realizó una encuesta donde se estimó que 100 millones de personas, es decir, el 25% de todos los habitantes de América Latina estaban en riesgo de infección, con 17,3 millones de personas infectadas en 18 países endémicos. Según estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) realizadas en el 2005, 20% de la población de América Latina estaba en riesgo (109 millones de personas) y casi 7, 7 millones de personas estaban infectadas (Rassi, Rassi, and Marin-Neto 2010; WHO, World, and Health Organization 2002). Actualmente se calcula que en Latinoamérica hay entre 8-15 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, y se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de esta región del continente Americano con unos 41,200 nuevos casos por año (Flores-Chavez et al. 2018; Martinez et al. 2019; Organization 2015). Alrededor del 20-40% de las personas infectadas desarrollarán daño cardíaco (Martinez et al. 2019). La prevalencia de la EC varía entre países, del 1.3% en Brasil al 20.0% en Bolivia (Martinez et al. 2019).

Según la OPS, calcula que hay unas 1,124,930 mujeres entre 15 y 44 años infectadas con *T. cruzi* en América Latina, y el riesgo general de infección congénita por *T. cruzi* en niños nacidos de madres infectadas es de alrededor del 5% (Howard et al. 2014). El éxito de la transmisión materno-fetal depende principalmente de la variabilidad genética del parásito y las respuestas inmunes materno-fetales (Lidani et al. 2019).

La tasa de transmisión de la madre infectada al lactante no está determinada cuantitativamente. En los países del Cono Sur de América Latina, las tasas de transmisión congénita de *T. cruzi* varían de 1% a 12% (Carlier and Torrico 2003). Por el contrario, se sabe muy poco sobre las tasas de transmisión congénita en México, América Central y en otros países no endémicos (Carlier and Torrico 2003; Howard et al. 2014).

### **1.3. Enfermedad de Chagas en países no endémicos**

Desde finales de 1800 hasta los años 1930 y 1940, millones de personas, principalmente de Italia, Portugal y España, emigraron de Europa a América Latina. En general, alrededor de 10 millones de personas emigraron solo a Argentina y Brasil, (Schmunis and Yadon 2010). En la década de 1990, el flujo original de migración de Europa a América Latina cambió de rumbo y la gente de América Latina migró a Europa. Esta migración, se aceleró aún más después de 2000 (Schmunis and Yadon 2010; Strasen et al. 2014) (Figura 1.1). En 2005, había más de 2 millones de personas nacidas en América Latina, proveniente de los países endémicos de la EC que vivían en países de Europa occidental, (Schmunis and Yadon 2010).

Los movimientos migratorios han hecho que la EC, una enfermedad autóctona del hemisferio occidental continental, se esté convirtiendo en un problema de salud global (Schmunis and Yadon 2010).

En las últimas décadas, la EC se ha extendido a otros continentes fuera del ambiente natural debido a la migración humana, a países no endémicos como el Norte del continente (USA y Canadá), Europa, Asia y Australia (Requena-Méndez, Albajar-Viñas, Angheben, Chiodini, Gascón, Muñoz, et al. 2014).

En Europa se estima que existen entre 100,000 y 200,000 casos de EC. Los países más afectados son España con aproximadamente 68,000 casos y en menor cantidad Italia, Francia, Suiza, Suecia y Reino Unido, con un número estimado de 10 millones de personas infectadas en todo el mundo (Hotez, Woc-Colburn, and Bottazzi 2014; Izeta-Alberdi et al. 2016; Requena-Méndez, Albajar-Viñas, Angheben, Chiodini, Gascón, and Muñoz 2014; Santos et al. 2016; Tanowitz, Weiss, and Montgomery 2011).

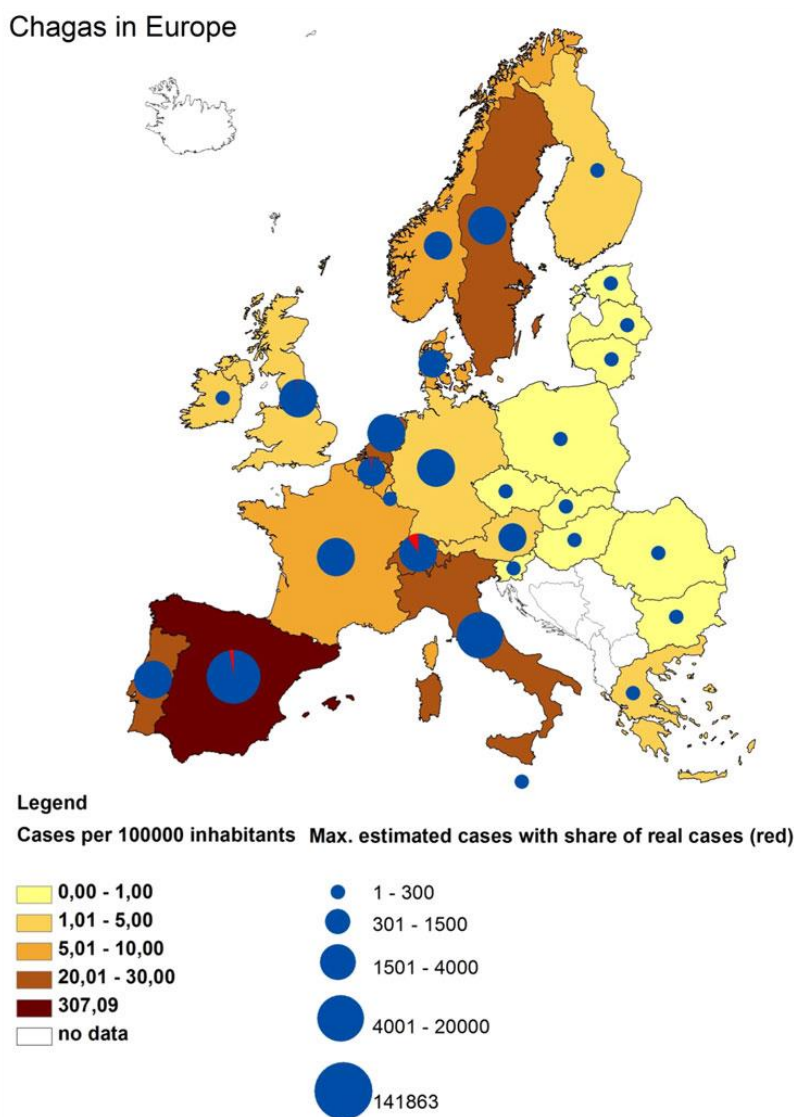


Figura 1.1.- Enfermedad de Chagas en Europa. Tomado de (Strasen et al. 2014).

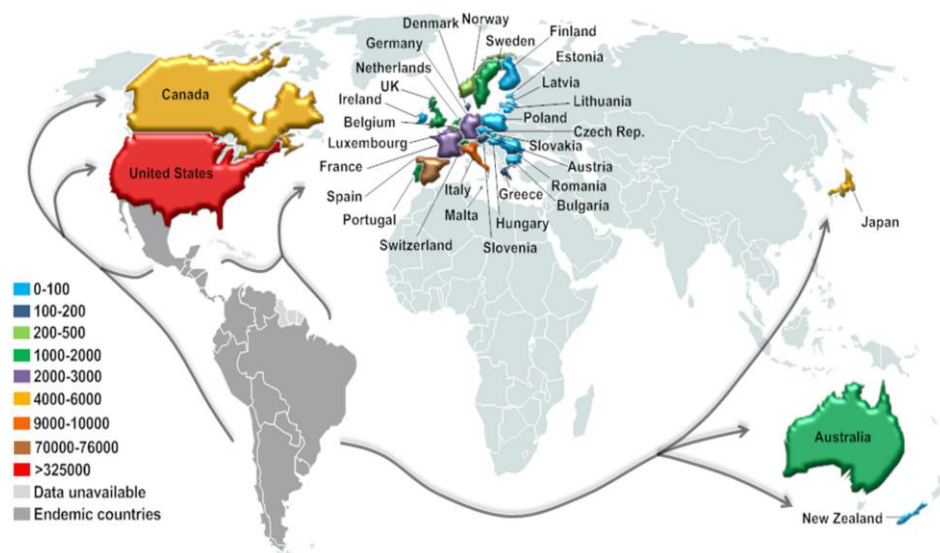
En España predominan inmigrantes de países latinoamericanos (Ecuador, Colombia, Argentina y Bolivia), Estados Unidos (México y El Salvador) y Japón (Brasil y Perú). Adaptado de (Gascon, Bern, and Pinazo 2010).



Italia es otro de los países más afectados con aproximadamente 12,000 personas infectadas. Los informes indican que hasta el 11% de las personas de origen latinoamericano (PLAO) en Italia tienen EC, con el nivel más alto (30%) entre personas de Bolivia (Repetto et al. 2015).

Según Gascon y colaboradores, Canadá y Australia, también tienen un número considerable de inmigrantes de países endémicos que totaliza 100,000 y 80,579, con un estimado de 1,789 y 1,392 casos de infección por *T. cruzi*, respectivamente (Gascon et al. 2010; Lidani et al. 2019)

Por otro lado, Japón con 371,700 latinoamericanos, con un 84% procedentes de Brasil, y un número estimado de 3.592 con infección por *T. cruzi* (Figura 1.2) (Gascon et al. 2010; Nishimura et al. 1997; Ueno et al. 1995).



**Figura 1.2.- Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Japón. Tomado de (Lidani et al. 2019).**

La EC se transmite naturalmente a través de triatominos. Dado que estos insectos no están presentes en Europa, la transmisión a través de la donación de sangre se consideran como la principal fuente de posibles infecciones en el continente (Strasen et al. 2014). Dado que la posibilidad

de que la transmisión por vectores pueda ocurrir en Europa o en otros continentes por triatomíneos autóctonos se considera remota, es sin embargo factible que el riesgo de transporte accidental de especies domésticas latinoamericanas de triatomíneos. (Schmunis and Yadon 2010; Schofield, C.J., Grijalva, M.J., Diotaiuti 2009). La EC todavía se considera una enfermedad exótica en la mayoría de los países europeos. Hasta ahora, solo España, Francia y el Reino Unido han implementado un programa de detección de donantes de sangre potenciales enfermos de la EC (Gascon et al. 2010; Strasen et al. 2014).

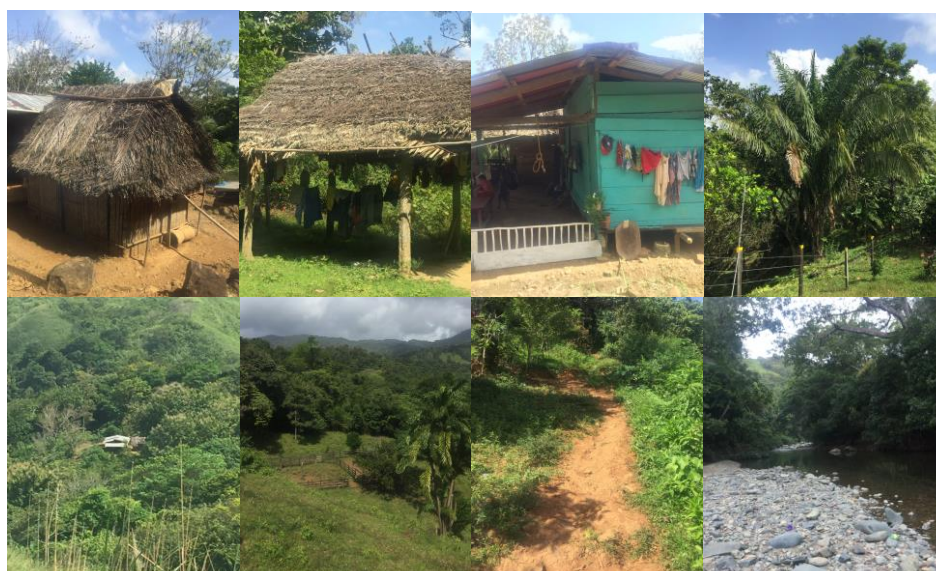
### **1.4. Enfermedad de Chagas en Panamá.**

*Rhodnius pallescens* y *Triatoma dimidiata* se consideran los principales vectores de *T. cruzi* en Panamá, pero *R. pallescens* presenta mayor eficiencia en la transmisión de la EC en ecosistemas intervenidos por el hombre, debido a un mayor grado de asociación con la palma real (*Attalea butyracea*), que se considera un buen indicador ecológico de las áreas de riesgo de EC. Por otro lado *T. dimidiata* transmite *T. cruzi* de manera eficiente bajo condiciones selváticas (Kieran et al. 2017; Rodríguez and Loaiza 2017; Romaña et al. 2003; Saldaña et al. 2018). *R. pallescens* también se considera que es el principal vector de *T. cruzi* en infecciones de humanos y animales en algunas áreas de Costa Rica y Colombia, países limítrofes con Panamá (Méndez, Sousa, and Turner 1997; Whitlaw and Chaniotis 1978). La gran biodiversidad que compone el paisaje panameño, especialmente en las riveras del canal, ofrece oportunidades a una amplia lista de hospedadores vertebrados y reservorios para *T. cruzi* en Panamá (Gottdenker et al. 2011; Rodríguez and Loaiza 2017; Sousa and Dawson 1976; Whitlaw and Chaniotis 1978).

La EC se conoce en Panamá desde 1930, cuando *T. cruzi* fue aislado por primera vez en una niña de 18 meses de edad procedente de la región de Agua Buena, Chilibre, Provincia de Panamá (Sousa and Johnson 1973). En 1965 el Dr. Octavio Sousa, realizó el primer estudio que proporcionó información acerca de la frecuencia y distribución de la tripanosomiasis en Panamá. Se estudiaron a 10,570 personas pertenecientes a nueve provincias más la región de San Blas, mediante exámenes directos y hemocultivos. En este estudio se encontró que *T. cruzi* y *T. rangeli* eran más frecuentes en las áreas rurales de Panamá Central, incluidas las provincias de Panamá, Colón y Coclé. En las áreas rurales estudiadas en la parte central de Panamá las personas que resultaron con EC positivas, en función de la metodología casos agudos, el 75% tenía menos de 16 años. Los tripanosomas sanguíneos se detectaron con mayor frecuencia en niños de 6 a 10 años de edad (Sousa and Johnson 1971). La EC, en Panamá, se describe con mayor frecuencia en áreas rurales a ambos lados del Canal, donde las condiciones ecológicas y epidemiológicas específicas para la transmisión de esta zoonosis están presentes (Garisto-Risco et al. 2009; Pineda et al. 2008; Sousa and Johnson 1973; Vasquez et al. 2004). En el 2004 se realizó un estudio descriptivo, parasitológico y de seroprevalencia en el distrito de la Chorrera, (área central de Panamá), con características ecoepidemiológicas favorables para la transmisión. Se analizaron muestras de niños de entre 3 y 14 años de edad, encontrándose una prevalencia de 2.9% de casos seropositivos para *T. cruzi* (Saldaña et al. 2005).

Posteriormente en el 2005 Saldaña y colaboradores iniciaron un estudio entomológico en 4 comunidades en Santa Fé, provincia de Veraguas, donde encontraron que los vectores predominantes fueron *T. dimidiata* y *R. Pallescens*, con tasas de infecciones mixtas para *T. cruzi* y *T. rangeli*, considerado no patógeno y con una confirmación de linaje Tc I para *T. cruzi* (Saldaña et al. 2012).

En el 2006 se identificaron nuevas áreas de riesgo en la región oriental de Panamá, con detección activa de casos en niños, específicamente en los distritos de Chepo y Chiman. Estas nueva localidades de estudio son consideradas distantes, poco pobladas, con condiciones de extrema pobreza y sobre todo con la presencia de la palmera *Attalea butyracea*, como factor de riesgo dado que constituye un lugar ideal para la reproducción de estos insectos (Figura 1.3) (Calzada et al. 2010).



**Figura 1.3.-** Ecotopos de los ambientes doméstico y selvático en la región de Chararé, Distrito de las Margaritas de Chepo. (autor: Alexa Prescilla, 2019).

Panamá es un país pequeño (con aproximadamente 75,517 kilómetros cuadrados), comparado con otros países de Centro América también endémicos, en donde existen áreas rurales remotas con condiciones ecológicas y socioeconómicas viables adecuadas para la transmisión de la EC (Saldaña et al. 2012).

En Panamá, a pesar de una prevalencia relativamente baja (1%-3%) en comparación con otros países de América del Sur, se reconoce como un problema de salud pública en varias regiones del país (Garisto-Risco et al. 2009). Según la OPS, en Panamá hay hasta el 2011, alrededor de 21,000 casos de Chagas con una seropositividad estimada de 0.01 %. (OPS 2006).

Se considera que esta parasitosis es la primera causa de miocarditis en Centroamérica y Suramérica, y la segunda causa de insuficiencia cardiaca en algunos países de esas regiones. Se postula que en Panamá sus formas clínicas muestran un curso más benigno que el observado en otros países (Sousa 1972).

En Panamá, a pesar de que no se presentan las formas graves gastrointestinales, existe regiones endémicas específicas con pacientes asintomáticos que presentan formas clínicas cardiotrópicas predominantes a los cuales se les debe dar seguimiento y tratamiento (Sousa et al. 2006).

En este contexto, un estudio realizado en Panamá a 61 pacientes con EC crónica, se encontró predominio de las formas cardíacas (conducción aberrante ventricular, bradicardia sinusal, hipertrofia ventricular izquierda, agrandamiento del corazón) en las fases agudas y crónicas, sin haberse hallado patologías gastrointestinales (Garisto-Risco et al. 2009).

Desde los primeros estudios patológicos realizados en Panamá no hay evidencia de megaesófago y megacolon (Blandon 1969).

## 1.5. Agente etiológico.

### 1.5.1. El parásito.

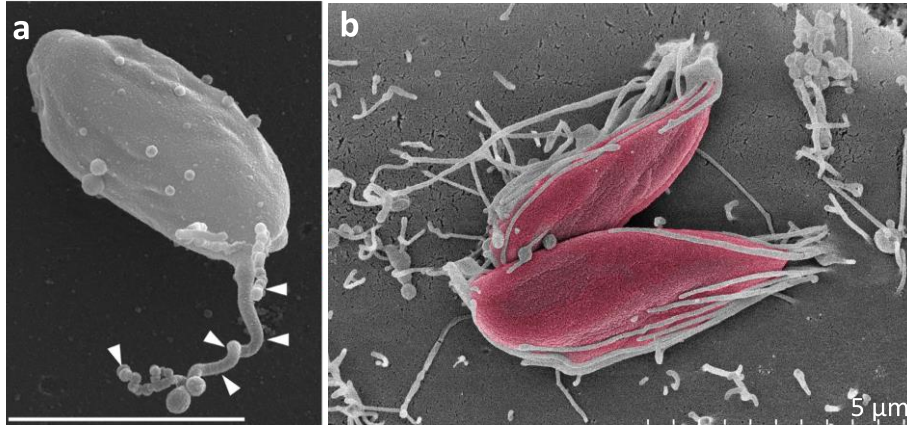
*T. cruzi* es un protozoo flagelado que se encuentra en la sangre circulante de los pacientes y de los reservorios en forma de tripomastigote, el cual se transforma en el interior de las células en la forma amastigote, estadio intracelular obligado que carece de flagelo (Jackson, Quail, and Berriman 2008).

*T. cruzi* se clasifica en el subfilo Mastigophora, orden kinetoplastida, que se caracteriza por tener ADN extranuclear en la mitocondria de la célula que se conoce como cinetoplasto. Pertenece a la familia Trypanosomatidae, dentro de la cual se adoptó el subgénero Schizotrypanum para designar a los tripanosomas que se multiplican intracelularmente en los vertebrados, el nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Fridberg, Buchanan, and Engman 2007; Jackson et al. 2008).

### 1.5.2. Etapas de *T. cruzi*.

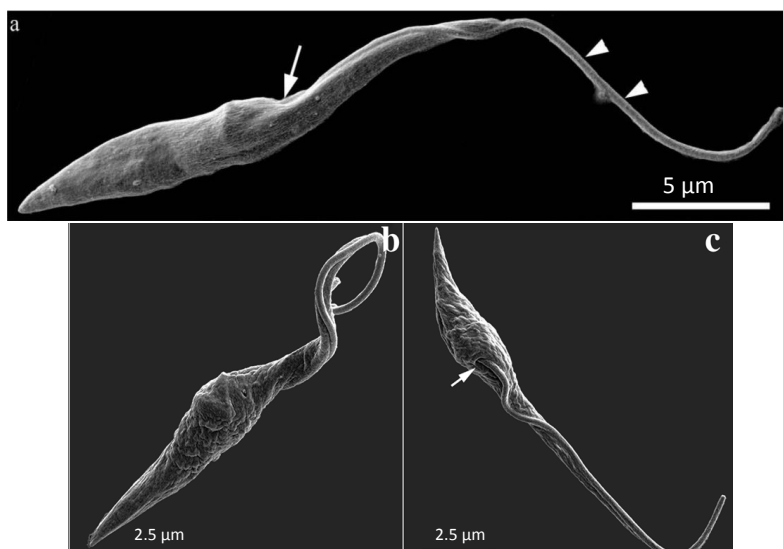
El ciclo de vida de *Trypanosoma* spp involucra muchas etapas morfológicamente distintas, más de lo que se describe para cualquier otro género en Trypanosomatidae (Hoare and Wallace 1966).

**Amastigote:** Miden entre 2-4  $\mu\text{m}$ , presentan una forma esférica u ovalada no móvil (carecen de flagelo), el Cinetoplasto se encuentra en la parte anterior cerca al núcleo y su división se da por fisión binaria. Es el estadio de localización intracelular se replica en las células del mamífero dependiendo de las diferentes cepas, formando pseudoquistes o nidos de amastigotes (Figura 1.4).



**Figura 1.4.-** (a) Amastigote extracelular de *T. cruzi* liberando microvesículas (Bonfim-Melo et al. 2018). (b) Amastigotes que interaccionan con las microvellosidades de la superficie de una célula Hela (Ferreira et al. 2012).

**Epimastigote:** Son formas de reproducción en el intestino del insecto y no infectivas. Miden entre 20-40 x 2µm, presenta una forma fusiforme o elongada, el Cinetoplasto se encuentra localizado centralmente anterior al núcleo, el flagelo surge de la mitad del parásito, que se encuentra delante del núcleo, en la membrana citoplasmática, dando la imagen de una membrana ondulante corta, liberándose por el extremo anterior. Como se ha indicado son las formas reproductivas en el tracto digestivo de los insectos vectores y en los medios de cultivos. Los epimastigotes migran al intestino posterior donde se diferencian en tripomastigotes infectivos metacíclicos, que se excretan con las heces del insecto vector (Figura 1.5) (Katzin et al. 1983).



**Figura 1.5.- (a) Epimastigotes de *T. cruzi*, durante la metacicloogénesis con flagelo que emerge de la porción anterior del cuerpo celular (flecha). (b) Epimastigote sometido a estrés nutricional durante 2 h. c Epimastigote con flagelo que emerge de la mitad del cuerpo celular (flecha). Tomado de (Gonçalves et al. 2018).**

**Tripomastigote:** Las formas tripanomastigotes existen de dos tipos: las formas metacíclicas y las sanguíneas o derivadas de células después de la infección y multiplicación. Las primeras miden entre 20-25  $\mu\text{m}$  son las formas a las que se diferencian los epimastigotes que se encuentran en la porción distal del intestino y recto del vector, tiene forma alargada, con un flagelo más largo que los epimastigotes, la membrana ondulante se observa a lo largo del cuerpo del parásito y surge libremente en el extremo posterior (Figura 1.6). Posee un núcleo grande y central, su cinetoplasto es de gran tamaño y de forma esférica, ubicada por detrás del núcleo. Se encuentra en la sangre de los mamíferos y es la principal etapa infectante. Las formas tripomastigotes son infectivas pero sin capacidad de multiplicación. Los tripomastigotes del torrente sanguíneo en el huésped mamífero, que se encuentran en la sangre del huésped vertebrado de mayor anchura de cuerpo



y de medidas variables dependiendo de la cepa que se trate (Alberto Toso, Felipe Vial, and Galanti 2011; Katzin et al. 1983).

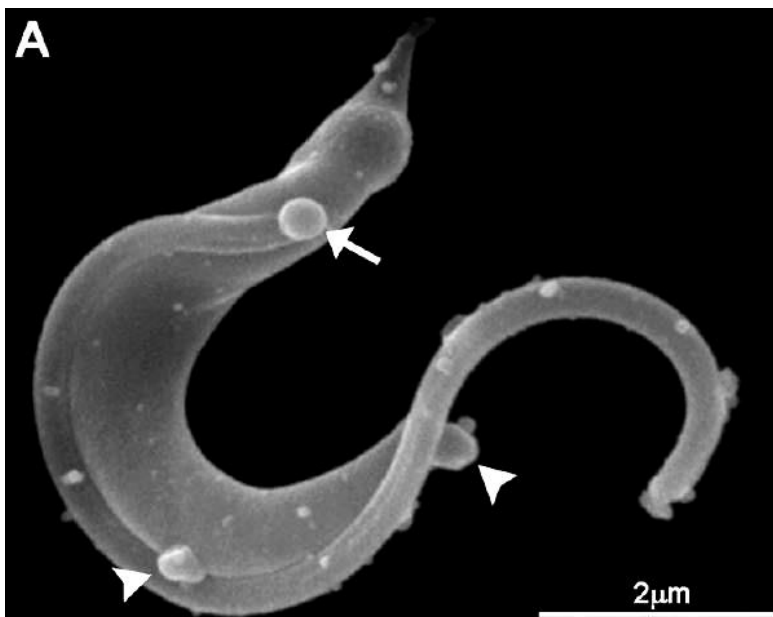


Figura 1.6.- (A) Tripomastigotes de *T. cruzi* analizados por SEM. Tomado de (Neves et al. 2014).

### 1.5.3. Ciclo de Vida.

El ciclo de vida de *T. cruzi* se inicia cuando un triatomino portador del parásito se alimenta de un mamífero, ingiere sangre y simultáneamente defeca. En las heces del insecto, se encuentran los tripomastigotes metacíclicos que penetran por el lugar de la picadura o por erosiones de la piel y son fagocitados fundamentalmente por macrófagos. En la célula hospedadora, el tripomastigote penetra hasta ser envuelto en una vacuola parasitófora, de la cual escapa alojándose en el citoplasma, en donde se diferencia en amastigote que se divide por fisión binaria. Esta forma celular inicia numerosos ciclos de división, ocupando el citoplasma de la célula hospedadora. Posteriormente los amastigotes se diferencian a tripomastigotes altamente móviles, que son liberados al torrente sanguíneo desde donde

infectan otras células. Estos tripomastigotes sanguíneos, cuando son ingeridos por triatominos, se diferencian en el intestino anterior a epimastigotes que se dividen por división binaria y migran hacia el intestino posterior del insecto (Figura 1.7). Cuando alcanzan el recto se adhieren a la pared mediante su flagelo diferenciándose en tripomastigotes metacíclicos, en un proceso conocido como metaciclogénesis. Una vez que se desprenden de la pared intestinal, son eliminados por las heces del triatominos, cerrando el ciclo de vida (Alberto Toso et al. 2011; Alves et al. 2017; Díaz and González 2014).

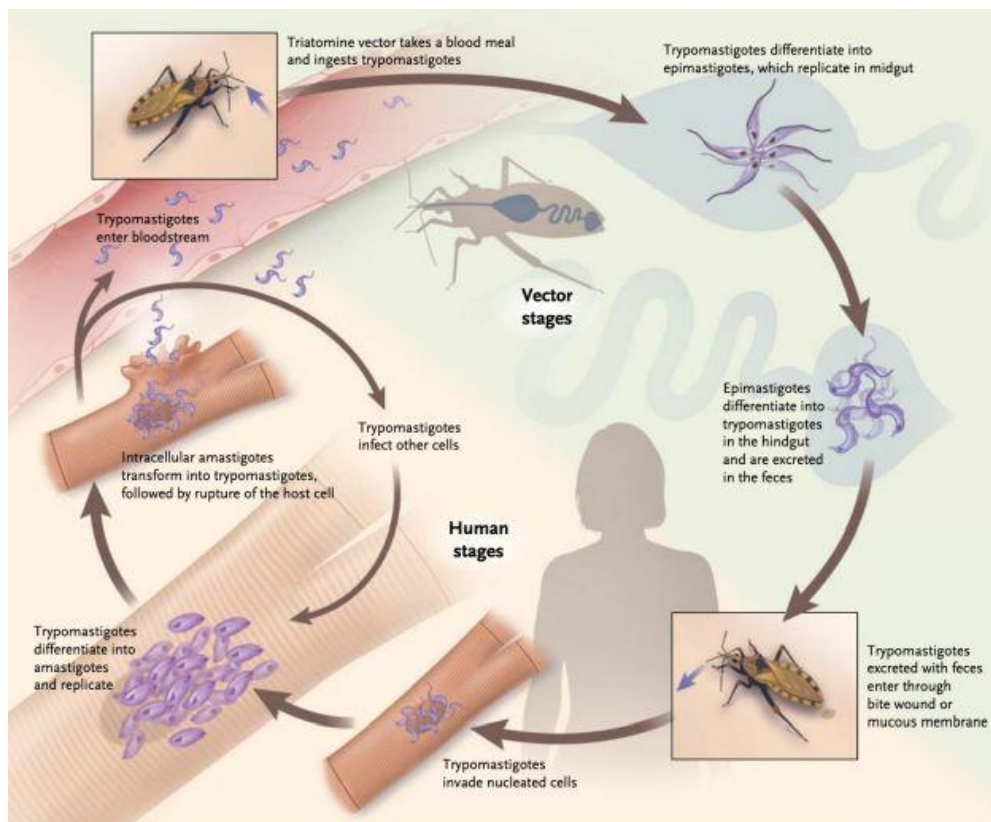


Figura N° 1.7.- Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de (Bern 2015).

## 1.6. Vectores de la Enfermedad de Chagas.

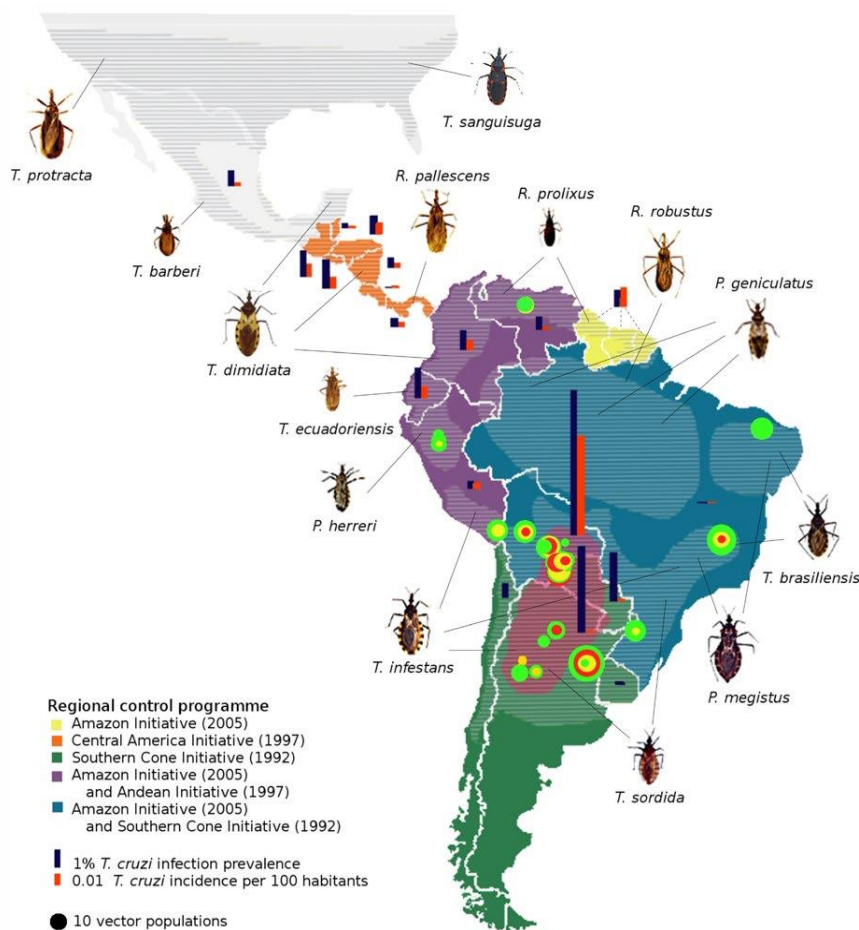
Los triatominos son insectos hematófagos que se alimentan de la sangre de vertebrados de diferentes taxones, pero ocasionalmente también pueden tomar líquidos de huéspedes invertebrados, incluidos otros insectos incluidos de su misma especie (Guarneri and Lorenzo 2017).

En el proceso de desarrollo de *T. cruzi* en triatominos y su domiciliación se han reconocido más de 140 especies de triatominos, agrupados en 19 géneros y 5 tribus. Entre estos, la gran mayoría son salvajes y están asociados con los ecotopos de mamíferos y aves; algunos se encuentran dentro de áreas peridomésticas, como gallineros, cerdos y corrales, y algunos se encuentran dentro de los hogares, lo que constituye vectores importantes para los humanos. Entre este último grupo se encuentra *Triatoma infestans* en el cono sur de América y *Rhodnius prolixus* en la Región Andina y en América Central (Coura, Viñas, and Junqueira 2014) (Catalá et al. 2004).

El grupo *pallelescens*, compuesto por *R. pallelescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*, también se denomina grupo *transandino* o *pacífico* porque su distribución geográfica está restringida básicamente a las regiones costeras de Ecuador, Colombia, Panamá y Costa Rica (Abad-Franch et al. 2009; Flores-Ferrer et al. 2018). *Rhodnius pallelescens* habita en palmeras, como *Attalea butyracea* y *Cocos nucifera*, y está ampliamente distribuido en América Central y Colombia en diferentes condiciones climáticas y zonas ecológicas (Figura 1.8) (Díaz et al. 2014; Flores-Ferrer et al. 2018; Gottdenker et al. 2011).

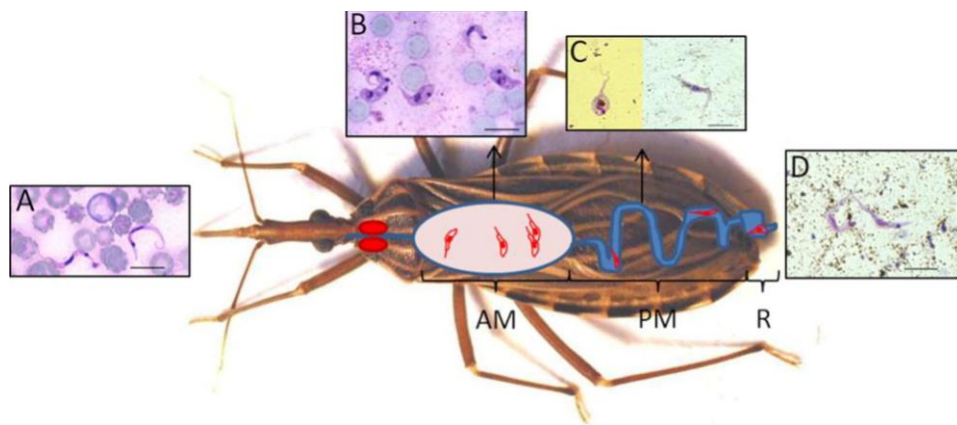
Los triatominos pueden ingerir formas tripomastigotas de *T. cruzi* cuando se alimentan de la sangre de mamíferos infectados. El desarrollo de *T. cruzi* ocurre exclusivamente en el tracto intestinal de estos insectos, la infección del insecto ocurre en dos fases distintas, la primera restringida al

intestino medio anterior, donde las poblaciones de parásitos entran en un período de regresión con una prevalencia de formas epimastigotes y una segunda fase que se desarrolla en el intestino medio posterior y la ampolla rectal, en la que los parásitos entran en un período multiplicativo en la primera porción seguido de la generación de tripomastigotes metacíclicos en el recto (Figura 1.9) (Díaz et al. 2014; Guarneri and Lorenzo 2017).



**Figura 1.8.- Distribución espacial de las principales especies de vectores triatominos (áreas sombreadas). Los países endémicos de la EC están coloreados de acuerdo a su (s) contribución (es) a los principales programas regionales de control iniciados en la década de 1990-2000. Los círculos verdes, amarillos y rojos representan poblaciones de triatominos susceptibles, resistentes y altamente resistentes a insecticidas. Tomado de (Flores-Ferrer et al. 2018).**

El sistema digestivo de los insectos está compuesto por tres porciones distintas que difieren en contenido: un intestino anterior forrado con una cutícula continua que cubre la superficie del cuerpo; un intestino medio cuyo epitelio está compuesto por células cúbicas o columnares; y un intestino posterior (recto) con un revestimiento cuticular delgado.



**Figura 1.9.- Representación esquemática del desarrollo de *Trypanosoma cruzi* dentro del triatmino. (A) Tripomastigote de sangre; (B) Tripomastigote y formas intermedias; C - Formas intermedias y epimastigotes; D - tripomastigotes metacíclicos; AM - intestino medio anterior; PM - intestino medio posterior; R - recto Tomado de (Guarneri and Lorenzo 2017).**

En los triatominos, el intestino medio se divide en dos porciones: el intestino medio anterior (estómago, AM) donde se almacena la sangre y el intestino medio posterior (PM) donde se produce la digestión (Guarneri and Lorenzo 2017).

En el estómago, la mayoría de los tripomastigotes del torrente sanguíneo ingeridos se diferencian en epimastigotes, la etapa replicativa principal, así como en algunos esferomastigotes. Después de pasar al intestino delgado y al recto, los epimastigotes se dividen repetidamente. En el intestino delgado se adhieren a las membranas perimicrovillar de las células intestinales (Garcia et al. 2007). El crecimiento de la población depende de la combinación *T. cruzi* / vectores, pero en infecciones antiguas (es decir,

aproximadamente 2 meses después de la infección) el mayor número de parásitos generalmente se encuentra en el recto. Después de la unión a la capa de cera de la cutícula rectal por interacciones hidrófobas, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos no replicativos pero infecciosos (Kollien and Schaub 2000). Los porcentajes de estos tripomastigotes en la población rectal aumentan hasta un 50% (Schaub 1989). Finalmente, todas las etapas se eliminan en las heces y la orina, pero solo los tripomastigotes pueden infectar al huésped mamífero (Garcia et al. 2010).

### **1.7. Reservorios.**

Se han descrito más de 100 reservorios salvajes de *T. cruzi* entre marsupiales, murciélagos, carnívoros, lagomorfos, roedores y primates no humanos. Entre los reservorios domésticos, es importante destacar perros, gatos, ratas domésticas, ratones y cobayas, en países donde se crían en casas. También se ha encontrado que otros animales, como los cerdos y los caprinos, están infectados. Las aves, los reptiles y los peces no se infectan porque tienen componentes en el suero "lisinas" que destruyen *T. cruzi* (Coura and Dias 2009).

En la naturaleza, *T. cruzi* mantiene ciclos silvestres, peridomésticos y domésticos. Este último se mantiene por medio de triatominos sinatropicos o domesticados que transmiten la infección de animales domésticos a humanos y también entre humanos. El ciclo salvaje es enzoótico y es mantenido por triatominos y animales salvajes, mientras que el ciclo peridoméstico se originó a partir del ciclo salvaje y mantiene la infección entre animales domésticos en áreas que rodean las viviendas humanas a través de la acción de triatominos peridomésticos, y ocasionalmente a través de intercambios

con el ciclo salvaje (perros y gatos que cazan animales salvajes, y animales salvajes, como ratas y *Didelphis*, que invaden áreas que rodean las viviendas humanas) (Figura 1.10) (Coura and Dias 2009).

*T. cruzi* comparte un doble ciclo entre vertebrados e invertebrados en el mismo huésped mamífero, *Didelphis marsupialis*, que es el reservorio silvestre más importante de este parásito.

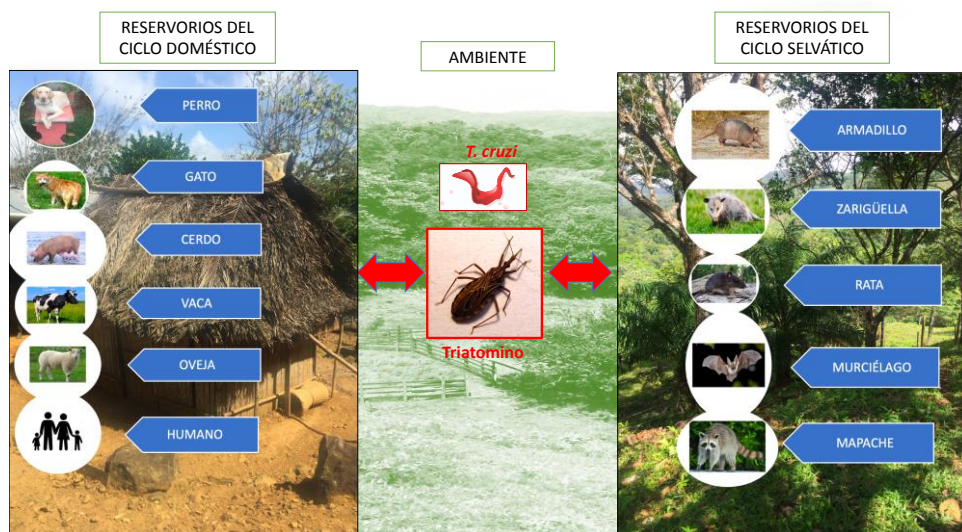


Figura 1.10.- Reservorios de *T. cruzi* del ciclo doméstico, peridoméstico y salvático (Autor: Alexa Prescilla Ledezma).

### 1.8. Vías de transmisión de la Enfermedad de Chagas.

Existen diversas vías de transmisión de *T. cruzi* adicional a la vectorial, que incluye transfusiones de sangre, trasplantes de órganos sólidos o de médula ósea, transmisión oral, accidentes de laboratorio, uso de drogas intravenosas y verticalmente de la madre al feto (Figura 1.11) (Bonney et al. 2019; Kemmerling et al. 2019). Estos mecanismos no vectoriales representan el modo primario de transmisión en países no endémicos (Flores-Chavez et al. 2018; Gascon et al. 2010; Organization 2015; Santos et

al. 2016). La Transmisión vectorial de la EC en un 70% de los casos es a los seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos y conejillos de indias) y mamíferos salvajes (roedores, marsupiales y armadillos) Aunque se han identificado más de 130 especies de triatomíneos, solo unos pocos son vectores competentes para *T. cruzi* (Galvao et al. 2003; Lent and Wygodzinsky 1979; Rassi et al. 2010).

En cuanto a la transmisión oral, Sudamérica registra el mayor número de casos de EC aguda adquirida por vía oral en los últimos 10 años. Los países que han publicado casos son Brasil, Venezuela, Argentina, Colombia, Ecuador, Bolivia y Guyana Francesa (Filigheddu, Górgolas, and Ramos 2017). Los brotes se asociaron con el consumo de alimentos y bebidas como: carne de animales silvestres infectados, verduras, extracto de caña de azúcar, pulpa de açaí, jugo de goiaba, bacaba, babaçu y vino de palma (Ferreira et al. 2001; J. et al. 2015; Pereira et al. 2009). Algunos estudios sugieren que los tripomastigotes metacíclicos son más infecciosos por contacto oral que cutánea, enfatizando la gravedad de la infección oral (Eickhoff et al. 2013). Por otro lado aproximadamente 13,835 casos de EC congénita ocurren por año en países de América Latina. La infección por *T. cruzi* adquirida de forma congénita es responsable de muchos de los casos de EC en países no endémicos (Sánchez and Ramírez 2013). Se estima que aproximadamente 1,7 millones de migrantes de países endémicos de América Latina viven en España. La comunidad boliviana, es el grupo más afectado por la EC y con mayor número de mujeres en edad fértil (Sicuri et al. 2011). La prevalencia de transmisión congénita varía del 5 al 10%. Más del 60% de los recién nacidos con infección congénita son asintomáticos o no presentan manifestaciones clínicas específicas (Bern, Martin, and Gilman 2011; Messenger and Bern 2018).



Por otro lado, la primera descripción de la transmisión de la infección por *T. cruzi* a través de transfusiones de sangre fue hecha en 1936 por Salvador Mazza en Argentina. Esto se confirmó más tarde entre 1949 y 1952 en Brasil (Gómez, Gutierrez, and Peñuela 2019).

En el 2006 la OPS realizó un estudio para medir la carga de la EC en Las Américas por las diferentes vías de transmisión, en una población de 531,432,850 personas y se encontró que el número de donantes de sangre que dieron positivo para *T. cruzi* en serología fue de 5.314.329 (Gómez et al. 2019). En América Latina, la transfusión es una importante vía de contagio, alrededor del 12 al 48% de las personas infectadas por transfusión desarrollarán la enfermedad (Schmunis 1999).

Sin embargo, la infección por trasplante de riñón se produjo por primera vez en la década de 1980. Últimamente se han notificado otros casos tras trasplantes de riñón, páncreas, hígado, corazón y médula ósea (Chocair et al. 1981).

En cuanto a los accidentes de laboratorio, la mayoría ocurren debido a la falta de personal capacitado en el manejo de muestras contaminadas, falta de protección y bioseguridad, o manejo incorrecto de equipos e instalaciones (Dias and Neto 2011a). Se han reportado algunos accidentes en laboratorios clínicos durante la manipulación de la sangre infectada de pacientes con EC, mientras que otros accidentes han ocurrido en laboratorios de investigación experimental (Dias and Neto 2011b).

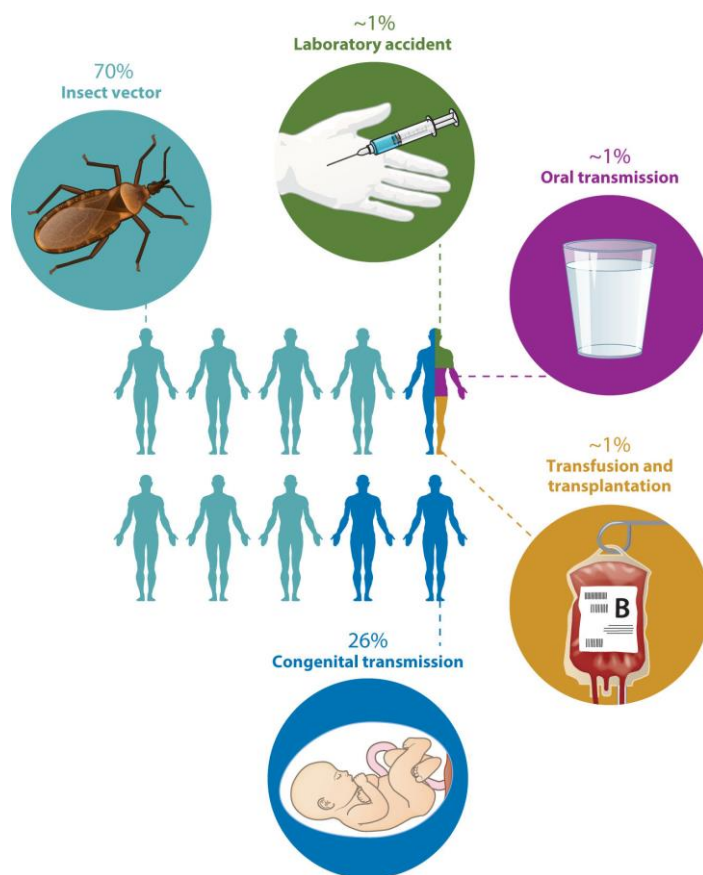


Figura 1.11.- Vías más comunes de transmisión de la Enfermedad de Chagas. Tomado de (Bonney et al. 2019).

## 1.9 Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad de Chagas.

### 1.9.1. Fase Aguda.

La mayoría de los casos de infección aguda por *T. cruzi* se atribuyen a los triatominos, el insecto vector que transmite el protozoo. Puede aparecer una lesión cutánea indurada de tipo retardado en la puerta de entrada del parásito en huéspedes inmunocompetentes, pero no en pacientes inmunodeprimidos que carecen de una respuesta inmunitaria mediada por células. La infección

aguda en este último caso pasa desapercibida por el paciente y / o por el médico en ausencia de signos y síntomas diagnósticos (Teixeira et al. 1978). La fase aguda suele ser levemente sintomática y, a menudo, se diagnostica erróneamente como una enfermedad febril de la infancia. La infección aguda grave ocurre en aproximadamente el 1% de los pacientes y se manifiesta por fiebre, escalofríos, erupción cutánea, anomalías de la función hepática, miocarditis aguda, derrame pericárdico, insuficiencia cardíaca aguda y / o meningoencefalitis. La fase aguda de la enfermedad dura aproximadamente 2 a 3 meses y evoluciona gradualmente hacia la etapa indeterminada de enfermedad crónica (Tanowitz et al. 2015).

### **1.9.2. Fase indeterminada.**

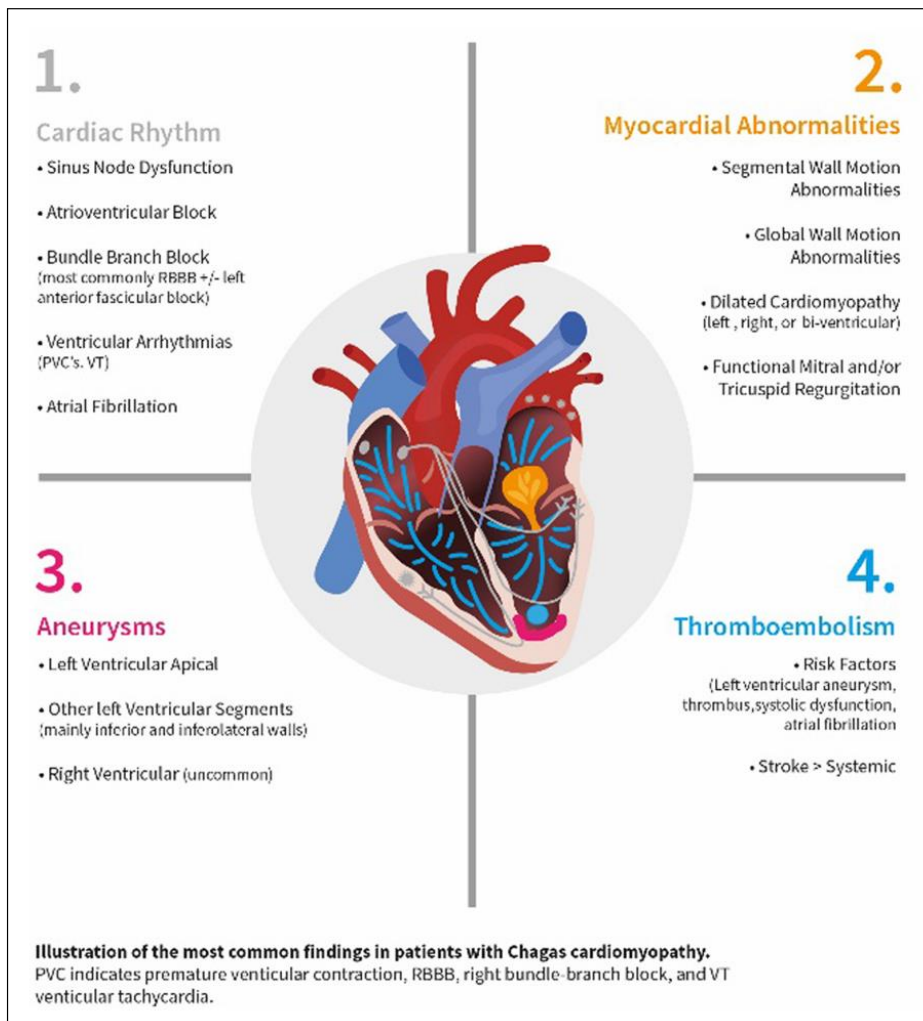
El individuo infectado crónicamente sigue siendo una fuente de por vida del parásito como reservorio de fase indeterminada. Aproximadamente el 70 % de las personas infectadas por *T. cruzi* llevan una vida normal sin desarrollar secuelas adversas de la infección y un tercio de todas las personas con infecciones indeterminadas desarrollarán la EC crónica (Figura 1.12) (Bonney et al. 2019). La fase indeterminada de la infección se ha definido con base en los criterios de (i) prueba positiva de anticuerpos IgG específicos y / o demostración parasitológica; (ii) ausencia de síntomas y signos de la EC; (iii) ausencia de anomalías en el ECG; (iv) tamaño regular del corazón, el esófago y el colon por radiografía. Usando estos criterios, independientemente del área geográfica donde se hayan realizado los estudios de campo, se ha estimado que dos tercios de los individuos infectados con *T. cruzi* permanecerán en esta condición durante sus vidas económicamente productivas. Por tanto, la mayoría de los pacientes con infecciones indeterminadas tienen entre 20 y 50 años de edad (Macêdo 1999).

### 1.9.3. Fase Crónica.

Décadas después de la infección primaria, entre el 20% y el 40% de los seres humanos infectados con *T. cruzi* desarrollarán afectación orgánica detectable, como miocardiopatía (20% -30%) o manifestaciones gastrointestinales (15% -20%) o ambas (10 %) (Prata 2001).

Los pacientes pueden sufrir muerte cardíaca súbita, fenómenos tromboembólicos, síncope e insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Los signos y síntomas de afectación cardíaca incluyen principalmente alteraciones eléctricas y mecánicas; bradicardia sinusal, arritmias auriculares y ventriculares; trastornos de la conducción auriculoventricular e intraventricular, como bloqueo de rama derecha y / o bloqueo fascicular anterior izquierdo (Rojas et al. 2018); y cambios ST-T. Las imágenes cardíacas muestran anomalías regionales en el movimiento de la pared, aneurismas apicales, trombos murales con potencial embólico y miocardiopatía dilatada con FEVI reducida (Figura 1.12) (Echeverría et al. 2020; Nunes et al. 2018).

Las principales manifestaciones potencialmente mortales de la enfermedad cardíaca crónica son la insuficiencia cardíaca, arritmias y tromboembolismo. Las anomalías del ECG son acumulativas con el tiempo y se vuelven más frecuentes a partir de los 20 años posteriores a la infección aguda.



**Figura 1.12.- Ilustración de los hallazgos más frecuentes en pacientes con miocardiopatía chagásica. Tomado de (Nunes et al. 2018).**

El tiempo promedio desde la infección aguda y el desarrollo de lesiones crónicas graves de Chagas se ha estimado en  $28 \pm 7$  años (Prata 2001). Sin embargo, la miocardiopatía de Chagas progresa rápidamente hacia la muerte no más de 5 años después de los signos de insuficiencia cardíaca. Un hallazgo común en la muerte por insuficiencia cardíaca es el infarto cerebral

como consecuencia de un trombo desprendido del ventrículo izquierdo (Teixeira, Nascimento, and Sturm 2006).

### **1.9.3.1. Formas digestivas.**

Los trastornos gastrointestinales se encuentran entre las manifestaciones clínicas más comunes de la EC crónica. La afectación digestiva, caracterizada por la presencia de megacolon o megaesófago, ocurre en aproximadamente 10% de los casos, pero su prevalencia parece variar según el origen geográfico de los pacientes y la cepa del parásito (Pérez-Ayala et al. 2011).

Los pacientes con enfermedad digestiva pueden quejarse de dificultad para tragar y regurgitación de alimentos, síntomas clínicos relacionados con megaesófagos. Alternativamente, algunos se quejan de estreñimiento debido a un bolo fecal en la ampolla rectal como resultado del megacolon. El megaesófago y el megacolon se ven con frecuencia en áreas endémicas. Estas condiciones “mega” pueden afectar a pacientes de forma individual e independiente, en asociación entre sí o en asociación con enfermedades cardíacas. El megaesófago puede manifestarse clínicamente en los chagásicos desde los 2 años o en cualquier momento de la vida, aunque la mayoría de los casos se observan en hombres de entre 20 y 40 años (Figura 1.13). La enfermedad se manifiesta por disfagia, pirosis, hipo, regurgitación de alimentos y aumento de la salivación. Este cuadro clínico asocia megaesófago chagásico y caquexis resultante de la dificultad para comer (Teixeira et al. 2006).

El megacolon se ve considerablemente más tarde en el curso de la EC en comparación con el megaesófago. El síntoma principal del megacolon chagásico es el estreñimiento. La retención progresiva de bolo endurecido

conduce a la dilatación y engrosamiento de las paredes del colon, por lo general comprometiendo el colon sigmoide y el recto. La dificultad para pasar el bolo conduce a la dilatación de los intestinos restantes, al aumento de las deposiciones, al dolor y al sufrimiento físico constante (Teixeira et al. 2006).

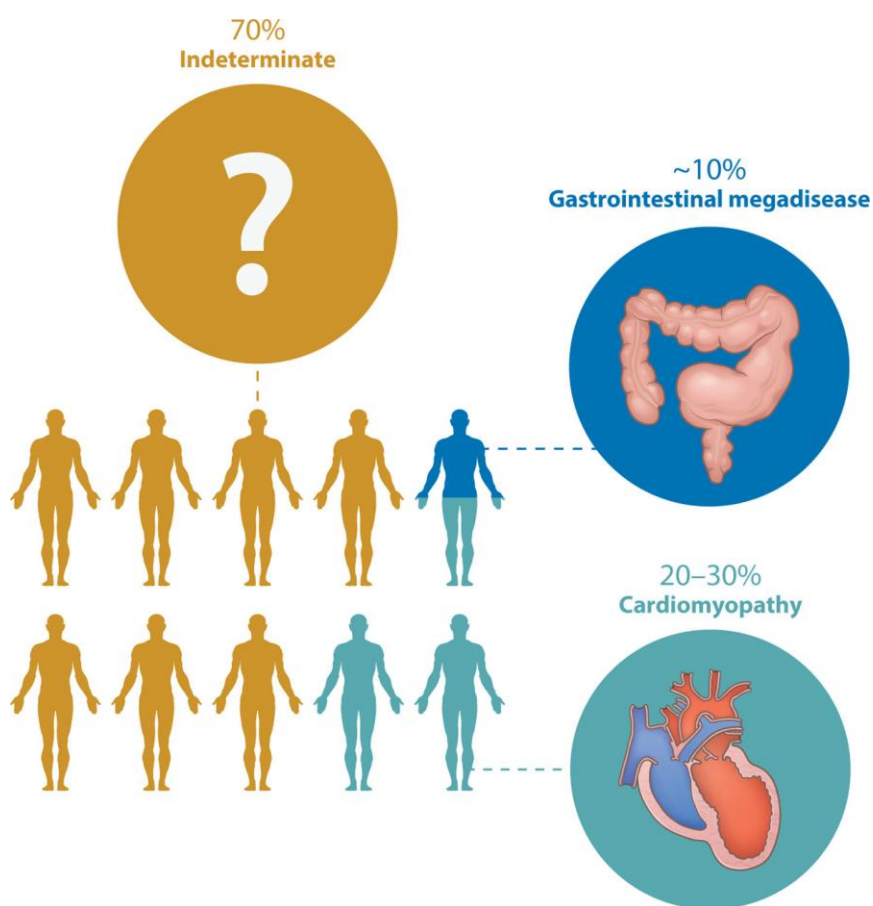
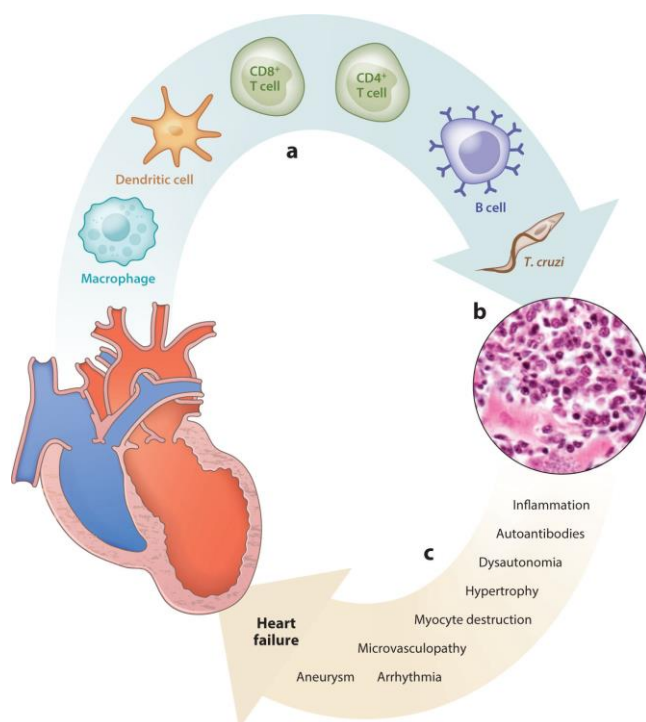


Figura 1.13.- Infección crónica por *T. cruzi*. Tomado de (Bonney et al. 2019).

El resultado de la enfermedad está determinado por una interacción muy compleja entre la virulencia de la cepa de *T. cruzi* y la susceptibilidad genética del individuo, y tanto la virulencia del parásito como la susceptibilidad del huésped varían con la combinación parásito-huésped. Es

decir, una cepa de parásito puede ser más virulenta para un huésped que para otro, y un huésped puede ser más susceptible a una cepa de parásito que a otra. Además, esta diversidad en la especie *T. cruzi* también se extiende al diagnóstico y la susceptibilidad a los fármacos (Zingales 2018). Las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas pueden contribuir al daño cardíaco y aumentar el riesgo de insuficiencia cardíaca al inducir inflamación sostenida, fibrosis y daño por estrés oxidativo, lo que lleva a la alteración de las miofibrillas, necrosis de miocitos, disfunción microvascular, disfunción autonómica e hipertrofia y fibrosis cardíaca (Figura 1.14).



**Figura 1.14.- Patogénesis de la cardiopatía Chagásica: (a) Una variedad de células, incluido el parásito *T. cruzi*, se infiltran en el miocardio, que desarrolla (b) Histopatología caracterizada por infiltraciones de células mononucleares, edema, destrucción de miocitos y fibrosis. Los parásitos no se observan en la infección crónica. (c) Diversos mecanismos conducen a una disfunción cardíaca progresiva que progresa a insuficiencia cardíaca durante la infección por *T. cruzi*. Tomado de (Bonney et al. 2019).**



Por tanto, el resultado de la infección es el resultado de la culminación de muchos procesos. Al final, el objetivo final de *T. cruzi* es el mismo que para cualquier otro patógeno: replicarse y persistir en su huésped humano hasta que pueda transmitirse a otro huésped (Bonney et al. 2019).

### **1.10. Inmunomodulación de la respuesta inmune frente a *T. cruzi* en la enfermedad de Chagas.**

El éxito de la infección de *T. cruzi* se debe a una variedad de estrategias que utiliza para escapar de los efectos de la inmunidad tanto innata como de la adquirida. Un paso crucial ocurre durante los primeros minutos de la infección cuando los tripomastigotes necesitan evadir el ataque lítico del complemento (Barbosa et al. 2017).

Tanto la respuesta inmunitaria humoral como la celular son esenciales para el control de los parásitos (Michailowsky et al. 2003). En este contexto, la respuesta del huésped utiliza varias estrategias para eliminar el parásito incluyendo la activación del complemento (Evans-Osses et al. 2014), la opsonización, la producción de anticuerpos específicos, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (Voltarelli et al. 1983). El complemento es parte de la inmunidad innata que actúa en la primera línea de defensa del huésped contra patógenos. Comprende más de 35 proteínas y puede ser activada por tres vías: lectina, clásica y alternativa (Lidani et al. 2017).

Las formas tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* no solo implican la expresión de moléculas reguladoras en la superficie del parásito, sino que también inducen vesículas derivadas de la membrana (microvesículas) de las células huésped, lo que afecta la formación y activación de la convertasa C3 (C4b2a), y resulta en la inhibición de activación del complemento, aumento de la supervivencia del parásito e invasión de células eucariotas (Cestari et al. 2012).

La patogenia de la EC crónica sintomática aún no se comprende completamente. Algunas hipótesis se basan en la respuesta directa del sistema inmunológico contra los tejidos infectados. Según estas hipótesis, una respuesta inmune eficiente podría resultar en la reducción sustancial del número de parásitos con menor daño tisular y ausencia de manifestaciones clínicas en pacientes asintomáticos. Por otro lado, una respuesta inmune ineficiente favorecería la persistencia del parásito en los tejidos con la consiguiente lesión y fibrosis (Bonney and Engman 2015).

Por otro lado, las microvesículas derivadas tanto de las células huésped como de *T. cruzi* pueden fusionarse, favoreciendo así la invasión de las células huésped y la diseminación del parásito. Ambos mecanismos interfieren también en la activación del complemento. La eliminación incompleta del parásito puede conducir a una reactividad inmune que podría provocar daño tisular que lleva a la exposición de neoepítomos y estímulo para la producción de autoanticuerpos, desencadenando mecanismos involucrados en la autoinmunidad en la EC crónica (Muñoz-Saravia et al. 2012).

Además, la hipótesis de la autoinmunidad sugiere que el daño cardíaco, desencadenado por la persistencia del parásito, conduciría a una exacerbación de la respuesta inmune y a la interrupción de la auto-tolerancia, lo que resultaría en una reacción auto inmune. En este caso, la respuesta autoinmune posiblemente sea la razón del daño tardío observado en la EC crónica (Figura 1.15) (De Bona et al. 2018; Muñoz-Saravia et al. 2012). En la EC la infección del miocardio provoca una intensa respuesta inflamatoria que puede verse como una "espada de doble filo". Aunque es necesaria para el control de la proliferación de parásitos, la inflamación da como resultado daño tisular que conduce a fibrosis miocárdica y remodelación cardíaca (Teixeira, Gazzinelli, and Silva 2002). La respuesta proinflamatoria que se produce incluye, pero no se limita a, secreción de citocinas y quimiocinas

Th1, eicosanoides y endotelina-1 durante la infección por *T. cruzi*. Se activan las células que participan en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, incluidas las células dendríticas, los macrófagos, las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, las células T citotóxicas y las células B productoras de anticuerpos líticos (Machado et al. 2012).

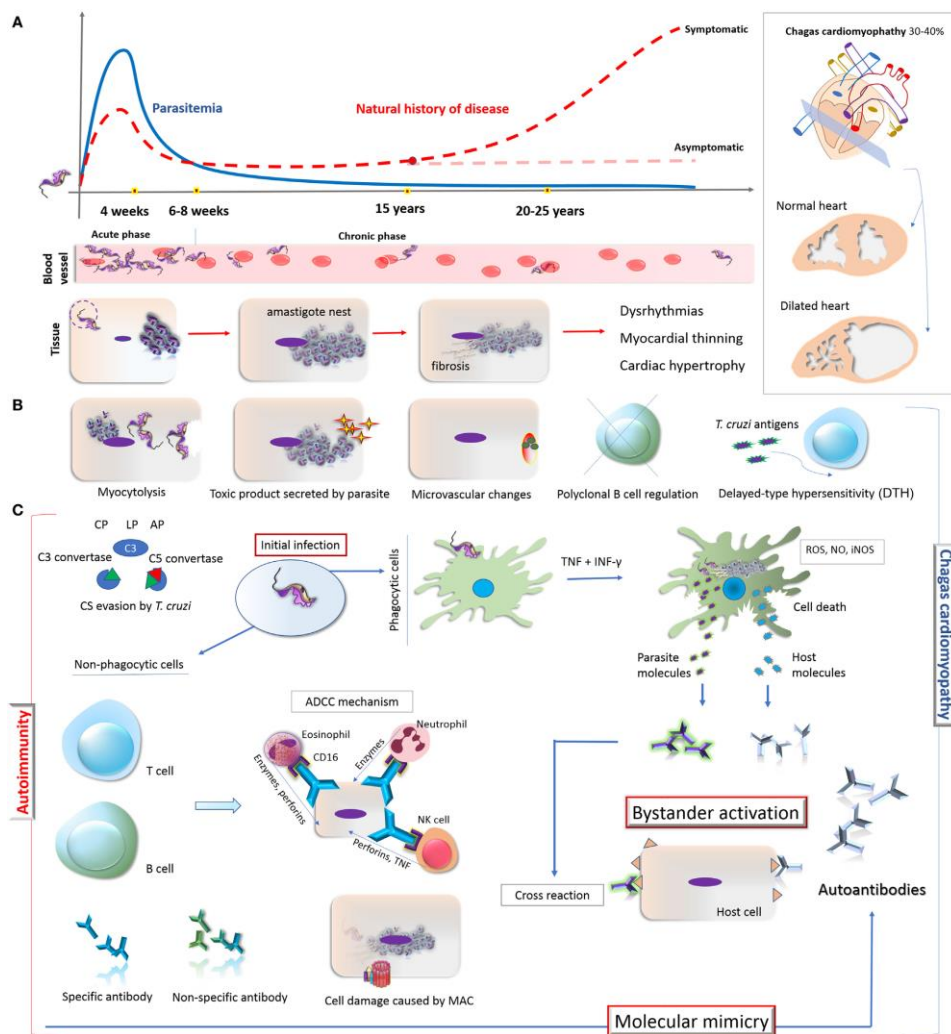


Figura 1.15.-Desarrollo de la miocardiopatía y sus mecanismos fisiopatológicos de autoinmunidad. Tomado de (De Bona et al. 2018) .

La activación de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> las células T que sintetizan citocinas Th1 generalmente se correlacionan con el daño miocárdico, al menos en modelos experimentales, y pueden ser moduladas por IL-17 y células reguladoras T (Machado et al. 2012). Durante la infección aguda, las células mononucleares producen niveles altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Tanowitz et al. 2015).

La infección por *T. cruzi* induce una respuesta inmunitaria compleja que involucra efectores y mecanismos reguladores. Es por eso por lo que el control de la infección requiere una fuerte respuesta inmunitaria humoral y celular; por lo tanto, el resultado de la interacción huésped-parásito en las primeras etapas de la infección es extremadamente importante. Un evento crítico durante este período de la infección es la respuesta inmune innata, en la que el papel del macrófago es vital. Así, después de ser fagocitado, el parásito puede desarrollarse intracelularmente; sin embargo, durante períodos posteriores, estas células inducen su eliminación mediante metabolitos tóxicos. A su vez, a medida que avanza la infección, los mecanismos de respuesta inmunitaria adaptativa se activan a través de las respuestas Th1 y Th2 (Basso 2013).

También se ha publicado recientemente que en la infección por *T. cruzi*, se bloquea la expresión de las subunidades del inmunoproteasoma de la célula huésped, la proteína activadora del proteasoma PA28b, el transportador asociado con presentación de antígeno TAP1 y la molécula del MHC de clase I mediante un control postranscripcional desconocido (Caccia et al. 2013). Esto indica que los tripomastigotes liberan proteínas y/u otras moléculas en respuesta a procesos causados por o después de la inducción de diferenciación. El repertorio de proteínas secretadas/excretadas (aquí genéricamente denominado exoproteoma) juega un papel importante en la

homeostasis, la respuesta inmune, el desarrollo, la proteólisis, la adhesión, la proliferación celular, la diferenciación celular, la morfogénesis y la comunicación celular (Mandacaru et al. 2019). Además, las proteínas secretadas / excretadas representan aproximadamente el 10% de las proteínas codificadas por un genoma (Buschiazzo et al. 2012). Los tripomastigotes son capaces de liberar EVs membranosas llenas de estas proteínas, como las *trans*-sialidasas (Buschiazzo et al. 2012). Son estas vesículas extracelulares las que han demostrado estar implicadas en la patogenia de EC al incrementar el parasitismo cardíaco y la inflamación (Mandacaru et al. 2019).

### **1.11. Linajes de *T. cruzi*.**

La variabilidad de *T. cruzi* ha sido estudiada por múltiples grupos de investigación utilizando diferentes estrategias biológicas, bioquímicas y moleculares dirigidas a diversos marcadores genéticos, permitiendo la identificación de seis unidades discretas de tipificación (UDT's) con la adición de uno nuevo al que se denomina TcBat originario de murciélagos (Zingales et al. 2012). Los subtipos de *T. cruzi* aislados y caracterizados globalmente se han designado como Tc I, Tc IIa a Tc IIe (Cura et al. 2010) (Cura et al. 2015). El concepto de UDT se refiere a un conjunto de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población (Abras, Gállego, Muñoz, et al. 2016).

Una de las posibles causas de la diversidad de las manifestaciones clínicas de la EC se ha atribuido a esta alta variabilidad genética y el carácter policlonal de las poblaciones naturales de *T. cruzi* (Macedo and Pena 1998). Entre las diferencias estudiadas se mencionan el histotropismo, la capacidad de invasión y multiplicación intracelular, la infectividad del vector, la

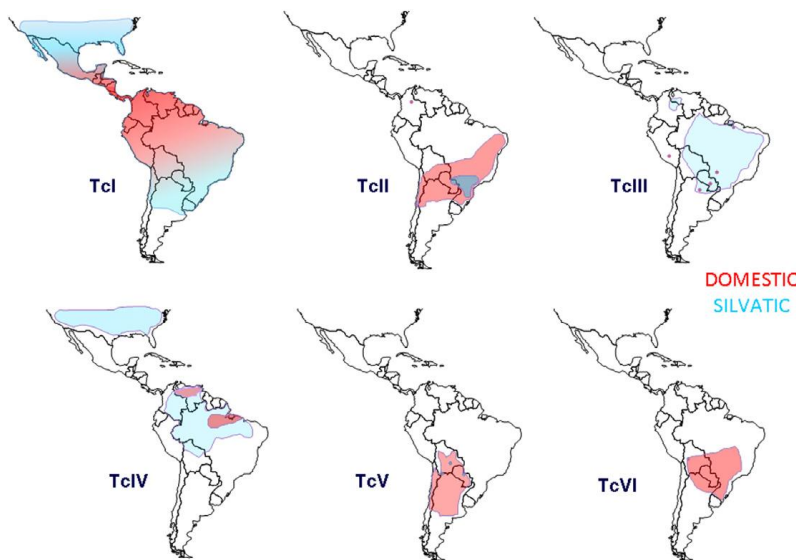
sensibilidad a fármacos, la morfología de las formas tripomastigotas, el perfil antigénico y la posible asociación a patologías (Zingales et al. 2009). La enorme variabilidad genética encontrada en esta especie favorece la aparición de estas "cepas", lo que complica la clasificación según su patología u otras peculiaridades fenotípicas (Minning et al. 2011).

La distribución geográfica de las UDT es particular, así como su vínculo con los reservorios, los ciclos de transmisión y los métodos de diagnóstico (Bhattacharyya, Mills, and Miles 2015; Llewellyn et al. 2009).

Geográficamente, TcI predomina en la región de los Andes, en América Central y del Norte, México (Brenière et al. 2007; Samudio et al. 2007), presentando un ciclo de transmisión selvática, principalmente entre marsupiales y triatomos selváticos (Ceballos et al. 2006; Jansen et al. 1999). Esta UDT también se asocia con infecciones humanas en los Estados Unidos (Roellig et al. 2008), México, Centroamérica (Bosseno et al. 2002; Martínez et al. 2013) y el norte de Sudamérica, detectado en pacientes con miocardiopatías de Venezuela y Colombia (Cuervo et al. 2002; Salazar, Schijman, and Triana-Chávez 2006; Triana et al. 2006).

TcI es conocida por presentar una alta diversidad genética y una amplia distribución geográfica, compatible con una evolución a largo plazo. Se cree que los marsupiales son su hospedador más ancestral y la región del Gran Chaco Argentina - Bolivia el lugar de su supuesto origen (Brenière, Waleckx, and Barnabé 2016). TcII es extremadamente rara en América del Norte y Central, y se identificó con más frecuencia en los ciclos domésticos que en los ciclos selváticos. Tiene una baja diversidad genética y probablemente haya encontrado refugio en algunas especies de mamíferos. Se cree que se origina en la zona sur del Amazonas (Lisboa et al. 2015). TcI y TcII son las

representantes de las líneas más ancestrales que se supone que han dado lugar a los linajes de 6 unidades de tipificación discreta (UDT, TcI-TcVI) que ahora componen esta especie genéticamente diversa (Figura 1.16) (Wang et al. 2021; Zingales et al. 2012).

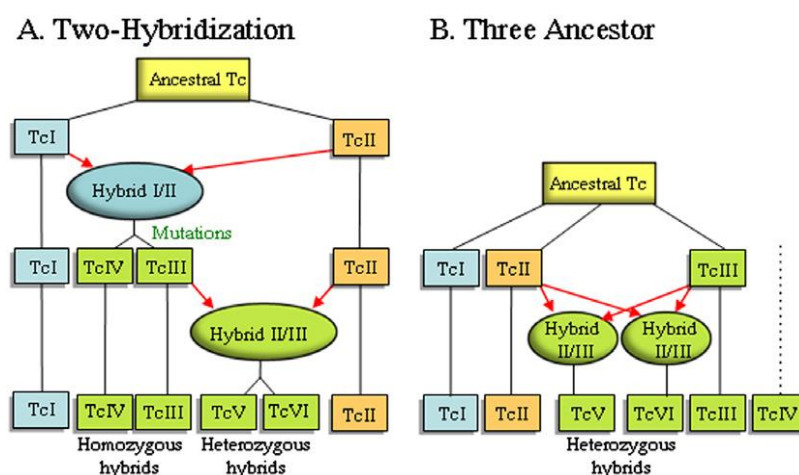


**Figura 1.16.- Distribución geográfica aproximada de las UDT de *T. cruzi* en los ciclos de transmisión domésticos y selváticos. Tomado de(Zingales et al. 2012).**

TcIII y TcIV son UDT que no parecen estar presentes en toda el área endémica. Varios estudios han demostrado que estas cepas son el resultado de hibridaciones antiguas entre las cepas TcI y TcII, que con el tiempo sufren reordenamientos genéticos, disminuyendo su nivel de heterocigosidad a expensas del mosaico de genes mitocondriales y nucleares. TcIII y TcIV muestran una diversidad genética sustancial y se cree que están compuestos por posibles subgrupos polifiléticos. Incluso se asocian principalmente con ciclos de transmisión selvática (Lewis et al. 2011). Las cepas híbridas TcV y TcVI están claramente asociados con los ciclos de transmisión domésticos (Brisse et al. 2003). La pronunciada heterocigosidad observada en los

aislados naturales de TcV y TcVI sugirió que estas UDT son híbridos y se derivan de TcII y TcIII (Zingales et al. 2012). Menos del 10% de estas UDT se identificaron juntas en hospedadores silvestres. Se cree que se originaron en la región del Gran Chaco, donde son predominantes y donde existen los originales putativos (TcII y TcIII). Algunas de estas cepas se han extendido por grandes áreas geográficas a través del modo de propagación clonal lo que ha diversificado dichas “cepas” (Tibayrenc and Ayala 1988).

El modelo de “Dos Hibridación” (Westenberger et al. 2005) y el modelo de “Tres Ancestros” (de Freitas et al. 2006) incorporan dos eventos de hibridación (Figura 1.17). En el modelo de los “Tres Ancestros”, los dos eventos de intercambio genético recientes entre TcII y TcIII producen TcV y TcVI.



**Figura 1.17.- Comparación de (A) los modelos de Dos Hibridación y (B) los Tres Ancestros para los roles del intercambio genético durante la evolución clonal de *T. cruzi*. Tomado de (Zingales et al. 2012).**

El modelo de “dos hibridación” invoca un evento de intercambio genético antiguo entre TcI y TcII, con pérdida de heterocigosidad entre la progenie para producir TcIII y TcIV, seguido de un segundo evento de hibridación



más reciente entre TcII y TcIII para producir tanto TcV como TcVI (Zingales et al. 2012).

Existen tendencias en las especificidades del hospedador-UDT, pero en general parece que la complejidad de los ciclos y la participación de numerosos vectores y hospedadores mamíferos en un área compartida, mantiene la diversidad de UDT (Brenière et al. 2016).

Por otro lado las correlaciones entre UDT / patogenicidad siguen siendo controvertidas. Clásicamente, TcII, TcV y TcVI se relacionaron con enfermedades humanas graves y TcI, TcIII y TcIV se relacionaron con el ciclo selvático, pero en la región amazónica, Colombia y Venezuela, los informes han descrito enfermedades humanas por TcI, TcIII y TcIV. Aunque diversos estudios han propuesto estas y otras correlaciones, que aún requiere mayores evidencias (Dario et al. 2016).

Como se ha descrito anteriormente en Panamá las variantes genéticas circulante de *T. cruzi* en vectores y pacientes, requieren más investigaciones (Saldaña et al. 2012; Samudio et al. 2007). En estudios preliminares solamente se había detectado *T. cruzi* TcI (Brandao et al. 2008; Cura et al. 2010; Sousa et al. 2006). Sin embargo en estudios recientes en muestras de sangre de pacientes chagásicos crónicos panameños, se encontraron infecciones mixtas de TcI más TcII / V / VI y que se describen por primera vez en Panamá (Ledezma et al. 2020).

### **1.12. Diagnóstico.**

El diagnóstico de infección por *T. cruzi* se debe realizar utilizando diferentes metodologías, tomando en cuenta la etapa de la enfermedad. En la fase aguda de la infección, la parasitemia es alta en la circulación periférica y el diagnóstico de la EC se puede realizar mediante un examen directo de la

sangre. En contraste, en la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia es transitoria y depende del estado inmunológico de cada paciente (Herbert A. Avila et al. 1991; D'Ávila, Lúcia Maria C. Galvão, et al. 2018).

### **1.12.1. Diagnóstico Serológico.**

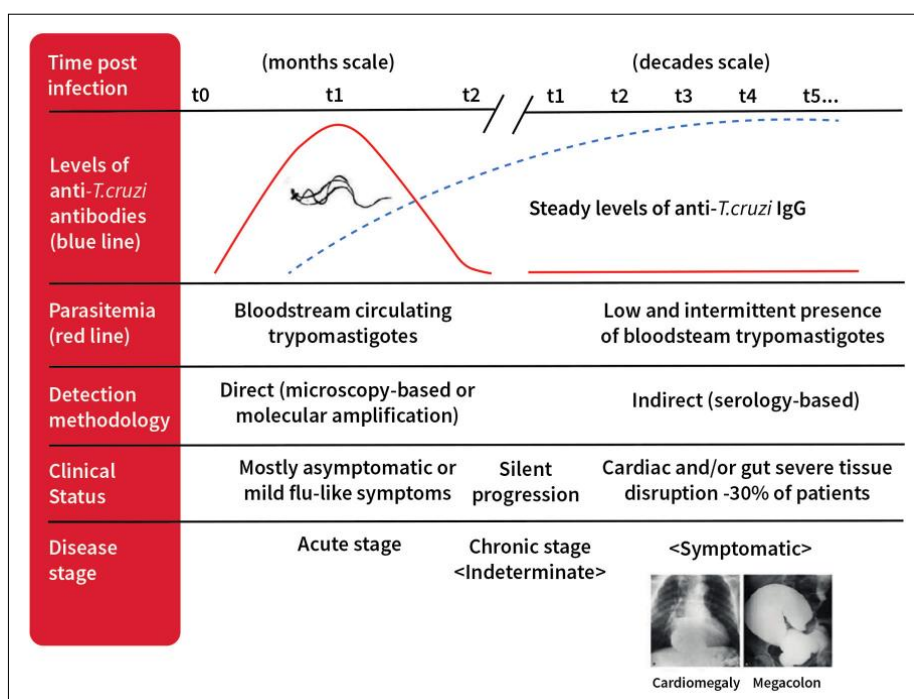
A pesar de que se dispone de numerosos ensayos para diagnosticar la EC, ningún ensayo se considera el estándar de referencia (Riera et al. 2012).

En la fase aguda de la infección, la parasitemia es alta en la circulación periférica y el diagnóstico de la EC se puede realizar mediante un examen directo de la sangre. Por el contrario, en la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia es subaparente, transitoria y depende de la respuesta inmune de cada paciente (H A Avila et al. 1991).

Tanto en pacientes chagásicos indeterminados como determinados, la parasitemia es típicamente baja e intermitente y el diagnóstico de la infección se realiza mediante pruebas serológicas indirectas. Esto es posible porque se producen altos niveles de inmunoglobulinas específicas de parásitos tras la infección por *T. cruzi* (Figura 1.18). Los niveles de inmunoglobulinas anti - *T. cruzi* tipo G (IgG) permanecen por encima de los umbrales de detección durante muchos años, lo que es ventajoso para el diagnóstico serológico de la infección (Alonso-Padilla et al. 2019).

Los métodos actuales disponibles para el diagnóstico serológico tienen limitaciones en la sensibilidad y especificidad, especialmente cuando se aplican para el diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad (Abrás, Gállego, Llovet, et al. 2016). La principal limitación de los métodos serológicos es la baja especificidad, debido a las reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos presentes en áreas endémicas como

*Leishmania* sp. y *Trypanosoma rangeli* (Caballero et al. 2007; D'Ávila, Lúcia Maria C. Galvão, et al. 2018).



**Figura 1.18.- Esquema temporal del diagnóstico de la enfermedad de Chagas y evolución del estado clínico. Tomado de (Alonso-Padilla et al. 2019).**

El diagnóstico serológico de la EC se basa con frecuencia en pruebas como inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos de hemaglutinación indirecta (HAI), que generalmente emplean epimastigotes de *T. cruzi* como el antígeno. Siempre que se seleccionan kits de buena calidad y se sigan las prácticas correctas de laboratorio, se puede lograr buena sensibilidad con cualquiera de las pruebas mencionadas (Caballero et al. 2007). Las sensibilidades del orden de 95 a 99% se pueden obtener, y éstas se pueden aumentar a 100% mediante el uso de más de una prueba. Para evitar las incongruencias de las pruebas serológicas la OPS recomienda aplicar al menos dos técnicas con la finalidad

de tener un alto grado de confiabilidad, sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia entre ellas (OMS 2002) (WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000 : Brasilia and Organization 2003). En algunos estudios se utilizan los métodos de inmunotransferencia con antígenos excretados-secretados de tripomastigotes (TESA blot) de *T. cruzi* como método para el diagnóstico de las fases crónica y aguda, así como de la EC congénita (en recién nacidos). Las muestras de suero de infecciones congénitas y de fase aguda se consideraron positivas cuando reaccionaban con bandas de antígenos en forma de escalera de 130 a 200 kDa, reconocidas por inmunoglobulina M (IgM) e anticuerpos IgG, mientras que las IgG de sueros de fase crónica reconocían un antígeno de 150 a 160 kDa (Umezawa et al. 1996).

Otra dificultad que repercute directamente en los tratamientos de los pacientes es que los métodos serológicos siguen siendo positivos durante varios años. En la fase crónica de la enfermedad, la reversión serológica posterior al tratamiento es inferior al 10%, lo que perjudica la eficacia de la evaluación terapéutica (D'Ávila, Lúcia Maria C Galvão, et al. 2018).

En Panamá el diagnóstico de la EC en fase crónica se hace a través de la presencia de anticuerpos IgG anti *T. cruzi*, detectados al menos por dos técnicas serológicas de principios diferentes de preferencia con titulación. Es importante que las pruebas comerciales utilizadas no presenten reacción cruzada con *Leishmaniasis* o la infección con *T. rangeli* (parásito muy frecuente en Panamá) (Caballero et al. 2007; OPS-MINSA-CSS. 2013). En la fase aguda, el uso de la IgG para diagnóstico requiere de dos muestras de sangre que permitan comparar la seroconversión (pasar de negatividad a positividad) o la variación en tres títulos serológico (IFI) con intervalo de mínimo 21 días entre una muestra y la otra. Sin embargo los anticuerpos IgM son más útiles en la fase aguda tardía, tras al menos 30 días de fiebre y

exámenes de investigación directa del parásito tuviesen el resultado negativo (OPS-MINSA-CSS. 2013). La experiencia en Panamá en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud (ICGES), con el análisis de PCR para la infección chagásica, demuestra con frecuencia resultados negativos aun con serología positiva (OPS-MINSA-CSS. 2013). Es importante destacar que *T. cruzi* tiene una gran diversidad genética y actualmente se divide en seis genotipos conocidos como unidades discretas de tipificación (UDT) (TcI a TcVI) (Zingales et al. 2012). Los resultados discordantes entre los ensayos serológicos se atribuyen a menudo a diferencias antigénicas entre proteínas recombinantes o a los diferentes UDT de *T. cruzi* (Guzmán-Gómez et al. 2015).

### **1.12.2. Diagnóstico Molecular.**

La principal técnica molecular que ha sido utilizada para el diagnóstico de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes en fase crónica es la PCR convencional, basada en el uso de oligonucleótidos sintéticos que amplifican secuencias específicas de DNA del parásito que presentan una alta sensibilidad y resultados prometedores, aunque no es factible para una evaluación cuantitativa (D'Ávila, Lúcia Maria C. Galvão, et al. 2018; Schijman 2000; Schijman et al. 2011). Esta técnica tiene mucho valor diagnóstico durante la fase aguda, en casos de transmisión congénita, en pacientes inmunocomprometidos y en el seguimiento post-tratamiento. Sin embargo, debido a la baja parasitemia durante la fase crónica su sensibilidad es muy variable y depende grandemente del protocolo utilizado (Schijman 2000; Schijman et al. 2011). Existen diferentes protocolos de PCR basados en distintas dianas moleculares de amplificación, solo unas pocas han resultado con los adecuados índices diagnósticos para *T. cruzi*. Tabla 1.1.

Tabla 1.1.- Protocolos de PCR empleados en el diagnóstico de la EC. Tomado de (Ferrer 2015).

Nº	Diana	Cebadores	Secuencia cebadores	Productos	Referencias
1	ADN satélite 195pb	TCZ1 TCZ2	5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'	188 pb*	Moser <i>et al.</i> 1989
2	ADNk kinetoplasto región variable	121 122	5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3' 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	330 pb	Britto <i>et al.</i> 1993, 1995
3	ADNk kinetoplasto región variable	S35' S36'	5'-ATAATGTACGGGTGAGATGCATG-3' 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	330 pb	Ávila <i>et al.</i> 1993
4	Secuencia repetitiva nuclear esparcida I025	O1 O2	5'-TGGCTTGAGAGTATTATTGTGC-3' 5'-AGGAGTGACGGTTGATCAGT-3'	250 pb	Requena <i>et al.</i> 1992
5	Espaciador intergénico (ITS1)	F1 F2	5'-GGGAGAGGTTCCAGATGT-3' 5'-GTCGGAGCAGGGACAGC-3'	130 pb	González <i>et al.</i> 1994
6	Repetición Clon 6	Clon 6 F Clon 6 R	5'-GATGCGCATTGTACGA-3' 5'-CTGGCTGGCCTTGATCC-3'	320 pb	Araya <i>et al.</i> 1997
7	Región subtelomérica	Tc189Fw2 Tc189Rv3	5'-CCAACGCTCCGGGAAAAC-3' 5'-GCGTCTTCTCAGTATGGACTT-3'	100 pb	Chiurillo <i>et al.</i> 2003
8	Gen Proteína flagelar	Tc24 F Tc24 R	5'-GACGGCAAGAACGCCAAGGAC-3' 5'-TCACGCGCTCTCCGGCACGTTGTC-3'	250 pb	Taibi <i>et al.</i> 1995

\*pb: pares de bases

Como se ha mencionado antes, debido a la diversidad genética y multiclonal de las poblaciones naturales de *T. cruzi* que ha sido ampliamente descrita por diferentes grupos de investigación, utilizando variadas estrategias biológicas, bioquímicas y moleculares dirigidas a diferentes marcadores genéticos, ha permitido la identificación de seis linajes o unidades discretas de tipificación (UDT) (Izeta-Alberdi et al. 2016; Macedo and Pena 1998; Miles et al. 2009; Zingales et al. 2009). En Panamá, Sousa y colaboradores realizaron un estudio basado en PCR- Multiplex, donde utilizaron la sangre de personas con diferentes perfiles clínicos de la EC, y encontraron que toda la población positiva para *T. cruzi* estudiada en Panamá, correspondía al linaje Tc-I. Este resultado apoya la hipótesis de que *T. cruzi*-I predomina en los ciclos de transmisión que afecta la población humana de Panamá (Sousa et al. 2006). Brandao y colaboradores, en estudios a partir de la secuencia parcial de la región no traducida del extremo 3' del gen de la calmodulina,

confirmaron que en Panamá circula solo la cepa *T. cruzi* I, tanto en las personas como en los animales hospedadores (Brandao et al. 2008).

### **1.13. Tratamiento.**

La EC todavía no tiene un tratamiento específico y eficaz para todas sus fases a pesar de que la enfermedad se descubrió hace más de 100 años. El desarrollo de fármacos comerciales se ha estancado desde la década de 1960. A pesar de la disponibilidad de dos medicamentos contra la infección (Benznidazol y Nifurtimox), múltiples factores impiden su efectividad al 100%: (1) La no concienciación de los pacientes y de los sanitarios; (2) falta de diagnóstico; (3) toxicidad de los medicamentos y ausencia de protocolos de tratamiento para abordar los efectos adversos; (4) falta de suministro y distribución de los medicamentos; y (5) eficacia del fármaco inconsistente contra la etapa crónica sintomática de la enfermedad (Alonso-Padilla et al. 2019).

Dado que el Benznidazol es el tratamiento de primera línea para los pacientes con EC, se requieren estrategias de quimioterapia racionales basadas en el análisis crítico de la evidencia sobre la relevancia y aplicabilidad de este fármaco en los diferentes estadios de la enfermedad.

Después de 40 años de uso clínico, la quimioterapia a base de Benznidazol sigue siendo el tratamiento de primera línea para los pacientes con EC. Después del tratamiento con Benznidazol, la cura parasitológica a menudo se ha relacionado con la ausencia de la parasitemia, la serología y la carga parasitaria. Por lo tanto, una alta correlación entre los ensayos negativos parasitológicos, serológicos y de PCR en el seguimiento postterapéutico a largo plazo se ha utilizado sistemáticamente como marcadores de eficacia terapéutica (Caldas, Santos, and Novaes 2019).

Desafortunadamente, todavía no se dispone de biomarcadores de progresión de la enfermedad ni de herramientas estandarizadas para determinar la

respuesta temprana al tratamiento, lo que complica enormemente el pronóstico y el seguimiento de los pacientes (Pinazo et al. 2014).

### **1.14. Generalidades de la Exovesículas (EVs).**

Los exosomas, descubiertos por primera vez en 1983 en reticulocitos, fueron considerados contenedores de basura, restos celulares, ampollas apoptóticas o signos de muerte celular (Blanc and Vidal 2010; Johnstone et al. 1987). Durante la última década, a los exosomas se les ha dado una importancia considerable debido a su participación en la comunicación intercelular, particularmente en el sistema inmunológico (Miller and Grunewald 2015), interacción de los exosomas con las células diana mediante la unión a los receptores presentes en su superficie, el cambio de comportamiento de las células, la fusión con las membranas de las células diana, la liberación de su propio contenido en el citosol y la internalización dentro de los fagosomas, por lo que se consideran poderosos agentes de comunicación celular (Mathivanan, Ji, and Simpson 2010).

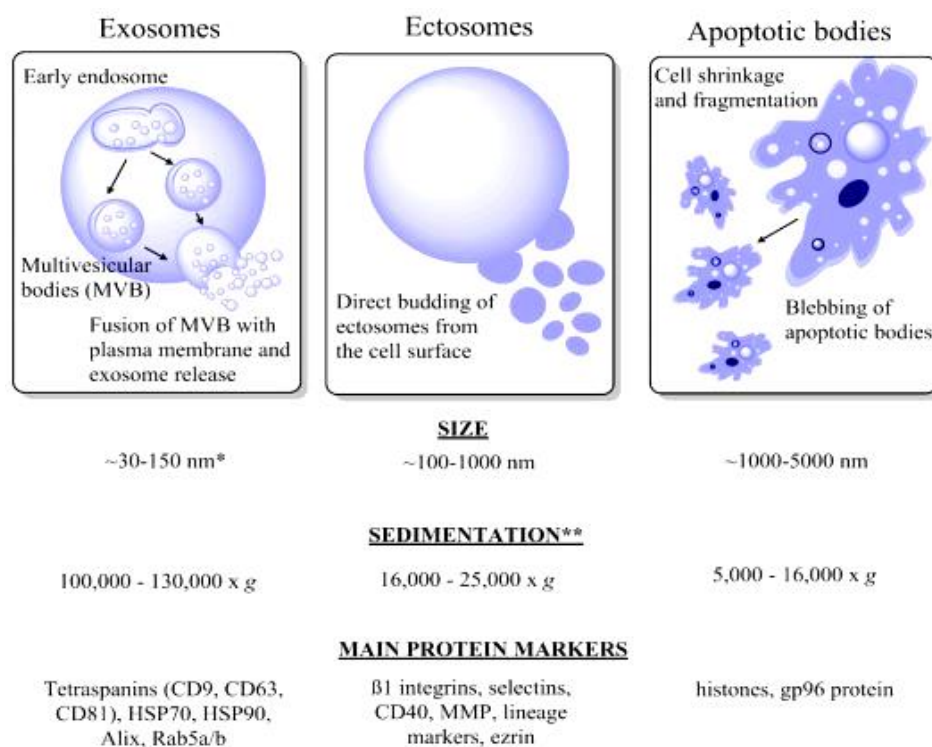
La terminología utilizada para describir estas vesículas no se ha estandarizado. Una convención adoptada es nombrar las vesículas según la fuente de aislamiento en lugar del mecanismo de biogénesis, es decir cuando las EVs se aíslan de biofluidos como sangre, líquido cefalorraquídeo u orina. De esta manera, se han utilizado términos que incluyen epididimosomas, argosomas, vesículas similares a exosomas, microvesículas, promininosomas, prostasomas, dexosomas, texosomas, arqueosomas y oncosomas (Al-Nedawi, Meehan, and Rak 2009). Otra terminología refleja tanto los diferentes métodos de aislamiento como los diferentes mecanismos de biogénesis. Por ejemplo, algunas vesículas aisladas de biofluidos utilizando los mismos métodos pueden ser



denominadas exosomas por algunos, microvesículas por otros, y aún otros difuminan la diferencia con el término “exosomas / microvesículas” (Shen et al. 2011). La fuente subyacente de confusión es que "exosoma" y "microvesícula" son términos definidos por los biólogos celulares para denotar las EVs que surgen a través de mecanismos biológicos específicos (Akers et al. 2013).

En la última década, las EVs se han reconocido como potentes vehículos de comunicación intercelular, tanto en procariotas como en eucariotas. La importancia de las EVs reside en su capacidad de transferir información a otras células, lo que influye en la función de la célula receptora. Las señales mediadas por EVs pueden transmitirse por todas las diferentes categorías de biomoléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y azúcares), lo que influye en diversas funciones fisiológicas y patológicas de las células tanto receptoras como parentales, y esta información proporciona protección y la opción de enviar simultáneamente múltiples y diferentes mensajes incluso a sitios remotos y distantes (Yáñez-Mó et al. 2015).

Las EVs se pueden categorizar de acuerdo a su tamaño, biogénesis o ruta en que se liberan al medio extracelular. Los exosomas, son exovesículas en forma de “copa” o gota de 30-150 nm, liberadas por fusión exocítica de los cuerpos multivesiculares (MBM) y membrana plasmática, los ectosomas que son exovesículas más grandes que varían alrededor de 100-1000 nm de diámetro y se liberan directamente de la membrana plasmática por gemación y la tercera categoría, los cuerpos apoptóticos, que son incluso más grandes (>1  $\mu\text{m}$ ) que provienen de células apoptóticas. Todas están involucradas en la señalización celular (Dragovic et al. 2011; György et al. 2011).



**Figura 1.19.- Características de las tres poblaciones de vesículas extracelulares. Tomado de (Surman, St<sub>c</sub> Epié N, and Przybyło 2019).**

Recientemente, se ha demostrado que las EVs derivadas de la membrana plasmática (PMV) desempeñan un papel en varias enfermedades, como el cáncer, la trombosis y las infecciones por patógenos. Varias células, como monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales, liberan PMV. Las PMV se liberan desde la membrana plasmática celular a niveles basales, o con un estímulo extracelular y un aumento concomitante en el Ca<sup>2+</sup> intracelular (Inal et al. 2012).

### 1.14.1. Biogénesis de las EVs.

Los exosomas se generan en un proceso que implica la doble invaginación de la membrana plasmática y la formación de cuerpos multivesiculares intracelulares (MVB) que contienen vesículas intraluminales (ILV). En última instancia, las ILV se secretan como exosomas con un rango de tamaño de ~ 40 a 150 nm de diámetro a través de la fusión de MVB a la membrana plasmática y exocitosis (Figura 1.20). La primera invaginación de la membrana plasmática forma una estructura en forma de copa que incluye proteínas de la superficie celular y proteínas solubles asociadas con el medio extracelular. Esto conduce a la formación *de novo* de un endosoma temprano (ESE) que, en algunos casos, puede fusionarse directamente con un endosoma preexistente. La red trans-Golgi y el retículo endoplásmico también pueden contribuir a la formación y al contenido del endosoma temprano (Willms et al. 2018). Los endosomas tempranos pueden madurar en endosomas de clasificación tardía y eventualmente generar cuerpos multivesiculares intracelulares, que también se denominan endosomas multivesiculares. Los cuerpos multivesiculares intracelulares se forman por invaginación hacia adentro de la membrana limitante endosómica (es decir, doble invaginación de la membrana plasmática). Este proceso da como resultado cuerpos multivesiculares que contienen varias vesículas intraluminales (futuros exosomas). Los cuerpos multivesiculares intracelulares puede fusionarse con lisosomas o autofagosomas para degradarse o fusionarse con la membrana plasmática para liberar los ILV contenidos como exosomas (Kalluri and LeBleu 2020).

La proteína relacionada con Ras GTPasa Rab, Sytenin-1, TSG101 (gen de susceptibilidad tumoral 101), ALIX (proteína X que interactúa con el gen 2 ligado a la apoptosis), sindecán-1, ESCRT (complejos de clasificación

endosomal necesarios para el transporte) proteínas, fosfolípidos, las tetraspaninas, ceramidas, esfingomielininas y SNARE (receptor de proteína de unión del factor sensible a *N*-etilmaleimida soluble (NSF)) están involucradas en el origen y proceso de biogénesis de los exosomas (Bebelman et al. 2018).

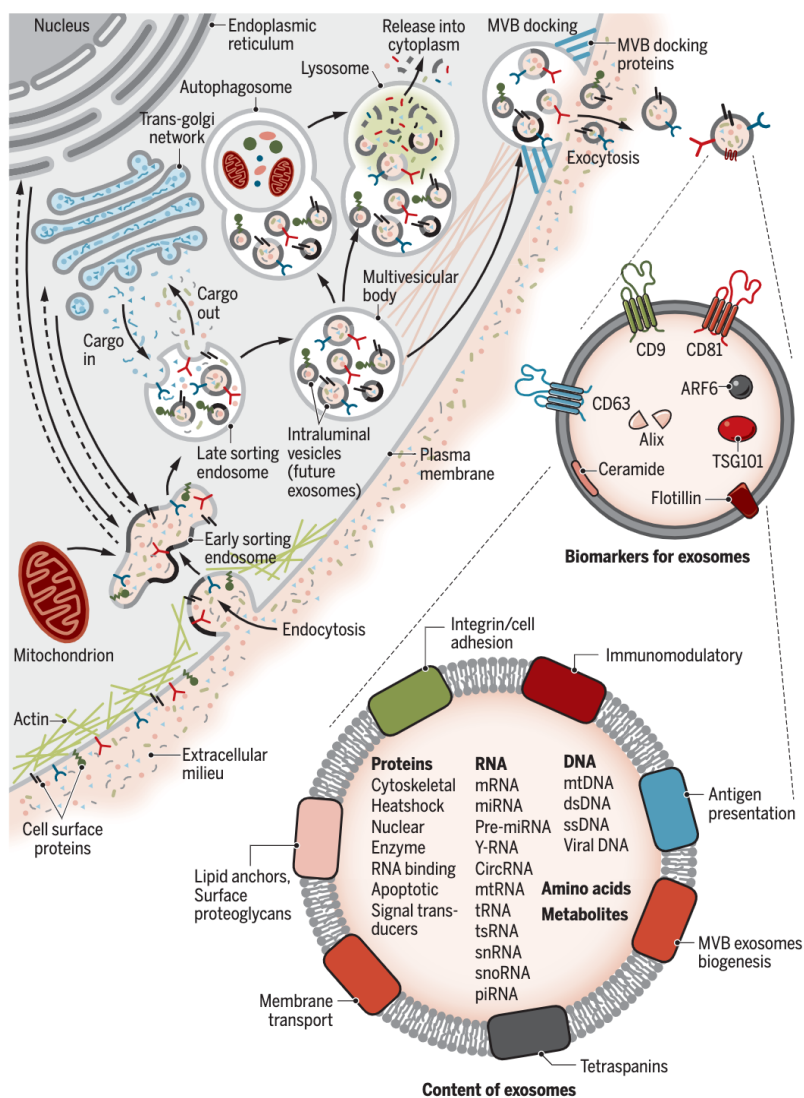


Figura 1.20 Biogénesis e identificación de exosomas. Tomado de (Kalluri and LeBleu 2020).

### **1.14.2. Contenido de EVs (Carga).**

El contenido proteico de los diferentes tipos de EVs, refleja el de la célula progenitora y está enriquecido con ciertas moléculas, como de adhesión, tráfico de membrana, citoesqueleto, proteínas de choque térmico, enzimas citoplásmicas, proteínas de transducción de señales, citocinas, quimiocinas, proteinasas y antígenos específicos de células (Ags). Además, las EVs contienen ARN mensajero (ARNm), ARN no codificante (ARNc) que incluye miARN e incluso ADN extracromosómico tal como c-Myc amplificado (Balaj et al. 2011). Casi todos los tipos de células que se encuentran en el plasma y en fluidos corporales, liberan EVs incluidas la leche materna, el semen, la saliva, la orina y el esputo (Robbins and Morelli 2014).

El contenido de proteínas de los exosomas se ha analizado en varios tipos de células y fluidos corporales mediante ME, Western blot, microscopía electrónica e inmunquímica, entre otras técnicas (Mathivanan, Ji, et al. 2010).

La composición de las proteínas del exosoma varía según el tipo de célula de origen y revela una firma única del tejido / tipo de célula (Mathivanan, Lim, et al. 2010). Un análisis proteómico detallado de diferentes clases de células encontró grupos de proteínas conservadas en los exosomas a pesar de su origen celular (Mathivanan and Simpson 2009).

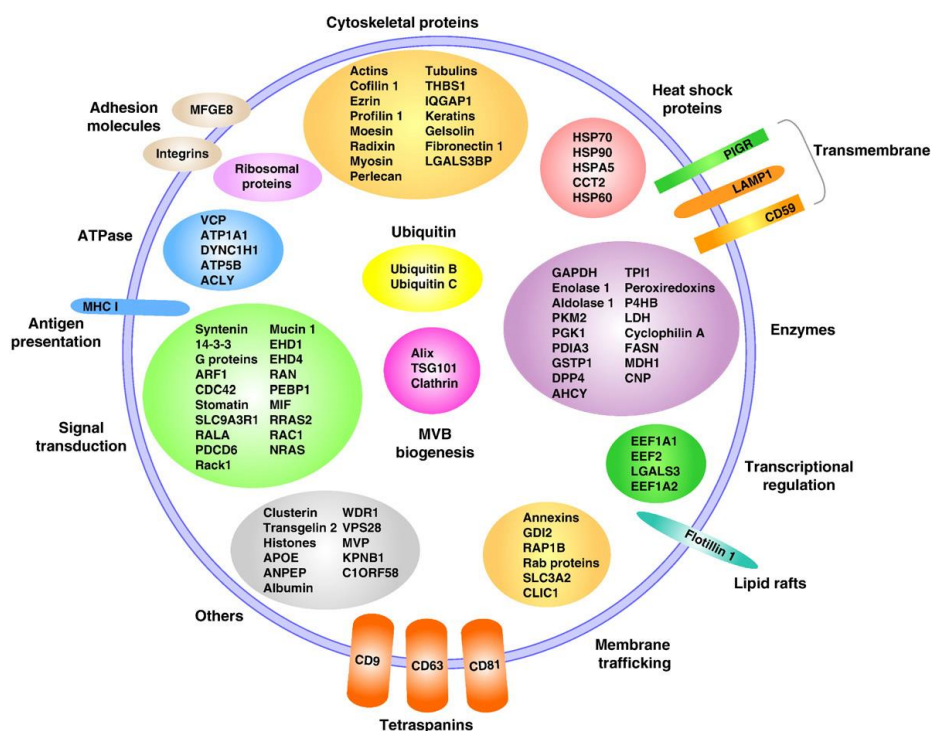


Figura 1.21.- Representación gráfica de la composición de proteínas de los exosomas categorizados según la función realizada. Tomado de (Mathivanan, Ji, et al. 2010).

### 1.14.3. Aislamiento y Caracterización de EVs.

Se requieren un métodos adecuados y estandarizados de aislamiento y caracterización de EV para profundizar nuestra comprensión biológica de las EV y su uso potencial como biomarcadores (Xu et al. 2016).

Hay varios métodos disponibles para la separación y el enriquecimiento de EVs de diferentes biofluidos (Figura 1.22). Muchos métodos utilizan propiedades físicas específicas de las EVs, es decir, su pequeño tamaño y baja densidad. Estos incluyen ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación en gradiente de densidad y fraccionamiento de flujo de campo asimétrico, entre otros (Oeyen et al.

2018). Otros métodos se basan en la precipitación de las EVs mediante, por ejemplo, polietilenglicol o protamina (Deregibus et al. 2016). Los métodos más avanzados se basan en la afinidad bioquímica que puede combinarse con tecnologías de microfluidos (Guo, Tao, and Dawn 2018). Los diferentes métodos independientes o combinados tienen sus ventajas y desventajas, lo que da como resultado un rendimiento y una pureza de EVs diferentes que influyen en los análisis posteriores (Deville et al. 2021) En este sentido la ultracentrifugación sigue siendo, la técnica de aislamiento más popular para EVs, independientemente del material de partida utilizado (Gardiner et al. 2016).

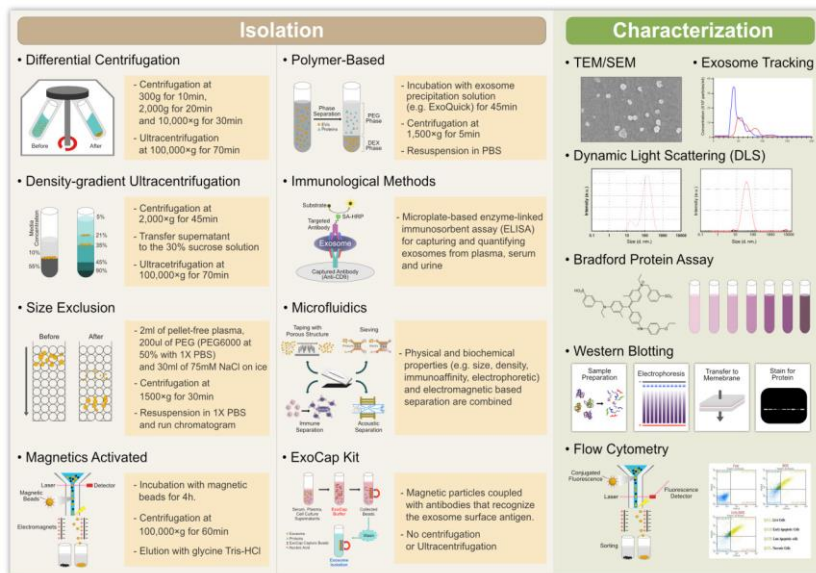
La diversidad de fuentes y metodologías impone desafíos en la comparación de los resultados de las mediciones entre estudios y características de la EVs (Royo et al. 2020).

En cuanto a la caracterización de las EVs los métodos existentes podrían distorsionar nuestra visión de la biología de los exosomas, comparando métodos directos para obtener imágenes de vesículas extracelulares y cuantificando el impacto de diferentes condiciones de producción y almacenamiento en la calidad de las muestras de EVs (Wu, Deng, and Klinke Ii 2015).

Las EVs aisladas también suelen contener una mezcla de contaminantes formada por pequeños orgánulos, lípidos, colesterol y otras micropartículas no deseadas (Morales-Kastresana et al. 2017). Es fundamental verificar la pureza de las muestras de EVs aisladas para validar la precisión de los resultados experimentales derivados del procesamiento de las muestras. Otra característica importante de las EVs que debe analizarse es la integridad de la micropartícula aislada. Además, las EV se pueden caracterizar para determinar el tipo de célula a partir de la cual se originó, basándose en la detección de antígenos de superficie de EVs que son idénticos a los

antígenos de superficie encontrados en su célula de origen. También, la caracterización de las EVs nos permite determinar el número de EVs liberadas (Carnino, Lee, and Jin 2019). En este sentido la caracterización de EVs individuales es un desafío debido al pequeño tamaño. Los métodos de análisis de EVs en total, como la PCR cuantitativa, las transferencias de Western y la espectrometría de masas, son ensayos de la población general en una muestra, en lugar de ensayos de EVs individuales o subconjuntos de EVs. El análisis por citometría de flujo de EVs permiten el estudio de poblaciones EVs específicos de interés mediante el uso de anticuerpos ligados a partículas que capturan las EVs para el análisis, pero sin información a nivel de una sola EVs (Melo et al. 2015). La Microscopía electrónica, el análisis de nanopartículas (NTA), son métodos útiles para caracterizar el tamaño y la concentración de los EVs en una solución (Arraud et al. 2014; Morales-Kastresana et al. 2017). Otro enfoque es buscar específicamente proteínas que son marcadores de las EVs. La transferencia de Western para marcadores como calnexina o gp96 entre otras proteínas se ha utilizado junto con las tetraspaninas para este propósito (Webber and Clayton 2013).





**Figura 1.22.- Técnicas para el aislamiento y caracterización de las propiedades funcionales de las EVs. Tomado de (Gurunathan et al. 2019).**

### 1.14.4. EVs en parásitos.

La mayoría de los parásitos en alguna etapa de su ciclo de vida dependen de la capacidad de comunicarse entre sí y con sus hospederos, pero los mecanismos que sustentan esta comunicación aún están aun poco a poco estudiándose (Coakley, Maizels, and Buck 2015).

En los últimos año, las EVs se han mostrado como otro componente de los productos de secreción de parásitos que proporcionan un mecanismo previamente no reconocido para empaquetar y proteger un conjunto de contenido del parásito para su absorción e integración en otras células, que se forman y descargan como instrumentos de reorganización estructural, respuesta al estrés y supervivencia (Deatheragea and Cooksona 2012).

Se han descrito diferentes EVs en la mayoría de los protozoos parásitos, incluidos flagelados, esporozoos y microsporidios, y se han detectado en estadios extracelulares e intracelulares. Además de los protozoos, se ha

demostrado que los helmintos parásitos también liberan EVs (Marcilla et al. 2014; Montaner et al. 2014). La secreción de EVs se conserva evolutivamente entre los organismos, y es un proceso celular constitutivo entre los protozoos parásitos (Deolindo, Evans-Osses, and Ramirez 2013).

Una serie creciente de estudios ha sugerido que los exosomas pueden vehiculizar moléculas a las células del hospedador y que pueden modular la respuesta inmune del hospedador (Samoil et al. 2018).

Las EVs se clasifican en función de las propiedades bioquímicas y proteínas de la superficie de la membrana que utiliza como marcadores (Wu et al. 2019). Sin embargo existe proteínas de superficie que son comunes a casi todas las EVs, en eucariotas, CD63, CD9, HSP 70, TSG101, flotilina y Rab5b son marcadores de exosomas (Jones et al. 2018; Shao et al. 2018).

En consecuencia, en protozoos han descrito en EVs la presencia de proteínas del citoesqueleto como Actina y tubulina, proteínas de estrés como la HSP70, HSP90, HSP83 / 90 o el factor de elongación-1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) así como muchas otras proteínas (Figura 1.23), (Ribeiro et al. 2018).

Aunque el mecanismo de secreción de EVs por tripanosomátidos aún no se ha aclarado por completo, parece bioquímicamente comparable al de las EVs de mamíferos en términos de densidad y morfología y en parte debido a su composición (Trocoli Torrecilhas et al. 2009).

Cabe destacar que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en diferentes modelos de tripanosomátidos, muestran que las EVs de parásitos transportan proteínas y material genético relacionado con la virulencia del parásito (Bautista-López et al. 2017; Rossi et al. 2021).

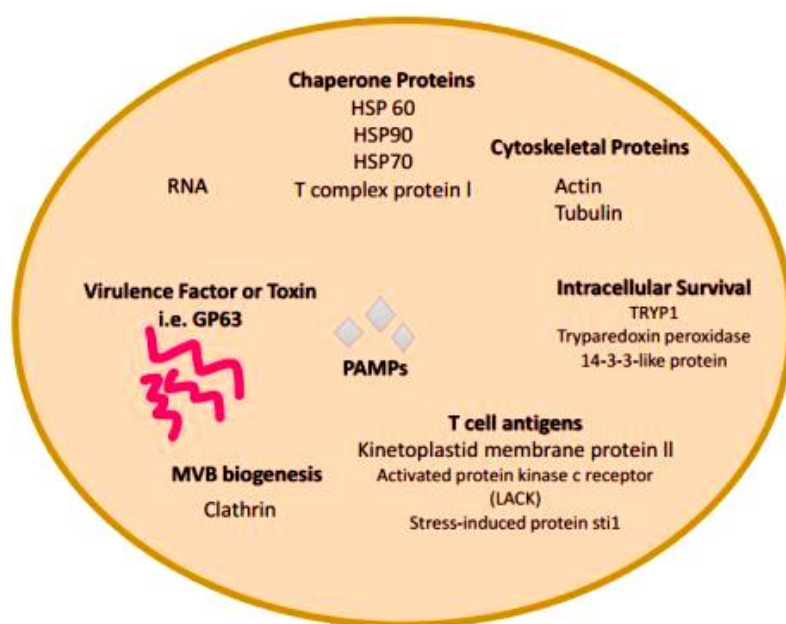


Figura 1.23.- Composición de exosomas derivados de protozoos. Tomado de (Jones et al. 2018).

#### 1.14.5. EVs de *T. cruzi*.

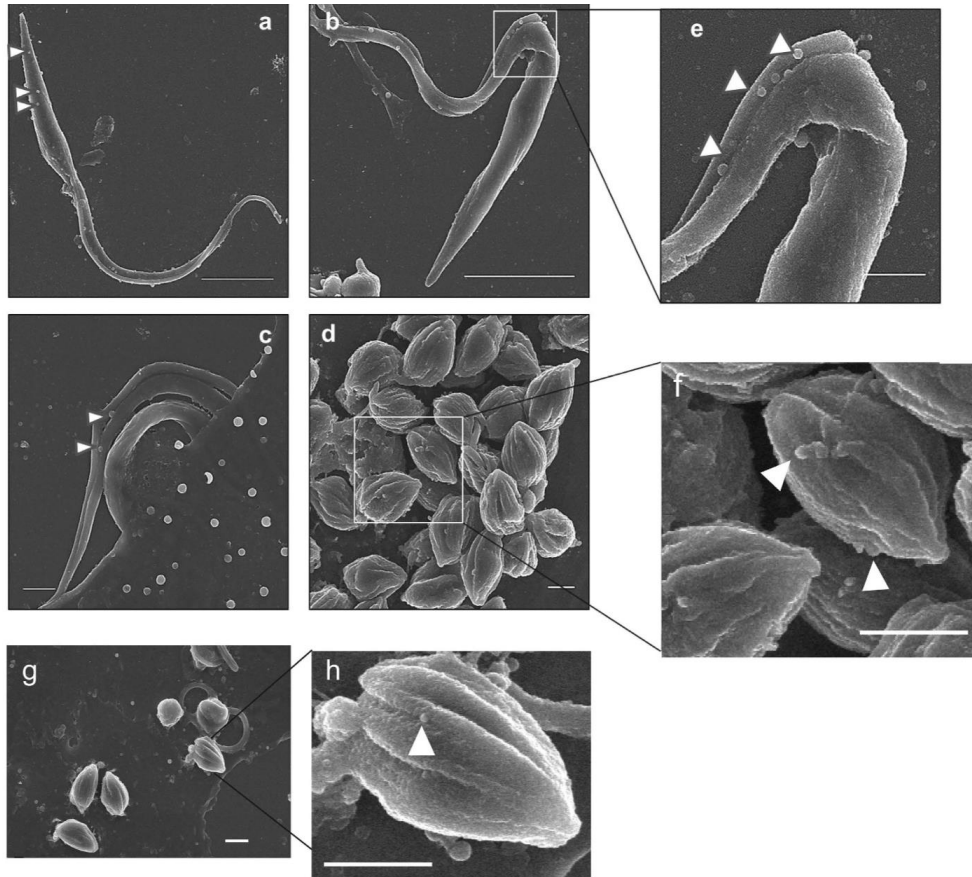
Las EVs de *T. cruzi* comenzaron a explorarse en 1979 y, hasta el día de hoy, muchos grupos han estado tratando de dilucidar el papel que juegan las EVs en los diversos procesos de la EC. El primer estudio describió que las vesículas de la membrana plasmática aisladas de *T. cruzi* tienen propiedades antigénicas (Da Silveira, Abrahamsohn, and Colli 1979) y otros estudios posteriores confirmaron estos hallazgos (Gonçalves et al. 1991).

Se conoce que en *T. cruzi* la liberación de EVs se origina en la bolsa del flagelo y que se producen en todas las etapas de desarrollo del parásito (Díaz

Lozano et al. 2017; De Pablos et al. 2016; Retana Moreira, Rodríguez Serrano, and Osuna 2019; Torrecilhas et al. 2012).

Investigaciones en este contexto han informado que los epimastigotes y los tripomastigotes de *T. cruzi* liberan dos clases de EVs que incluyen Ectosomas con origen en herniaciones de la membrana plasmática (Díaz Lozano et al. 2017) y una segunda población de vesículas más pequeñas derivadas principalmente de la fusión exocítica de cuerpos multivesiculares con la membrana la bolsa del flagelo (Figura 1.24) (Díaz Lozano et al. 2017; Garcia-Silva et al. 2014). También se ha descrito que es posible que los exosomas o microvesículas en *T. cruzi* tengan su origen en la red tubular del retículo endoplásmico y Golgi (Díaz Lozano et al. 2017).

Varios estudios posteriores han sugerido que las EVs desempeñan un papel importante en la dinámica parásito-huésped y en la fisiopatología de la enfermedad de Chagas. En las primeras etapas de la infección, el contacto de *T. cruzi* con las células huésped en el torrente sanguíneo promueve la liberación de EVs capaces de inhibir el ataque del complemento (Cestari et al. 2012) y aumenta la infección de parásitos a las células huésped (Neves et al. 2014; Ramirez et al. 2017; Retana Moreira et al. 2019). Jugando un papel en la lisis mediada por el complemento y la invasión de células eucariotas por el parásito (Díaz Lozano et al. 2017; M. P. Wyllie<sup>1</sup> and M. I. Ramirez<sup>1,2</sup> 2017; De Pablos et al. 2016; Retana Moreira et al. 2019). En cuanto al contenido de las EVs de *T. cruzi* y la eliminación de algunas proteínas a través de la secreción de vesículas, existen muchos factores que intervienen. La incubación de los epimastigotes de *T. cruzi* en medios de cultivo sin suero bovino fetal (FBS) también desencadena la transformación del parásito y la eliminación de algunas proteínas a través de la secreción de EVs (Bayer-Santos et al. 2013).



**Figura 1. 24.- Imágenes de liberación de EVs de *T. cruzi* analizadas mediante SEM. (a y b) epimastigotes derivados de cultivos celulares. (c) tripomastigotes metacíclicos que interactúan con células de mamíferos hospedadores, (d-h) formas intracelulares libre, (e, f y h) corresponden a imágenes ampliadas de (b, d y g). Las flechas indican las EVs liberadas. Barra de escala = 1  $\mu$ m. Tomado de (Díaz Lozano et al. 2017).**

Los medios de cultivo para inducir estrés nutricional, desencadenan la liberación de EVs de diferentes tamaños entre las cepas de *T. cruzi* (Ribeiro et al. 2018). Aparentemente, los medios privados de suero desencadenarán la formación de vesículas e inducirán la apoptosis (Gonçalves et al. 2018), que puede conducir a la liberación de diversas EVs de diferente composición, tamaño y biosíntesis (exosomas, ectosomas y cuerpos apoptóticos (Olajide and Cai 2020)).

En este sentido las EVs derivadas de tripomastigotes de *T. cruzi* están enriquecidos con  $\alpha$ -galactosil ( $\alpha$ -Gal) que desencadenan fuertes respuestas proinflamatorias en macrófagos murinos a través de la vía dependiente del receptor Toll-like (TLR2). El análisis proteómico de estos EVs reveló la presencia de varios miembros de la superfamilia TS / gp85 (Nogueira et al. 2015) (Ribeiro et al. 2018).

También se conoce que las respuestas inflamatorias que ocurren durante la infección por *T. cruzi* puede ser producida por las EVs del parásito (Nogueira et al. 2015). Asimismo, se ha demostrado que los tripomastigotes metacíclicos inducen la liberación de vesículas de la membrana plasmática recubiertas de TGF- $\beta$  de los macrófagos y linfocitos sanguíneos, lo que podría aumentar aún más la infectividad del parásito (Cestari et al. 2012; Ramirez et al. 2017). Sin embargo, se desconoce si las EVs liberados por macrófagos infectados por *T. cruzi* o las EVs aisladas del parásito modulan las respuestas inflamatorias y la invasión celular (Cronemberger-Andrade et al. 2020).

Otros estudios han descrito que las EVs contienen los principales glicoconjugados de la superficie del parásito, que modulan la invasión de las células huésped en un proceso clave de la infección por *T. cruzi*, ya que se ha encontrado que las moléculas de la superficie del parásito juegan un papel importante en la adhesión del parásito y la entrada en la vacuola parasitófora (Ribeiro et al. 2018). Al igual que la desorganización del citoesqueleto, la entrada masiva de Calcio, la permeabilización de la membrana celular al igual que la parada del ciclo celular en G0 o activación de la cascada de señales con acción directa sobre las proteínas Rho lo que sugiere una unión mediada por receptor (Retana Moreira et al. 2019).

Las EVs de *T. cruzi* participan en la invasión a través de un mecanismo independiente del reclutamiento de lisosomas. La invasión del parásito está

asociada con la activación de PI3K (Wilkowsky et al. 2001). Los receptores TLR2 activan PI3K durante la infección de *T. cruzi*, que conduce a la activación de Rab5, que es esencial para la formación del fagosoma (Maganto-Garcia et al. 2008). También se ha encontrado que la comunicación entre las células se produce mediante la liberación de contenidos exosomales que incluyen citocinas, péptidos, hormonas, microARN y numerosas sustancias bioactivas, que actúan en función de la inmunidad innata (Varikuti et al. 2020).

Varios grupos han indicado que los EV de *T. cruzi* inducen un perfil proinflamatorio en macrófagos, induciendo IL-6, IL-beta y TNF-alfa en diferentes patrones (Choudhuri and Garg 2020). Uno de los factores responsables del aumento de citocinas proinflamatorias parece ser la presencia de ADN oxidado en los EVs, que es reconocido por los sensores del ADN citosólico y activa el recetor NF-κB mediante activación de los TLR9 (Lovo-Martins et al. 2018). Estos estudios mostraron un perfil antiinflamatorio para los EVs de *T. cruzi*, ya que los macrófagos pretratados con EV tenían menos formación de cuerpos lipídicos y una producción reducida de PGE2 y TNF-alfa en comparación con el control (Lovo-Martins et al. 2018). Una explicación de este fenómeno podría ser el caso de la cepa Y de *T. cruzi*, ya que no parece inducir la producción de citocinas proinflamatorias (Nogueira et al. 2015). Estas divergencias experimentales pueden reflejarse en el rendimiento de las EVs en cada modelo, lo que justifica futuras investigaciones de las EVs en el complejo contexto de la EC.

### **1.15. Estudio de la interacción EV-célula.**

La interacción entre las EVs y las células han revelado muchas funciones importantes de las EVs, aún no está claro cómo los exosomas ingresan a las

células y su tráfico en las células. Varias hipótesis han descrito los mecanismos de interacción entre exosomas y células. Algunos investigadores han propuesto que, debido a su tamaño, la endocitosis y la fusión pueden ser los dos mecanismos más posibles de captación de exosomas. También se propuso que las células dendríticas internalizan los exosomas a través de la endocitosis (Morelli et al. 2004). Un estudio reciente indicó que la captación de exosomas por las células fagocíticas se produciría a través de la fagocitosis, (Feng et al. 2010a). Los exosomas podrían ser internalizados por células tumorales a través de la fusión (Parolini et al. 2009). Por último, también se ha estudiado el tráfico intracelular de los componentes del exosoma en la célula (Tian et al. 2010).

Un paso fundamental para la comunicación EVs-células es la adhesión. La adhesión de los exosomas a las células requiere el cambio conformacional de las integrinas de un estado de afinidad baja a una alta. Esto permite la oligomerización de las integrinas y el acoplamiento con elementos del citoesqueleto, para facilitar la unión de alta avidéz de la célula a la EVs unida a la integrina de las células (Morelli et al. 2004).

En el caso de los EVs de células eucariotas las tetraspaninas también tienen un papel en la adhesión, motilidad, transducción de señales y activación celular. Se han informado varias tetraspaninas en la superficie de los exosomas, incluidos CD9, CD53, CD63, CD81 y CD82, aunque la combinación y la proporción de exosomas que expresan una tetraspanina particular difieren según la célula de origen. Las tetraspaninas forman complejos heterobimoleculares con las integrinas (McKelvey et al. 2015).

Se considera que la endocitosis es el principal mecanismo de captación de exosomas. La endocitosis se puede dividir en al menos cuatro vías, que



incluyen endocitosis dependiente de caveolas, endocitosis dependiente de clatrina, macropinocitosis y fagocitosis (Horibe et al. 2018).

La fagocitosis es un mecanismo mediado por actina que requiere la presencia de receptores de opsonina específicos (es decir, receptores FcR y del complemento), receptores de tipo Toll. Si bien la fagocitosis la realizan típicamente "fagocitos profesionales" como los macrófagos y las CD, también pueden realizarla células "no profesionales" (Wu et al. 2009).

Se demostró que la fagocitosis de los exosomas depende del citoesqueleto de actina, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y dinamina2 (Feng et al. 2010b). En particular, la actina, PI3K y dinamina2 se han asociado tanto en la endocitosis mediada por clatrina como en la fagocitosis (Grassart et al. 2014).

La Endocitosis mediada por clatrina (CME) es un proceso endocítico mediado por receptores que implica la interacción entre el ligando en la superficie exosómica y los receptores específicos presentes en la membrana plasmática para la internalización. Utiliza complejos de clatrina y proteína AP2 para la posterior formación de vesículas recubiertas de clatrina para la internalización de moléculas. Las vesículas recubiertas de clatrina alteran la estructura de la membrana plasmática y dan como resultado la invaginación de la membrana. Posteriormente, las vesículas intracelulares se someten a un revestimiento de clatrina para fusionarse con el endosoma y transferir la carga de las moléculas (Jadli et al. 2020).

La Endocitosis dependiente de caveolina (CDE) es una endocitosis mediada por balsas, que requiere la presencia de caveolina, una proteína dimérica con microdominios ricos en colesterol, en la membrana plasmática. Las caveolas son pequeñas invaginaciones en forma de matraz en la membrana plasmática

implicadas en un transporte extenso transcelular. Las caveolas representan subdominios ricos en caveolina, colesterol y esfingolípidos de las balsas de glicolípidos de la membrana plasmática. La morfología única de las caveolas es conferida por la caveolina, que se incrusta en la cara interna de la membrana plasmática como un bucle en horquilla con sus extremos N y C expuestos al citoplasma y forma una capa de caveolina en forma de espiga en las caveolas. La caveolina-1 (Cav1) interactúa con el colesterol para la formación de invaginaciones en la membrana (Nabi and Le 2003).

Por otro lado durante la macropinocitosis, las protuberancias de la membrana plasmática impulsadas por filamentos de actina forman una invaginación que endocitan inespecíficamente el líquido extracelular y las partículas pequeñas como las EVs. Se ha descrito que la fosfatidilserina (PtdSer) presente en la superficie de exosomas activan la macropinocitosis en macrófagos sin capacidad de la presentación antigénica y que la macropinocitosis de exosomas depende de  $\text{Na}^+$  y PI3K (Fitzner et al. 2011).

La endocitosis mediada por receptores y la endocitosis mediada por balsas requieren un ligando en la superficie exosomal para activar receptores específicos en la membrana plasmática celular, o la presencia de microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos en la membrana plasmática, respectivamente. El primero, también llamado endocitosis mediada por clatrina, utiliza complejos de clatrina y proteína adaptadora 2 AP2, que recubren la membrana e inducen la invaginación de la membrana en una vesícula. Este último incluye endocitosis mediada por caveolas, así como los mecanismos de endocitosis independientes de clatrina y caveolas, endocitosis regulada por RhoA, CDC42 y ARF6, que utilizan distintas combinaciones de dinamina, flotilina y / o proteínas Rab (Mayor and Pagano 2007).

La endocitosis de los exosomas, ya sea por macropinocitosis o por mecanismos mediados por receptores o balsa, siempre da como resultado el vertido de la carga vesicular a la vía endosomal. Las primeras endosomas actúan como compartimento de clasificación. Los que se envían a los endosomas tardíos se envían unidireccionalmente para su degradación por fusión con lisosomas; mientras tanto, algunas proteínas y fluidos pueden ser redirigidos de regreso a la membrana plasmática a través del reciclaje de endosomas. Sin embargo, incluso los enviados al endosoma tardío pueden escapar a la degradación por la red trans-Golgi (McKelvey et al. 2015).

Cada tipo de célula diferente puede utilizar diversas vías de captación de EV pero, en general, la captación de EV parece ser un proceso complejo y cooperativo que implica una combinación de diferentes vías (Toribio et al. 2019).

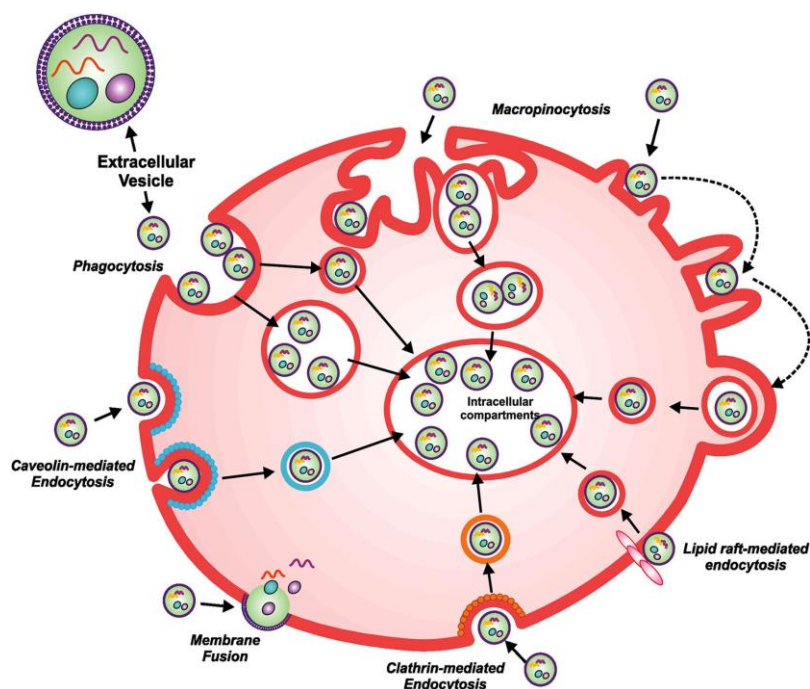


Figura 1.25.- Mecanismos de captación de exosomas por las células receptoras. Tomado de (Jadli et al. 2020).

## Capítulo 2

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

## 2. Justificación y objetivos.

### 2.1 Justificación.

Las enfermedades conocidas como desatendidas, cada vez cobran mayor atención en la comunidad científica y organismos internacionales ya que siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo, creando problemas económicos y Sanitarios en países desarrollados donde estas infecciones suponen un gasto considerable a la sanidad consecuencia del incremento de las poblaciones migrantes procedentes de áreas endémicas.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por *T. cruzi* para la que no existe profilaxis, ni inmunoprofilaxis ni quimioprofilaxis, ni un tratamiento eficaz capaz de eliminar y revertir los daños que causa el parásito en los afectados, que al final tendrán o afectación cardíaca grave o síndromes mega intestinales.

En esta Tesis Doctoral, partiendo de un estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas, en dos zonas de desarrollo socioeconómico bien diferente en Panamá se han estudiado, mediante métodos moleculares basados en ADN circulante en el suero de pacientes crónicos no solo la parasitación sino las diferentes cepas circulantes del parásito y que pueden coexistir en un mismo paciente, lo que puede significar una diferente patología en dichos pacientes. Hasta ahora solo los *Trypanosomas* de la DTU I habían sido descritos en el país. La variabilidad de *T. cruzi* ha sido ampliamente demostrada utilizando diferentes estrategias biológicas, bioquímicas y moleculares dirigidas a diferentes marcadores genéticos, permitiendo la identificación de seis unidades discretas de tipificación (UDT's) con la adición de una nueva a la que se denomina TcBat, originaria de murciélagos.

Los subtipos aislados y caracterizados globalmente de *T. cruzi* se han designado como Tc I, Tc IIa a Tc IIe. El concepto de DTU se refiere a un conjunto de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población.

Panamá además de ser un país endémico para la EC, por su posición geográfica y socioepidemiología, es zona de tránsito de población, reservorios y posiblemente vectores, es una zona donde a su vez convergen todos los factores para que se presente a parte de la DTU I que ya se ha descrito en el país, otras cepas de *T. cruzi* que puedan cambiar las características y manifestaciones clínicas de la enfermedad de los pacientes.

Partiendo de estas muestras de pacientes crónicos se ha profundizado en los métodos de diagnóstico tanto moleculares como inmunológicos, donde se estudia el reconocimiento antigénico por parte de los anticuerpos del suero de los pacientes del secretoma particulado (Exovesículas) de las formas infectivas (tripomastigotas procedentes de cultivos celulares). De igual manera, la presencia de inmunocomplejos formados por las Exovesículas y las inmunoglobulinas de los pacientes chagásicos a fin de reconocer, en primer lugar, su presencia y las diferentes subclases de IgGs que reconocen los antígenos del secretoma parasitario, poniendo esto de manifiesto la presencia de material biológico del parásito aun en enfermos crónicos. Por lo que la identificación de marcadores inmunológicos que evalúan la progresión de la enfermedad puede constituir una herramienta valiosa para el control del tratamiento y evaluar la progresión de la enfermedad.

En este contexto el éxito de la infección por *T. cruzi* depende de una serie de mecanismos complejos que permiten al parásito evadir la respuesta inmune del huésped. De hecho, *T. cruzi* emplea una variedad de estrategias para escapar de los efectos de la inmunidad tanto innata como adaptativa.

Estudios de causas etio-patológicas de las manifestaciones chagásicas, atribuyen a los anticuerpos como una causa importante de miocarditis durante la enfermedad de Chagas. Según estos estudios, el mimetismo molecular entre el huésped y los antígenos de *T. cruzi* provocarían la producción de anticuerpos con reactividad cruzada, lo que sería responsable del daño tisular del huésped. Numerosos trabajos muestran la reactividad cruzada de anticuerpos de suero de pacientes infectados por *T. cruzi* con proteínas del huésped. Sin embargo, se acepta que el daño tisular en el miocardio se atribuye a una respuesta inflamatoria del huésped exacerbada, a través de la producción de interleucinas inflamatorias. La respuesta Th1 podría inducir un anticuerpo subclases IgG<sub>2</sub> / IgG<sub>3</sub>, mientras que una respuesta Th2 promueve IgG<sub>1</sub> / IgG<sub>4</sub> e IgE.

Teniendo en cuenta que *T. cruzi* utiliza diversas estrategias para evadir el sistema inmune del huésped con el fin de establecer la infección, los mecanismos involucrados en la evasión podrían ser objeto de estudios para ser explorados en el contexto de la prevención y el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

En este contexto las exovesículas (EVs) de *T. cruzi* pueden contribuir a uno de los mecanismos usados por el parásito para evadir la respuesta y permitir sobrevivir al sistema inmune. Dado que dichas exovesículas engloban proteínas y los ARN transportados y están protegidos contra la hidrólisis o la degradación en el entorno extracelular, se los considera una fuente potencial de biomarcadores de enfermedades. Estas propiedades de las EVs hacen que los estudios con dicho secretoma sean prometedores en las enfermedades olvidadas, incluida la enfermedad de Chagas.

Los EVs pueden ser significativamente útiles para descubrir biomarcadores para una posible identificación de objetivos, así como para pronósticos, diagnósticos y desarrollo de vacunas.

Tomando en consideración las implicaciones de las EVs de *T. cruzi* en el desarrollo de las diferentes etapas de la enfermedad de Chagas, el objetivo de esta Tesis Doctoral es conducir a una mejor comprensión y conocimiento del papel que proporciona la interacción de las EVs en el hospedador, evaluando el tipo de respuesta inmune que levantan y los mecanismos de interacción con la célula hospedera.

## **2.2. Objetivo General**

Objetivo General:

Determinar el papel de las exovesículas de origen parasitario en el diagnóstico y confirmación de la parasitemia en sueros de dos poblaciones de enfermos crónicos chagásicos en Panamá, evaluando y caracterizando las diferentes variedades genéticas (DTUs) que afectan a dichos pacientes.

Evaluar el papel de las exovesículas del parásito en el suero de los pacientes y sus implicaciones en el diagnóstico y subclases de inmunoglobulinas que las reconocen. Así como evaluar en modelos experimentales de ratón, la biodistribución, tipo de respuesta inmune que levantan las exovesículas de las formas infectantes y estudiar los mecanismos de interacción y entrada de las exovesículas en las células con las que interaccionan.



### 2.3 Objetivos específicos.

1. Evaluar y diagnosticar de manera directa e indirecta a nivel serológico y molecular la parasitación por *T. cruzi* en poblaciones urbanas y rurales de Panamá tomando en cuenta sus características socioeconómicas y demográficas.
2. Estudiar las Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) (variantes Genéticas) con el ADN circulante del parásito en las muestras de sangre de los pacientes chagásicos diagnosticados, a fin de determinar las cepas del parásito responsables de la infección en Panamá.
3. Determinar la presencia de las exovesículas circulantes de *T. cruzi* en los sueros de los pacientes crónicos, como biopsia líquida, para su uso en el diagnóstico inmunológico confirmatorio de la parasitación por *T. cruzi*.
4. Estudiar la existencia de inmunocomplejos circulantes en el suero de los pacientes, formados por EVs con antígenos del parásito - Inmunoglobulinas del hospedador y tipificación de las subclases e isotipos de inmunoglobulinas que los forman.
5. Estudiar la biodistribución de las EVs *T. cruzi* o los inmunocomplejos que forman, a fin de localizar los órganos de destino y estudiar las diferentes respuestas inmunes que desencadenan.

6. Estudiar los mecanismos de internalización de las EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* en diferentes tipos de células mediante técnicas microscópicas de alta resolución.
  
7. Estudiar las interacciones intermoleculares existentes entre las exovesículas de tripomastigote de *T. cruzi* e inmunocomplejos y anticuerpos frente a ligandos específicos de la superficie de las EVs del parásito mediante Microscopia de Fuerza Atómica.

## Capítulo 3

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

### **3. Materiales y Métodos.**

#### **3.1. Estudio de muestras de pacientes chagásicos crónicos de Panamá.**

En este estudio se evaluaron características clínicas, epidemiológicas, serológicas y moleculares que adopta esta zoonosis en el país, en un grupo de pacientes crónicos a los cuales se les aplicó una serie de protocolos que se describen a continuación.

##### **3.1.1. Consideraciones éticas para la obtención y análisis de muestras de pacientes chagásicos crónicos.**

El estudio realizado fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Santo Tomás de la ciudad de Panamá, y le fue asignado el código de identificación N° 2015-310 V1. Tras informar a la población en qué consistía el estudio, todos los pacientes evaluados estuvieron de acuerdo en participar y firmar un consentimiento informado. Seguidamente se llevó a cabo la recolección de las muestras procediéndose como lo muestra la figura 3.1.1.

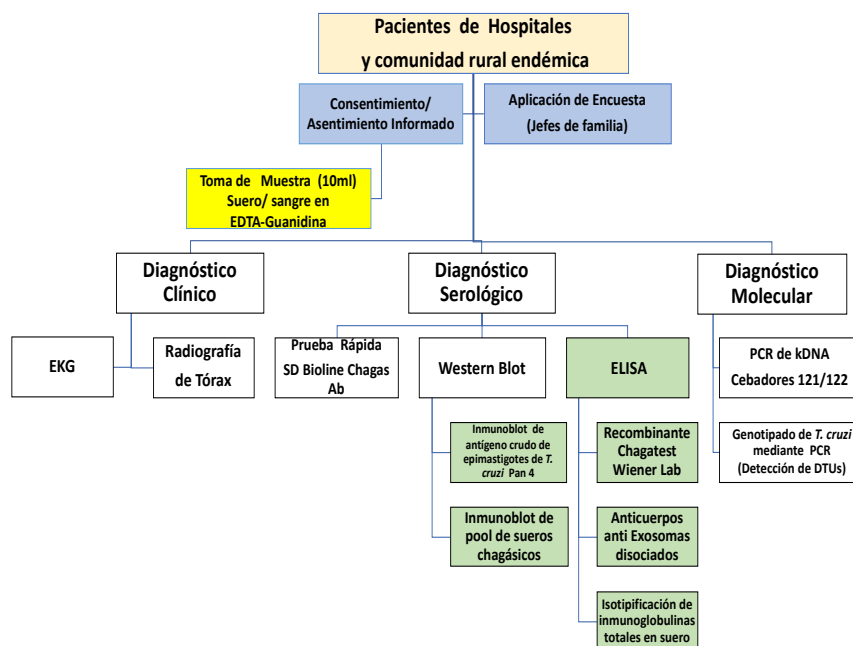


Figura 3.1.1. Diagrama de flujo de procedimientos para estudio de muestras chagásica de pacientes panameños.

### 3.1.2. Población y muestra.

A los participantes del estudio se le realizó una encuesta de conocimiento, actitudes y prácticas sobre la enfermedad de Chagas y se les explicó el consentimiento informado. Se tamizaron 106 muestras de pacientes procedentes del servicio de Cardiología del Hospital Santo Tomás, Bancos de Sangre de hospitales de la Caja de Seguro Social (C.S.S) y personas de la comunidad rural endémica de Chararé, en el Corregimiento de Las Margarita, Distrito de Chepo, Provincia de Panamá, que participaron en el estudio de forma voluntaria. La colecta de muestras se realizó entre enero 2016 y enero del 2017.

A todos los individuos que aceptaron participar del estudio se les tomaron dos muestras de sangre venosa. La primera se colectó en tubos de EDTA (BD Vacutainer™, 367863) para los ensayos moleculares, donde se

mezclaron 5 mL de sangre en proporción 1:1 con una solución de clorhidrato de guanidina 6 M (Sigma Aldrich, G4505) y EDTA (Sigma Aldrich, ED4SS) 200 mM, pH 8,0. Estas muestras se conservaron a temperatura ambiente durante al menos 4 días. Para la segunda muestra se utilizaron tubos de suero (BD Vacutainer™, 366430), donde se colectaron 5 ml de sangre. Luego de formarse el coágulo cada tubo fue centrifugado a  $1,500 \times g$  durante 10 min, de los cuales se recogieron aproximadamente 2.0 mL de suero para llevar a cabo las diferentes pruebas serológicas.

### **3.1.3. Estudio Serológico.**

Las muestras de suero de 106 pacientes fueron recolectadas según los protocolos establecidos, se analizaron para detectar anticuerpos anti *T. cruzi* siguiendo los procedimientos de dos ensayos comerciales (ELISA recombinante Chagatest, (Wiener Lab, Argentina) y SD (Bioline Chagas AB), prueba rápida cualitativa para la detección de anticuerpos de *T. cruzi*. La prueba rápida se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la cual tiene una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 99.2%. (Umezawa et al. 2004) Los sueros positivos se confirmaron con una técnica de inmunotransferencia (prueba de referencia) con una preparación antigénica de epimastigote sin purificar, procedente de una cepa panameña de *T. cruzi* (Burunga) descrita por Saldaña y colaboradores (Saldaña, Sousa, and Orn 1995). Las muestras se consideraron positivas cuando mostraron reactividad en al menos dos de estas tres pruebas (Caballero et al. 2007; WHO, World, and Health Organization 2002).

### 3.1.3.1. Prueba Rápida SD Chagas Ab.

La prueba SD Bioline Chagas Ab Rapid (Abbott, 49FK10) es una prueba de inmunocromatografía para la detección de anticuerpos para *T. cruzi* en plasma, suero o sangre total humana.

El dispositivo de la prueba rápida Chagas Ab tiene dos líneas precubiertas, (línea de prueba) "T" y (línea control) "C" sobre la superficie de la membrana, como se muestra en la Figura 3.1.2.



**Figura 3.1.2.- Casete de prueba rápida Chagas Ab.**

Tanto la línea de prueba como la línea control en la ventana de resultados no son visibles antes de aplicar cualquier muestra, la línea control es usada como control del procedimiento; debe siempre aparecer si el procedimiento de la prueba es realizado apropiadamente y los reactivos de prueba de la línea control están funcionando. La presencia de dos bandas de color será visible en la ventana de resultados si hay suficientes anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra. Si los anticuerpos de *T. cruzi* no están presentes o están presentes en un muy bajo nivel en la muestra, no aparece color en la línea de prueba. Cuando se adiciona un suero al pocillo de muestra, los anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra reaccionaran con el conjugado antígeno oro (Au)

coloidal de *T. cruzi* recombinante y forma un complejo antígeno-anticuerpo. El complejo migra a lo largo del dispositivo de prueba por acción capilar, el cual es capturado por el antígeno de *T. cruzi* recombinante en la línea a través del dispositivo de prueba y genera una línea de color.

Para llevar a cabo la prueba se agregaron 100 µL de suero en estudio en el pocillo de muestra y 50 µL del tampón del ensayo (100 mM Tris-Cl (5 ml), Azida de Sodio (NaN<sub>3</sub>). La lectura de la prueba se realizó visualmente después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente. La sensibilidad de la prueba es de 99.2% y la especificidad es 100% (Ji et al. 2009).

Interpretación de resultados: Figura 3.1.3.

Resultado Negativo: La presencia de solamente una banda de color purpura dentro de la ventana de resultados indica un resultado negativo.

Resultado Positivo: La presencia de dos bandas de color (banda T y banda C) sin importar cual aparezca primero indica un resultado positivo.

Resultado Invalido: Si la banda de color purpura no es visible dentro de la ventana de resultados después de realizar la prueba, el resultado es considerado invalido. Se recomienda analizar nuevamente la muestra.

Cualquier muestra positiva con la prueba rápida Chagas Ab SD Bioteline fue confirmada con métodos de prueba alternos.

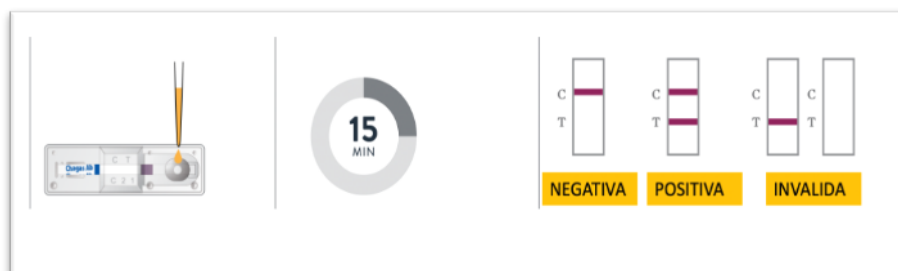


Figura 3.1.3.- Interpretación de resultados del casete de prueba rápida Chagas Ab.



### 3.1.3.2. ELISA Chagatest.

En esta técnica comercial cualitativa ELISA Chagatest (Wiener Lab, 1293257) de tercera generación se utilizaron antígenos recombinantes inmovilizados. Estos antígenos son obtenidos por técnica recombinante de proteínas específicas de los estadios epimastigote y tripomastigote del *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. Las técnicas de ELISA o comerciales empleadas en esta Tesis se describen más adelante. Las muestras que contienen los anticuerpos específicos forman un complejo con los antígenos unidos al sustrato de la placa. La fracción no unida se elimina por lavado. Se agregaron anticuerpos anti-inmunoglobulina humana conjugados con peroxidasa (Affranchino et al. 1989; Frasch and Reyes 1990). Se emplearon 10 µL de suero obtenido por punción venosa de cada paciente y se diluyeron en 200 µL del diluyente de muestra (albúmina bovina en solución fisiológica tamponada con buffer fosfato pH 7,2). Se incubó por 30 minutos a 37°C y luego se lavó 5 veces con el tampón de lavado diluido 1:5 (cloruro de sodio 1,4 mol/L en tampón fosfato 100 mmol/L y tensioactivo no iónico Tween 20, 0,1 g/L). Posteriormente se agregaron 50 µL del conjugado (anti-inmunoglobulinas humanas (cabra) conjugadas con peroxidasa) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Seguidamente se realizaron 5 lavados con 300 µL de tampón de lavado (PBS-T).

Tras los lavados se agregaron 50 µL de cada uno de los reveladores A (peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en buffer citrato 50 mmol/L pH 3,2) y B (Diaminobenzidina (DAB) tetrahidroclorhidrica 0,1N) incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se agregaron 50 µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2 N) y se procedió a realizar la lectura a

490 nm en un lector Multiskan® Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Finlandia)

Tanto las muestras como los controles negativos (dilución de suero no reactivo, inactivado) y positivos (dilución de suero inactivado conteniendo anticuerpos contra el *T. cruzi*) se realizaron por triplicado.

Los criterios de validación de la prueba se obtuvieron a través del cumplimiento de 2 condiciones específicas relacionados a los controles.

La primera condición es que la lectura de al menos 2 de los 3 controles negativos corregidas contra el blanco de reactivos debe ser menor o igual a 0,150 D.O y la segunda es que la lectura media de los controles positivos corregida debe ser mayor o igual a 0,600 D.O.

La interpretación de los resultados se determinó relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor cut-off.

El cut-off de la prueba se calculó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, utilizando el valor del  $CN + 0.300 DO$ , donde CN es el promedio de las lecturas del control negativo. Se considera como zona indeterminada el valor de cut-off  $\pm 10\%$ .

Las muestras no reactivas son aquellas con absorbancias menores al límite inferior de la zona de indeterminación. Las muestras reactivas tienen absorbancias mayores al límite superior de la zona de indeterminación y las muestras indeterminadas tienen absorbancias que caen dentro de la zona de indeterminación.

### **3.1.3.3. Western Blot.**

La transferencia del perfil electroforético de los polipéptidos de *T. cruzi* a membranas de nitrocelulosa fue realizada siguiendo la metodología descrita por Towbin 1979 adaptada y descrita para este caso por Saldaña y

colaboradores (Saldaña et al. 1995).

Para la producción de tiras individuales conteniendo el perfil proteico de *T. cruzi*, se utilizaron geles de SDS-PAGE al 10% con un sólo pozo. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia MINI-PROTEAN III a 100 voltios constantes por 1 hora. Se determinó la eficacia de la transferencia mediante la tinción de la membrana de nitrocelulosa con colorante rojo Ponceau (Rojo Ponceau al 2% en 5% ácido acético).

Luego se cortó la membrana en tiras de 3mm de ancho, y se incubaron con solución de bloqueo (leche en polvo descremada al 5% en PBS-Tween 0.1%) por al menos dos horas a temperatura ambiente y bajo agitación constante. Las membranas bloqueadas se congelaron a -20°C hasta su posterior uso. Cada membrana fue incubada con una dilución 1:100 (en solución de bloqueo) de los sueros de los pacientes evaluados. La incubación se realizó bajo agitación, a temperatura ambiente, toda la noche, en tubos de 2.5mL conteniendo la tira de nitrocelulosa y 700µL de la dilución del suero. Luego de lavar las tiras 3 veces con PBS se agregó un conjugado anti-inmunoglobulinas totales humanas IgA, IgG, IgM (DAKO, P0212) diluido 1:700 en PBS por una hora. Seguidamente cada tira fue lavada 3 veces con PBS 1X antes de agregar el sustrato-cromógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS, NiCl, DAB), la reacción se detuvo con agua del grifo, aproximadamente después de 10 minutos. Las tiras se dejaron secar entre dos hojas de papel filtro y se fotografiaron para la interpretación de los perfiles generados al compararlas con los patrones mostrados en la Figura 3.1.4.

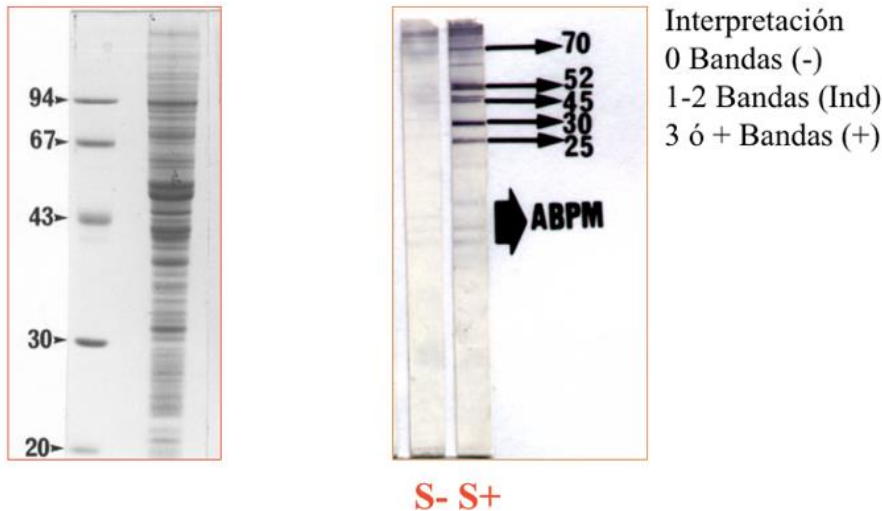


Figura 3.1.4.- Interpretación de los resultados de los sueros estudiados mediante Western Blot-Chagas. A la izquierda se observan bandas antigénicas para *T. cruzi* SDS PAGE 10% y a la derecha se observa las bandas antigénicas marcadoras.

### 3.1.4. Ensayos moleculares.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirve como indicador de la presencia de parásito en la sangre y puede usarse también en tejidos infectados. Mediante este procedimiento se pueden amplificar secuencias del DNA nuclear de *T. cruzi* o bien secuencias de DNA del kinetoplasto, La amplificación de DNA del kinetoplasto es la que tiene mayor sensibilidad en comparación con la amplificación de DNA nuclear, permitiendo la detección de hasta un parásito en 100 ml de sangre (0.005 parásitos/mL)<sup>3</sup>. Con ello se obtiene una ventaja en el diagnóstico diferencial frente a otros tripanosomátidos como *Leishmania spp* (Martínez, Cervantes-Landín, and Espinoza 2013).

#### 3.1.4.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit de purificación High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, 11796828001). Brevemente, 500  $\mu$ L de sangre total con guanidina-EDTA, 40  $\mu$ L de proteinasa K y 100  $\mu$ L de tampón de unión (guanidina-HCl 6M, urea 10 mM, Tris-HCl 10 mM y 20% Triton X-100 (v/v), pH 4.4 ) se mezclaron en vortex y se incubaron a 70° C por 10 min (Zulantay et al. 2007). Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol y se transfirieron a una columna comercial provista por el kit. Seguidamente se centrifugó a 8000  $\times$  g durante 1 min. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ L del tampón capaz de eliminar los inhibidores del enzima DNA Polimerasa, se centrifugó a 8000  $\times$  g durante 1 min y se agregaron 2 volúmenes de 500  $\mu$ L de tampón de lavado (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, pH 7.5 y etanol absoluto). Seguidamente se cambió el tubo colector y centrifugó a 13,000  $\times$  g durante 10 seg para eliminar restos de tampón. Finalmente, se eluyó en 50  $\mu$ L del tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5) suministrado con el kit. Se cuantificó la concentración del DNA extraído utilizando un equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis (Figura 3.1.4.1).

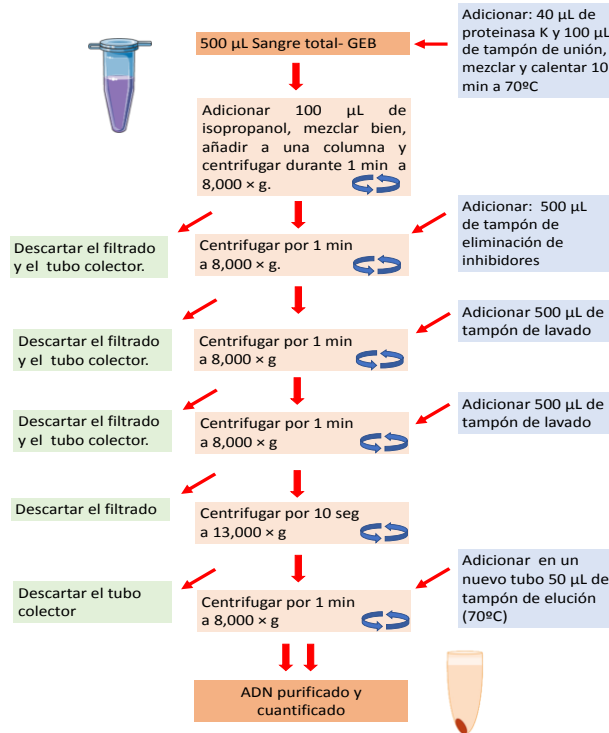


Figura: 3.1.5.- Extracción de DNA

### 3.1.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *T. cruzi*.

Todas las muestras de sangre de los pacientes de este estudio fueron analizados por PCR para la región variable del minicírculo (kDNA) de 330 pb, a través de protocolos descritos por Zulantay y col, 2007 (Zulantay et al. 2007). Se realizó una PCR en un termociclador CFX96™ Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD, Singapore), con los cebadores específicos 121 (AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA) y 122 (GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA) utilizando 5 µL de ADN molde en un volumen final de 25 µL de reacción (Tabla 3.1.1). Las condiciones de temperatura fueron una etapa de desnaturalización inicial de

3 minutos a 94 °C; posteriormente dos ciclos de alineamiento de 1 minuto a 97.5 °C y 2:30 minutos a 64 °C, seguido de 32 ciclos de extensión de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 62 °C y una etapa de extensión final de 10 min a 72°C (Burgos et al. 2007). Los productos de PCR de kDNA se mezclaron con tampón de carga de DNA (Invitrogen, 10816-015) y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (Condalab, 8010.22) al 1,0 % teñido con Sybr® Safe DNA (Invitrogen, S33102). Se incluyó en la electroforesis un marcador de peso molecular de DNA de 50 a 1000 pb (Canvax, L0009) y se evaluaron con luz ultravioleta para detectar la amplificación del fragmento específico de 330 pb del kDNA de *T. cruzi* en un equipo de análisis de imágenes ChemiDoc® (Bio-Rad Laboratories, EE. UU). Se incluyeron controles positivos y negativos para cada reacción de amplificación.

**Tabla 3.1.1: Reactivos y volúmenes empleados para las reacciones de PCR de la amplificación del fragmento de kDNA de *T. cruzi*.**

---

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (µL)</b>
Agua	7.5
Tampón 10X Go Taq® flexi buffer	5.0
MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM	2.5
dNTPs 25mM	2.4
Oligonucleótido-F (10 mM)	1.25
Oligonucleótido-R (10 mM)	1.25
Go Taq® (Promega, USA) 1,0 U	0.125
DNA molde	5.0
Volumen final	25.0 µL

---

### 3.1.4.3. Genotipado de *T. cruzi* mediante ensayos de PCR para la determinación de UDTs.

Para la identificación de las UDT de *T. cruzi* detectables en las muestras de sangre, se realizó una serie de PCRs dirigidas a diferentes marcadores genómicos, siguiendo el algoritmo basado en PCR descrito por Burgos y colaboradores (Burgos et al. 2010), como se describe en la figura 3.1.6, utilizando una serie de secuencias de cebadores y condiciones de amplificación descritas en la tabla 3.1.2. El algoritmo de tipificación de DTU incluyó las siguientes dianas genómicas de *T. cruzi*:

(1) se utilizó la región Intergénica Spliced Leader (SL-IR PCR) para distinguir *T. cruzi* I (150 pb), II, V y VI (157 pb) de *T. cruzi* III y IV (200 pb); (2) se usó SL-IR-I de primera ronda y semianidada para identificar DTU de *T. cruzi* I (475 pb y 350 pb, respectivamente), y se usó SL-IR-II de primera ronda y semianidada para identificar DTU *T. cruzi* II, V y VI (425 pb y 300 pb, respectivamente); (3) se usó una PCR semianidada de ADN ribosómico  $\alpha$ -24S para distinguir *T. cruzi* V (125 o 125 + 140 pb) de *T. cruzi* II y VI (140 pb); y (4) se usó una PCR en tiempo real hemianidada dirigida al fragmento A10 para discriminar *T. cruzi* II de *T. cruzi* VI. Las muestras que dieron resultados positivos de la PCR SL-IR-II pero resultados negativos de la PCR del ADN ribosomal 24S  $\alpha$  se notificaron como *T. cruzi* II, V o VI (II / V / VI). Las muestras que amplificaron el fragmento de ADNr de 24Sa de 140 pb pero los resultados negativos de la PCR en tiempo real dirigida a A10 se informaron como *T. cruzi* II o VI, como se describe en Burgos y colaboradores (Burgos et al. 2010). La genotipificación de las muestras fue realizadas en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET), Argentina por el Dr. Alejandro Schijman.



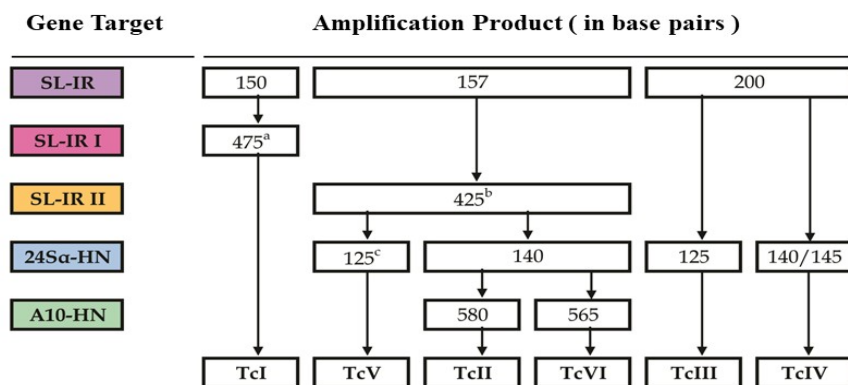


Figura 3.1.6.- Diagrama de flujo para la identificación de unidades discretas de tipificación (UDT) de *T. cruzi* (Burgos et al. 2010).

**Tabla 3.1.2.- Secuencias de cebadores y condiciones de amplificación de PCR para tipificar UDTs en muestras clínicas.**

PCR	Target	Primers		PCR Mix			Thermocycler				Amplicon size (bp)	<i>T. cruzi</i> DTU
		Name	Sequence	Primer	dNTPs	MgCl	D	A	E	C		
SL-IRac	Spliced leader intergenic region	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	1.5	250	3	94	70	72	3	150	Tc I
							94	68	72	3	157	Tc II, V, VI
		TCac	CTCCCCAGTGTGGCCTGGG				94	66	72	3	200	Tc III, IV
							94	64	72	3		
SL-IR II	Spliced leader intergenic region	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	1.5	250	3	94	70	72	3	425	
							94	68	72	3		
	TC1	TCCGCCACCTCCTTCGGGCC				94	66	72	3			
						94	64	72	3			
						94	62	72	33		Tc II, V, VI	
						94	67	72	5			
Heminested	TC	CCCCCTCCCAGGCCACACTG	4	250	3	94	65	72	5	300		
						94	63	72	5			
	TC1	TCCGCCACCTCCTTCGGGCC				94	61	72	28			
						94	61	72	28			
SL-IR I	SL-IR	UTCC	CGTACCAATATAGTACAGAAACTG	1.5	250	3	94	62	72	3	475	
							94	60	72	3		
	TC2	CCTGCAGGCACACGTGTGTG				94	58	72	35			
						94	67	72	5		Tc I	
						94	65	72	5	350		
						94	63	72	5			
					94	61	72	28				
24Sa-rDNA	D7 domain	D76	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT	4	250	3	94	64	72	2	275	Tc I
							94	62	72	2		
	1st round	D75	GCAGATCTTGGTTGCGGTAG				94	60	72	2	275-290	Tc II-VI
						94	58	72	35			
	Heminested	D76	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT	5	250	2	94	60	72	3	125	Tc I
							94	57	72	3	140	Tc II, VI
	D71	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG				94	55	72	35	125-140*	Tc V	
A 10	1st round	pr1	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA	0.5	250	3	94	60	72	35	690	Tc II
		p6	GTGATCGCAGGAAACGTG							94	60	72
	Real Time	pr1	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA	0.5	250	3	94	60	72	35	580	Tc II
	pr3	TGCTTTATTACCCATGCCACAG								525	Tc I, III-VI	
										MT=82.0±0.2°C		

### 3.2. Cultivos de células, parásitos y aislamiento y purificación de exovesículas (EVs) de *T. cruzi* Pan 4.

Para el desarrollo de diversos ensayos de esta tesis doctoral se han utilizado cultivo de células parásitos y exovesículas de *T. cruzi* aisladas y purificadas siguiendo una serie de protocolos que se detallan en los siguientes apartados.

### 3.2.1. Cultivo de células Vero.

La línea celular Vero derivan de un cultivo procedente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), es una de las líneas celulares de mamíferos más comunes utilizadas en la investigación a nivel de biología celular. Esta línea celular se ha utilizado ampliamente en la propagación y el estudio de virus, bacterias intracelulares, parásitos y la evaluación de fármacos, toxinas y otros estudios celulares a nivel molecular. Además, las células Vero han sido empleadas para la producción de vacunas virales vivas o inactivadas y la producción de diferentes virus, incluidos los virus de la rabia, reovirus, virus de la encefalitis japonesa, entre otros y recientemente coronavirus como el SARS –CoV-2 (Ammerman, Beier-Sexton, and Azad 2008; Bullard et al. 2020). Las células Vero (ECACC 84113001) fueron proporcionadas por el banco de líneas celulares del Centro de Instrumentación Científica (CIC), de la Universidad de Granada. Se cultivaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células /mL en medio Eagle's modificado (MEM) (Sigma-Aldrich, 51200-046), suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SFB) (Gibco, 10439024) previamente inactivado (SFBI) a 56°C durante 30 min, suplementado con antibióticos (penicilina 100 U / mL, estreptomycin 100 µg / mL). Seguidamente fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Para su cultivo se utilizaron frascos de cultivos de 75 cm<sup>2</sup> (Thermo Fischer Scientific, 156499) con 10 mL de medio de cultivo, en donde adheridas a su superficie interna crecen las células en forma de monocapa. Los subcultivos de células Vero se realizaron semanalmente siguiendo el protocolo de tripsinización que se describe a continuación.

### 3.2.2. Tripsinización para subcultivos de células Vero.

Con el objetivo de mantener la línea celular y renovar los cultivos para los diferentes ensayos, es necesario realizar los subcultivos. Las células adherentes fueron separadas de los frascos de cultivo, agregando a la monocapa una solución de 5 mL de tripsina 0.05%/ EDTA 0.02%, previamente atemperada a 37 °C, y la posterior incubación durante 10 minutos a 37 °C en la estufa de cultivo. Una vez disgregada la monocapa, se agregaron 5 mL de Solución de Hank's estéril para facilitar el lavado y la eliminación de la solución de Tripsina-EDTA. Finalmente, y tras una fuerte agitación previa, las células despegadas fueron centrifugadas a  $500 \times g$  durante 5 minutos y el botón de células fue resuspendido en medio de cultivo para ser sembradas en nuevos frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> a razón de  $1 \times 10^6$  células / mL con medio de cultivo y debidamente identificados. Después de 24 horas las células del cultivo forman una monocapa confluyente al 80%, de manera que los cultivos están listos para su posterior infección con tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*.

### 3.2.3. Sincronización del ciclo celular de células Vero.

Para llevar a cabo las infecciones con las formas infectantes de *T. cruzi* y otros experimentos con la línea celular Vero, se sincronizó su ciclo celular en la fase S siguiendo el protocolo descrito por Osuna y colaboradores (Osuna et al. 1984). En este proceso, las células Vero se incubaron durante 12 horas con el medio de cultivo DMEM (10 % de SBF1 (v/v)) suplementado con timidina (Sigma-Aldrich, T9250) a una concentración 25 mM. Luego de la incubación por 12 horas, las células se lavaron con PBS estéril y se mantuvieron en medio de cultivo sin timidina, suplementado con 10 % de

SFBI y antibióticos, durante al menos una hora antes de iniciar los experimentos de infección de los cultivos.

#### **3.2.4. Cultivo de células RAW 264.7**

Las células RAW 264.7 son una línea celular de monocitos / macrófagos línea derivada de ratones BALB /c. Estas células se describen como un modelo apropiado de macrófagos que mantienen su capacidad fagocítica, pinocitosis y fagocitosis. Cuando las células RAW 264.7 son estimuladas, son capaces de diferenciarse en osteoclastos (Taciak et al. 2018).

La línea celular Raw 264.7 fue cedida por el Centro de Instrumentación Científica (CIC) en el pase número 13. Las células se subcultivaron a una concentración de  $2-4 \times 10^4$  células / mL, en frascos de cultivos de 25 mm<sup>2</sup> con 5 mL de medio DMEM suplementado con glutamina 2mM y glucosa a 4.5g /L a 37°C en atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que los cultivos estaban confluentes al 90% se tripsinizaron con Tripsina /EDTA. Los cultivos se verificaban y subcultivaban periódicamente con un procedimiento similar al descrito para las células Vero.

#### **3.2.5. Inactivación del suero fetal bovino (SBF) utilizado en cultivos.**

Todos los SBF (Gibco, 10439024) empleados en los cultivos celulares o de parásitos fueron previamente tratados con calor a 56°C durante 30 minutos, con el fin de inactivar el sistema del complemento. Este proceso es importante a fin de evitar procesos de citotoxicidad mediada por reacciones cruzadas producidas por anticuerpos inespecíficos o por lectinas capaces de desencadenar la cascada de complemento u otros sistemas en los que el complemento puede tener una influencia no deseada (Leshem, Yogev, and Fiorentini 1999; Soltis et al. 1979) Una vez terminada la incubación la

botella se introdujo en un baño con hielo durante 15 minutos. Finalmente se etiquetó y se congeló hasta su uso en los diferentes ensayos.

### **3.2.6. Control de contaminación de cultivos celulares por *Mycoplasma sp.* a través de ensayos de PCR.**

Como medida de seguimiento y control de contaminaciones de los cultivos celulares por *Mycoplasma sp.* se realizaron PCRs de forma periódica, empleando oligonucleótidos específicos del gen 16S RNA ribosomal de la bacteria para detectar su presencia. Las células se tripsinizaron siguiendo el protocolo ya descrito. Para ello, una vez tripsinizadas se colectó un mililitro de células en suspensión y se centrifugaron durante 10 minutos a  $14000 \times g$ , seguidamente se lavaron 2 veces con PBS 1X. La extracción de DNA de los botones de las células y los sobrenadantes centrifugados se realizó utilizando el “Blood and Cell Culture DNA mini kit” (Qiagen, 13323), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, muestras tanto de las células como del sobrenadante fueron centrifugadas a  $500 \times g$  y  $14,000 \times g$ , respectivamente, con el fin de formar un botón, procediéndose a la extracción del DNA como se describe en el apartado 3.1.4.1. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen 16S RNA ribosomal de *Mycoplasma sp.* fueron: GPO3-F 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3' y MGSO-R 5'-TGCACCATCTGTCCTGTTAACCTC-3'. Como control positivo se utilizó DNA de una muestra respiratoria positiva por *Mycoplasma sp.* (confirmada mediante secuenciación) y como control negativo se utilizó agua ultrapura estéril en lugar de DNA molde. La mezcla de reacción utilizada para la PCR se muestra en la Tabla 3.2.1.

**Tabla 3.2.1.- Reactivos utilizados en las reacciones de la amplificación del gen RNA ribosoma 16 S.**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (µL)</b>
H <sub>2</sub> O MQ	5.8
Tampón 5X	2.0
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.0
dNTPs 8 mM	2.0
Oligonucleótido-F (10 mM)	1.5
Oligonucleótido-R (10 mM)	1.5.
Horse power Taq DNA polimerasa	0.2
DNA molde	5.0.
Volumen Total	20

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.

Los productos de PCR se mezclaron con tampón de carga de DNA (Invitrogen,10816-015) y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa (Condalab, 8010.22) al 2,0 % teñido con Sybr<sup>®</sup> Safe DNA (Invitrogen, S33102). Se incluyó un marcador de peso molecular de DNA de 50 a 1000 pb (Canvax, L0009) y se evaluaron con luz ultravioleta para detectar la presencia del producto de amplificación de 270 pb específico para *Mycoplasma sp.*

### **3.2.7. Cultivo de parásitos.**

La cepa utilizada en los experimentos de esta tesis fue la cepa Pan 4 de *T. cruzi* (TcIa + TcId) (Cura et al. 2010; Sousa et al. 2006). Es una cepa aislada de un paciente de la comunidad de Burunga (Panamá) en 2004 y donada al laboratorio de la UGR, por la profesora A. Ying de la Universidad de Panamá. Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron las formas epimastigotes (formas no infectivas del parásito) y formas tripomastigotas procedentes de cultivos celulares (formas infectivas).

#### **3.2.7.1. Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4.**

Los epimastigotes fueron cultivados en concentraciones de  $1 \times 10^8$  parásitos/mL aproximadamente, en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Thermo Fischer Scientific, 156499) con 10 mL de medio de cultivo LIT por su sigla en inglés (Liver Infusion Tryptose) (Difco, 226920) suplementado con 10% de SFBI, e incubados a 28°C, para que se conservaran en fase exponencial de crecimiento mediante siembras continuas semanalmente.

Para la obtención de las formas tripomastigotas metacíclicas, utilizados en las infecciones celulares, se llevó a cabo la inducción de la metaciclogénesis de los epimastigotes mediante diferentes medios de cultivo.

#### **3.2.7.2. Metaciclogénesis *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi*.**

Con el propósito de obtener formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, se realizó la diferenciación *in vitro* de los epimastigotes, empleando la metodología descrita por Silva y colaboradores (Gonçalves et al. 2018; Osuna, A. 1979), con algunas modificaciones. Se utilizaron cultivos de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, los cuales fueron



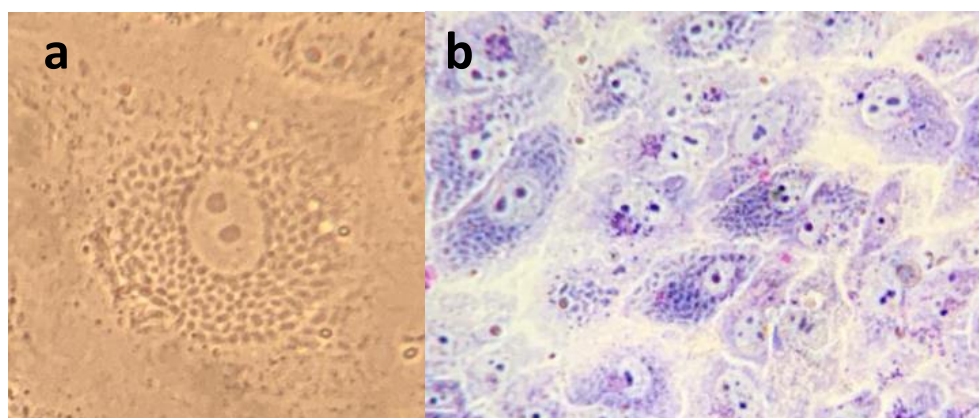
centrifugados a  $500 \times g$  durante 5 minutos para obtener un botón de parásitos y eliminar el sobrenadante. Se realizó el recuento de parásitos mediante cámara de Neubauer, ajustándose la concentración a  $1 \times 10^5$  parásitos/ mL. Los epimastigotes se incubaron en viales de 2 mL con medio TAU (NaCl 190mM, tampón fosfato 8mM, KCl 17mM,  $MgCl_2$  2mM, pH 6.0) y se mantuvieron a  $28^\circ C$  en agitación durante 2 horas. Seguidamente se centrifugaron a  $500 \times g$  durante 5 minutos para eliminar el medio TAU e incubarlos nuevamente en un frasco de cultivo Nunc® de 25 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher, 156340) con medio TAU3AAG (TAU suplementado con 0.035% de bicarbonato de sodio, l-prolina 10 mM, glutamato de sodio 50mM, l-aspartato de sodio 2 mM y glucosa 10 mM) durante 5 días, en el que se obtuvo una tasa de transformación de aproximadamente del 80%. Una vez lograda la transformación, el medio con los parásitos se transfirió a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugó a  $1,000 \times g$  durante 5 minutos donde el botón de tripomastigotes metacíclicos, se lavó tres veces con PBS 1X estéril, se centrifugó y finalmente se resuspendió en 1 mL de medio MEM sin SFBI para llevar a cabo las infecciones de las células Vero previamente cultivadas.

### **3.2.7.3. Infección de células Vero con tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* Pan4.**

Una vez que las células Vero fueron sincronizadas al final de la fase S del ciclo celular, se realizó el proceso de infección con los parásitos. Frascos de cultivo Nunc® de 75 cm<sup>2</sup> con células Vero en monocapa confluyente de aproximadamente un 75%, fueron infectadas en una proporción de 10: 1 (tripomastigotes metacíclicos / células) con una concentración final de  $1 \times 10^6$  células /mL, en 10 mL de medio DMEM sin suero. Seguidamente los frascos fueron incubados a  $37^\circ C$  en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas las primeras 24 horas de incubación se les retiró el medio de infección

sustituyéndolo por 10 mL de medio de cultivo DMEM con 10 % de SFBI. Diariamente y por 5 días continuos se observaron los cultivos para verificar que no hubiese contaminación bacteriana o de hongos y la infección por *T. cruzi* se desarrollara satisfactoriamente (Figura 3.2.1).

Una vez pasada la semana de cultivo, se obtuvieron los tripomastigotes libres para la posterior liberación de las exovesículas.



**Figura 3.2.1.- Células Vero-infectadas con amastigotes de *T. cruzi* al tercer día de la infección. b. Amastigotes teñidos con Giemsa. (autor: Alexa Prescilla-Ledezma, 2020)**

### **3.2.8. Aislamiento de exovesículas (EVs) de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* Pan 4.**

El sobrenadante de los frascos de cultivo de las células Vero infectadas con los tripomastigotes de *T. cruzi*, fue recolectado en tubos estériles de 50 mL (Sarsted, 62547257) y centrifugado a  $500 \times g$  por 5 min para eliminar los amastigotes o restos de células Vero. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril con centrifugaciones de 5 min a  $2,800 \times g$ . Seguidamente el botón de parásitos se resuspendió en 10 mL de medio DMEM sin suero en

un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se incubó durante 4 horas a 37°C para iniciar el proceso de liberación de exovesículas por los tripomastigotes. Una vez concluido el tiempo de incubación, el contenido del frasco de cultivo fue centrifugado a 2,800 × g durante 15 minutos. Finalmente, el botón de parásitos fue descartado y el sobrenadante conteniendo las exovesículas fue almacenado a 4 °C con inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche, 11836170001), para su posterior purificación.

En el caso de las EVs liberadas a partir de los epimastigotes cultivados en medio LIT (Difco, 226920) con 10 % SFBI a 28 °C, se colectaron de igual manera y se centrifugaron a 500 × g por 5 min a 20 °C. Seguidamente se realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril y se sembraron en 10 mL de LIT sin suero durante 24 horas a 28 °C en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Finalizadas las 24 horas de incubación el medio con parásitos se centrifugó a 2,800 × g durante 15 minutos a 20 °C y el sobrenadante se almacenó con inhibidores de proteasas en refrigeración hasta su purificación. Este procedimiento se realizaba diariamente para obtener cantidades adecuadas de exovesículas para los diferentes ensayos planificados.

### **3.2.9. Purificación de EVs de *T. cruzi*.**

La purificación de EVs secretadas por tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* se realizó por centrifugación diferencial, según la metodología descrita por De Plablos y colaboradores (2016)(De Pablos et al. 2016), con algunas modificaciones. Los sobrenadantes obtenidos de la liberación de EVs de los tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*, fueron expuestos a una segunda centrifugación a 17,000 × g durante 30 minutos a 4°C. Una vez finalizada el segundo ciclo de centrifugación el sobrenadante fue pasado por un filtro de 0,22 µm (Sartorius, 16534) para eliminar partículas, restos o fragmentos de

membrana superiores a 220 nm. Posteriormente el sobrenadante fue ultracentrifugado a  $100,000 \times g$  durante 16 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  en una ultracentrífuga Avanti J-301 (Beckman Coulter, EE. UU) equipada con un rotor JA-30.50 Ti. El botón que contenía las EVs, se lavó dos veces con 15 mL de PBS 1X a  $1000,000 \times g$  durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, los botones fueron resuspendidos en 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X con inhibidores de proteasas, cuantificados, alicuotados y almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Figura 3.2.2).

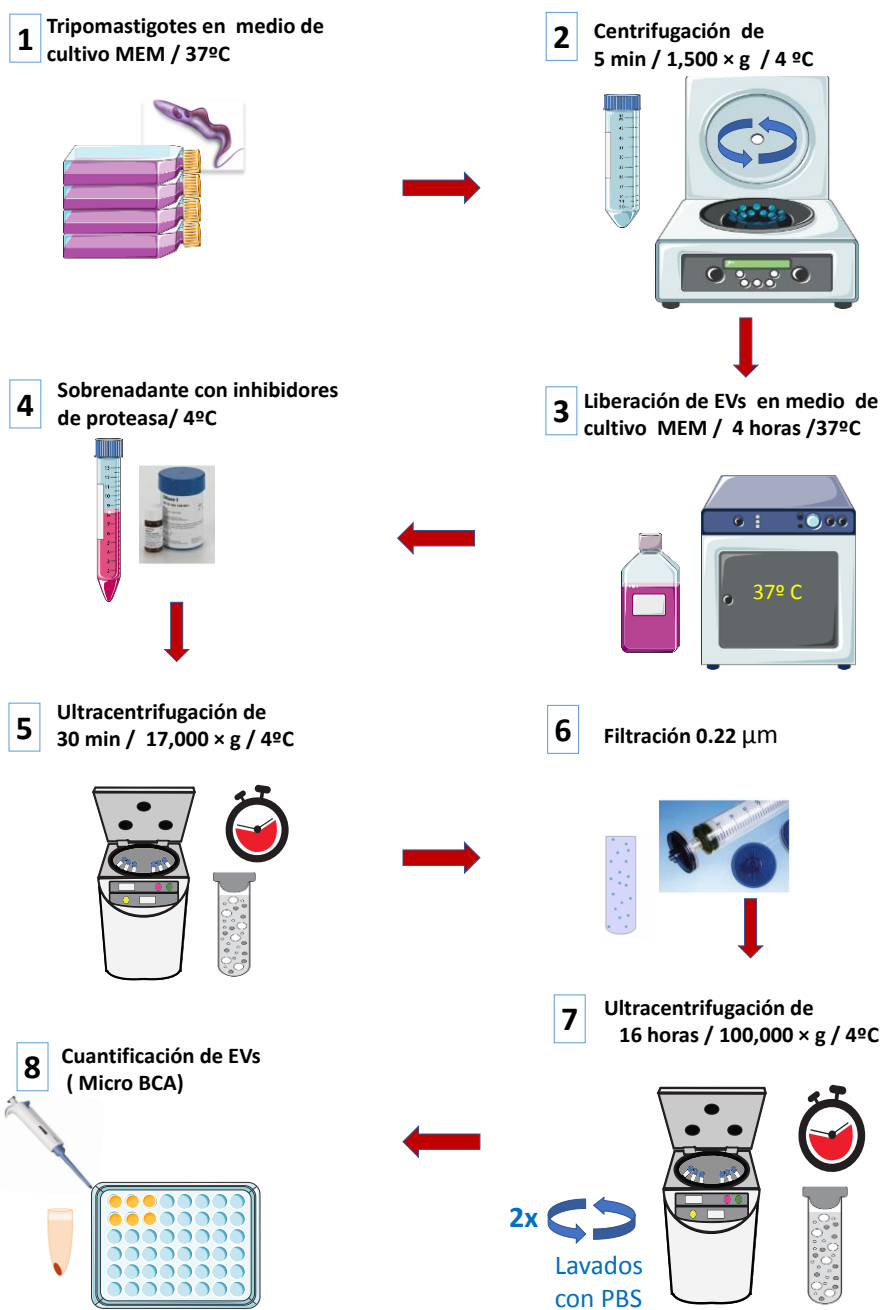


Figura 3.2.2.- Diagrama de Flujo de purificación de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan 4.

### **3.3. Modelo animal.**

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española vigente para el Bienestar Animal, donde se establece que la manipulación de ratones se debe realizar utilizando el número mínimo necesario para los ensayos, siguiendo las indicaciones y protocolos (RD53/2013 de 1 de febrero, Artículo 20.2 del Decreto 65/2012 por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales, BOE, núm. 79, de 2 de abril de 2015. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales para fines científicos.

#### **3.3.1. Obtención de lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 para inmunización de animales.**

Con el propósito de obtener sueros anti *T. cruzi* de la cepa Pan4, se utilizaron tripomastigotes cultivados como previamente se ha descrito y sometidos a un proceso de ruptura celular mediante varios procesos de congelación y descongelación. Posteriormente, los parásitos, fueron sonicados en un equipo (Branson SLPe) con 10 pulsos de 1 minuto, en 500  $\mu$ L de PBS 1X mantenidos en hielo. La concentración proteica del lisado fue cuantificada a través del kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23235), usándose para realizar la curva estándar en la cuantificación de diferentes concentraciones de albumina bovina (BSA). Las absorbancias obtenidas fueron analizadas con una regresión lineal a fin de calcular las absorbancias problema obtenidas del lisado de los parásitos como se describe a continuación.

### 3.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas a través del kit comercial de Micro BCA™.

Para cuantificar la concentración de proteína del lisado de *T. cruzi* se utilizó una mezcla de los tres reactivos del kit Micro BCA™, proporcionando una solución de trabajo que está concentrada de manera que permita medir la proteína cuando se mezcla con un volumen igual de muestra. El resultado es un ensayo que permite medir con precisión soluciones de proteínas de 0,5 a 20 µg / mL. El ensayo es lineal y muestra niveles muy bajos de variabilidad de proteína a proteína. El método utiliza el ácido bicinónico (BCA) como reactivo de detección para  $\text{Cu}^{+1}$ , que se forma cuando  $\text{Cu}^{+2}$  se reduce en un ambiente alcalino (Smith et al. 1985). Se forma un producto de reacción de color púrpura por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ). Este complejo soluble en agua exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm a la que fue medida en un espectrofotómetro Multiskan® Spectrum (Thermo Scientific, Finlandia). Para la determinación de las concentraciones de proteínas se realizó una curva de regresión patrón con las soluciones de concentraciones conocidas de BSA (Tabla 3.3.1). Como solución diluyente (WR) se empleó una mezcla de 25 partes del reactivo MA (tampón alcalino de tartrato -carbonato) con 24 partes del reactivo MB (solución de ácido bicinónico) y una parte del reactivo MC (solución de sulfato de cobre). Un volumen de 150 µL de cada dilución del estándar de albumina, así como de las muestras, se mezcló con 150 µL del reactivo completo formado, en una microplaca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, 167008), la cual se agitó activamente durante 60 minutos, incubándose a 37°C durante 2 horas, protegidos de la luz. La absorbancia fue medida a 562 nm en un lector de placas Multiskan® Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Finlandia). 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 versión 9

**Tabla 3.3.1 Curva patrón de albúmina (BSA) para la determinación de concentración de proteínas a través del método Micro BCA.**

Vial	Volumen de diluyente (mL)	Volumen y origen del BSA	Concentración final del BSA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
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	3.2 mL de la dilución del vial F	1.0
H	4.0	4.0 mL de la dilución del vial G	0.5
I	8.0	0.0	0.0 (blanco)

### 3.3.3. Inmunización de animales de experimentación para la obtención de inmunosuero frente a lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4.

Con el propósito de obtener inmunosueros para diversos ensayos, se inmunizaron ratas Wistar machos de cuatro semanas de edad y ratones CD1 machos de 5 semanas. La cantidad de proteínas del lisado, administrada en las inoculaciones dependió del peso del animal. Los ratones se inmunizaron con 10  $\mu\text{g}$  de proteínas totales del lisado y las ratas con 20  $\mu\text{g}$ . La inoculación se realizó por vía intraperitoneal utilizando una solución compuesta por el extracto de los tripomastigotes de *T. cruzi* diluido en PBS 1X y adyuvante completo de Freund's (Sigma- Aldrich, F5881), en una proporción 1:1 en un volumen final de 250  $\mu\text{L}$  para los ratones y 500  $\mu\text{L}$



para las ratas. En la primera inoculación se utilizó el adyuvante completo de Freund's y en las inmunizaciones posteriores se utilizó adyuvante incompleto de Freund's (Sigma-Aldrich, F5506).

Se realizaron un total de 7 inoculaciones con intervalos de 1 semana (Tabla 3.3.2). Previo a la primera inoculación, se extrajo sangre por punción en la vena submandibular en los ratones y de la vena femoral en las ratas para la obtención de sueros pre inmunes que se utilizaron como control de la inmunización y como controles de suero pre inmune en los diferentes experimentos. La titulación de los sueros se evaluó mediante ensayos de ELISA (Figura 3.3.3).

De una manera similar a la obtención de un inmunosuero frente al extracto total de *T.cruzi*, se llevó a cabo la obtención de inmunosueros frente a EVs liberadas por las formas tripomastigotes. El aislamiento y purificación de las EVs se describirá más adelante.

Con el fin de eliminar los potenciales efectos biológicos que las EVs pudieran inducir en los animales inoculados, previamente a la inoculación con el adyuvante, las vesículas fueron fijadas con glutaraldehído 2%, durante 2 h a TA, concentradas mediante centrifugación y tratadas con glicina (Sigma, G7126) (0.2M) a fin de bloquear los grupos aldehídos libres. El inóculo se ajustó a una concentración de 20 µg de EVs con el que se inmunizaron 2 ratas Wistar macho de cuatro semanas, procediéndose de igual manera a la descrita.

**Tabla 3.3.2.- Tabla de inmunizaciones para la obtención de anticuerpos policlonales anti lisado y EVs de *T. cruzi*.**

Espacie Semanas	Ratones CD1 (n=3)	Ratas Wistar (n=3)	Ratas Wistar (n=2)
Semana 1	125 µL adyuvante completo 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante completo 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg/µL) 500 µL	250 µL adyuvante completo 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg/µL) 500 µL
Semana 2	125µL adyuvante incompleto 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg/µL) 500 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg/µL) 500 µL
Semana 3	125 µL adyuvante incompleto 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg/µL) 500 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg/µL) 500 µL
Semana 4	125 µL adyuvante incompleto 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg/µL) 500 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg/µL) 500 µL
Semana 5	125 µL adyuvante incompleto 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg / µL) 500 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg / µL) 500 µL
Semana 6	125 µL adyuvante incompleto 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg /µL) 500 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg /µL) 500 µL
Semana 7	125 µL adyuvante incompleto 115 µL PBS 10 µL lisado (10 µg/µL) 250 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL lisado (20 µg / µL) 500 µL	250 µL adyuvante incompleto 230 µL PBS 20 µL EVs (20 µg / µL) 500 µL
Semana 8	<b>Exanguinación y ELISA</b>		

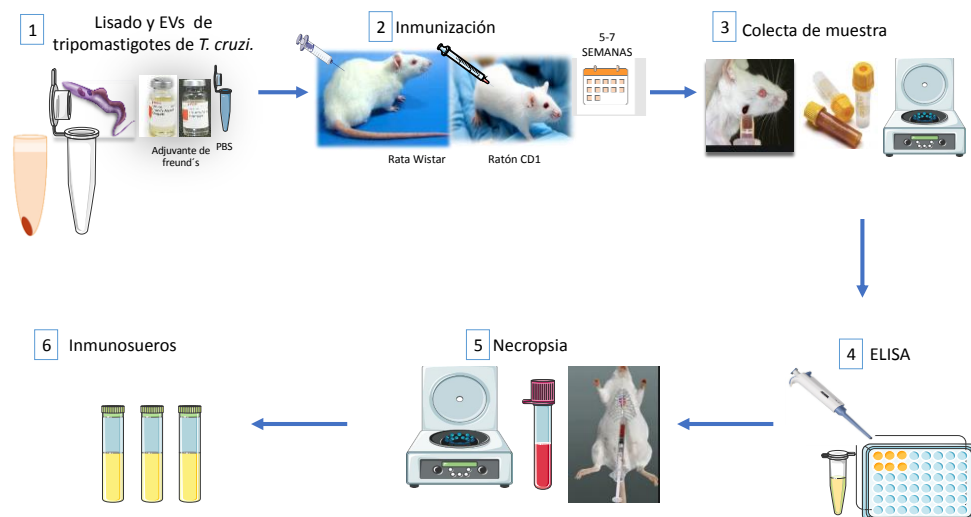


Figura 3.2.3 Esquema de la producción de inmunoseros anti *T. cruzi*.

### 3.3.4. Valoración de los títulos de anti *T. cruzi* y anti-EVs en sueros de ratas y ratones inmunizados mediante técnica de ELISA.

La evaluación del título de los diferentes inmunoseros obtenidos se llevó a cabo mediante técnicas inmuno enzimáticas de ELISA. El antígeno utilizado fue absorbido en placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, 167008) (100  $\mu$ L/pocillo). Se utilizaron 5  $\mu$ g del lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* en tampón de carbonato/bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9,6) por pocillo. El proceso de adsorción se produjo a 4 °C durante 16 horas, en agitación lenta y en cámara húmeda. Pasada la incubación las placas se lavaron con PBS-0.1% Tween 20 y se bloquearon toda la noche a 4°C con una solución de PBS-T (2% de leche desnatada en PBS-Tween 20 al 0.1%). Seguidamente los diferentes inmunoseros y los sueros preinmunes negativos, controles positivo y negativo se diluyeron 1:100 en PBS-T y los sueros de ratones y ratas se diluyeron de forma seriada (1:100 a 1:15000) agregándose alícuotas de 100  $\mu$ L de cada dilución (1:10) a cada tres pocillos.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas en agitación. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS-T y tras los lavados fueron incubadas con IgG anti-rata conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich, A9037) en una dilución 1:1,000 y anti -ratón HRP (Dako Denmark, P0447) diluido 1:1000 en PBST. Se incubaron durante una hora a 37°C, en agitación, en cámara húmeda y protegidos de la luz. Finalmente, las placas se lavaron con PBS-T y se revelaron usando sustrato de peroxidasa (0.1 M ácido cítrico, 0.1 M citrato de sodio, pH 5), 12.5 mL agua destilada, OPD (Sigma-Aldrich, P8287) y 25 µL de peróxido de hidrógeno (100 µL/pocillo). La reacción fue detenida con 50 µL de solución de parada 3 M HCl (Scharlau, AC07411000) en agua destilada.

Para la evaluación de los inmunosueros anti-EVs de *T. cruzi*, se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific, 167008) (100 µL/pocillo) y se recubrieron con 5 µg /pocillo de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* previamente cuantificadas siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Se utilizaron controles positivos y negativos que se evaluaron simultáneamente con los inmunosueros por triplicado.

La absorbancia se determinó a 492 nm en un lector espectrofotométrico multicanal Multiskan® Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Finlandia). El punto de corte del ensayo se realizó calculando la media de la absorbancia del control negativo + 3 veces la desviación estándar obtenida. Las medias de las tres medidas superiores al valor de corte fueron considerados positivos y bajo el valor de corte negativas.

### **3.3.5. Purificación de inmunosueros a través de columnas de afinidad para Ig G.**

Se utilizaron las columnas de IgG Protein G HP SpinTrap / Ab Spin Trap (GE Healthcare Life Sciences, 28-9031-34). El primer paso fue remover la solución de almacenamiento a través de una centrifugación a  $100 \times g$  durante 1 minuto. Luego se equilibró la columna con 600  $\mu\text{L}$  del tampón de unión compuesto por Fosfato sódico (Sigma-Aldrich, 255793) 20 mM en PBS pH 3.0 y se centrifugó a  $100 \times g$  durante 2 minutos. Seguidamente se realizó la unión o acoplamiento del anticuerpo a la columna al añadir 600  $\mu\text{L}$  de los sueros, que fueron incubados durante 4 minutos con rotaciones suaves, con el objetivo que las inmunoglobulinas Gs presentes en el suero se unieran a la resina de sefarosa de la columna. Una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugó durante 2 minutos a  $100 \times g$  y se lavó dos veces con 600  $\mu\text{L}$  de tampón de unión, para eliminar las inmunoglobulinas que no se acoplaron a la columna. Por último, se realizó la elución del anticuerpo al añadir 400  $\mu\text{L}$  de tampón de elución (Glicina-HCL 0.1 M pH 3.0) que se mezcló por inversión durante un minuto. Las columnas fueron colocadas sobre viales de 2 mL con 15  $\mu\text{L}$  de tampón neutralizante (Tris-HCL 1 M pH 9.0) y se centrifugaron a  $100 \times g$  durante 2 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces, obteniendo un volumen final de eluido de 800  $\mu\text{L}$  por cada suero purificado con la columna. Una vez obtenida la obtención de las Inmunoglobulinas Gs purificadas se procedió a la cuantificación de proteínas, utilizando el kit de Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23235), ya descrito. Debido a que en el proceso de purificación de inmunoglobulinas se obtienen cantidades reducidas de proteínas, se utilizó para la cuantificación de las mismas un método sensible que detectara con precisión dicha concentración.

### **3.3.6. Adsorción de anticuerpo primario (rata Wistar) para estudios inmunoquímicos.**

Para la adsorción de los anticuerpos obtenidos, se utilizaron células Vero (ECACC 84113001) cultivadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células /mL en medio MEM. El cultivo fue mantenido a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez formada la monocapa confluyente de células Vero, se lavaron dos veces con PBS filtrado a través de filtros de 0.22 µm (Sartorius, 16534) y se fijaron con metanol (Scharlau, ME0302005P) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente fueron lavadas tres veces con PBS y permeabilizadas con Triton®X-100 (VWR Chemicals, 28817.295), al 0.1% (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras repetidos lavados con PBS, se agregó 1.5 mL de suero policlonal de rata Wistar anti *T. cruzi* durante 12 horas a 4 °C en agitación lenta. La incubación con el suero policlonal fue repetida tres veces, con incubaciones previas de las células con 2 mL de glicina-HCL pH 3.5 por 20 segundos, a fin de eliminar los posibles anticuerpos unidos a las células y que podrían interferir en las técnicas inmunoquímicas posteriormente usadas.

Finalmente se colectó el suero, se centrifugó 10 minutos a 14, 000 rpm, se alícuotó y almacenó a -20°C hasta su uso.

### **3.3.7. Diálisis y liofilizado de inmunosueros.**

Las Ig Gs de los sueros fueron purificados por cromatografía de afinidad a través de la columna IgG Protein G HP SpinTrap / Ab Spin Trap (GE Healthcare Life Sciences-28-9031-34) y cuantificados con el kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23235). Los eluidos fueron dializados con solución de acetato de amonio 0.1 M usando una membrana de diálisis 3500 MWCO (Spectra/Por®Dialysis, 132725). Posteriormente

fueron liofilizados, mediante un LyoBeta Lyophilizer system (Telstar S.A.) y almacenados a -20°C hasta su uso.

### **3.4 Estudio de la respuesta inmune ante *T. cruzi* en sueros chagásicos crónicos de pacientes de Panamá.**

Con el propósito de confirmar los datos obtenidos por las técnicas serológicas de diagnóstico y evaluar la respuesta a las formas tripomastigotas procedentes de cultivo en nuestras condiciones experimentales, se procedió a titular los sueros de los pacientes chagásicos panameños frente a dichos antígenos, y de esta manera conocer los títulos para posteriores ensayos.

#### **3.4.1. Determinación de títulos de anti *T. cruzi* en suero de pacientes chagásicos frente a lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Pan4, a través de ensayos de ELISA.**

Para alcanzar este objetivo, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific, 446639) con 100 µL de lisado de tripomastigote de *T. cruzi* a una concentración de 5 µg / pocillo diluido en tampón carbonato/ bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9,6) a 4 °C durante 16 horas en agitación lenta. Posterior a la absorción del lisado en las placas, se desarrolló el protocolo detallado en el apartado 3.3.4.

Los sueros en estudio y los controles humanos positivos y negativos se diluyeron 1:100 en PBS-T, y se añadieron alícuotas de 100 µL a cada pocillo incubándose a 37 °C durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Las placas se lavaron 3 veces con el tampón de lavado PBS-T y luego incubadas con IgG anti-humana desarrollada en cabra, conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich, A0170) diluida 1:1,000 en

PBS-T durante una hora a 37 °C, en agitación. Se lavó 3 veces con PBS-T y se realizó todo el procedimiento como se ha descrito anteriormente.

Cada muestra de suero, controles positivos y negativos se analizó por triplicado. Para el cálculo del valor de corte de la prueba se utilizó la media de la absorbancia del control negativo + 3 veces la desviación estándar obtenida.

### **3.4.2. Aislamiento y purificación de EVs y disociación de inmunocomplejos a partir de sueros chagásicos panameños.**

Para aislar y purificar las EVs de los sueros chagásicos se utilizó una técnica de centrifugación diferencial.

El protocolo de aislamiento y purificación de EVs, al igual que el de disociación de inmunocomplejos, se realizó en una ultracentrífuga Sorwal WX80 con el rotor Fiberlite™ F50L-24 x 1.5 Fixed- Angle Rotor (Thermo Fisher Scientific, EE. UU).

Se utilizaron alícuotas de 1 mL de suero para el aislamiento de las EVs, con una primera centrifugación de 15 minutos a  $1,500 \times g$ , y colección de los sobrenadantes para realizar una segunda centrifugación de 30 minutos a  $17,000 \times g$ . Los sobrenadantes fueron colectados y ultracentrifugados a  $100,000 \times g$  durante 4 horas a 4 °C, con el objetivo de obtener las EVs del suero. Una vez finalizada la ultracentrifugación del sobrenadante (proteínas del suero) se realizó un mínimo de tres lavados por ultracentrifugación con PBS 1X filtrado, a fin de eliminar las proteínas del suero y con ellas las inmunoglobulinas, descartando cada vez el sobrenadante. El botón fue colectado para realizar la disociación del complejo anticuerpos-exovesículas, siguiendo la metodología descrita por Díaz y colaboradores (Díaz Lozano et al. 2017).<sup>1</sup> Para tal fin se utilizó una solución de Glicina-HCl (Sigma,



G7126; Scharlau, AC07411000) 0.1 M pH 4.5 en proporción 1:1, con la cual se incubó el botón colectado, durante 15 minutos a temperatura ambiente en constante agitación. Posteriormente se realizó una nueva ultracentrifugación de 1 hora a  $100,000 \times g$  a 4 °C, en donde se recolectaron por separado los sobrenadantes que contenían los anticuerpos para posteriores estudios y los botones de cada suero con las EVs. Los botones se resuspendieron en 40  $\mu$ L de PBS con un cocktail de inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche, 11836170001). Los sobrenadantes que contienen los anticuerpos en estudio se neutralizaron con 100  $\mu$ L de Tris 1 N (Sigma-Aldrich, T6066) y purificaron con columnas de IgG Protein G HP SpinTrap / Ab Spin Trap (GE Healthcare Life Sciences, 28-9031-34) o usados directamente cuando se caracterizaron otras inmunoglobulinas sin afinidad por la proteína A/G.

Tanto el sobrenadante (conteniendo los anticuerpos) como el botón (conteniendo las exovesículas) se cuantificaron a través del kit de Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23235) para posteriores ensayos (Figura 3.4.1).

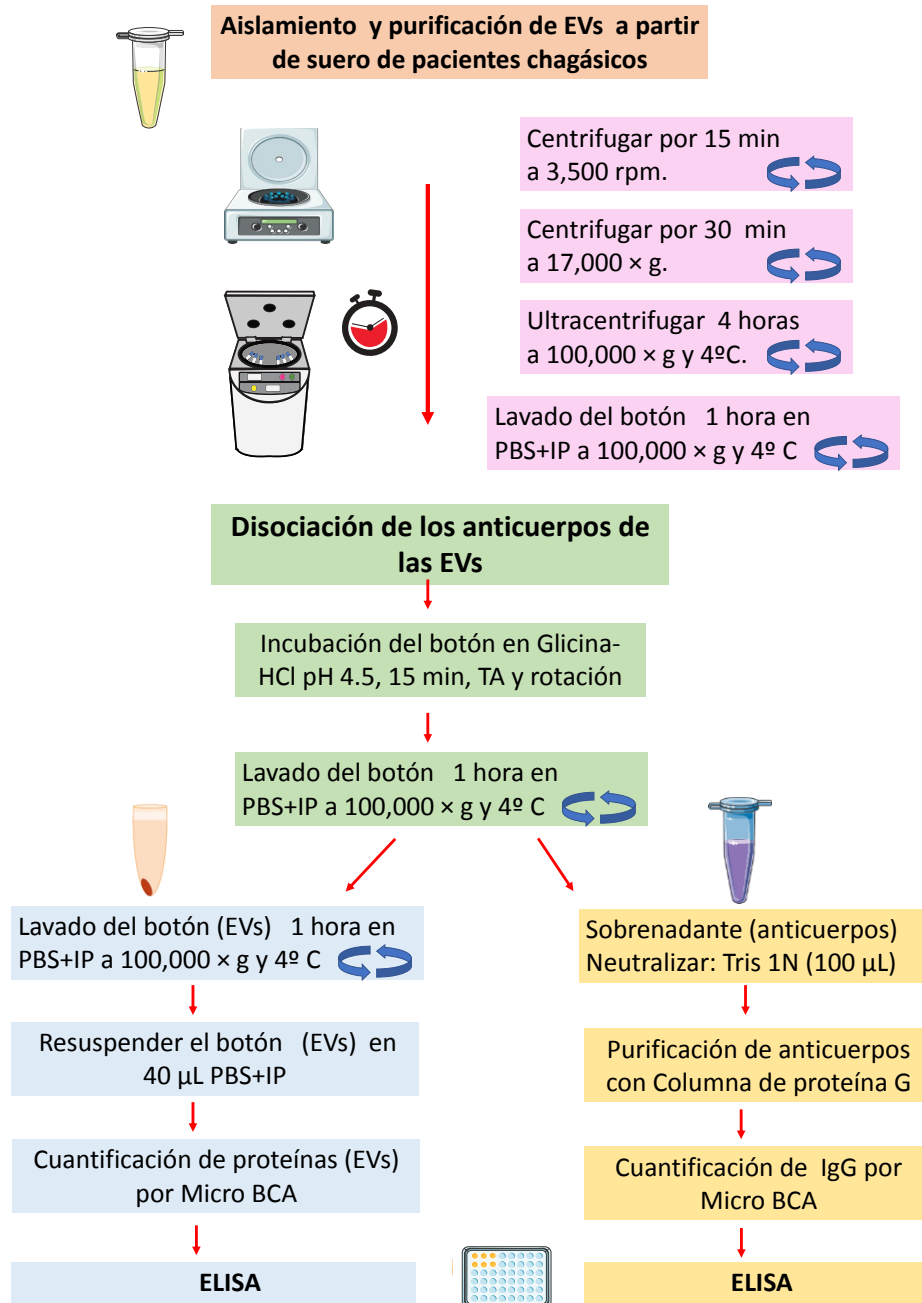


Figura 3.4.1.- Diagrama de aislamiento y purificación de y disociación de inmunocomplejos a partir de sueros chagásicos panameños.

### **3.4.3 Determinación de títulos de anticuerpos anti-EVs disociadas a partir sueros de pacientes chagásicos panameños mediante ELISA.**

En placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, 167008 se absorbieron las EVs (100  $\mu$ L/ pocillo) purificadas y disociadas, procedentes del suero de pacientes panameños con la enfermedad de Chagas. Los pasos siguientes se realizaron de igual manera que en los ELISAs anteriores.

El anticuerpo primario utilizado fue un inmunosuero de rata Wistar, que al igual que los controles positivos y negativos (suero de rata) se diluyeron 1:100 en PBS-T. Se añadieron alícuotas de 100  $\mu$ L a cada pocillo, incubándose a 37 °C durante 2 horas y en agitación. Las placas se lavaron con el tampón de lavado PBS-T y luego fueron incubadas con IgG anti-rata desarrollada en cabra, conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich, A90379), diluida 1:1,000 en PBS-T durante una hora a 37 °C, en agitación. Se lavó con PBS-T y se adicionó 100  $\mu$ l / pocillo del sustrato de peroxidasa con la composición que se ha detallado en el apartado 3.3.1, durante 30 minutos en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo adicionando 50  $\mu$ L de solución de parada (HCl 3 M) y se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector espectrofotométrico Multiskan® Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Finlandia). Cada muestra de suero, controles positivos y negativos se analizó por triplicado.

Para este estudio, se realizaron ELISAs en muestras de suero individuales de 23 pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica clínicamente asintomáticos, y se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el paquete de gráficos Origin 2016 para calcular los valores de *P*.

#### **3.4.4. Isotipificación de inmunoglobulinas en sueros chagásicos panameños mediante ensayos de ELISA.**

Las sobrenadantes que contenían las inmunoglobulinas obtenidas en la fase de disociación, una vez purificados por la columna de IgG y cuantificados con el kit comercial micro BCA Protein Assay Kit® (Thermo Fisher Scientific, 23235) fueron diluidos 1:2 con tampón carbonato pH 9.6.

Placas de microtitulación de Nunc® de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific, 167008) fueron recubiertas con 100 µl de la dilución 1:2 de IgG purificada de las muestras en estudio. La fijación del anticuerpo a las placas se realizó durante la incubación por 16 horas a 4°C en agitación constante. Posterior a los lavados y bloqueo se agregó 100 µL de las diferentes inmunoglobulinas utilizadas como anticuerpo primario (Tabla 3.4.4), diluidas 1:500 e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo secundario-HRP según especificaciones del fabricante y descritas en la tabla 3.3.4, en una dilución 1:1000. Las microplacas fueron incubadas una hora a temperatura y agitación suave. Posteriormente las placas se lavaron bajo las mismas condiciones y se procedió a revelar, agregando 100 µL de una solución de sustrato de peroxidasa a cada pocillo. Las placas fueron incubadas durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, y seguidamente se detuvo la reacción agregando 50 µL de la solución de parada, compuesta por 3 M HCl (Scharlau, AC07411000) en agua destilada. De igual manera la lectura de las placas fue hecha a 492 nm. Para determinar el punto de corte del experimento se calculó la media de las absorbancias del control negativo + 3 veces la desviación estándar obtenida.

Para la determinación de otras inmunoglobulinas como IgA, IgM e IgE que pudieran formar inmunocomplejos con la EVs, los pocillos fueron tapizados

## Materiales y Métodos

con los eluidos procedentes directamente de la disociación de los inmunocomplejos sin purificar a través de las columnas de proteína G. Se realizó el mismo protocolo detallado con los anticuerpos secundarios específicos de cada una y descritos en la tabla 3.4.1.

**Tabla 3.4.1.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para isotipificar los sueros de los pacientes chagásicos a través de ensayos de ELISA.**

Anticuerpo Primario	Fabricante/Referencia	Dilución	Anticuerpo Secundario	Fabricante/Referencia	Dilución
Anti-Human IgG1 Clone HP6001	Sigma-Aldrich MAB1307	1:500	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated)	Dako P0447	1:1000
Monoclonal Anti-Human IgG2 (Fc specific) antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich I9513	1:500	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated)	Dako P0447	1:1000
Mouse monoclonal [HP6050] Anti-Human IgG3 hinge heavy chain	Abcam ab99826	1:500	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated)	Dako P0447	1:1000
Mouse Anti-Human IgG4 pFc' [HP6023] (HRP)	Abcam ab99817	1:500			
Anti-Human IgA ( $\alpha$ -chain specific)-HRP antibody produced in goat	Sigma- Aldrich A0295	1:500			
Anti-Human IgE ( $\epsilon$ -chain specific) antibody produced in goat	Sigma-Aldrich I6284	1:500	Goat Anti-Human IgG(H+L) Antibody, Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, cross-adsorbed	Novex A18811	1:1000
Anti-Human IgM. ( $\mu$ -chain specific)-HRP antibody produced in goat	Sigma-Aldrich A0420	1:500			

### **3.4.5. Determinación de títulos de anti-EVs de *T. cruzi* en sueros de pacientes chagásicos panameños a través de ensayos de ELISA.**

Placas de microtitulación de Nunc® de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific, 167008) fueron recubiertas con 5 µg/ pocillo de EVs de *T. cruzi* resuspendido en tampón carbonato pH 9.6. La adsorción de las EVs se produjo durante la incubación de la disolución por 16 horas a 4°C en agitación. Posterior a los pasos de incubación, lavado y bloqueo se agregaron 100 µL de los sueros en estudio y controles en diferentes diluciones y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación lenta. Las placas se lavaron 3 veces con el tampón de lavado PBS-T y luego incubadas con IgG anti humana desarrollada en cabra, conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich, A0170) diluida 1: 1,000 en PBS-T durante una hora a 37 °C, en agitación. Los pasos siguientes se realizaron igual que los apartados anteriores. Cada muestra de suero, controles positivos y negativos se analizó por triplicado. El calculo del valor de corte de la prueba se determinó como se ha descrito en los apartados anteriores.

### **3.4.6. Reconocimiento de antígenos de *T. cruzi* en las EVs circulantes procedentes de pacientes chagásicos a través de Western Blot.**

Con el objetivo de reconocer proteínas de *T. cruzi* presentes en exosomas purificados a partir de un pool de sueros de pacientes chagasicos crónicos, se realizó un Western Blot utilizando anticuerpos anti-EVs de *T. cruzi* y un inmunosuero anti-*T. cruzi* obtenidos en rata. En los geles de SDS-PAGE se cargaron 75 µg de proteínas de lisado de *T. cruzi*, EVs de sueros de pacientes chagasicos y EVs procedente de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan 4.

#### **3.4.6.1 Preparación de muestras.**

Se utilizó un lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4, EVs procedentes de sueros de pacientes chagasicos y EVs procedente de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan 4. Las proteínas de las muestras se precipitaron con acetona en proporción 3:1 v/v durante 24 horas a -20 °C. Una vez precipitada se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado en su totalidad y eliminado el exceso de acetona del botón mediante corriente de aire mientras era mantenido en hielo. Seguidamente el botón precipitado fue resuspendido en 50 µL de PBS estéril y cuantificada la cantidad de proteínas como ya ha sido descrito anteriormente.

Para llevar a cabo la electroforesis, las muestras fueron ajustadas a 75 µg por pocillo en 5 µL de tampón de carga 4X en una proporción 1:3. Las muestras junto con el tampón de carga se calentaron durante 10 minutos a 98 °C, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 minutos a fin de eliminar posibles grumos y posteriormente se cargaron en el gel.

#### **3.4.6.2. Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.**

Los reactivos, concentraciones y volúmenes para hacer los geles se describen en el último apartado de este capítulo. Primero se preparó el gel separador al 12% de acrilamida/bis-acrilamida en tampón tris pH 8.8, el cual se agregó sobre el soporte de cristal e inmediatamente se añadió 2 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich, 19516) para lograr que el borde superior del gel fuese horizontal y evitar la formación de burbujas, se dejó polimerizar durante 20 minutos y posteriormente se eliminó el isopropanol. Una vez polimerizado el gel separador se agregó el gel concentrador preparado con tampón tris a

pH 6.8 y finalmente se colocó el peine de 1 mm de grosor de 9 pocillos, hasta finalizar su polimerización.

Las muestras preparadas fueron colocadas en los pocillos formados, de igual manera que el marcador de peso molecular de proteínas PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, 26616). Seguidamente se aplicó un campo eléctrico usando un voltaje constante de 70 V para la separación de las muestras en el gel espaciador y 150 V para la separación en el gel separador. La separación electroforética se desarrolló en una cubeta con tampón de electroforesis. La electroforesis se realizó utilizando un sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, EE. UU).

#### **3.4.6.3. Western Blot.**

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de SDS-PAGE conteniendo las proteínas se colocaron durante 10 minutos en un tampón de equilibrio previo a la transferencia. Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Bio-Rad, 1704156) de 0.2  $\mu\text{m}$ . Para ello, se utilizó un sistema de transferencia semi seco Trans blot Turbo (Bio-Rad, Laboratories, Singapore). Las condiciones de la transferencia fueron de 25 V y 0.5 A durante 30 minutos. Una vez hecha la transferencia, la membrana PVDF fue teñida con el tinte rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich, P7170) para comprobar la presencia de las bandas. Posterior a la transferencia, las membranas fueron bloqueadas para lograr uniones específicas de los anticuerpos utilizados en el reconocimiento antigénico. Este proceso se realizó mediante la incubación de la membrana en una solución de bloqueo preparada con leche en polvo desnatada al 5% en PBS-T e incubada durante toda la noche, a 4°C en agitación suave. Finalizada la incubación se realizaron 5 lavados de 10



minutos cada uno con tampón de lavado compuesto por PBS-Tween 20 (0.1%).

Para la inmunodetección, las proteínas inmovilizadas en la membrana se incubaron con anticuerpos primarios específicos que permitieron identificar y cuantificar perfiles de proteínas concretas de una mezcla compleja de proteínas. Para estos ensayos se prepararon diferentes anticuerpos primarios y secundarios que se describen en la Tabla 3.4.2. Los anticuerpos primarios utilizados se incubaron durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda y en agitación suave. Pasado el tiempo de incubación se lavaron 3 veces con PBS-T. Para la isotipificación de las inmunoglobulinas se agregó un segundo anticuerpo primario con la finalidad de reconocer las Ig Gs descritas en la Tabla 3.4.2. El anticuerpo se incubó por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente y en agitación lenta. Una vez pasado el tiempo de incubación, se lavó tres veces con PBS-T y se colocó el anticuerpo secundario (Tabla 3.4.6.3) durante 1 hora, a temperatura ambiente, en cámara húmeda, protegidos de la luz, y en agitación suave. Terminada la incubación se lavó 3 veces las membranas con PBS-T (Figura 3.4.2). La reacción se visualizó utilizando el sustrato Clarity® ECL Western substrate (Bio-Rad Laboratories, 170-5060) en un equipo de análisis de imágenes ChemiDoc® (Bio-Rad Laboratories, EE. UU).

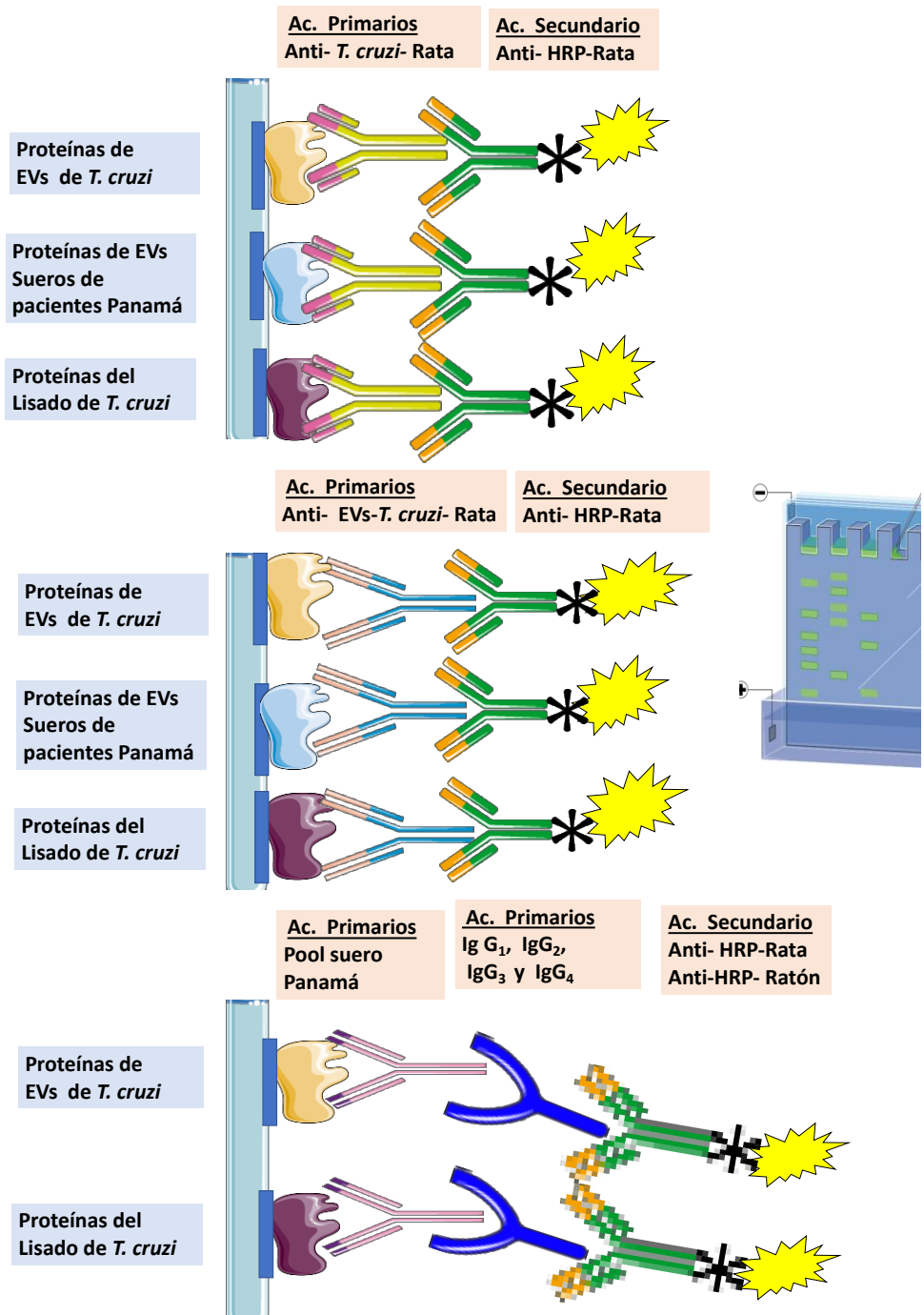


Figura 3.4.2.- Esquema de Inmunodetección

**Tabla 3.4.2.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el reconocimiento de proteínas totales y anticuerpos de sueros chagásicos crónicos a través de Western Blot.**

Anticuerpo Primario	Fabricante/Referencia	Dilución	Anticuerpo Secundario	Fabricante/Referencia	Dilución
Anti <i>T. cruzi</i> (rata)	Inmunosuero	1:1000	Anti-Rat IgG (whole molecule)-Peroxidase	Sigma-Aldrich A9542	1:5000
Anti exosoma de <i>T. cruzi</i> (rata)	Inmunosuero	1:500	Anti-Rat IgG (whole molecule)-Peroxidase	Sigma-Aldrich A9542	1:5000
Pool de Sueros de pacientes chagásicos	Inmunosuero	1:200	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated). Anti-Rat IgG (whole molecule)-Peroxidase	Dako P0447 Sigma-Aldrich A9542	1:5000 1:5000
Anti-Human IgG1 Clone HP6001	Sigma-Aldrich MAB1307	1:500	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated)	Dako P0447	1:1000
Monoclonal Anti-Human IgG2 (Fc specific) antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich I9513	1:500	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated)	Dako P0447	1:1000
Mouse monoclonal [HP6050] Anti-Human IgG3 hinge heavy chain	Abcam ab99826	1:500	Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (affinity isolated)	Dako P0447	1:1000
Mouse Anti-Human IgG4 pFc' [HP6023] (HRP)	Abcam ab99817	1:500			
Anti-GAPDH (Loading control antibody, GA1R) (control de carga)	Invitrogen MA5-15738	1:5000	Polyclonal Goat Anti-Rabbit immunoglobulins/HRP	Dako Denmark P0448	1:2000

Las membranas PVDF fueron reutilizadas con el propósito de asegurar la misma carga proteica en todos los Western Blot y lograr una correcta cuantificación de las bandas obtenidas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 24 horas en una solución ácida pH 2.3 compuesta por glicina (Sigma-Aldrich, G7126) 2 M, HCl 37% (Schalau, AC07411000),  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M7522) y Tween 20, 10 % v/v (Sigma-Aldrich, P7949), lo que permitió la eliminación de los anticuerpos utilizados en la inmunodetección de otras proteínas. Luego de la incubación se

realizaron abundantes lavados, que facilitaron la eliminación de los anticuerpos y de la propia solución de ácida. A continuación se procedió al nuevo bloqueo de las membranas y uso de otros anticuerpos tal y como se indico anteriormente (gonzalez, Lozano, and Fonseca 2007).

### **3.5. Ensayos de biodistribución y localización de las EVs e inmunocomplejos (EVs- IgGs) de tripomastigotes de *T. cruzi* en órganos de ratón.**

Para determinar la biodistribución y localización de EVs e inmunocomplejos en los diferentes órganos de un modelo animal, se diseñó un ensayo con seguimientos cada 24 horas para tomas de muestras e imágenes. Los protocolos se describen a continuación.

#### **3.5.1 Preparación de EVs e Inmunocomplejos (EVs-IgGs) para ensayo de biodistribución y localización.**

Las EVs purificadas y cuantificadas como ya se ha detallado anteriormente fueron ajustadas a una concentración aproximada de 0.4 mg /  $\mu$ L. Alícuotas de 50  $\mu$ L fueron tratadas previamente a temperaturas de 37 °C y 80 °C en una termoplaca (Major Science, Taiwán) durante 30 minutos. La formación de los inmunocomplejos (EVs-IgG) se realizó por incubación de las EVs con 100  $\mu$ L de IgGs de ratón procedentes de los inmunosueros anti *T. cruzi*, que previamente habían sido purificadas por columnas de Prot G y diluidas 1:100 en PBS 1X. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora en rotación orbicular. Seguidamente se realizaron dos lavados con PBS filtrado y centrifugado a 100,000  $\times$  g durante 1 hora a 4°C a fin de eliminar las inmunoglobulinas no

unidas. Una vez formado el inmunocomplejo (EVs-IgGs), se procedió al marcaje con el colorante lipofílico.

### **3.5.2. Marcaje de EVs y de inmunocomplejos (EVs- IgGs) con colorante lipofílico (DiR).**

Para el marcaje se utilizaron 4 alícuotas de 50  $\mu$ L de EVs. Se prepararon EVs e inmunocomplejos con tratamientos térmicos a 37°C y 80°C (dos de EVs solas y dos de inmunocomplejo). Seguidamente, las 4 alícuotas se tiñeron con 10  $\mu$ L del fluoróforo lipofílico 1,1-dioctadecil-3,3,3,3-tetrametilindotricarbocianina yoduro (DiR) (Invitrogen, D12731) diluido en PBS (1:10). El DiR es un colorante fluorescente que se une a membranas permitiendo su marcaje. Dicho marcaje se realizó durante 45 minutos a 37°C, en rotación orbicular protegidas de la luz. Posterior a la incubación se realizaron dos lavados con PBS filtrado por centrifugación a 100,000  $\times$  g durante 1 hora a 4°C, a fin de eliminar el exceso de colorante no ligado, seguidamente se almacenó a 4 °C protegido de la luz hasta su uso (Figura 3.5.1).

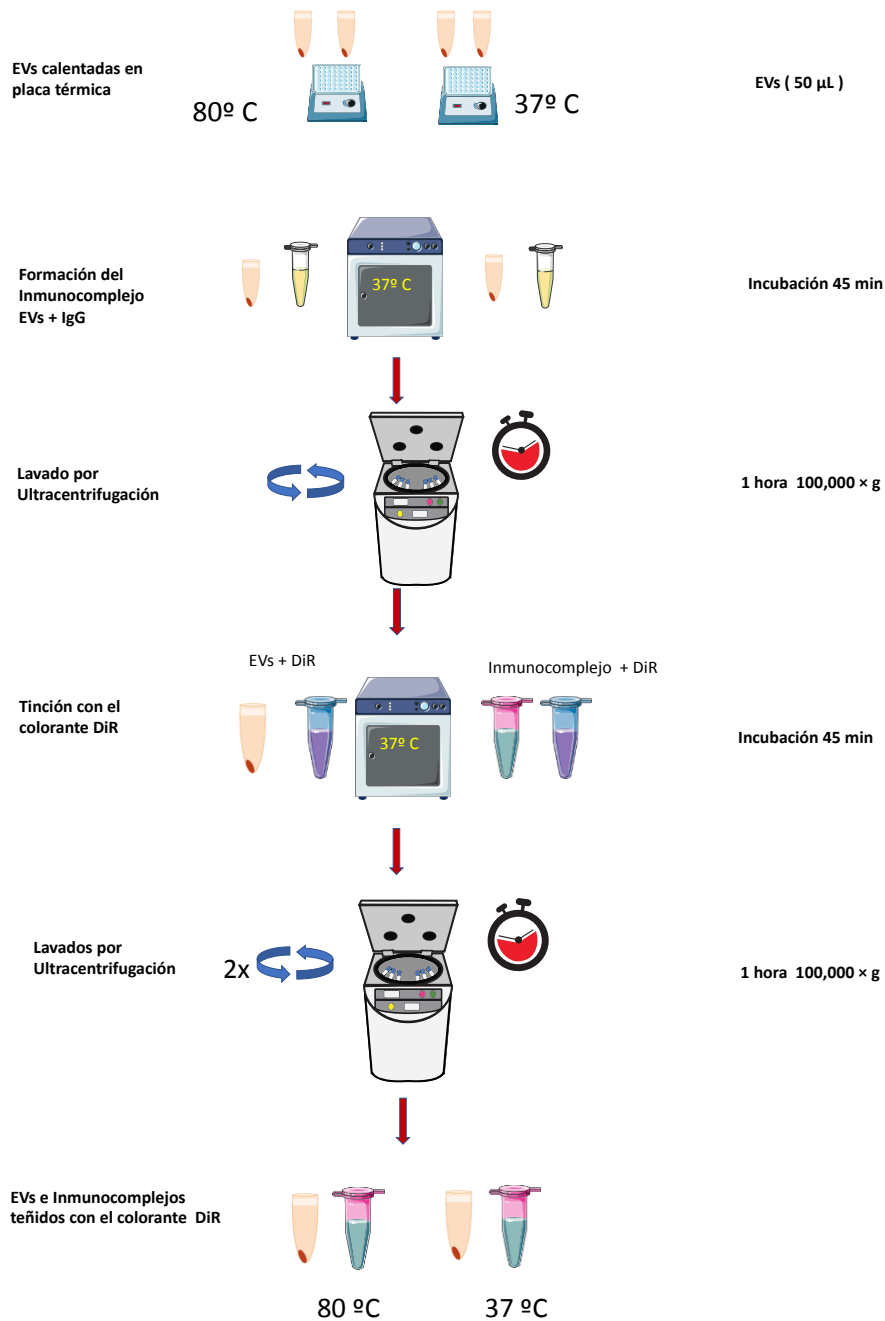


Figura 3.5.1.- Esquema del desarrollo del marcaje de EVs e Inmunocomplejos de *T. cruzi*

### **3.5.3. Biodistribución de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* e inmunocomplejos (EVs-IgGs) anti-*T. cruzi* mediante el sistema de análisis de imágenes IVIS en ratones CD1.**

Siguiendo los protocolos y reglamentación de la legislación española vigente para el Bienestar Animal, se utilizó un total de 22 ratones, 2 grupos de 10 ratones hembra CD1 de 4 semanas y 2 ratones control. Cada experimento se realizó por duplicado.

El primer grupo de 10 ratones fue dividido en dos grupos de 5. El primer grupo de 5 fue inoculado con 50  $\mu$ L de EVs recién purificadas calentadas a 80°C, al objeto de desnaturalizar las moléculas bioactivas de dichas vesículas y marcadas como se describe en el apartado anterior con el fluoróforo lipófilo DiR, inyectado por vía intravenosa (iv) en la vena de la cola. El segundo grupo de 5 ratones se inoculó con EVs incubadas a 37°C igualmente marcadas con DiR. El segundo grupo de 10 ratones también se dividió en dos grupos de 5, el primer grupo de 5 animales se inoculó con EVs calentadas a 80 °C unidas a IgG de ratón purificadas (Inmunocomplejos) marcadas con DiR. El segundo grupo de 5 ratones fue inoculado con EVs incubadas a 37°C unidas a IgG de ratón y marcadas con el colorante DiR. Los 2 ratones control fueron inoculados con 50  $\mu$ L de PBS 1X estéril y filtrado con 10  $\mu$ L de DiR. Con los 4 grupos de 5 ratones debidamente identificados se realizaron mediciones a los 30 minutos de realizar la inoculación y posteriormente cada 24 horas por 5 días consecutivos para el análisis de la distribución de DiR-EVs-IC, a través del equipo IVIS Spectrum (Perkin Elmer) (Figura 3.5.2). Se tomaron imágenes de los ratones vivos sedados con isoflurano (Isovet<sup>®</sup>, CN571105.8) 1000 mg/g (Líquido para inhalación del vapor). Dependiendo de la distribución de las exovesículas en los diferentes órganos a medida que transcurrían los días, se elegía un ratón de cada grupo de 5 para tomar las

imágenes *in vivo* y luego practicarle la necropsia. Durante la sedación con isoflurano se extrajo sangre a través de punción intracardiaca, para la obtención de suero y seguidamente se realizó la necropsia.

Los órganos fueron analizados por imagen y colocados inmediatamente en proporción de al menos 10 volúmenes del reactivo (o aproximadamente 10  $\mu$ L de reactivo por 1 mg de tejido) en RNAlater<sup>®</sup> (Invitrogen, AM7020) un reactivo de almacenamiento de tejido que impregna rápidamente los tejidos para estabilizar y proteger el ARN celular para estudios de determinación de interleukinas por RTq PCR. Los datos de imágenes se analizaron con el software IVIS (Living Image Software for IVIS).<sup>®</sup>



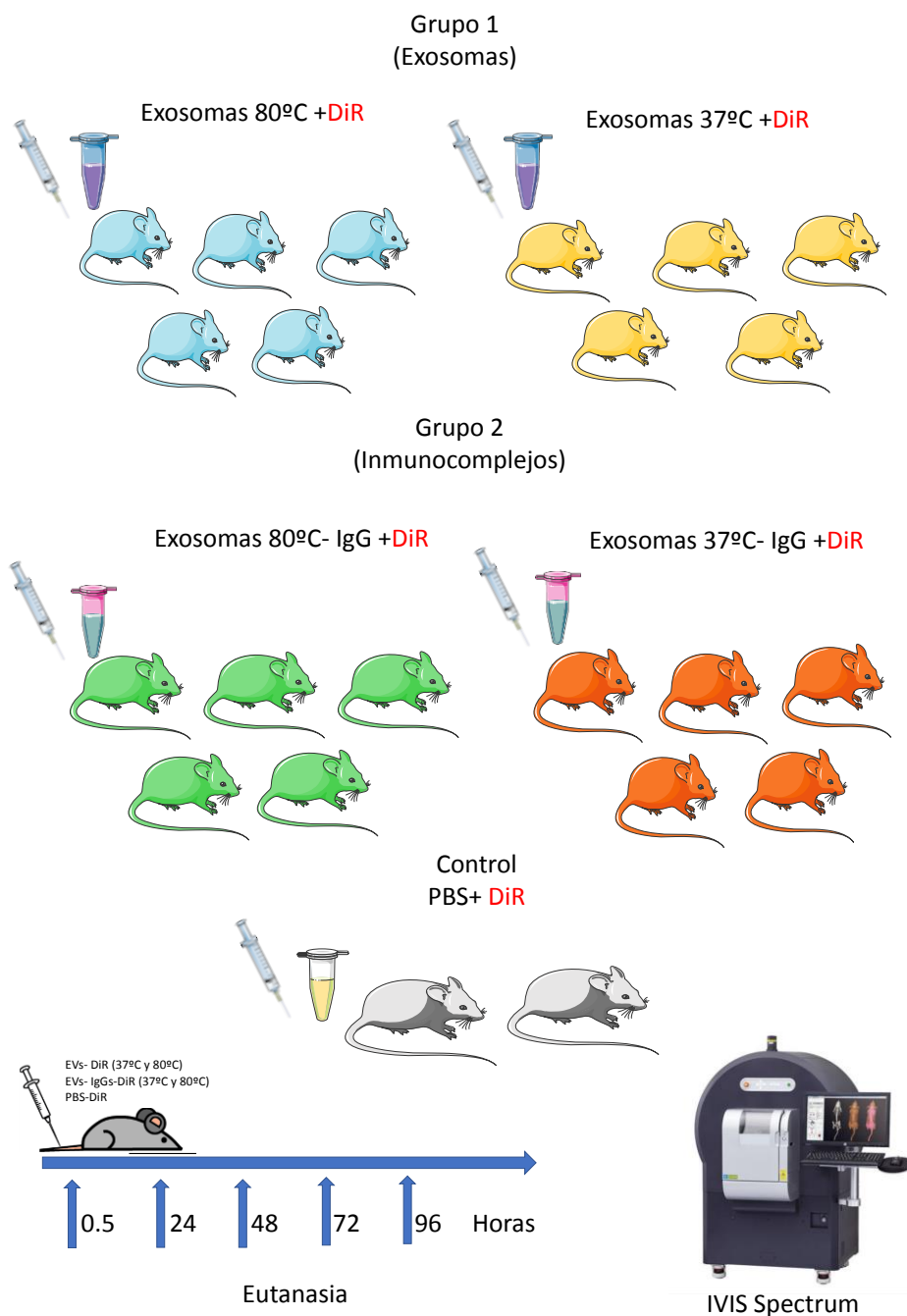


Figura 3.5.2.- Esquema de los ensayos de biodistribución de las EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* e inmunocomplejos EVs-IgGs anti-*T. cruzi* mediante el sistema de análisis de imágenes IVIS en ratones CD1.

### **3.6. Cuantificación de la expresión de interleucinas en muestras de hígado y bazo de ratones CD1 inoculados con EVs e inmunocomplejos (EVs-IgG) de tripomastigotes de *T. cruzi*.**

Para cuantificar la expresión génica de una batería de interleucinas detalladas en la Tabla 3.6, en muestras de hígado y bazo de ratones CD1, se extrajo el RNA siguiendo los protocolos descritos por Florell y colaboradores (Florell et al. 2001).

#### **3.6.1. Extracción de RNA de hígado y bazo de ratones CD1.**

Con la finalidad de estudiar la expresión de interleucinas en modelo animal, se realizó la extracción de ARN de muestras de órganos colocados en 2 mL de RNAlater. Este protocolo se llevó a cabo con el kit comercial RNeasy® Midi kit (Qiagen, 74104), siguiendo las especificaciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente se pesaron aproximadamente 10 mg de tejido de hígado y bazo procedente de los diferentes grupos objeto de estudio, que fueron homogenizados manualmente con jeringuillas de diferentes calibres 23G x1” y 25G x1” mm (BD Microlance™, 300600) con 600 µL de tampón RLT. Seguidamente se precipitaron los ácidos nucleicos con 600 µL de etanol al 70 % y se transfirió a una columna (de membrana de sílice con una capacidad de unión de 100 µg de ARN), para centrifugar 30 seg a 8000 × g. El eluido se descartó en el tubo colector colocándose la columna en un nuevo tubo, al cual se agregó otros 700 µL del tampón RW1 con el objeto de lavar la membrana de la columna, centrifugándose nuevamente a 30 seg a 8,000 × g. El proceso de lavado se repitió nuevamente y se añadieron 500 µL de tampón RPE centrifugándose 30 seg a 8,000 × g. Este paso se repitió nuevamente con una centrifugación de 2 minutos. Se cambio nuevamente el tubo colector y se realizó una

centrifugación de 1 min a  $8000 \times g$ , para garantizar que no quedaran restos de los tampones previamente utilizados. Finalmente, la columna se colocó en un eppendorf de 1.5 mL y se añadieron directamente a la membrana de la columna 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas para posteriormente centrifugar 1 min a  $8,800 \times g$ . Este paso se repitió al menos dos veces. Todo el protocolo se realizó manteniendo las muestras a  $4^\circ\text{C}$ . El RNA total obtenido fue cuantificado espectrofotométricamente en un equipo (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific) y almacenado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso. La calidad del RNA fue evaluada a través de una electroforesis en gel desnaturizante (Aranda, LaJoie, and Jorcyk 2012) como se describe a continuación.

### **3.6.2. Verificación de la calidad del RNA extraído de diferentes muestras de tejidos mediante electroforesis en gel desnaturizante.**

Una vez se obtuvieron los RNA de las muestras biológicas, se llevó a cabo una electroforesis en gel desnaturizante a fin de evaluar visualmente la calidad del RNA; para ello se siguió la metodología descrita por Aranda y colaboradores (2012), con algunas modificaciones (Aranda et al. 2012). Se preparó un gel de agarosa de bajo peso molecular (Condalab, 8010.22) al 1% en 50 mL de tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) al que se agregó 200  $\mu\text{L}$  de hipoclorito de sodio al 15% y 5  $\mu\text{L}$  de Sybr® Safe DNA (Invitrogen, S33102). La electroforesis se realizó en el tampón de corrida TAE 1X, cargándose junto a las muestras un marcador de DNA de 50-1000 pb (Canvax, L0009) y las muestras de RNA (concentración mínima de  $1\mu\text{g}$ ) con tampón de carga de DNA (Invitrogen, 10816-015) para una concentración final de 1X. El gel se corrió durante 50 minutos a 100V. El resultado de la electroforesis se visualizó en el equipo de análisis de imágenes ChemiDoc® (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.). La banda de 28s (corre a 4.8kb) y 18s (corre a 2kb) se observaron separadas.

### **3.6.3. Eliminación del DNA genómico e inactivación de la Enzima DNasa**

#### **1.**

Para eliminar el DNA genómico se utilizó El kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, AM1907), que contiene reactivos para la digestión completa y eficaz del DNA y la eliminación de la enzima y los cationes divalentes tras la digestión, ya que se elimina cantidades mínimas de ADN que pueden proporcionar falsos resultados con la RT-qPCR. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Para ello en un eppendof libre de RNAasa de 0.5 ml se agregó 5 µL del buffer DNase turbo, 1 µL de DNasa turbo y 44 µL de RNA total, para un volumen final de 50 µL. Seguidamente se agitó en un vortex, se centrifugó brevemente y se incubó 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregó 5 µL de reactivo de inactivación y se mezcló nuevamente durante 20 seg para posteriormente centrifugar durante 1.5 min a 10,000 × g. Finalmente, el sobrenadante se almacenó a -80° C hasta su uso.

### **3.6.4. Retrotranscripción del RNA**

La retrotranscripción se realizó con el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, 205311) siguiendo las especificaciones del fabricante, en un volumen final de 20 µL, como se describe en la tabla 3.6.1.

Tabla 3.6.1.- Reactivos para la retrotranscripción.

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O MQ	9 $\mu\text{L}$
gDNA Wipeout Buffer	2 $\mu\text{L}$
RT Primer Mix	1 $\mu\text{L}$
Quantiscript RT Buffer	4 $\mu\text{L}$
Transcriptasa inversa cuantiscript	1 $\mu\text{L}$
RNA	3 $\mu\text{L}$
Volumen final	20 $\mu\text{L}$

Las condiciones de la retrotranscripción fueron: 2 minutos a 42 °C, 16 min a 42 °C y finalmente 2 min a 92 °C.

### 3.6.5. Determinación de los niveles de expresión de genes de interleucinas a través de RT-qPCR.

La amplificación de los diferentes genes seleccionados para el estudio de las interleucinas se realizó utilizando oligonucleótidos, diseñados con el programa eprimer3, cuyas secuencias se encuentran descritas en la Tabla 3.4. Para cada pareja de oligonucleótidos se hizo una curva de calibración y se optimizaron las condiciones de amplificación. El gen de referencia utilizado para normalizar la expresión de cada interleucina y como control interno de la reacción, fue el gen de la  $\beta$ -actina (338-340). El cDNA con concentraciones aproximadas de 50 ng por reacción fue amplificado por triplicado usando el reactivo Ssofast<sup>TM</sup> Eva Green<sup>@</sup> Supermix (BIO-RAD, 172-5201). La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , como se describe en la Tabla 3.6.2.

Tabla 3.6.2.- Reactivos para la qPCR.

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Eva Green	5 $\mu\text{L}$
IL-qPCR-F	0.4 $\mu\text{L}$
IL-qPCR-R	0.4 $\mu\text{L}$
ADNc (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O MQ	2.2 $\mu\text{L}$
Volumen final	10 $\mu\text{L}$

Las condiciones de la amplificación fueron: 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, alineamiento a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 60 °C durante 1 minuto, y finalmente mantenidas a 12°C. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador CFX96™ Real-Time System (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD, Singapore). Los cebadores de ensayo fueron sintetizados por Life Technologies™ (Tabla 3.6.3). El ciclo umbral del gen diana promedio ( $\Delta\text{Ct}_g$ ) para cada muestra (calculado utilizando los valores CT de las réplicas técnicas dentro de cada condición experimental) se normalizó a los valores promedio Beta actina ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Beta actina}}$ ) de la misma muestra de cDNA. Luego, las variaciones de expresión calculadas se normalizaron para el control interno (es decir, la célula de control a las 3 h) usando el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ .

Finalmente, la expresión de cada gen se calculó como la diferencia en el umbral de los ciclos qPCR ( $\Delta\text{CT} = \text{CT gen de interés} - \text{CT gen o genes de referencia}$ ). La expresión de cada gen se determinó como la diferencia entre los valores  $\Delta\text{Ct}$  ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ), utilizando en cada caso su control. Como un ciclo de PCR representa 2 veces la diferencia en la abundancia del DNAc

(generado a partir del RNAm por la enzima Transcriptasa Reversa), los cambios en la abundancia relativa se calcularon como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Tabla 3.6.3.- Secuencia de oligonucleótidos de interleucinas estudiadas.**

Interleucina	Secuencia (5'- 3')	Temperatura de Melting
β-Actina	F TCCATCATGAAGTGTGACGT R GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	60 °C
IL2	F CCACTTCAAGCTCCACTTCA R ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT	55°C
IL4	F CCTCACAGCAACGAAGAACA R ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT	55°C
IL9	F TGATTGTACCACACCGTGCT R AGGTCACTCCAACGATACGG	55°C
IL10	F CAGAGCCACATGCTCCTAGA R TCATTTCCGATAAAGGCTTGG	55°C
IL12	F GACCAAACCAGCACATTGAA R CTACCAAGGCACAGGGTCAT	55°C
IL13	F AGCATGGTATGGAGTGTGGA R TTGCAATTGGAGATGTTGGT	60 °C
IL15	F CATTTTGGGCTGTGTCAGTG R TGCAACTGGGATGAAAGTCA	55°C
IL17	F TCCAGAAGGCCCTCAGACTA R TCATGTGGTGGTCCAGCTT	60 °C
IL21	F GAGGACCCTTGTCTGTCTGG R TCATCTTTTGAAGAAGCCATTT	60 °C
IL23	F TAATGTGCCCCGTATCCAGT R AGGCTCCCCTTTGAAGATGT	60°C
IL25	F ACCACAACCAGACGGTCTTC R CTGCTTCAGGTAGGGCTTTG	55°C
IL38	F TCAGTATGGGTGGAGGGT R ACAAGGGAGGTGAACAAA	60 °C
INF - γ	F GCTCTCCTCATGGCTGTTT R GTCACCATCCTTTTGCCAGT	55°C
TGF-β	F TGGAGCAACATGTGGAAGTC R AGCCCTGTATCCGTCTCCT	55°C
TNF- α	F CCCCAAAGGGATGAGAAGTT R CACTTGGTGGTTTGCTACGA	55°C

### **3.7. Caracterización de EVs de *T. cruzi*.**

El estudio de los exosomas por diferentes técnicas resulta un verdadero desafío debido a su pequeño tamaño (50-100 nm). En este apartado se detallan diversas técnicas biológicas y químicas que permiten su caracterización (Kotrbová et al. 2019); (Szatanek et al. 2017).

#### **3.7.1 Dynamic Light Scattering (DLS).**

Con el objetivo de determinar el tamaño de las EVs purificadas de tripomastigotes y epimastigotes del *T. cruzi*, se preparó una dilución (1:100) con 10 µL de la muestra de exosoma resuspendida en 990 µL de PBS filtrado 0.2 µm, se mezcló bien y se cargó en la cubeta. Se tomaron tres determinaciones por muestra para cada experimento independiente, a temperatura ambiente (25°C) usando un medidor de partículas de alto rendimiento o sistema Zetasizer Nano range system (Malvern Instruments, RU).

#### **3.7.2 Caracterización de EVs de *T. cruzi* a través de la detección de las proteínas cruzipaina y trans-sialidasa mediante ensayos de Western Blot.**

La superficie celular de *T. cruzi* está cubierta por una amplia gama de moléculas que incluyen miembros de la familia proteica *trans*-sialidasa (TS/gp85), glicoproteínas similares a mucina, superfamilias de proteínas asociadas a mucina (MASP) y proteasas implicadas en la adhesión e invasión a la célula del huésped por las formas infectivas del parásito, como es el caso de la cruzipaina (Czp) (Brossas et al. 2017; Ferrão et al. 2015). Estudios de proteómica indican variaciones en el contenido de las EVs de tripomastigotes



y epimastigotes de las distintas cepas (Brossas et al. 2017; Ribeiro et al. 2018).

### 3.7.2.1. Preparación de muestras.

Para la electroforesis se utilizó EVs de tripomastigote y epimastigote de *T. cruzi* Pan 4 y lisado de tripomastigotes *T. cruzi* Pan 4. Todas las muestras se precipitaron con acetona (VWR, 20067.320) en proporción 3:1 v/v durante 24 horas a -20 °C. Una vez precipitada las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado en su totalidad y del botón evaporada los restos de acetona. Seguidamente el botón se resuspendió en 50 µL de PBS 1X estéril filtrado, filtro de 0,22 µm (Sartorius, 16534) y cuantificado a través del kit comercial BCA Protein Assay Kit® (Thermo Fisher Scientific, 23235).

Para el desarrollo de este ensayo también se incluyó muestras de EVs de tripomastigotes y epimastigotes tratadas con Proteinasa K con el objetivo de eliminar las proteínas de su superficie.

Para llevar a cabo el tratamiento enzimático, se incubó una alícuota de 1,5 µg de tripomastigotes en 2 mL de solución de Hank (pH 7,5) durante 1 hora a 37°C, con proteinasa K (Merck, 70663-5) (0,5 mg / mL) en rotación orbicular. Seguidamente la muestra se lavó dos veces con PBS mediante ultracentrifugación a 100,000 x g durante 2 h con la finalidad de eliminar la enzima restante. La incubación de las EVs con la enzima se realizó de acuerdo con Retana Moreira et al (2019) (Retana Moreira, Rodríguez Serrano, and Osuna 2019). Las EVs tratadas con proteinasa k fueron precipitadas y cuantificadas de igual manera como se describió anteriormente.

Con dichas muestras se llevó a cabo un Western Blot, como se ha descrito previamente, y las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-trans-sialidasa (mAb 39) y anti-cruzipaína, donados por el Dr. J. González, de la Universidad de Antofagasta, Chile (Tabla 3.7.1).

**Tabla 3.7.1.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la caracterización de EVs de *T. cruzi* Pan4 a través de ensayos de Western Blot.**

Anticuerpo Primario	Fabricante/ Referencia	Dilución	Anticuerpo Secundario	Fabricante/ Referencia	Dilución
Anti Trans-sialidasa (mAb 39)	Inmunosuero. Universidad de Antofagasta, Chile.	1:1000	Goat Anti-Mouse-HRP	Dako P0447	1:1000
Anti- Cruzipaína	Inmunosuero. Universidad de Antofagasta, Chile.	1:1000	Goat Anti-Rabbit-HRP	Dako P0448	1:2000
Anti <i>T. cruzi</i> (Ratón)	Inmunosuero	1:100	Goat Anti-Mouse-HRP	Dako P0447	1:1000
Anti-calmodulina (control de carga)	Abcam ab2860	1:500	Goat Anti-Mouse-HRP	Dako P0447	1:1000

### 3.7.3 Caracterización microscópica de la interacción EVs de *T. cruzi* – célula

#### 3.7.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Los experimentos de interacción EVs- célula se realizó en células Vero que fueron tratadas con exosomas de tripomastigote de *T. cruzi* Pan4 a diferentes tiempos.

### 3.7.3.1.1. Preparación de muestras para el estudio de la interacción célula- EVs mediante SEM.

Para nuestros ensayos de SEM se usaron células Vero (ECACC 84113001) ( $1 \times 10^4$  células /mL) cultivadas en medio Eagle's modificado (MEM) (Sigma-51200-046), suplementado con 10% de SFBI (Gibco, 10439024), más antibióticos (penicilina 100 U / mL, estreptomycin 100  $\mu$ g / mL), sobre cubreobjetos de 13 mm (Marienfeld, 111530) en placas de cultivo de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, 142475). El cultivo fue mantenido a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez adheridas y formando la monocapa de forma confluyente se lavaron dos veces con medio MEM sin suero. Seguidamente se le agregó, 300  $\mu$ L de MEN sin suero y 30  $\mu$ L (0.1  $\mu$ g/  $\mu$ L) de EVs de *T. cruzi*, todo ello previamente calentando a 37 °C. Los tiempos de interacción previo a la fijación fueron de 5, 7.5 y 10 minutos. Transcurrido los diferentes tiempos de incubación a 37°C, las células fueron lavadas tres veces con MEN sin suero y fijadas con 500  $\mu$ L de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, P6148) 4% (v/v) en PBS durante una hora a 37 °C.

Tras la fijación se lavó la placa con PBS y se procedió a bloquear los grupos aldehído libres agregándose glicina (Sigma-Aldrich, G7126-1KG) 0.02 M, pH 7.1 durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. La placa de cultivo fue lavada con PBS y bloqueada con 1% de ovoalbúmina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, A5503-5G) con tres incubaciones de 10 minutos a temperatura ambiente. Tras el proceso de bloqueo se llevaron cabo tres lavados con PBS y se procedió a realizar el marcaje con los anticuerpos.

### **3.7.3.1.2. Inmunomarcaje.**

Para el inmunomarcado se utilizó un anticuerpo primario anti *T. cruzi-rata* policlonal, diluido 1:50 durante dos horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS ultra filtrado se agregó el anticuerpo secundario marcado con oro coloidal Anti-Rat IgG-Gold (10nm) (Sigma-Aldrich, G7035) en dilución 1:50 durante dos horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los cubreobjetos con tampón carbonato/ bicarbonato de sodio pH 8.3 filtrado y se fijó con 500  $\mu$ L de una solución de glutaraldehído (Sigma, G6257) al 1% y paraformaldehído (Sigma, P6148) al 2% en tampón de cacodilato de sodio isotonzado con sacarosa 0,1 M durante 30 minutos a 37°C.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio AURIGA™ FIB-FESEM (Carl Zeiss SMT), en el Centro de Instrumentación científica (CIC) de la Universidad de Granada con capacidad de analizar cationes mediante un equipo OXFORD Instrument.

### **3.7.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).**

Para verificar los mecanismos por la cual se da la interacción célula-EVs se realizó el protocolo que se describe a continuación tanto con células Vero como con células Raw 264.7 (macrófagos) en diferentes tiempos.

### 3.7.3.2.1. Preparación de muestra para el estudio de la interacción célula- EVs mediante TEM.

Las interacciones con células Vero fueron realizadas cómo ya se ha sido descrito para SEM, en este caso en frascos de cultivos de 25 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher, 156340), con medio MEM a 37 °C, en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La monocapa confluyente, se puso en contacto con una suspensión de 30 µL de EVs (0.4 µg/µL) de *T. cruzi* Pan4, con tiempos de interacción de 1, 5, y 10 minutos.

Transcurrido los tiempos de incubación, las células tratadas con las EVs fueron lavadas tres veces con MEM sin suero y fijadas con 3 ml de 4 % paraformaldehído (Sigma-P6148) 1% glutaraldehido (v/v) en PBS durante 2 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de fijación las células se lavaron tres veces con PBS, tras lo que se separó la monocapa con un “cell scraper” (SPL Life Science, 90020) para luego concentrar las células fijadas por centrifugación 10 minutos a 16,000 g.

Una vez centrifugadas las células, se descartó el sobrenadante y el botón de células fue resuspendido en 100 µL de PBS y procesado en el laboratorio de muestras Biológicas del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, para realizar los cortes y montar sobre rejillas de níquel.

Para los ensayos con células Raw se cultivó 2x10<sup>4</sup> células /mL en frascos de cultivo de 25mm<sup>2</sup> con 5 mL de medio DMEM suplementado con glutamina, 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Una vez los cultivos tenían monocapas confluentes en un 70-80%, se les agregó 30 µL de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración aproximadamente de 0.4 µg/µL a diferentes tiempos de incubación. Los siguientes pasos del protocolo se realizó como se ha descrito antes.

### 3.7.3.2.2. Inmunomarcaje.

Las rejillas montadas con los cortes de células Vero tratadas con las EVs en diferentes tiempos, se utilizaron para la inmunocitoquímica como se describe a continuación, donde se utilizó una serie de pasos de bloqueo. El primer paso fue bloquear los restos de fijador y de resina que pudieran interactuar con los anticuerpos. Para ello las rejillas se transfirieron a una solución de glicina (Sigma, G7126) 0.02 M en PBS, pH 7.3 durante 10 min a temperatura ambiente, con el objetivo de bloquear los grupos aldehídos de las muestras que pudieran haber quedado libres, posteriormente fueron sumergidas en una gota de solución de gelatina de teleósteo (Fluka Chemie, AG-48722) al 1% en PBS 1X durante 10 min a temperatura ambiente. Se bloqueo nuevamente 3 veces en una solución al 1% de ovoalbúmina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, A5503), disuelta en PBS 1X durante 10 min a temperatura ambiente. Tras ello, las rejillas fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal (anti- *T. cruzi* de rata), diluido en tampón de bloqueo de ovoalbúmina (1/75) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de la incubación con el anticuerpo, se realizaron 4 lavados por 5 min con PBS 1X. La siguiente incubación fue con el anticuerpo secundario marcado con oro coloidal Anti-Rat IgG (whole molecule) Gold (Sigma- Aldrich, G7035) diluido 1:50 durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, las rejillas se lavaron 5 veces con PBS y con agua bidestilada a fin de eliminar las sales de la solución salina.

Las preparaciones fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo de Reynolds en el laboratorio centralizado de Muestras Biológicas del CIC.

### 3.7.3.2.3. Inmunomarcado con doble anticuerpo en la interacción célula-EVs.

Para el inmunomarcaje con doble anticuerpo se utilizó rejillas tanto con EVs y células Vero como con células Raw, tratadas con las diversas soluciones de gelatina, glicina y ovoalbúmina, como se detalló en el apartado 3.7.3.2.2. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: suero policlonal anti *T. cruzi*-rata (adsorbido en células Vero) dilución 1:25, anti -caveolina-conejo (Santa Cruz Biothechnology, sc-7942) diluido 1:100 y anti-Clatrina-cabra (Santa Cruz, sc-6580) diluido 1:100. Las muestras fueron incubadas 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Pasada la incubación se lavaron 5 veces con tampón carbonato pH 8.6 y se agregaron los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y preparados en tampón carbonato según las especificaciones del fabricante. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-rata marcado con oro coloidal de 18nm (Abcam, ab105302) diluido 1:50, anti-conejo marcado con oro coloidal (10nm) (Sigma- G7402) diluido 1:50 y proteína A marcada con oro coloidal (5nm) (Boster, GA1053) diluida 1:50. Luego de la incubación las rejillas fueron lavadas 5 veces con tampón carbonato y otras 5 veces con agua destilada para eliminar restos de sales. Para el inmunomarcaje doble de las células Raw se utilizó los anticuerpos primarios y secundarios de la Tabla 3.7.2.

Finalmente se llevaron al Servicio de procesamiento de muestra del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, para contrastar con acetato de uranilo al 2% y su posterior análisis.

**Tabla 3.7.2.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el inmunomarcaje de la interacción célula Raw- EVs de *T. cruzi*.**

Anticuerpo primario	Fabricante/ referencia	Dilución	Anticuerpo Secundario	Fabricante/ referencia	Dilución
Anti- <i>T. cruzi</i>	Inmunosuero	1:25	Anti -Rat- Gold (18nm)	Abcam ab105302	1:50
Anti- Clatrina	Invitrogen MA1-065	1:50	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50
Anti- Caveolina	Invitrogen MA3-600	1:50	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50
Anti- Calmodulina	Abcam ab2860	1:50	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50

Para complementar los ensayos de TEM se emplearon EVs de las formas tripomastigotes y epimastigotes tratados con Proteinasa K como ya se ha descrito anteriormente y se inmunomarcaron con los anticuerpos detallados en la Tabla 3.7.3.



**Tabla 3.7.3.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el inmunomarcaje de EVs de *T. cruzi*.**

Anticuerpo primario	Fabricante/ referencia	Dilución	Anticuerpo Secundario	Fabricante/ referencia	Dilución
Anti- <i>T. cruzi</i>	Inmunosuero	1:25	Anti -Rat-Gold (18nm)	Abcam ab105302	1:50
Anti- Transialidasa.	Inmunosuero	1:50	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50
Anti- Cruzipaína	Inmunosuero	1:50	Anti- Rabbit-Gold (10 nm)	Sigma-G7402	1:50
Anti- Clatrina	Invitrogen MA1-065	1:100	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50
Anti- Caveolina	Invitrogen MA3-600	1:100	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50
Anti- Calmodulina	Abcam ab2860	1:100	Anti.-Mouse IgG-Gold (10 nm)	Sigma 67777	1:50

**3.7.3.2.4. Preparación de muestras para tinción negativa de EVs de *T. cruzi*.**

Botones de EVs de tripomastigotes y epimastigotes ultracentrifugados por los protocolos ya descritos fijados y resuspendidos en PBS 1X, fueron llevados al CIC de la Universidad de Granada, para que en la unidad de procesamiento de muestra se le realizara la tinción negativa con el siguiente protocolo:

Se incubaron aproximadamente 15  $\mu$ L de exosomas sobre una rejilla de Níquel recubiertas con una capa de carbón, de malla 300, durante 5 minutos. Seguidamente se lavaron las rejillas con agua ultrapura durante un minuto (2 pasos). Posteriormente se hizo la tinción negativa en acetato de uranilo al 1% durante 1 minuto. Una vez terminada la tinción fueron secadas en papel de filtro y observadas en el TEM Libra 120 Plus de Zeiss a 120KV en el CIC.

### **3.7.3.3. Microscopia Confocal.**

A través de la microscopía confocal se obtuvo imágenes de alta calidad con detalles muy específicos de la interacción célula-EVs, estudiada con diversos anticuerpos que permitieron la reconstrucción de imágenes virtuales tridimensionales (3-D) de los diferentes tiempos.

#### **3.7.3.3.1. Marcaje *in vitro* de EVs.**

Los exosomas recién purificados y cuantificados con los protocolos detallados anteriormente, se resuspendieron en PBS 1X estéril hasta un volumen total de 100  $\mu$ L. Para marcar las EVs se utilizaron 3 colorantes diferentes: SYTO<sup>®</sup> RNASelec (Life Technologies <sup>TM</sup>-S32703), Bodipy<sup>®</sup>TRCeramide (Life Technologies <sup>TM</sup>-D7540) y PKH67 (Sigma-Aldrich, PKH67GL).

SYTO<sup>®</sup> RNASelec es un colorante fluorescente de color verde que tiñe los ácidos nucleicos, por lo que se une a los RNAs de los exosomas. Su espectro de absorción/ emisión máxima  $\sim$  490/530 nm). Para este marcaje se añadieron 10  $\mu$ L del colorante diluido 1: 250 en DMSO (Sigma -D8418) a 30  $\mu$ L de EVs con concentración de 1.0  $\mu$ g en los 30  $\mu$ L. La incubación del colorante con los exosomas se realizó a 37°C en la oscuridad durante 1 h. Después de la incubación, las EVs fueron lavadas dos veces con PBS a

100,000 × g en la ultracentrífuga Avanti J-301 (Beckman Coulter, EE. UU.) equipada con un rotor JA-30.50 Ti, durante 2 horas a 4°C, se resuspendieron a una concentración de 1 a 1,5 µg/µL, y fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

El marcaje con Bodipy®, un colorante lipofílico fluorescente rojo, con espectro de absorción/ emisión máxima ~589/617 nm, permitió un marcaje de la membrana de los exosomas (Laulagnier et al. 2005). Este marcaje se realizó bajo las mismas condiciones que el marcaje con el colorante SYTO®. El tinte PKH67 utiliza propiedades de marcaje de membrana al incorporar un colorante verde fluorescente con largas colas alifáticas en regiones de lípidos de la membrana celular. Es útil para monitorear exosomas o captación de liposomas, transferencia de membrana celular, fagocitosis y presentación de antígenos, así como para el estudio del tráfico celular in vivo.

El protocolo realizado en nuestros ensayos utilizó un volumen final de tinción de 2 ml que contenía una concentración final de  $2 \times 10^6$  M de PKH67 y 100 µL de EVs con una concentración de 1.0 µg. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente (20–25 ° C).

### **3.7.3.3.2. Preparación de muestras para la interacción célula Vero-EVs mediante microscopia láser confocal.**

Para desarrollar este protocolo se cultivaron células Vero en monocapa (80 % de confluencia aproximadamente) en cubetas rectangulares de 8 pocillos (Ibidi, 80827), en concentraciones de  $1 \times 10^4$  células durante 24 horas a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>. El medio utilizado fue MEM sin rojo fenol (Gibco, 51200-046), suplementado con 10% de SFBI. Posterior a la incubación, las células se lavaron dos 2 veces con PBS 1X filtrado con filtros 0.2 µm (Sartorius-16534) y se agregó a cada pocillo 100 µL del mismo medio, de

manera que cubriese la monocapa de células. Seguidamente se agregó a los pocillos 20  $\mu$ L de EVs (0.2  $\mu$ g) de tripomastigotas de *T. cruzi* que se mantuvieron en tiempos de interacción de 1, 5, y 10 e incubados a 37 °C. Pasado los diferentes tiempos, se lavó la cubeta con PBS 1X y se fijó con 3 mL de paraformaldeido 2 % (Sigma, P6148) en tampón cacodilato (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a la fijación se lavó 2 veces con PBS y se permeabilizó con Triton®X-100 (Sigma-Aldrich, X100) en PBS (v/v) al 0.1 %, 10 minutos a TA. Seguidamente se lavó 2 veces con PBS 1X y se agregó 100  $\mu$ L de una solución de faloidina marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Aldric, P-5282) en DMSO. Se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente, protegido de la luz, con la finalidad de teñir los microfilamentos de actina. Posterior a la incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X y finalmente para visualizar los núcleos de las células se agregó 300  $\mu$ L de DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Sigma-Aldrich®<sup>®</sup>, D9542) durante 5 minutos. Las preparaciones fueron lavadas 2 veces con PBS y se almacenaron en 300  $\mu$ L de PBS 1X a 4 °C en oscuridad hasta su observación. La observación de las muestras se llevó a cabo en el CIC (CIBM) de la Universidad de Granada en un microscopio confocal espectral de alta velocidad con cabezal ASHS-1 marca Nikon modelo A1. Para complementar los ensayos con faloidina se llevó a cabo el mismo protocolo con algunas modificaciones ya que la interacción célula-EVs se estudió utilizando EVs marcadas con los Colorantes: SYTO® RNASelec (Life Technologies™-S32703), Bodipy®TRCeramide (Life Technologies™, D7540) y PKH67 (Sigma Aldrich, PKH67GL), detallados en el apartado 3.7.3.3.1.

Los mismos protocolos se repitieron para el estudio de la interacción de células-EVs marcadas, en los tiempos 1, 5, y 10 min con otros anticuerpos primarios como anti- $\beta$ -Tubulina, Clatrina HC (N-19) y Caveolina-2 (H-96)

detallados en la Tabla 3.7.4. Una vez cumplidos los tiempos de incubación requeridos por cada anticuerpo se hicieron los lavados y se agregaron los anticuerpos secundarios (Tabla 3.7.4), según las especificaciones del fabricante. Se realizaron 3 lavados con PBS y finalmente para visualizar los núcleos de las células se agregó 300  $\mu$ L de DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride 1 mg (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, D9542) durante 5 minutos. Las cubetas se lavaron 2 veces con PBS y almacenaron con 300  $\mu$ L de PBS a 4 °C en oscuridad hasta su observación (Figura 3.7.1).

Adicional a los anticuerpos ya mencionados se utilizó el colorante fluorescente LysoTracker<sup>™</sup> (Invitrogen, L7528) que se acumula selectivamente en orgánulos ácidos, como los lisosomas. La concentración de trabajo del LysoTracker fue de 75 nM en PBS y el tiempo de incubación empleado en el ensayo fue de 30 minutos, a 37° C y protegido de la luz. La longitud de onda máxima de excitación es de 577 nm y la de emisión de 590 nm. Esta sonda no requiere el uso de un segundo anticuerpo para la detección.

**Tabla 3.7.4.- Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los ensayos de la interacción célula-EVs a través de Microscopia confocal.**

Anticuerpo Primario	Fabricant/ referencia	Dilución	Tiempo de incubación	Anticuerpo Secundario	Fabricant/ referencia	Dilución	Tiempo de incubación
Faloidina-FITC	Sigma P-5282	1:40	30 min TA				
Anti- $\beta$ -Tubulina	Sigma Aldrich T4026	1:500	1 hora TA	Alexa Fluor <sup>™</sup> 488	Invitrogen A-1100	1:500	1 hora TA
Clatrina HC (N-19)	Santa Cruz sc-6580	1:100	1 hora TA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	Abcam ab150132	1:500	1 hora TA
Caveolina-2 (H-96)	Santa Cruz sc-7942	1:100	1 hora TA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	Abcam ab150075	1:500	1 hora TA

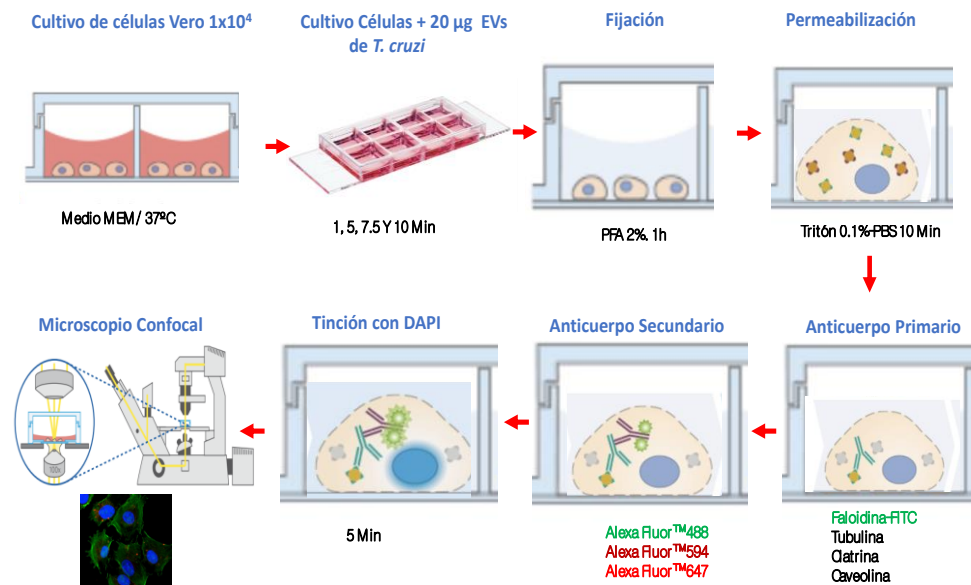


Figura 3.7.1.- Esquema del protocolo de microscopía confocal de la interacción célula-EVs.

### 3.7.3.3.3. Preparación de cortes semifinos (Células Vero-EVs).

Con la finalidad de observar de forma más específica las interacciones de las células Vero con las EVs, a los diferentes tiempos de incubación (1, 5, 7.5 y 10 min), se prepararon cortes semifinos de 1 micra. Los cultivos de células Vero en frascos de cultivos de 25 cm<sup>2</sup> con EVs fueron fijadas con tres mL de 4 % paraformaldehído (Sigma-P6148) 1% glutaraldehído (v/v) en PBS, durante 4 horas a 4° C. Posteriormente, se descartó el fijador y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Una vez lavadas las monocapas celulares, las células fueron separadas de la superficie del frasco de cultivo mediante el uso de “cell scraper” y centrifugadas a 16,000 × g, durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el botón de células fue resuspendido en 100 µL de PBS. Las

muestras fueron procesadas en el laboratorio de preparación de muestras biológicas del CIC, donde se realizaron los siguientes pasos:

Primero se fijaron las células en paraformaldehído al 2% en PBS al que se le añadió un 0.1 M de sacarosa, durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS a 4°C. Se deshidrataron en gradientes de etanol: 50, 70, 90, 100% (3 cambios) a -20°C. Seguidamente se realizó la infiltración en gradientes de etanol 100% y LRWhite a -20°C. Una vez que las muestras fueron incluidas, se polimerizaron en cápsulas de resina con luz ultravioleta durante 48 h a -20 °C y posteriormente a TA durante 24 h. Seguido del tallado de los bloques se procedió a la obtención de cortes semifinos de 1 micra de espesor en ultra- microtomo S o R (Leica), montados sobre rejillas de Níquel-Fomvar de malla 300.

### **3.7.3.3.4. Inmunomarcaje de cortes semifinos (células Vero- EVs).**

Las preparaciones con los cortes semifinos, debidamente identificados fueron tratados con las diversas soluciones de gelatina, glicina y ovoalbúmina, como ya se ha descrito. Seguidamente se realizó el inmunomarcaje con el anticuerpo primario, para el cual se utilizó un anti *T. cruzi* producido en ratón, en una dilución 1:50 en PBS-T y con una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con tampón carbonato pH 8.6 y se agregó el anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, A-1100) diluido 1:500 en PBS-T, se incubó por una hora a TA y protegido de la luz. Para visualizar los núcleos de las células, a cada preparación se agregó 300 µL de DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride 1 mg (Sigma-Aldrich®), D9542) durante 5 minutos con su correspondiente lavado. Finalmente se agregó 50 µL del medio de montaje Vectashield® HardSed™, (Vector Laboratories, H-1400),

se colocó un cubreobjeto 24X60 (Thermo Scientific, 48404-133), se dejó secar y sellar durante 10 minutos. Las preparaciones se almacenarán a 4 °C y protegidas de la luz hasta su observación.

#### **3.7.3.3.5. Captura de imágenes y análisis de resultados.**

Las muestras de fluorescencia se observaron utilizando el microscopio confocal (modelo Nikon A1, Centro de Instrumentación Científica, UGR). Se escanearon un mínimo de 3 regiones representativas de 3 muestras diferentes. Las imágenes panorámicas se tomaron con un objetivo de 20x y los detalles a 20x con zoom óptico de 3x y 5x con una resolución de 72x72 píxeles. Cada imagen es el resultado de proyectar 5 planos confocales, separados 1µm entre sí, a lo largo del eje z; es decir, cada proyección máxima obtenida con el software del equipo confocal NIS-Elements equivale a un volumen en z de 5 micras.

#### **3.7.3.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).**

La microscopía de fuerza atómica es una técnica que pertenece, junto al Microscopio de Efecto Túnel, a la familia de la Microscopía de Sonda Local o Campo Próximo (SPM). Estas técnicas permiten obtener información de la topografía de una muestra con resolución nanométrica y de la densidad de carga de los átomos, respectivamente. Se distingue de otras técnicas de Microscopía por la peculiar característica de no utilizar lentes ni ópticas (Venkateshaiah et al. 2020).



#### **3.7.3.4.1. Preparación de muestras para la internalización de EVs de *T. cruzi* Pan4 por células Vero.**

Las EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 se aislaron y purificaron como se describió anteriormente en los apartados 3.2.8 y 3.2.9. Células Vero (ECACC 84113001), fueron incubadas con EVs para visualizar el contacto y posterior internalización o captura de las EVs por las células, al interactuar a diferentes tiempos de incubación. En la preparación de la muestra para AFM, se utilizaron cubreobjetos redondos de 25 mm (Marienfeld, 0111560), que se trataron con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, P4707) durante 30 minutos con la finalidad de facilitar la unión de las células a la superficie. Luego, los cubreobjetos fueron colocados en placas Nunc® de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific, 140675) y sobre ellos se cultivaron células Vero en una concentración de  $1 \times 10^6$  células / mL en medio MEM sin rojo fenol, suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado (SFBI) (Gibco, 51200-046). Después de 24 horas, los cubreobjetos con células se lavaron 3 veces con MEM sin rojo fenol y se incubaron con 0,38 µg de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* durante 3 tiempos diferentes: 5, 7,5 y 10 min. Posteriormente se lavaron como se describió anteriormente y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 2% en tampón de cacodilato de sodio con sacarosa 0,1 M durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con medio MEM sin rojo fenol y suero y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Los experimentos consistieron en la visualización de las células incubadas a diferentes tiempos con las EVs para determinar su internalización, observar los mecanismos producidos por la interacción de las EVs con las membranas celulares y su fusión o captación activa por parte de dichas células.

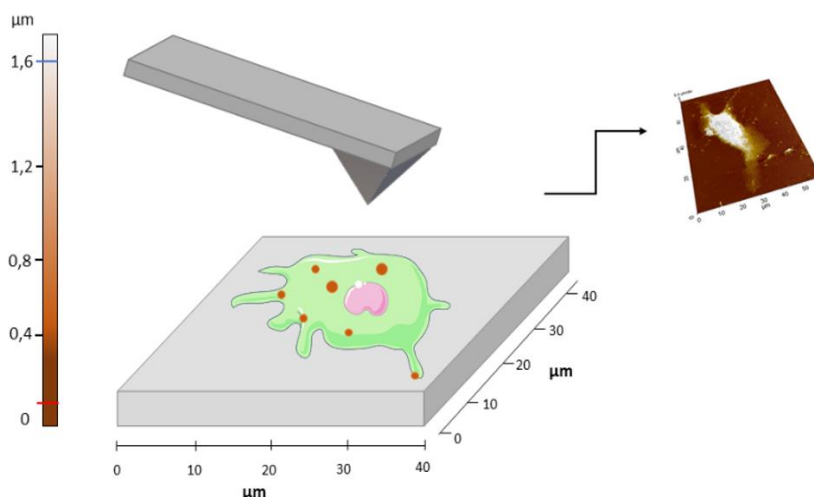


Figura 3.7.2.- Representación esquemática del mecanismo de interacción del cantilever con la muestra (célula Vero- EVs).

#### 3.7.3.4.2. Reconocimiento Molecular.

Otro tipo de experimentos posibles con el Microscopio de Fuerza Atómica son los de Reconocimiento Molecular o entre moléculas. Consisten en una vía de caracterización de complejos entre moléculas con un AFM operando en el modo de espectroscopías de fuerzas en el que a partir de una curva de separación se puede obtener la fuerza de adhesión entre punta y muestra.

Se ha comprobado que estas mediciones son útiles para propósitos de identificación, para determinar la compatibilidad entre dos estructuras y para predecir interacciones entre ellas (Venkateshaiah et al. 2020) (Vezenov, Noy, and Ashby 2005).

##### 3.7.3.4.2.1. Funcionalización de puntas para AFM.

En el proceso que hemos empleado para funcionalización se utilizaron cantilévares del tipo NSC36 de los que se usaron las puntas A y C ( $K=1$  y  $0.6$  N/m, respectivamente). Este proceso fue realizado por el grupo de Química

Orgánica de la UGR Prof Francisco Santoyo y sintetizado por el Dr. Mariano Ortega, e incluía varias etapas que se describen a continuación:

Funcionalización con Etanolamina: Se disolvieron 1.65g de hidroclouro de etanolamina en 5 mL de DMSO caliente, se añadió un tamiz molecular 4A y se introdujeron las puntas durante una semana a vacío y a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con DMSO dos veces por inmersión.

Seguidamente al grupo  $-NH_2$  terminal se le añadió un linker bifuncional con PEG=Polietilenglicol que introduce numerosas ventajas: previene las interacciones no específicas punta-muestra y aporta flexibilidad conformacional a los elementos que enlazan durante el reconocimiento mejorando dicha unión(Hinterdorfer et al. 2000). Con este fin, se disolvieron 130 mg del divinil sulfonato PEG1000 en 5ml de DMSO, se añadieron 100  $\mu$ L de trietilamina en el que se sumergieron las puntas durante 24 horas. Posteriormente, fueron lavadas por inmersión en DMSO y Diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ) y secadas. El linker PEG debe tener la longitud suficiente para que las puntas no den lugar a interacciones inespecíficas con algún otro grupo funcional añadido y asimismo, debe facilitar la flexibilidad necesaria que permita la aproximación e interacción entre los elementos involucrados en el reconocimiento molecular, de tal modo que los sitios de enlace se puedan acoplar e interactuar. Al mismo tiempo, el “linker” debe ser suficientemente corto y hacer factible el barrido manteniendo una alta resolución espacial (Ebner et al. 2005). En la práctica, los “linkers” suelen tener longitudes entre 5 y 20 nm.

Con el objetivo de poder orientar los anticuerpos con la región Fab al exterior y de captar sus epítomos por las puntas del cantiléver funcionalizado, se les unió proteína A, para que la parte Fc de las IgGs permitan el acoplamiento a dicha proteína quedando orientadas las regiones Fab hacia los epítomos que reconocen. Para ello se sumergieron las puntas en 100  $\mu$ L

de una disolución de proteína A de *Staphylococcus aureus* (Sigma, P6031) durante 1 hora. Seguidamente los grupos libres capaces de ligarse a los grupos amino de las proteínas, fueron bloqueados por inmersión en una solución de glicina (Sigma, G7126) (0.2M en tampón carbonato a pH 8.3) durante 1 hora a temperatura ambiente. En el siguiente paso, se incubaron las puntas en 100  $\mu$ L de una dilución del anticuerpo anti-*trans*-sialidasa (mAb 39) (1:100) en tampón bicarbonato 0.1 M y pH=8.3 durante 2 horas. Tras la ligación de las IgGs a la proteína A las puntas fueron sumergidas en 200  $\mu$ L de una solución de dietilenglicol divinil sulfonate (20% en dietilenglicol) 1h, para formar un crosslinker lateral entre la proteína A y el anticuerpo anti-*Trans*-sialidasa y así fijarlo y evitar que se suelte el complejo proteico con los cambios potenciales de pH. Para finalizar las puntas fueron nuevamente bloqueadas con glicina para evitar que los potenciales grupos reactivos de la sulfona reaccionen con los grupos aminos de la muestra a medir, en este caso de las EVs o cualquier otra traza de proteínas procedente de cualquier otra muestra biológica. Por último, se añadió nuevamente una disolución de glicina (Sigma-G7126) (0.2 M) para bloquear los extremos libres del “crosslinker”. Los catilever funcionalizados se mantuvieron a 4°C durante 24 h hasta su uso.

#### **3.7.3.4.2.2. Formación de Inmunocomplejo de EVs-anti TS para análisis por AFM.**

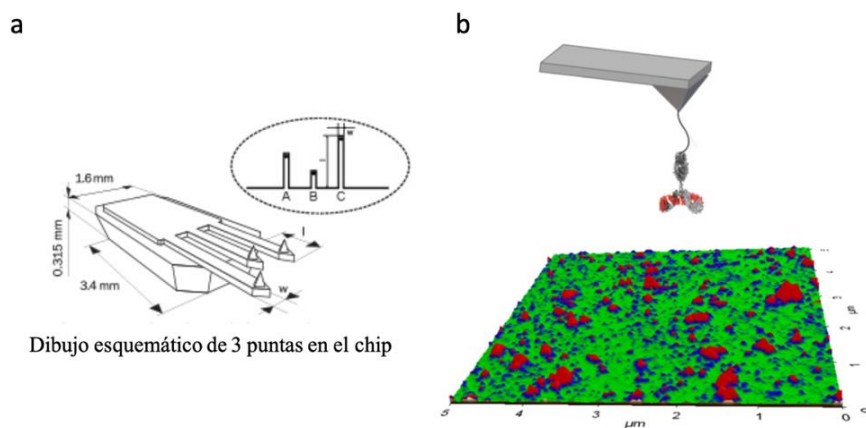
Para la formación del inmunocomplejos, ya descritos anteriormente en esta memoria (EVs-anti TS) de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Pan 4 y el anticuerpo anti-*trans*-sialidasa (TS) de *T. cruzi*, se mezclaron 100  $\mu$ L de EVs con una concentración de proteína de 0.2  $\mu$ g /  $\mu$ L y 200  $\mu$ L del anticuerpo anti-*trans*-sialisada dilución 1:1000 con una concentración 0.84

$\mu\text{g}$  de proteína. La mezcla (EVs-anti TS) se colocó a 37 °C durante 1 hora en agitación. Seguidamente se realizaron 2 lavados con PBS 1X con inhibidores de proteasa (Roche, 11836170001) durante 2 horas, por centrifugación a  $100,000 \times g$  en una ultracentrífuga (Beckman Coulter, EE. UU) a 4 °C. El sedimento o botón se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de PBS y se refrigeró hasta su uso.

Como control negativo del ensayo de formación de inmunocomplejos a través de los experimentos de reconocimiento molecular, se utilizaron EVs tratadas con la enzima proteinasa K (Merck, 70663-5), preparadas con los protocolos antes descritos.

### **3.7.3.4.2.3 Preparación de muestra de inmunocomplejo (EVs-Ig).**

Para la observación del inmunocomplejo a través de AFM se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra preparada siguiendo el protocolo anterior en la superficie de una lámina de mica, con carga negativa que permite la unión covalente o adhesión e inmovilización de las proteínas con carga positiva en su superficie (Klein et al. 2003). Tras de 10 minutos de incubación del inmunocomplejo con el sustrato se realizaron 3 lavados con 70  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura. Una vez depositada y seca la muestra se procedió al análisis utilizando un microscopio Park AFM NX20 (Park Systems, Korea), en la unidad de microscopía de fuerza atómica del Centro de Instrumentación Científica, de la Universidad de Granada.



**Figura 3.7.4.2.3. Esquema de los procesos de reconocimiento molecular: a) Cantilevers NSC-36 utilizados. b) Proceso de caracterización de complejos en modo espectroscopía de fuerzas.**

### 3.7.3.4.3. Captura de imágenes y análisis de resultados.

Las imágenes se adquirieron con el AFM a una resolución de 256 x 256 píxeles con una velocidad 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 zonas diferentes de 3 muestras diferentes. Para la determinación de las propiedades mecánicas tales como la rigidez, el módulo de elasticidad y la adhesión en cada una de las muestras, se utilizaron sondas o cantilevers del tipo 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. Las mediciones se realizan en tres pasos: 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) 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 consideran valores relativos.

### **3.8 Análisis Estadístico**

Los experimentos realizados en animales se realizaron por duplicados conforme a las normativas y decretos de bienestar animal. Los experimentos se hicieron al menos por triplicado. Los análisis o las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA unidireccional no pareado y a posteriori las pruebas de LSD o Tukey, mediante el uso del software Prism 8.4.1 (GraphPad). Para todas las pruebas, las diferencias de  $P < 0,05$  se consideraron significativas.

### **3.9. Medios de cultivos, tampones, soluciones y reactivos.**

#### **3.9.1. Medios de cultivo para células y parásitos.**

- Medio MEM (1 L): se mezcla 9.53 g “Minimum Essential Medium Eagle” (Sigma Aldrich, EE. UU.), 2.2 g carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 4.4 g HEPES, 0.056 g penicilina, 0.1 g estreptomycin, 0.048 g kanamicina, pH 7.2. Llevar a 1 L con agua destilada y esterilizar mediante filtración.
- **Medio MEM suplementado con 10% de SFBI (1 L):** MEM preparado con el protocolo anterior y se le añade 100 mL SBFi filtrado previamente.

- Medio HEPES (1 L): 16.4 g RPMI-1460 medium (Sigma Aldrich, EE. UU.), 2.2 g carbonato de sodio, 0.134 g penicilina, 0.060 g estreptomicina, 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.
- Medio LIT (1 L): 4 g cloruro de sodio (NaCl), 0.4 g cloruro de potasio (KCl), 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.
- Medio LIT suplementado con 10% de (SFBI) (1 L): medio LIT preparado como se detalló anteriormente y se le añadió 100 mL de SFBI filtrado previamente.
- Medio RPMI: 16.4 g RPMI-1640 *Medium* (Sigma), 2.2 g carbonato Sódico, 0.134 g penicilina, 0.060 g estreptomicina, 0.134 g kanamicina, 100 ml suero bovino fetal inactivado (SBFi) (Gibco) (previamente inactivado mediante incubación a 56°C durante 30 min), agua bidestilada hasta 1 litro, pH 7.7-7.4. Se esterilizó por filtración.
- DMEM + 2mM glutamina + 1.5 g/ L bicarbonato sódico + 10 mM HEPES + 1 mM piruvato sódico + 4.5 g/L glucosa+ 10% Suero bovino fetal. El medio está formulado para incubar a 37o C en atmósfera con 5% CO2.



### **3.9.2. Medios de cultivo para transformación: metaciclógenesis.**

- Medio TAU: mezclar 190 mM NaCl, 8 mM de buffer fosfato, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6. Se esterilizó por filtración.
- Medio TAU3AAG: TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato de sodio, 2 mM L-aspartato de sodio y 10 mM D- glucosa, pH 6. Se esterilizó por filtración.

### **3.9.3. Medios de congelación**

- Medio de congelación células Vero: 80% de medio de cultivo MEM con 10% de SBF1 y 10% de DMSO.
- Medio de congelación de parásitos: 85% de SBF1 y 15% de glicerol estéril.

### **3.9.4. Tampones y soluciones para cultivo de células y parásitos.**

- Tripsina-EDTA (400 mL): 0.08 g EDTA y 0.2 g tripsina, pH 7.4. Aforar a 400 mL con agua destilada y esterilizar mediante filtración.
- Tampón fosfato salino (PBS) estéril: 10 mM de fosfato de sodio y 10 mM de fosfato de potasio, pH 7.2. Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

### 3.9.5. Tampones y soluciones para electroforesis de geles de agarosa.

- Tampón TAE (10X): 48.4 g/l Tris, 3.72 g/l EDT A, 11.14 ml ácido acético, completar hasta 1 l de H<sub>2</sub>O, pH 8.2.
- Tampón de electroforesis TAE 1X (1L): 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.

### 3.9.6. Tampones y soluciones para los protocolos de Western Blot.

#### 3.9.6.1. Preparación de geles de poliacrilamida al 12 %.

Reactivos	Gel concentrador (mL)	Gel separador (mL)
Agua destilada	1.8 mL	3.44 mL
Acrilamida al 30%	0.43 mL	3.9 mL
1.5M Tris-HCl pH 8.8	0.313 mL	-
1M tris-HCl pH 6.8	-	2.5 mL
10% SDS	0.025 mL	0.1mL
10% APS	0.025 mL	0.2mL
TEMED	0.01 mL	0.01mL
Volumen Final	2.6 mL	10.15 mL

#### 3.9.6.2. Tampones para el desarrollo Electroforético

- Tampón de carga: Tris 0.1 M pH 6.8, SDS 2%, EDTA 4 mM pH 8, glicerol 20%, azul bromofenol 0.01%, 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Tampón de electroforesis: 3.02 g/l de Tris, 14.4 g/l de glicina y 1 g/l de SDS.

### 3.9.6.3. Soluciones de tinción de geles de poliacrilamida

- Solución de tinción: 0.025% azul de Coomassie (p/v) (Brillant Blue-250, Sigma Aldrich, EE. UU.) 40% metanol, 10% ácido acético en agua destilada.
- Solución de desteñido: 10% 2-propanol y 10% ácido acético en agua destilada.
- Tinción de Rojo de Ponceau (1L): 1g de Rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich-P3504-10G), 50 mL de Acido acético y 950mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.
- Soluciones para la Tinción de Plata

Tipo de Solución	Composición (100 mL)	Tiempos Minutos	Temperatura °C
1- Fijador Etanol 50% Acido acético glaciado 10%	50 mL de etanol 10 mL de ácido acético glaciado 40 mL de agua destilada	2 min	20°C
2- Sensibilizadora Glutaraldehído 83%	33 mL glutaraldehído 25% 67 mL de agua destilada	6 min	40°C
3- Lavado	Agua destilada	2 min	40°C
4- Lavado	Agua destilada	2 min	40°C
5- Tinción (proteger de la luz)	0.25 g de Nitrato de plata 100 mL de agua destilada	13 min	30°C
6- Lavado	Agua destilada	1 min	20°C
7- Lavado	Agua destilada	1 min	20°C
8- Reveladora	2.5 g de Carbonato de sodio 0.4 mL de formaldehído 100 mL de agua destilada	4 min	30°C
9- Reveladora	2.5 g de Carbonato de sodio 0.4 mL de formaldehído 100 mL de agua destilada	4 min	30°C
10- Parada	5 mL de ácido acético 95 mL de agua destilada	3 min	30°C
11- Preservadora	10 mL de ácido acético 5 mL de glicerol 85 mL de agua destilada	3 min	30°C

#### 3.9.6.4. Soluciones utilizadas en los Western Blot

- Tampón de bloqueo: Tween 0.1% en PBS, leche en polvo 2% y BSA 1%.
- Tampón de lavado: Tween 1% en PBS 1X.
- Sustrato de revelado (1mL): *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad). 0.5 mL de Reactivo A (peróxido) y 0.5 mL del reactivo B (Luminol) por membrana.
- Solución ácida o stripping (1L): glicina-HCl (Sigma-Aldrich, G7126) 2 M, HCl (Schalau-AC07411000),  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M7522) y Tween 20, 10 % v/v (Sigma-Aldrich, P7949) en agua destilada.

#### 3.9.7. Tampones utilizados en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

- Tampón carbonato (50 mL): 0.525 g de Carbonato de sodio 0.1 M y 0.42 g de bicarbonato de sodio 0.1 M en agua destilada a pH 9.6.
- Tampón de bloqueo: 5% de leche en polvo desnatada y 0.1% de Tween 20 disuelto en PBS.
- Tampón de lavado: 0.3% de Tween 20 en solución PBS 1X.

- Tampón citrato: 0.46 g de ácido cítrico 18 mM, 0.72 g de fosfato sódico 50 mM, completar con 100 ml de agua destilada, pH 5.0.
- Tampón sustrato de peroxidasa: 12.5 mL de tampón citrato pH5.0, 12.5 mL de agua destilada, 1 patilla de OPD y 25  $\mu$ L de Peróxido de hidrógeno.
- Tampón de parada: 3M HCl en agua destilada.

### **3.9.8. 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.

### **3.9.9. Tampón de diálisis (1L).**

- Acetato de amonio 1M. Pesar 7.7 g y diluir en agua destilada. Esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

### **3.9.10. Tampón de lisis (500mL).**

- Fosfato de potasio/sodio 20 mM, sacarosa, 0,25 mM, EDTA 1M, KCl 0.45mM, DTT 1M, Triton X-100 1%, 1 pastilla de inhibidores de proteasa (10 mL) al momento de uso.pH 7.4.

### **3.9.11. Tampones utilizados en técnicas de microscopia.**

#### **3.9.11.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

- Tampón de fijación: glutaraldehído al 1% y paraformaldehído (Sigma-P6148) al 2% en tampón de cacodilato de sodio con sacarosa 0,1 M.

#### **3.9.11.2. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM).**

- Tampón de fijación: 2% formaldehído y 1% glutaraldehído en PBS.
- Tampón de bloqueo: Gelatina de Teleosteo 1% en tampón Carbonato, filtrada en 0.22  $\mu\text{m}$  (Sartorius-16534).
- Solución de bloqueo: glicina 0.02 M en tampón carbonato, pH 7.2.
- Tampón de bloqueo: ovoalbúmina 1% disuelta en tampón carbonato filtrado con filtro 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### **3.9.11.3. Microscopia Confocal**

- Tampón de permeabilización (experimentos de citoesqueleto): Triton®X-100 (VWR Chemicals- 28817.295), al 0.1% en PBS.
- Tampón de fijación de células : 4% formaldehído en PBS (0.37 g paraformaldehído en 7 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calentar en baño a

60°C, añadir unas gotas de NaOH 1 M, dejar enfriar a temperatura ambiente y ajustar hasta 10 ml con PBS (0.2 M). Ajustar el pH a 7.4.

- Tampón de fijación de Karnovsky (utilizado para fijar células Vero y parásitos): 2% de paraformaldehído y 1% glutaraldehído en tampón PBS, pH 7.4.
- Tampón de lavado: PBS filtrado en filtro de 0.22 µm de tamaño de poro (Sartorius-16534).
- Tampón de bloqueo: albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA) 1% en PBS 1X.

#### **3.9.11.4. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).**

- Tampón de lavado de EVs: PBS filtrado 0.22 µm, con inhibidores de proteasas libre de EDTA (Roche, 11836170001).
- Tampón carbonato (50 mL): 0.525 g de Carbonato de sodio 0.1 M y 0.42 g de bicarbonato de sodio 0.1 M en PBS a pH 8.6.
- Glicina en Tampón Carbonato pH 8.6: Pesar 0.75g de glicina 0.2M y disolver en tampón carbonato pH 8.6. Ajustar pH a 8.3.

# Capítulo 4

## RESULTADOS

---



## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización de muestras de pacientes chagásicos crónicos de Panamá.

Con la aprobación del protocolo por el Comité de Bioética del Hospital Santo Tomás en ciudad de Panamá, y la asignación del código de identificación N° 2015-310 V1, se aplicó el consentimiento informado y realizó la extracción de muestra sanguínea y aplicó la encuesta a todos los pacientes que decidieron voluntariamente participar en el estudio.

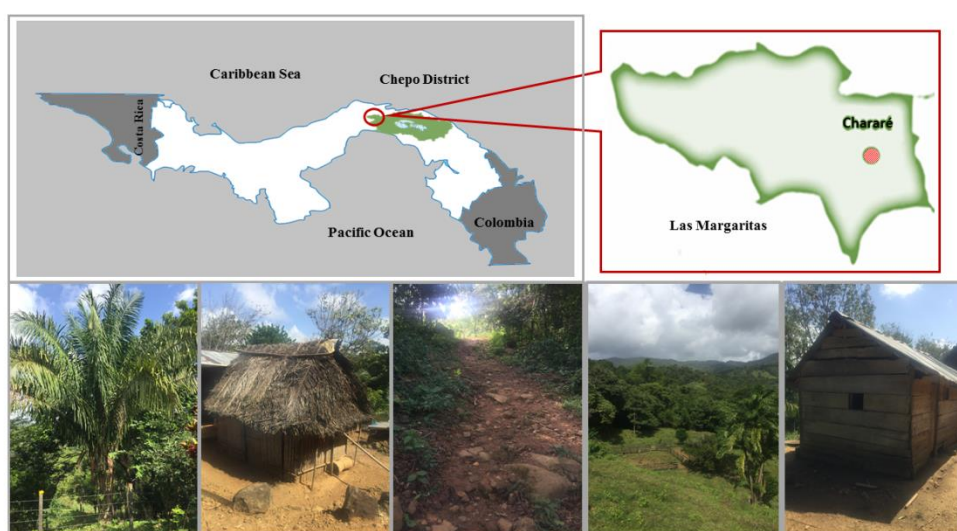
#### 4.1.1. Población y muestras.

El número total de muestras estudiadas fue 106, de los cuales el 73.58% (78/106) correspondían a residentes de una comunidad rural (Chararé), ubicada en un área montañosa del corregimiento de Las Margaritas, distrito de Chepo, provincia de Panamá (coordenadas 9.243640, -79.059162) (Figura 4.1). También se estudio un grupo de 28 pacientes procedentes de áreas urbanas, diagnosticados en hospitales de tercer nivel de atención del área metropolitana de la ciudad de Panamá. Todos los casos hospitalarios con serología positiva fueron diagnosticados por manifestaciones clínicas como trastornos de la repolarización, bloqueo auriculoventricular, bradicardia y trastorno de la conducción. Dichos diagnósticos fueron realizados en los hospitales de tercer nivel de atención sanitaria incluidos en el estudio (Hospital Santo Tomás, Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid y Hospital de Especialidades Pediátricas Omar Torrijos Herrera). La confirmación de la infección por *T. cruzi* se llevó a cabo en todos los casos rurales y urbanos, mediante al menos 2 pruebas inmunológicas tal como se describió en el capítulo de Materiales y métodos. Todos los pacientes urbanos se encontraban

## Resultados

---

bajo evaluación médica especializada en los respectivos hospitales. En el caso de los pacientes procedentes de la comunidad rural, una vez realizado el diagnóstico serológico fueron evaluados clínicamente en el Hospital Regional del distrito de Chepo.



**Figura 4.1.- Ubicación geográfica de los pacientes de la comunidad de Chararé, corregimiento de Las Margaritas, distrito de Chepo, Provincia de Panamá (Autor: Alexa Precilla Ledezma, 2019).**

### **4.1.2 Características sociodemográfica de la población estudiada.**

De las 43 encuestas que se aplicó a los jefes de familia tanto en el área urbana como rural se obtuvieron los siguientes resultados: el 53% correspondían al sexo masculino y 47% femenino, incluyendo entre ambos grupos a 6 niños menores de 15 años (11%).

La comunidad rural de Chararé, es una comunidad con marcada pobreza y difícil acceso terrestre. Tienen escasos recursos sanitarios y muestran una economía de subsistencia basada en la agricultura; el 57 % e los encuestados

trabaja por su cuenta o en trabajos domésticos, 13 % son desempleados y sólo el 30% son asalariados. En cuanto a el tiempo de permanencia en la región, el 95.65 % de los encuestados tiene más de 5 años de vivir en la comunidad cohabitando, con una gran variedad de animales domésticos/silvestres y frecuentemente expuestos a la presencia de triatominos vectores. La mayoría de sus habitantes (78%) tienen escolaridad básica (primaria y secundaria), mientras que el 22 % no tienen escolaridad y desconocen muchos aspectos de la sintomatología, patología, tratamiento o el control de la enfermedad de Chagas. Un hallazgo sobresaliente en nuestros resultados en la comunidad de Chararé fue el diagnóstico de hasta 4 pacientes positivos para la enfermedad de Chagas, viviendo en la misma unidad familiar, lo que indica el elevado nivel de positividad. (Tabla 4.1). En Cuanto a los pacientes procedentes de áreas urbanas hay un 25 % desempleado, un 30 % que trabaja por cuenta propia y solo un 30 % es asalariado. En lo referente a la escolaridad el 65% de los encuestados tiene formación básica (primaria y secundaria) y un 35 % tiene formación superior ya sea universitaria o no universitaria, lo que muestra que a pesar de ser un porcentaje bajo, es una población potencialmente capacitada para conocer los aspectos generales de la enfermedad de Chagas y sus complicaciones. A diferencia de los pacientes de la comunidad de Chararé este grupo solo reporta un paciente positivo para la enfermedad de Chagas por unidad habitacional, lo que implica lo ya conocido, donde las condiciones socioeconómicas juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

## Resultados

**Tabla 4.1.- Descripción de las características sociodemográficas de los pacientes estudiados de las dos áreas geográficas.**

Variables	Total n=53		Pacientes Urbanos n=20		Pacientes Rurales n=33	
	n	%	n	%	n	%
<b>Sexo</b>						
Femenino	25	47.16	7	40.0	18	54.54
Masculino	28	52.83	13	60.0	15	45.45
<b>Edad (Años)</b>						
Menos de 25 años	10	18.86	0	0.0	10	30.3
De 25 a 39 años	18	33.96	9	45.0	9	27.27
De 40 a 59 años	17	32.07	9	45.0	8	24.2
Más de 60 años	8	15.0	2	10.0	6	18.18
Total	53	100.0	20	100.0	33	100.0
Variables	Total n=43		Pac. Urbanos n=20		Pac. Rurales n=23	
	n	%	n	%	n	%
<b>Tiempo de residencia (años)</b>						
Menos de 1 año	3	7.0	2	10.0	1	4.3
De 2 a 5 años	5	11.6	5	25.0	0	0.0
Más de 5 años	35	11.6	13	65.0	22	95.7
<b>Escolaridad</b>						
Ningún grado	5	11.6	0	0.0	5	21.7
Primaria	21	48.8	7	35.0	14	60.9
Secundaria	10	23.3	6	30.0	4	17.4
Superior no Universitaria	3	7.0	3	15.0	0	0.0
Superior Universitaria	4	9.3	4	20.0	0	0.0
<b>Ocupación</b>						
Empleado o asalariado	13	30.2	6	30.0	7	30.4
Trabajador por cuenta propia	12	27.9	6	30.0	6	26.1
Trabajo doméstico	11	25.6	0	0.0	7	30.4
Desempleado	4	9.3	5	25.0	3	13.0
No contesto	3	7.0	3	15.0	0	0.0
<b>Cantidad de personas en la vivienda</b>						
1	4	9.3	2	10.0	2	8.7
De 2 a 5	15	34.9	8	40.0	7	30.4
Más de 5 personas	24	55.8	10	50.0	14	60.9
<b>Cantidad de pacientes en la vivienda</b>						
1	38	88.4	20	100.0	18	78.3
2	3	7.0	0	0.0	3	13.0
3	1	2.3	0	0.0	1	4.3
4	1	2.3	0	0.0	1	4.3

### **4.1.3 Diagnóstico Serológico de los sueros de pacientes chagásicos panameños.**

En este estudio para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica, donde la parasitemia es muy baja o indetectable, se emplearon métodos serológicos que consisten principalmente en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, con un total de pacientes con serología positiva de 50 % (53/106). La comunidad rural de Chararé registró 42.3% (33/78) de pacientes con resultaron positivos para la enfermedad de Chagas. En cuanto a la población hospitalaria un 71.42% (20/28) de resultados positivos. De ellos 13 provenían del servicio de Cardiología del Hospital Santo Tomás, 6 fueron diagnosticados en el Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid de la Caja de la Seguridad Social, de los cuales 4 provenían del banco de sangres y 2 de la consulta externa de infectología y un paciente provenía del banco de Sangre del Hospital de Especialidades Pediátricas de la CSS; todas instituciones públicas de sanidad de Panamá.

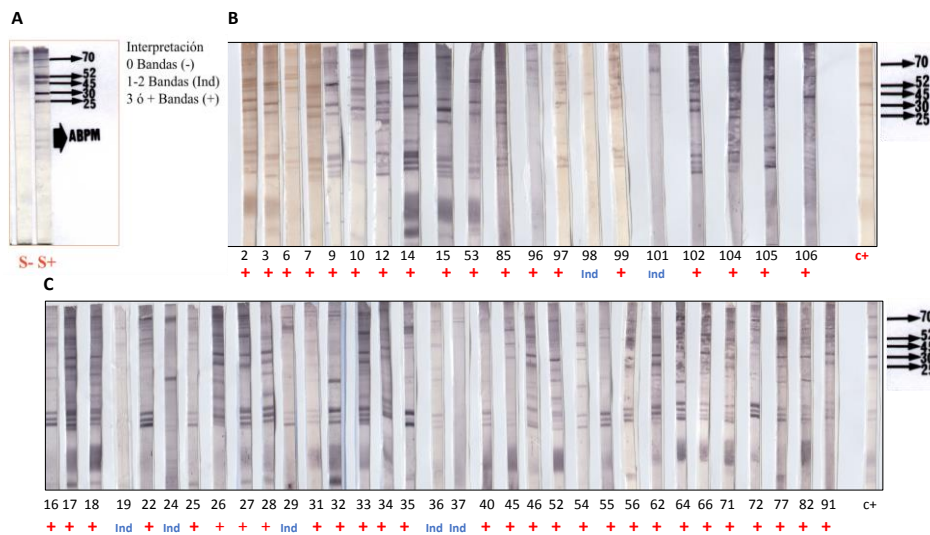
#### **4.1.3.1 Diagnóstico a través de Western Blot.**

Las pruebas de detección de anticuerpos son muy sensibles, pero su especificidad está limitada, ya que pueden presentar reacción cruzada con anticuerpos de pacientes con otras parasitosis, como la leishmaniosis. La inmunotransferencia o Western Blot, está considerada como la técnica confirmatoria en el diagnóstico de diversas enfermedades y fue utilizada para tal fin en nuestro estudio.

En el análisis por SDS-PAGE se utilizó el antígeno crudo del lisado de epimastigotes de *T. cruzi*, que revela un patrón de proteína que varía desde 25

## Resultados

hasta 70 kDa con presencia de múltiples antígenos de bajo peso molecular (ABPM) mostrado en el patrón electroforético (Figura. 4.2A). Los sueros de pacientes chagásicos crónico en este estudio, muestran una gran cantidad de bandas prominentes y débiles. Se visualizan claramente las diferencias en los perfiles electroforéticos de los pacientes indeterminados y positivo (Figura 4.2).



**Figura 4.2.- Perfil de Inmunotransferencia (Western Blot) de sueros de pacientes chagásicos crónicos de dos poblaciones de Panamá. A) Patrón de bandas (antígeno crudo de lisado de epimastigotes de *T. cruzi* Pan 4). B) Suero de pacientes procedente de áreas urbanas de la ciudad de Panamá. C) Sueros de pacientes de la comunidad rural de Chararé.**

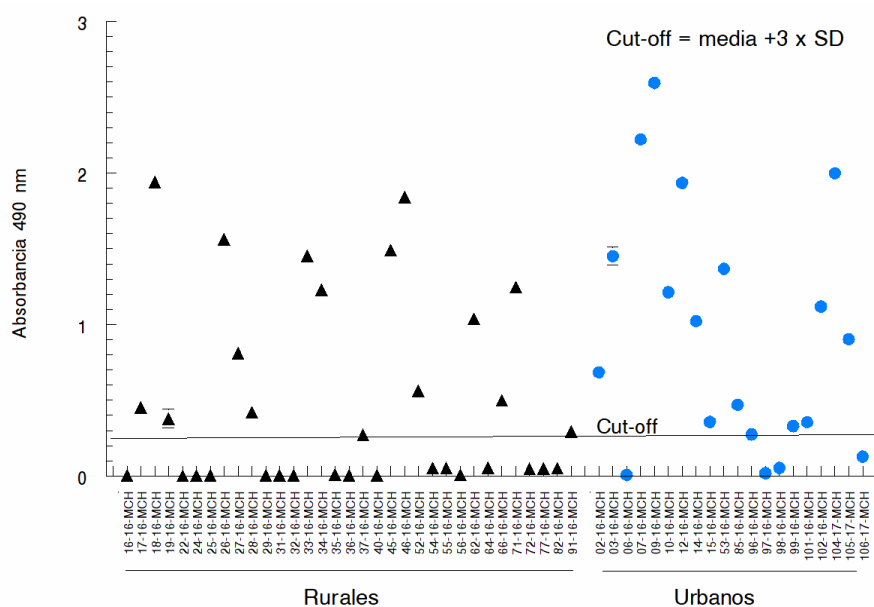
El lisado crudo de epimastigotes de *T. cruzi* Pan 4 utilizados en el Western blot, muestra las bandas antigénicas específicas presentes en los sueros positivos (25, 30, 45, 52, 70 KDa). El resto de las bandas son consideradas como inespecíficas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Para la interpretación de los resultados se utilizó el patrón de bandas de la Figura 4.2.A, donde se determina que un resultado es negativo cuando no se observa ninguna de las bandas antigénicas, un resultado indeterminado es cuando sólo se visualizan dos bandas y las muestras que presentaron 3 o más bandas comparadas con el control fueron consideradas positivas. En los pacientes procedentes de áreas urbanas se encontraron resultados positivos en un 90% (18/20) y resultados indeterminados en un 10% (2/20) (Figura 4.2B). Sin embargo los pacientes de la comunidad rural de Chararé, presentaron un 84 % (28/33) de positividad y un 15% (5/33) resultados indeterminados (Figura 4.2C).

#### **4.1.3.2 Diagnóstico mediante pruebas inmunoenzimáticas. ELISA.**

Con la finalidad de corroborar la presencia de anticuerpos de *T. cruzi* en los sueros estudiados, se utilizó un segundo método serológico inmunoenzimático (ELISA). Todos los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricantes. La reactividad de cada una de las muestras se determinó según las especificaciones técnicas.

## Resultados



**Gráfica 4.1.- Absorbancia de los sueros de los pacientes chagásicos de las dos poblaciones estudiadas. Las líneas horizontales en la gráfica representan el punto de corte o Cut-off calculado (Media de los valores + 3 veces la desviación estandar).**

Los resultados obtenidos a través de esta técnica determinaron que de los 53 sueros de pacientes crónicos contrastados con las otras técnicas y considerados seropositivos; a través de el método de ELISA se obtuvo un 56% (30/53) de pacientes positivos, 6 % (3/53) indeterminados al presentar reactividad en la zona límite o indeterminada y 38% (20/53) fueron negativos. Los sueros de los pacientes de la comunidad endémica presentaron un 45% de positividad para el método y los sueros de los pacientes urbano 75%. Los sueros que se situaron en la zona dudosa presentaban  $DO_{490}$  en los rangos de 0.271- 0.332. Los sueros no reactivos se ubican claramente debajo del cut-off de la prueba. Los resultados se representan en la gráfica 4.1. Todas las muestras de suero se evaluaron por triplicado y se tomó como resultado de la prueba la media del valor de densidad óptica de estas determinaciones simultáneas. Se calcularon valores de corte estándares con ELISA negativo tomando la media de la densidad óptica de las muestras de suero negativas más 3 veces la desviación



estándar, como ya se especificó en Material y Métodos. El título de los sueros se expresó por los valores de absorbancia frente a los valores de corte generado por los sueros negativos.

#### **4.1.3.3 Diagnóstico a través de pruebas rápidas.**

Cómo complemento a las pruebas de Western Blot y ELISA, se realizó una tercera prueba de cribado de los sueros en estudio. Este método permitió aumentar el diagnóstico de infección por *T. cruzi* /enfermedad de Chagas y discriminar entre resultados positivos, indeterminados y negativos. El principio inmunocromatográfico con el que funciona, nos permitió obtener resultados rápidos y confiables, capaces de tener un primer barrido de la población en estudio, principalmente en el área rural donde se trabajó con la población, ya que sus resultados son cualitativos o semicuantitativos y las muestras no requieren ningún tipo de equipamiento ni sistema de refrigeración especializada. El 75% (15/20) de los pacientes urbanos analizados presentaron resultados positivos para la prueba rápida Tabla 4.2. Mientras que para los pacientes rurales de la comunidad de Chararé el 87.8 % (29/33) de los pacientes fueron positivos, Tabla 4.3.

## Resultados

**Tabla 4.2.- Determinación de la positividad a *Trypanosoma cruzi* a través de diferentes métodos en muestras de sangre de pacientes chagásicos crónicos, provenientes de áreas urbanas de Panamá. Determinación de las Unidades Discretas de Tipificación (UDT) en las muestras de sangre de los pacientes.**

Nº de Caso	Código de Muestra	Edad	Sexo	Procedencia	Perfil Clínico	Western Blot	ELISA	Prueba Rápida	kDNA -PCR	DTUs
1	02-16-MCH	49	F	Arraijan-HST	A	+	+	+	+	Tc I
2	03-16-MCH	41	M	Chepo-HST	A	+	+	+	+	No tipificado
3	06-16-MCH	46	M	Santiago, Veraguas-HST	C	+	-	+	+	Tc I
4	07-16-MCH	28	F	Chilibre-HST	A	+	+	-	+	Tc I
5	09-16-MCH	35	F	Arraijan-CHDr.AAM	A	+	+	-	+	Tc I
6	10-16-MCH	27	M	Río Abajo-HST	C	+	+	+	+	Tc I
7	12-16-MCH	33	F	Chepo-HST	C	+	+	+	+	Tc I
8	14-16-MCH	75	M	Capira-HST	C	+	+	+	+	Tc I
9	15-16-MCH	28	F	Capira-HST	C	+	+	+	+	Tc I
10	53-16-MCH	46	M	Las Margaritas-HST	C	+	+	+	+	Tc I
11	85-16-MCH	39	M	Chepo-HST	A	+	+	+	-	No tipificado
12	96-16-MCH	40	M	Arraijan-HST	C	+	IND	+	+	Tc I
13	97-16-MCH	53	F	Chilibre-HST	A	+	-	+	+	No tipificado
14	98-16-MCH	75	F	Chilibre-HST	C	IND	-	+	+	Tc I
15	99-16-MCH	39	M	Alcalde Díaz-CHDr.AAM	A	+	+	+	+	Tc I
16	101-16-MCH	32	M	Pacora-CHDr.AAM	C	IND	+	+	+	No tipificado
17	102-16-MCH	44	F	Chame-CHDr.AAM	A	+	+	-	+	Tc I
18	104-17-MCH	46	M	La Chorrera-HEPOTH	A	+	+	-	+	Tc I
19	105-17-MCH	37	M	La Chorrera-CHDr.AAM	A	+	+	-	+	No tipificado
20	106-17-MCH	43	M	La Chorrera-CHDr.AAM	A	+	-	+	+	Tc I

\* **A:** Asintomáticos, **C:** Cardiacos

**Tabla 4.3.- Determinación de la positividad a de Trypanosoma cruzi a través de diferentes métodos en muestras de sangre de pacientes chagásicos crónicos, provenientes de la comunidad rural Chararé, en el distrito de Chepo, provincia de Panamá. Determinación de las Unidades Discretas de Tipificación (UDT) en las muestras de sangre de los pacientes.**

Nº de Caso	Código de Muestra	Edad	Sexo	Procedencia	Perfil Clínico	Western Blot	ELISA	Prueba Rápida	kDNA -PCR	DTUs
1	16-16-MCH	72	M	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
2	17-16-MCH	35	F	Chararé	A	+	+	+	-	No tipificado
3	18-16-MCH	15	F	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
4	19-16-MCH	2	F	Chararé	C	IND	+	+	+	Tc I
5	22-16-MCH	65	F	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
6	24-16-MCH	76	F	Chararé	A	IND	-	+	+	Tc I
7	25-16-MCH	77	M	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I HN+*
8	26-16-MCH	35	M	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
9	27-16-MCH	39	F	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
10	28-16-MCH	52	F	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
11	29-16-MCH	6	F	Chararé	A	IND	-	+	+	Tc I
12	31-16-MCH	51	M	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
13	32-16-MCH	43	M	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
14	33-16-MCH	56	M	Chararé	C	+	+	+	+	Tc I
15	34-16-MCH	12	M	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
16	35-16-MCH	9	F	Chararé	A	+	-	+	+	No tipificado
17	36-16-MCH	32	M	Chararé	A	IND	-	+	+	Tc I
18	37-16-MCH	75	M	Chararé	A	IND	IND	+	+	Tc I
19	40-16-MCH	79	F	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
20	45-16-MCH	17	F	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
21	46-16-MCH	34	F	Chararé	A	+	+	-	+	Tc I
22	52-16-MCH	40	M	Chararé	C	+	+	+	+	Tc I + Tc II/V/VI
23	54-16-MCH	14	F	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I + Tc II/V/VI
24	55-16-MCH	17	F	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
25	56-16-MCH	41	M	Chararé	C	+	+	-	+	No tipificado
26	62-16-MCH	39	F	Chararé	C	+	+	-	+	Tc I + Tc II/V/VI
27	64-16-MCH	54	M	Chararé	C	+	-	+	+	Tc I
28	66-16-MCH	36	F	Chararé	A	+	+	+	+	Tc I
29	71-16-MCH	20	M	Chararé	A	+	+	-	+	No tipificado
30	72-16-MCH	22	M	Chararé	A	+	-	+	+	No tipificado
31	77-16-MCH	49	F	Chararé	A	+	-	+	+	Tc I
32	82-16-MCH	29	F	Chararé	A	+	-	+	+	No tipificado
33	91-16-MCH	57	M	Chararé	A	+	IND	+	+	No tipificado

\* A: Asintomáticos, C: Cardiacos

#### 4.1.4 Diagnóstico Molecular.

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito.

#### 4.1.4.1. PCR Convencional.

Con el fin de confirmar los resultados de los pacientes positivos por serología se realizó una PCR convencional usando los “primers” 121F-122R, como se describe en Material y métodos a los dos grupos de pacientes.

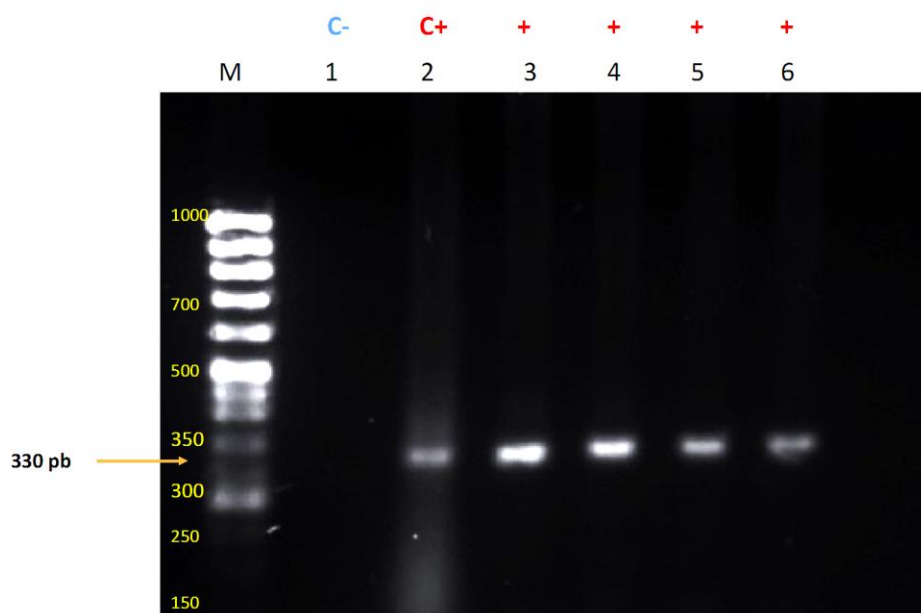


Figura 4.3.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se muestra la amplificación del producto de PCR de kDNA para *T. cruzi* de 330 pb de muestras de pacientes de la población rural. (M) Marcador de peso molecular de 50-1000 pb (Canvax). (carril 1) control negativo. (2) control positivo, amplificación de ADNg de tripomastigote de *T. cruzi*. (carriles del 3-6).

Todos los pacientes analizados estaban en fase crónica de la enfermedad, de los cuales resultaron positivo por PCR-kDNA en un 96.22% (51/53) (Tabla 4.4). De los pacientes provenientes del área rural con serología positiva el 100% (33/33) obtuvieron resultados positivos para la PCR Figura 4.3.

Sin embargo, de los pacientes procedente del área urbana el 90% (18/20) fueron positivos para la kPCR, como se muestra en la Figura 4.4.

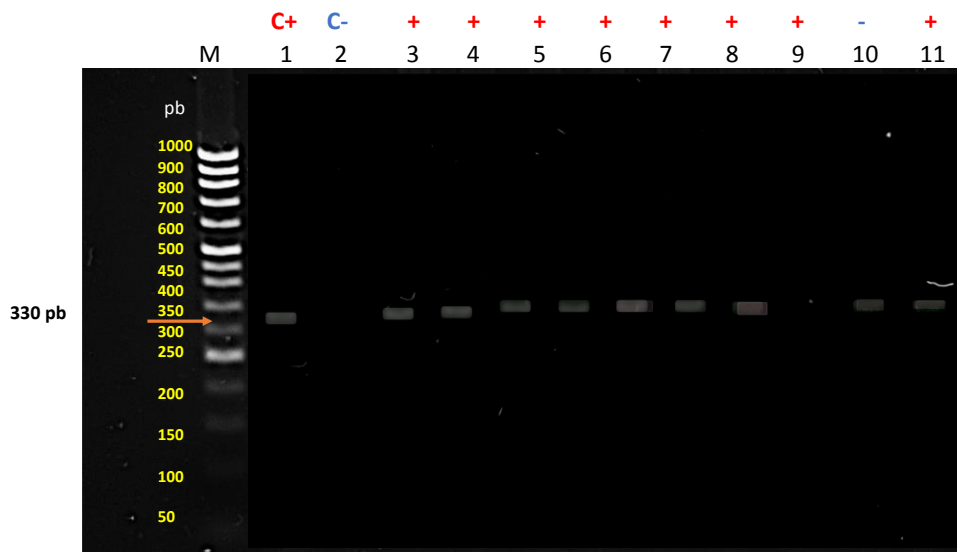


Figura 4.4.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se muestra la amplificación del producto de PCR de kDNA para *T. cruzi* de 330 pb de muestras de pacientes de la población urbana. (M) Marcador de peso molecular de 50-1000 pb (Canvax). (carril 1) Control negativo. (2) Control positivo, amplificación de ADNg de tripomastigote de *T. cruzi*. (Carriles 3-9 y 11) y (Carril 10) paciente con PCR negativo.

#### 4.1.4.2. Genotipado de *T. cruzi* mediante ensayos de PCR para la determinación de unidades discretas de tipificación (UDT).

Todos los casos seropositivos detectados en la región de Chararé pueden considerarse pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Antes de la recolección de la muestra, ninguno de los pacientes reportó fiebre o signos clínicos que pudieran sugerir la fase aguda de la enfermedad. El genotipado de las UDT de las muestras de sangre de estos pacientes se realizó a partir de las mismas muestras de ADN sin el conocimiento previo del resultado de la

## Resultados

kDNA-PCR. De hecho, las muestras negativas de kDNA-PCR no amplificaron los genes utilizados para la tipificación de UDT.

**Tabla 4.4.- Resultados serológicos y moleculares de los dos grupos de pacientes del estudio.**

Muestras	Pacientes Urbanos	Pacientes Rurales	Total
<b>Total de muestras analizadas</b>	28 (26.42%)	78 (73.58%)	106 (100%)
<b>Seroreactividad Anti-<i>T. cruzi</i></b>	20 (71.43%)	33 (42.30%)	53 (50%)
<b>kDNA-PCR positivos</b>	18/20 (90%)	33/33 (100%)	51/53 (96.22%)
<b>DTU-PCR positivos</b>	15/20 (75%)	29/33 (87.88%)	44/53 (83.01%)
<b>Tc I</b>	15/20(75%)	26/33 (78.78%)	41/53 (77.35%)
<b>Mixtos Tc I + Tc II/V/VI</b>	--	3/33 (9.09%)	3/53 (5.66%)*
<b>UDTs No tipificadas#</b>	5/20 (25%)	4/33 (12.12%)	9/51 (17.64%)

\* Se presenta claramente la presencia del 5,6% (3/53) de pacientes con DTU mixta (DTU I y II / V / VI).

# Se incluyen aquellos casos con positividad para kDNA-PCR no detectables más aquellas muestras positivas de kDNA-PCR que dieron resultados no detectables en las PCR realizadas para el genotipado de UDTs.

Los resultados presentados en la Tabla 4.4 muestra como en las muestras positivas por kDNA-PCR, fue posible identificar los UDT de los parásitos sanguíneos o de su ADN en 15/18 y 29/33 muestras de localidades rurales y urbanas respectivamente tras la amplificación de los genes SL-IR I y SL-IR II de *T. cruzi* como dianas moleculares (Figura 4.5), mientras que los otros marcadores de genotipado dieron resultados no detectables. Por tanto, sólo se pudo hacer una distinción entre los grupos TcI y Tc II / V / VI UDT. Estos procedimientos de PCR basados en SL-IR I y II mostraron que en Chararé, el

78,78% de los pacientes estaban infectados con cepas de UDT I, mientras que el 9,09% correspondía a infecciones mixtas de UDT I más otras UDTs, UDT II / V / VI. En cuatro de estas muestras (12,12%), no se pudo determinar el grupo de UDT correspondiente. La falla en el genotipo de algunas de las muestras analizadas probablemente se debió a cargas parasitarias muy bajas, por debajo de los límites de detección de los métodos de PCR SL-IR I y II. Por lo que se puede sospechar la misma limitación para los otros marcadores de genotipado que dieron resultados indetectables.

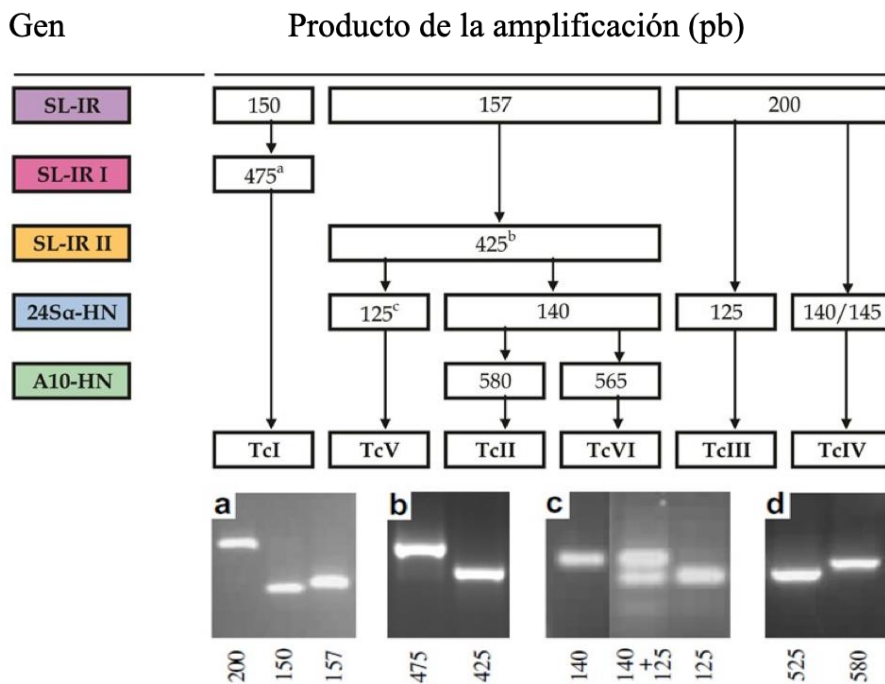


Figura 4.5.- Diagrama de flujo de las dianas de PCR para el genotipado de UDT. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la detección por PCR basada en SL-IR I y SL-IR II de grupos de UDT de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica de Panamá.

#### 4.1.5. Diagnóstico clínico.

Los pacientes con diagnóstico serológico positivo realizado tanto en los hospitales de tercer nivel de atención (Hospital Santo Tomás, Complejo

Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid y Hospital de Especialidades Pediátricas) donde se realizó el primer cribado, como en nuestro estudio, se les realizó electrocardiograma y radiografía de tórax en los diferentes hospitales responsable de las evaluaciones (Hospital Regional de Chepo). De los pacientes procedentes del área urbana el 26.4% (14/53) fueron diagnosticados como asintomáticos y el 17 % (9/53) como cardiacos (Tabla 4.2). Sin embargo de los pacientes de la comunidad endémica rural, el 45.2 % (24/53) fueron asintomáticos y el 11.3 % (6/53) fueron diagnosticados como cardiacos (Tabla 4.3). Las manifestaciones clínicas más comunes encontradas en los pacientes cardiacos fueron: trastornos de la repolarización, bloqueo auriculoventricular, bradicardia y trastorno de la conducción.

#### **4.1.6 Evaluación de la respuesta inmune de sueros de pacientes chagásicos de Panamá a través de ensayos de ELISA, con extractos de las formas infectantes del parásito y otros componentes del parasito presentes en los sueros.**

Los métodos inmunológicos presentan algunas divergencias debido a los diferentes protocolos de las preparaciones de antígenos y las variaciones genéticas de las cepas circulantes, lo que produce diferencias en el rendimiento entre las pruebas comerciales disponibles (Santos et al. 2016) .

Estudios indican que las pruebas o kit comerciales que utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos son una alternativa más específica a los que utilizan extractos crudos complejos, aunque en ocasiones tienen sensibilidades variables (Caballero et al. 2007).

En este escenario y debido a la heterogeneidad de la especificidad descrita, las pruebas, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en este trabajo

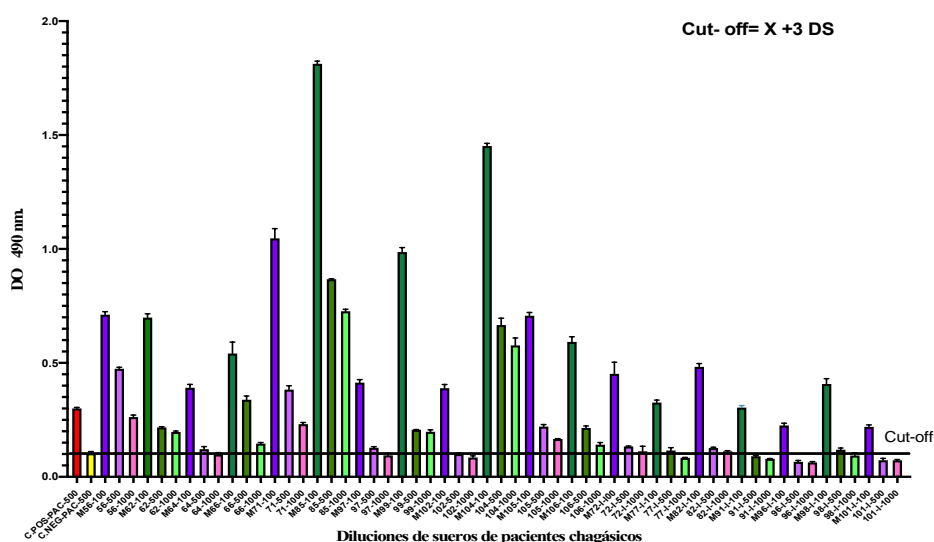


decidimos evaluar la respuesta inmune frente a *T. cruzi* con diferentes fracciones o componentes del parásito a través de ensayos de ELISA.

**4.1.6.1. Determinación de títulos de anti *T. cruzi* en suero de pacientes chagásicos frente a lisado de tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Pan4, a través de ensayos de ELISA.**

La determinación de los títulos anti-*T. cruzi* de pacientes chagásicos panameños, se realizó a través de ensayos de ELISA, utilizando el extracto procedente del lisado crudo de tripomastigotes, sensibilizando las placas con una concentración de 5µg/pocillo. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 4.2. Se estudió 19 pacientes seleccionados aleatoriamente de ambos grupos de población (urbana y rural) con el objetivo de obtener respuesta inmune, independientemente de la localidad y la evaluación clínica. Todos los pacientes presentaron títulos por arriba del valor de corte en relación con el control negativo a la dilución 1:500. Lo que corrobora los resultados anteriores realizados con el Kit Comercial Chagatest. A las muestras evaluadas se les realizó tres titulaciones (1:100, 1:500 y 1:1000); En todas (100%), se obtuvieron resultados por arriba del valor de corte en las diluciones 1:500, sin embargo, en la dilución 1:1000, solo el 79% (15/19) resultaron con valores positivos en comparación al cut-off.

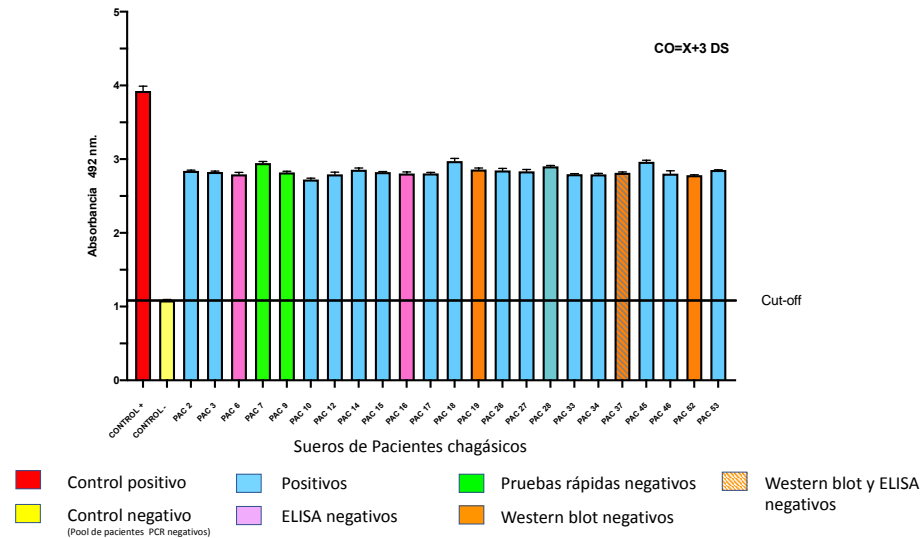
## Resultados



Gráfica 4.2.- Evaluación de la respuesta inmune de sueros de pacientes chagásicos frente a lisado crudo de tripomastigote de *T. cruzi* Pan4 a través de ensayos de ELISA.

### 4.1.6.2 Determinación de respuesta inmune en las EVs purificadas de los sueros de pacientes chagásicos frente a inmunosuero anti-*T. cruzi*, obtenido en rata Wistar a través de ensayos de ELISA.

Se pudo comprobar en 23 sueros de los pacientes panameños crónicos, verificados por PCR, la presencia de inmunocomplejos formados por EVs, tras los procesos de aislamiento por ultracentrifugación. Una vez separados las EVs de las inmunoglobulinas que forman los inmunocomplejos, las EVs fueron lisadas y cuantificadas las proteínas, para ser adsorbidas en placas de ELISA. Para este estudio se utilizaron EVs obtenidas a partir de sueros de pacientes que en el primer tamizaje serológico fueron considerados como indeterminados; con el objeto de comprobar si las EVs del parásito estaban presentes en dichos los sueros y eran determinantes en el diagnóstico de los pacientes en estudio.



**Gráfica 4.3.- Reconocimiento antigénico en las EVs obtenidas de sueros de pacientes chagásicos frente a un inmunosuero anti-*T. cruzi* (rata), a través de ensayos de ELISA.**

En la gráfica 4.3 se observa como todas las muestras (100%), tienen respuesta inmune frente a los antígenos presentes en las EVs con valores de absorbancia superiores al valor cut-off, independientemente si son consideradas indeterminadas, positivas o incluso negativas en análisis inmunológicos anteriores. Como se muestra, las muestras 6 y 16 fueron negativas en los ensayos de ELISA, al igual que las muestras 7 y 9 donde fueron negativas en las pruebas rápidas. Las muestras 19 y 37 fueron consideradas indeterminadas mediante los ensayos de Western Blot y por último la muestra 37 fue también considerada negativa en las pruebas de ELISA frente a los antígenos totales de *T. cruzi* presentes en estos sueros.

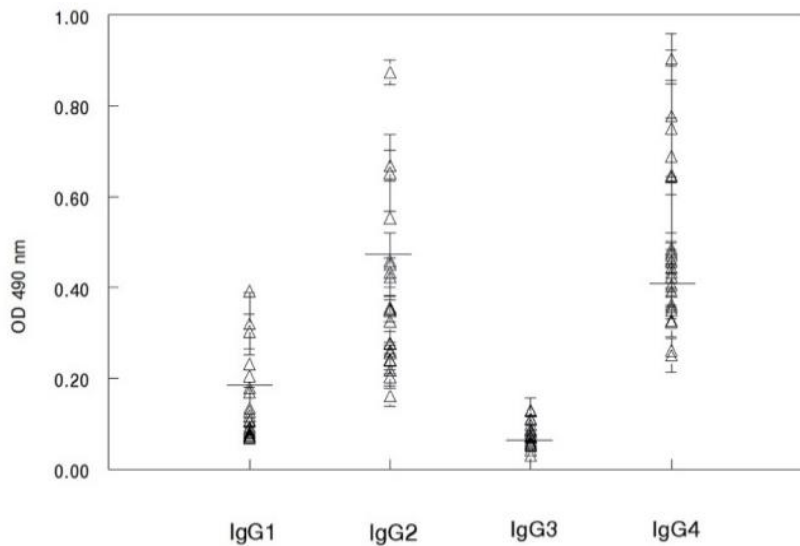
Los resultados obtenidos de tres ensayos diferentes, corroboran la especificidad de los estudios, al utilizar las EVs presentes en el suero de los

pacientes como antígeno y un inmunosuero frente a *T. cruzi* como método de diagnóstico directo.

#### **4.1.6.3. Tipificación de las inmunoglobulinas en sueros de pacientes chagásicos crónicos a través de ensayos de ELISA.**

De las 5 principales tipos de inmunoglobulina séricas, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. La inmunoglobulina G (IgG) es una de las proteínas más abundante en el suero humano, y representa aproximadamente el 10-20% de las proteínas plasmáticas totales. IgG en la especie humana se divide en cuatro subclases, nombradas, en orden decreciente de abundancia IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cada subclase tiene un perfil único con respecto a la unión a antígenos, formación de inmunocomplejos, activación del complemento, activación de células efectoras y el transporte al feto a través de la placenta.

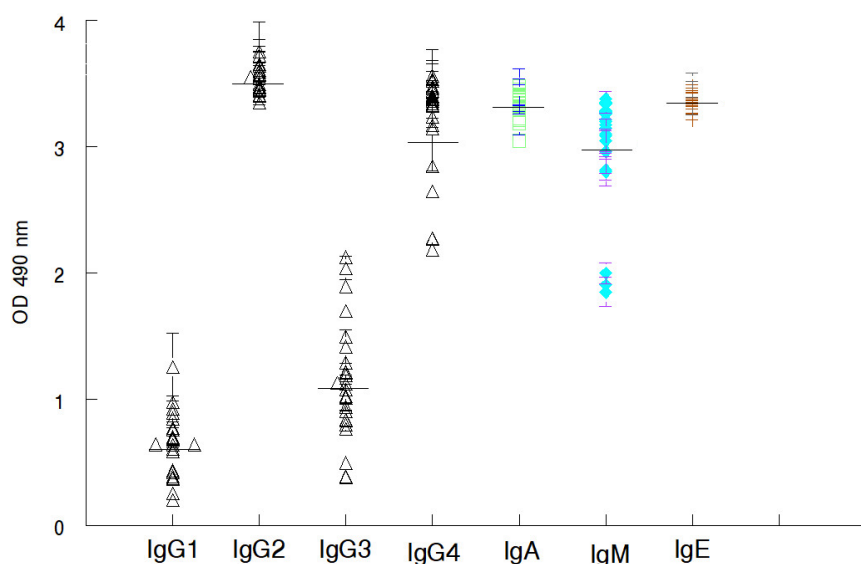
El papel de estas IgGs en la respuesta inmune humoral en la progresión y desarrollo de la enfermedad de Chagas está poco explorado. El objetivo de este ensayo fue identificar el tipo de inmunoglobulinas anti *T. cruzi* y sus isotipos en la formación de los inmunocomplejos circulantes en los pacientes crónicos usados en estos estudios.



**Grafica 4.4.- Tipificación de subclases de IgG en los Inmunocomplejos de sueros de pacientes chagásicos crónicos mediante ELISA. Las líneas horizontales indican los valores medios obtenidos.**

Para tal objetivo se utilizó un ELISA de captura en donde se estudio cada inmunoglobulina de forma individual en 23 muestras de sueros con sus respectivos controles negativos y positivos. Como antígeno se empleó las inmunoglobulinas que se disociaron previamente de los inmunocomplejos (EVs- Ig) a partir de los sueros de pacientes chagásicos. Se observó que los niveles más altos obtenidos fueron para IgG4 e IgG2 en casi todos los casos. Hubo niveles moderadamente altos de anticuerpos IgG3 y niveles más bajos de anticuerpos IgG1 en todos los pacientes como se muestra en la gráfica 4.4.

## Resultados

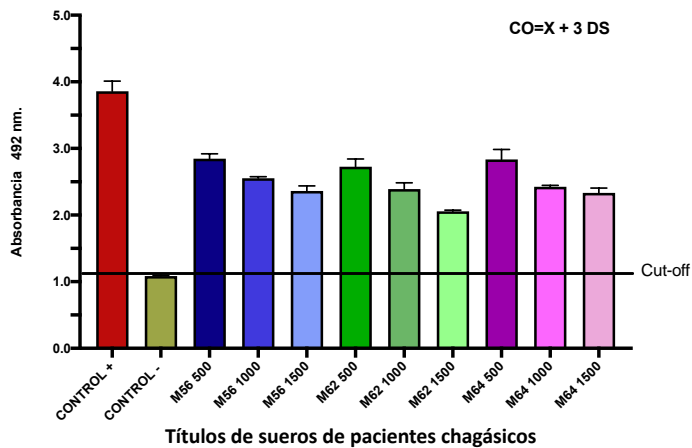


**Gráfica 4.5.- Comparación de la reactividad de las IgG y Ig A, IgE e IgM en suero de pacientes chagásicos crónicos.**

En cuanto a la presencia de las inmunoglobulinas A, E y M, capaces de reconocer antígenos de *T. cruzi*, encontramos que su reactividad fue similar entre ellas en la mayoría de las muestras analizadas. Dando un perfil de reactividad de las IgGs a las procedentes de los inmunocomplejos circulantes, grafica 4.5.

#### **4.1.6.4. Determinación de la respuesta inmune de sueros de pacientes chagásicos, frente a EVs liberadas por tripomastigotes de *T. cruzi*, mediante ensayos de ELISA.**

Para este estudio se utilizó como antígeno las EVs de *T. cruzi* liberadas y cuantificadas según los protocolos anteriormente descritos, las cuales se adsorbieron en placas de microtitulación, para ensayos de ELISA.



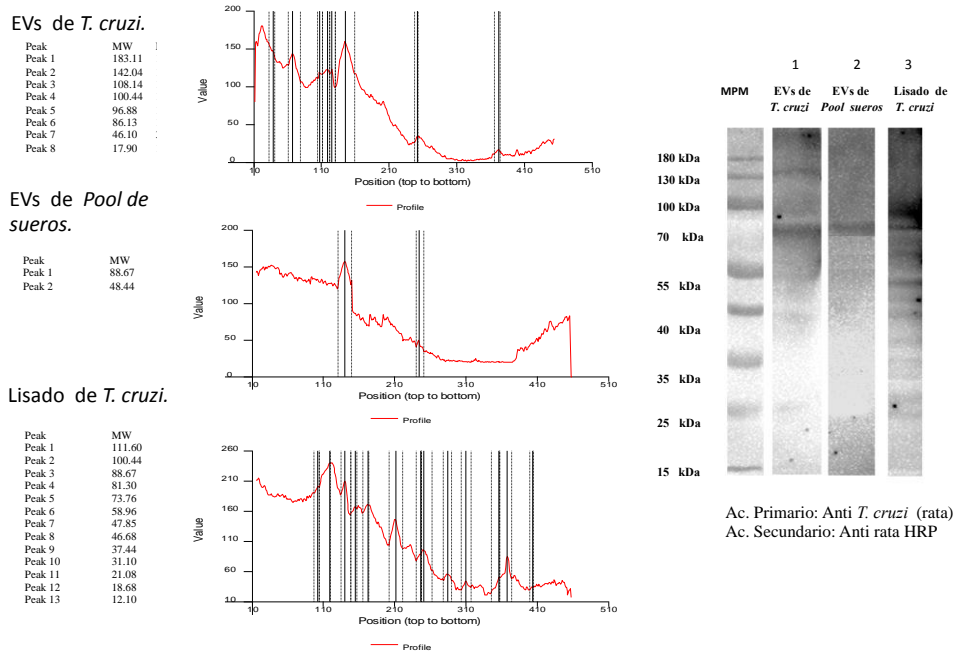
**Gráfica 4.6.- Reactividad inmunológica de los sueros de pacientes chagásicos frente a EVs de *T. cruzi* Pan4.**

Los sueros de los pacientes chagásicos fueron estudiados a tres diluciones (1:500, 1:1000 y 1:1500). El objetivo de este ensayo fue, una vez más corroborar la reactividad de los sueros elegidos para el ensayo frente a otro antígeno mucho más específico del parásito, en este caso las EVs procedentes de tripomastigotes de *T. cruzi*. Los resultados representados en la gráfica 4.6 muestran como los sueros presentan títulos elevados con respecto al cut-off, en las tres diluciones, a pesar de que, en las pruebas serológicas del primer tamizaje, las muestras 56 y 62 fueron consideradas negativas para las pruebas rápidas y la muestra 64 por ELISA (datos mostrados en la tabla 4.3)

#### **4.1.7. Detección de antígenos presentes en las EVs de tripomastigotes y reconocimiento de las inmunoglobulinas formadoras de inmunocomplejos circulantes en sueros de pacientes chagásicos crónicos.**

Con el objetivo de conocer el reconocimiento de los diferentes antígenos presentes en las EVs, que forman los inmunocomplejos circulantes en el pool de sueros usados en los estudios anteriores, se llevaron a cabo una serie de experimentos usando la técnica de Western blot, al objeto de reconocer dichos antígenos para posteriores estudios de caracterización. Se comparó el perfil de reconocimiento por parte de un inmunosuero frente a *T. cruzi* (obtenido en rata) y de un inmunosuero anti-EVs de *T. cruzi* (obtenido en rata). Para estos ensayos se prepararon membranas de PVDF con las proteínas transferidas procedentes de una electroforesis SDS-PAGE de EVs purificadas de un pool de sueros de pacientes chagásicos, EVs de tripomastigote de *T. cruzi* y un lisado de tripomastigotes de *T. cruzi*.

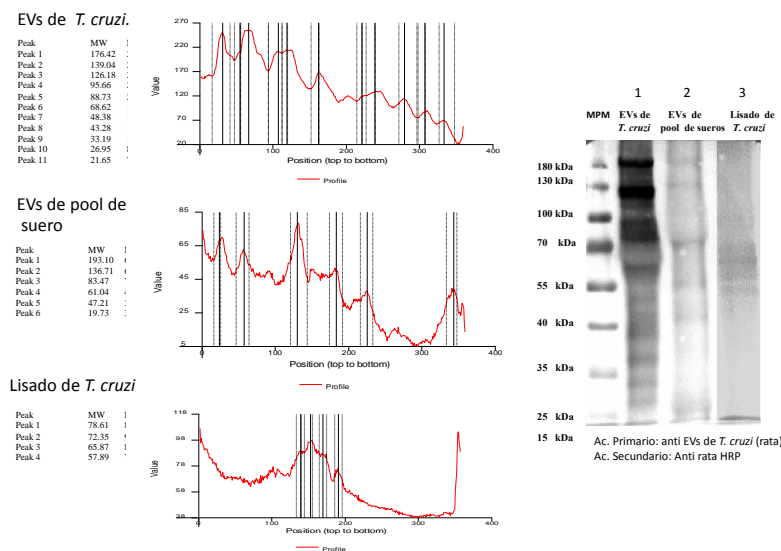




**Figura 4.6.- Reconocimiento de proteínas en EVs de *T. cruzi* y EVs de pool de suero de pacientes chagásicos panameños mediante Western blot. Se utilizó un inmunosuero anti *T. cruzi* (hecho en rata), en dilución 1:1000.**

En los resultados que se muestran en la figura 4.6 se observa en el carril 1 el reconocimiento antigénico de al menos 8 antígenos de pesos moleculares aproximados de ~ 183 kDa, hasta ~ 17 kDa en las EVs de *T. cruzi*. En el carril 2, se observan el reconocimiento de proteínas en las EVs del pool de suero, con una banda mayoritaria de aproximadamente ~ 88 kDa y en el carril 3 se corresponde al reconocimiento antigénico del lisado de *T. cruzi*, con el reconocimiento de 13 proteínas con pesos moleculares aproximados de ~ 111 kDa, hasta ~ 12 kDa. Es de destacar la banda de ~86 - 88 kDa presente en las tres muestras, pudiendo ser un antígeno candidato para reconocimiento de la parasitación, lo que requerirá futuros estudios de identificación del mismo para su posterior uso.

## Resultados

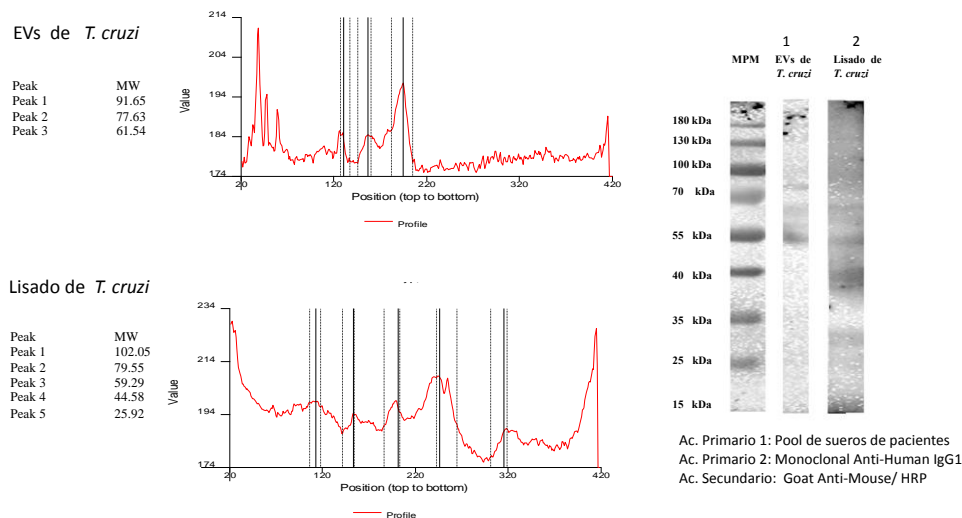


**Figura 4.7.- Reconocimiento de proteínas en EVs de *T. cruzi* y EVs de pool de suero de pacientes chagásicos panameños mediante Western blot. Se utilizó un inmunosuero anti EVs de *T. cruzi* (obtenido en rata), dilución 1:1000.**

En la figura 4.7 se muestra el reconocimiento antigénico de las mismas muestras procedentes de la electroforesis usadas en el estudio anterior, pero en este caso se realizó el reconocimiento con un inmunosuero (obtenido en rata) frente a EVs liberadas por las formas tripomastigotes del parásito. En el carril 1 se observa el reconocimiento de al menos de 11 antígenos proteicos de las EVs con pesos moleculares que oscilan desde ~ 176- 21 kDa. En el carril 2 se detectan al menos 6 bandas con pesos moleculares ~ 193-19 kDa aproximadamente, coincidiendo en el perfil las bandas de ~83 kDa posiblemente reconocidas en el experimento anterior por parte de los sueros de los pacientes. En el carril 3, que corresponde al lisado del parásito donde se reconocen proteínas con pesos moleculares desde 78 hasta 57 kDa. Haciéndose constar la presencia de un grupo de proteínas de ~ 80 kDa en el lisado de *T. cruzi* reconocidas por el inmunosuero anti -EVs de *T. cruzi* (hecho en rata), que bien pueden corresponder a las reconocidas en los extractos de

las vesículas extracelulares y que como consecuencia de las inexactitudes de los densitogramas o a la posible glicosilación en las EVs cambiaran su  $r_f$  en la electroforesis.

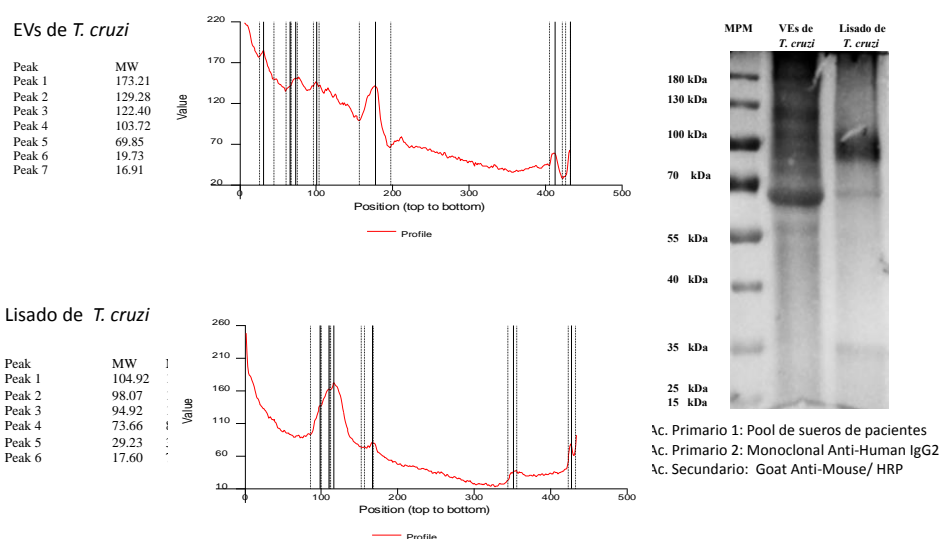
Con la finalidad de identificar los isotipos de las inmunoglobulinas que acompañan a los inmunocomplejos (EVs-Anticuerpo) presentes en el suero de los pacientes crónicos, se llevó a cabo una serie de experimentos con la técnica de Western blots semejantes a los anteriormente descritos. Los anticuerpos primarios utilizados procedían de un pool de suero de pacientes chagásicos (dilución 1:200) y como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos monoclonales en ratón, capaces de reconocer cada uno de los 4 diferentes subclases de inmunoglobulinas IgG humanas, como se describe en el apartado de Material y métodos.



**Figura 4.8.- Detección antigénica de inmunoglobulinas IgG1 en pool de sueros de pacientes chagásicos panameños, a través del reconocimiento de proteínas en EVs y lisado de tripomastigotes de *T. cruzi*, mediante Western blot.**

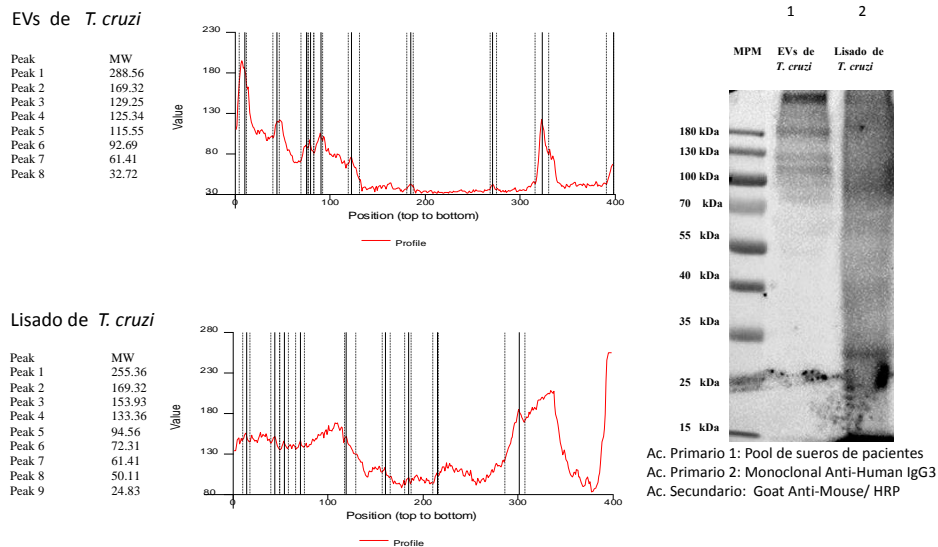
## Resultados

En la figura 4.8, en el carril 1 se muestra la detección por parte de la inmunoglobulina IgG1 del pool de sueros de pacientes chagásicos, mediante el reconocimiento de 3 bandas de aproximadamente de 91, 77 y 61 kDa en el perfil de las EVs de *T. cruzi*. De igual manera se puede observar en el carril 2 el reconocimiento de una serie de bandas, principalmente de 79, 59 y 44 kDa en el lisado de *T. cruzi*, correspondiente a la detección de la IgG1 presente en el pool de los sueros.



**Figura 4.9.- Detección antigénica de las inmunoglobulinas IgG2 en el pool de sueros de pacientes chagásicos panameños, a través del reconocimiento de proteínas en EVs y lisado de tripomastigotes de *T. cruzi*, mediante Western blot.**

En la figura 4.9. se observa la detección de la inmunoglobulina IgG2 en el pool de sueros, que reconocen proteínas tanto para EVs como para el lisado de *T. cruzi*. En el carril 1 se identifican proteínas aproximadamente de 173, 129, 122, 103, 66 y 69 kDa entre otras menos detectables. En el carril 2 se observa claramente el reconocimiento de bandas de 104, 98, 94 y 73 kDa. Lo que muestra un perfil de reconocimiento diferente a mostrado por las IgG1



**Figura 4.10.- Detección antigénica de inmunoglobulinas IgG3 en pool de sueros de pacientes chagásicos panameños, a través del reconocimiento de proteínas en las EVs y lisado de tripomastigotes de *T. cruzi*, mediante Western blot.**

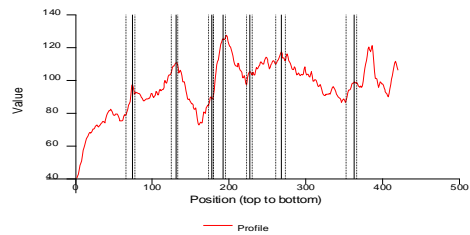
En la figura 4.10 se observa la detección de la IgG3 presente en el pool de sueros en estudio, donde se reconocen múltiples proteínas en el carril 1 que oscilan desde 288-32 kDa. De igual manera en el carril 2, se observan aproximadamente 9 bandas reconocidas en el lisado de *T. cruzi*.

En la figura 4.11 se identifica la inmunoglobulina IgG4 presente en el pool de suero en estudio, con el reconocimiento de al menos 7 bandas en las EVs en el carril 1 y 3 bandas en el carril 2 con pesos moleculares de 49, 39 y 29 kDa para el lisado de *T. cruzi*. Es de destacar de nuevo el reconocimiento de una banda de ~ 80kDa al igual que era detectada en los experimentos anteriores en las EVs del parásito. De igual manera se comprueba como el perfil de reconocimiento es diferente al producido por las otras subclases.

## Resultados

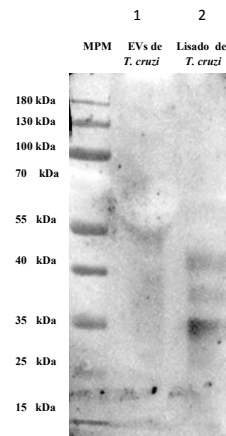
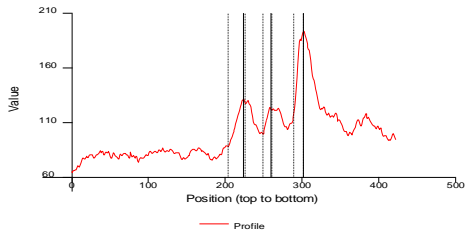
### EVs de *T. cruzi*

Peak	Position	MW
Peak 1	74.00	121.51
Peak 2	130.91	84.74
Peak 3	177.00	64.60
Peak 4	192.00	59.29
Peak 5	227.00	48.36
Peak 6	268.00	37.52
Peak 7	363.00	17.72



### Lisado de *T. cruzi*

Peak	Position	MW
Peak 1	224.00	49.23
Peak 2	259.00	39.75
Peak 3	301.18	29.95



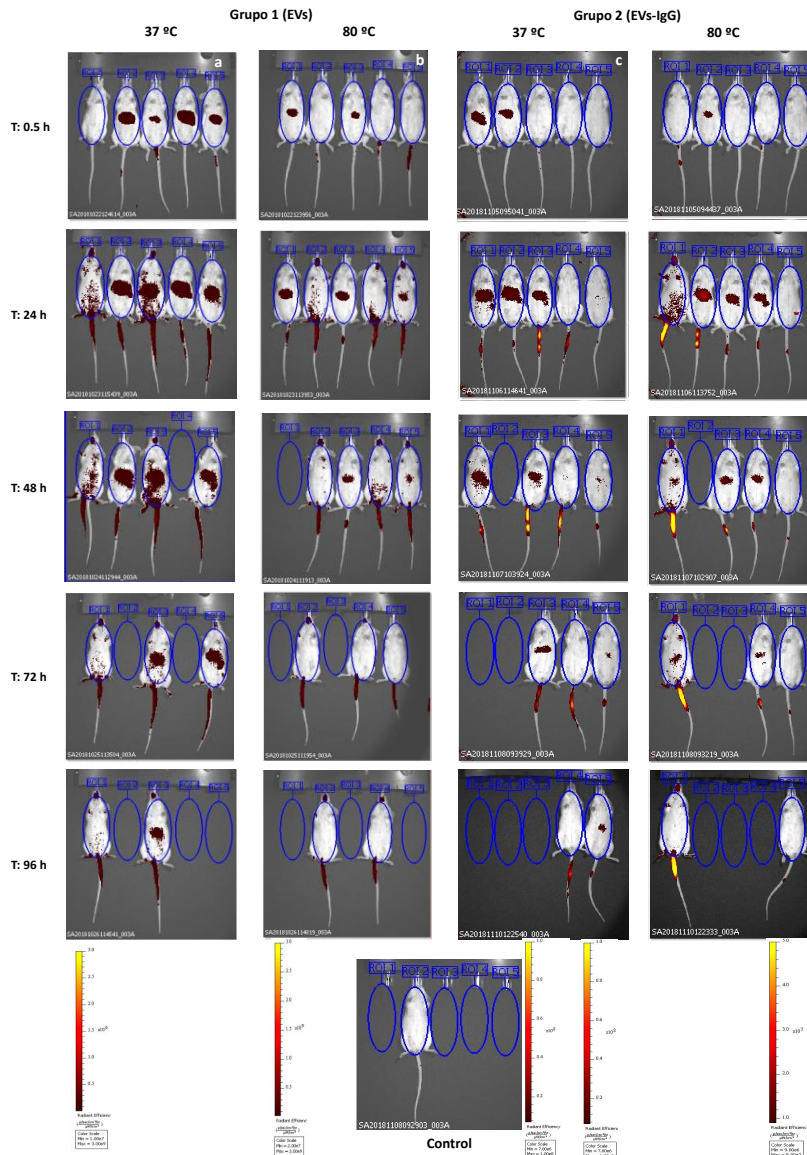
Primario 1: Pool de sueros de pacientes  
 Secundario: Monoclonal Anti-Human IgG4/HRP

**Figura 4.11.- Detección antigénica de inmunoglobulinas IgG4 en pool de sueros de pacientes chagásicos panameños, a través del reconocimiento de proteínas en EVs y lisado de tripomastigotes de *T. cruzi*, mediante Western blot.**

#### **4.2. Estudio de la biodistribución en ratones CD1 inoculados con EVs de *T. cruzi* e ICs (EVs-IgGs).**

Las EVs utilizadas fueron aisladas de tripomastigotes de *T. cruzi* como se describe en Material y Métodos y sometidas a tratamientos térmicos de 37°C y 80°C; las IgGs se obtuvieron de ratas Wistar inmunizadas con tripomastigotes de *T. cruzi* y purificadas a través de columna de afinidad con Prot A. Como se describe también en Material y Métodos, los inmunocomplejos (IC) se formaron al incubar las IgGs totales purificadas de los inmunosueros anti *T. cruzi* con EVs purificadas y previamente marcadas con el colorante lipofílico (DiR). Las EVs marcadas y los IC formados fueron administradas a través de la vena marginal de la cola.

## Resultados



**Figura 4.12.-** Imágenes de fluorescencia “in vivo” de la localización en los ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* inyectados por vía intravenosa. a) Ratones inoculados con EVs marcadas con DiR sin previo tratamiento térmico. b) Ratones inoculados con EVs marcadas con DiR tratadas previamente a 80°C. c) Ratones inoculados con IC (EVs-IgGs) marcados con DiR y sin tratamiento térmico. d) Ratones inoculados con IC (EVs-IgGs) marcados con DiR y tratados a 80°C. Las medidas y capturas de imágenes del tráfico de EVs de los 4 grupos de ratones se realizaron cada 24 horas a lo largo de 5 días. La barra de escala (parte inferior de cada grupo) se correlacionó con la presencia del color rojo donde hay señal, debido a la presencia de EVs marcadas. Las señales máximas y mínimas se indican en la parte superior e inferior de la barra de escala, respectivamente.



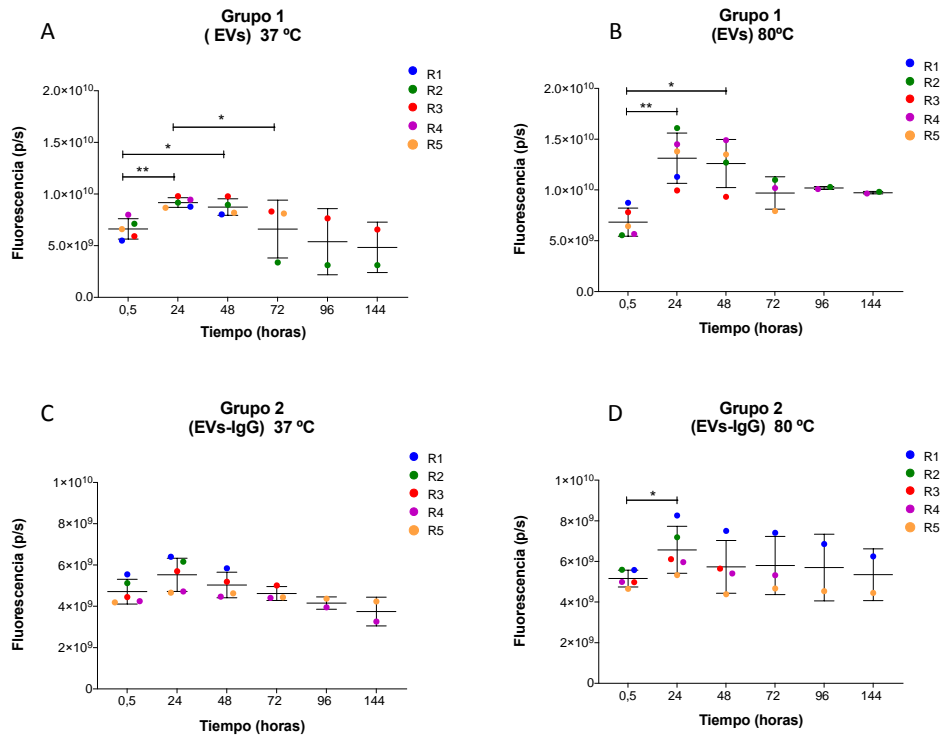
Las imágenes capturadas por el equipo IVIS fueron obtenidas a diferentes tiempos en los ratones previamente sedados con isoflurano. Una vez sacrificados los animales, se les extrajeron los diferentes órganos y de forma aislada se llevó a cabo medidas de fluorescencia. Se identificaron los órganos donde preferentemente se localizaba la fluorescencia emitida por las EVs e IC a lo largo del tiempo, tras el inóculo. El registro de FLIT con la tomografía computarizada se generó utilizando el software Living Image.

Los resultados de la biodistribución tanto de EVs como de IC muestran patrones claros de fluorescencia a los tiempos de 24 h y 48 h, que aparecen en la Figura 4.12a.

Sin embargo los ratones que se inocularon con EVs mantenidas a 37°C registraron una mayor intensidad de fluorescencia a las 48 horas, que el grupo de ratones inoculados con EVs tratadas a 80°C.

Es decir, una vez pasada las primeras 24 horas del ensayo, se observó cómo se producía un incremento de la fluorescencia en todos los grupos, con diferentes niveles de intensidad. Se sacrificó un ratón por grupo a fin de estudiar la fluorescencia en los órganos y tejidos. Como control se utilizó un ratón inoculado con PBD+DiR, para poder contrastar la escala de las imágenes capturadas (Figura 4.12).

## Resultados

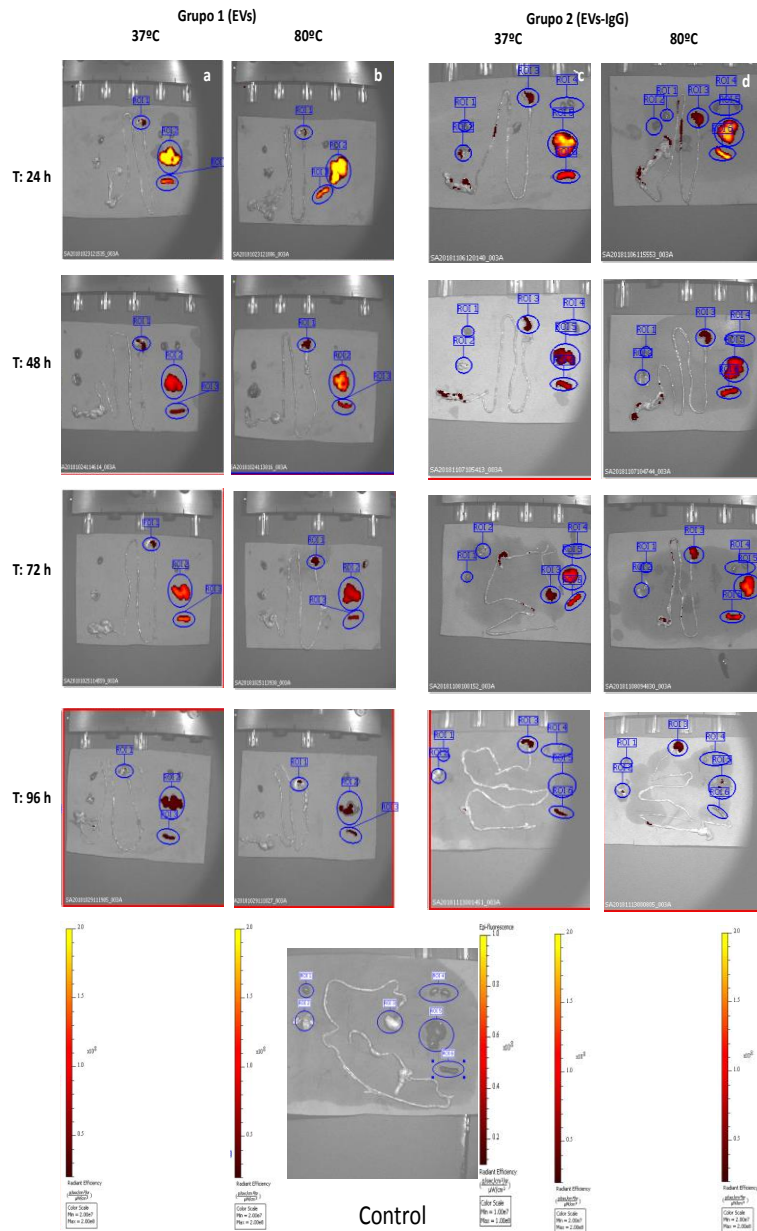


**Figura 4.13.-** Cuantificación de los niveles de fluorescencia de los ROI, en el estudio de la biodistribución de las EVs e IC de *T. cruzi* en los 4 grupos de ratones en relación con el tiempo de tratamiento transcurrido. A) EVs sin tratamiento térmico (grupo1). B) EVs tratadas a 80°C (grupo 1). C) IC (EVs-IgG) (Grupo2). D) IC formados con EVs previamente tratados a 80°C (grupo 2).

Las gráficas de la figura 4.13. muestran la cuantificación de los niveles de fluorescencia en las regiones de interés (ROI), de la distribución y efecto de diferentes tratamientos de EVs e ICs marcados con DiR en relación con el tiempo de exposición en cada grupo de ratones. Es evidente en los 4 grupos la disminución de la fluorescencia a partir de las 24 horas, independientemente del tratamiento que hayan recibido. Sin embargo, en los grupos tratados a 80°C la disminución de la fluorescencia es mayor después de las 48 horas.

Las diferencias significativas entre los Grupos 1 y Grupo 2 frente a cada una de las variables evaluadas fue determinada empleando el test no paramétrico de Mann Whitney. Se consideró que las diferencias observadas son estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ . Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como  $*p \leq 0,05$  y  $**p \leq 0,01$ . Todos los gráficos se realizaron en Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).

## Resultados



**Figura 4.14.- Evaluación de órganos mediante imágenes de fluorescencia.**

**Grupo 1:** ratones CD1 inoculados con EVs a 37°C y tratadas y 80°C.

**Grupo 2:** ratones CD1 inoculados con IC con y sin previo tratamiento térmico (80°C) y teñidos con colorante lipofílico DiR. Captura de imágenes de los órganos de los animales sacrificados. La barra de escala (parte inferior de cada grupo) se correlacionó con la intensidad de la señal, donde el amarillo indica una señal más alta y el rojo indica una señal más baja. Las señales máximas y mínimas se indican en la parte superior e inferior de la barra de escala, respectivamente.

Debido al seguimiento llevado a cabo en los 4 grupos, se observó cada animal de forma individual, al objeto de elegir el de mayor fluorescencia en las evaluaciones diarias, para el posterior sacrificio y estudio de la biodistribución de EVs e IC en los diferentes órganos.

Para identificar con precisión el tejido, se hicieron capturas de imágenes de los órganos cada 24 horas. Los órganos estudiados fueron corazón, estómago, intestino delgado y grueso, pulmones, riñones, hígado y bazo. En la figura 4.14, se identifica la fluorescencia de mayor intensidad en órganos como el hígado, bazo y estómago, ya que la señal roja, derivada de las EVs marcadas con DiR, se localizó en estos órganos, sin embargo, se detectaron niveles muy bajos de señal en algunos ratones en intestino, mientras que, en órganos como el corazón, los riñones y pulmones no se observó ninguna señal. Probablemente esto se deba a que los niveles de EVs en estos últimos órganos son mínimos y por lo tanto, están por debajo del umbral de detección de la técnica.

La captación y acumulación de EVs de *T. cruzi* en los órganos, presenta mayor intensidad a las 24 horas en los 4 grupos, sin embargo, se observa mayor intensidad de señal en el grupo 1 con EVs sin tratamiento térmico. El análisis de las imágenes permitió observar que en el grupo de ratones inoculado con el IC (grupo 2) hay señal en órganos como el intestino delgado y grueso, con los dos tratamientos en las primeras 48 horas y que a medida que pasan las horas va desapareciendo, situación que no se presenta en el grupo 1 (Figura 4.14 Figura 4.15).

Resultados

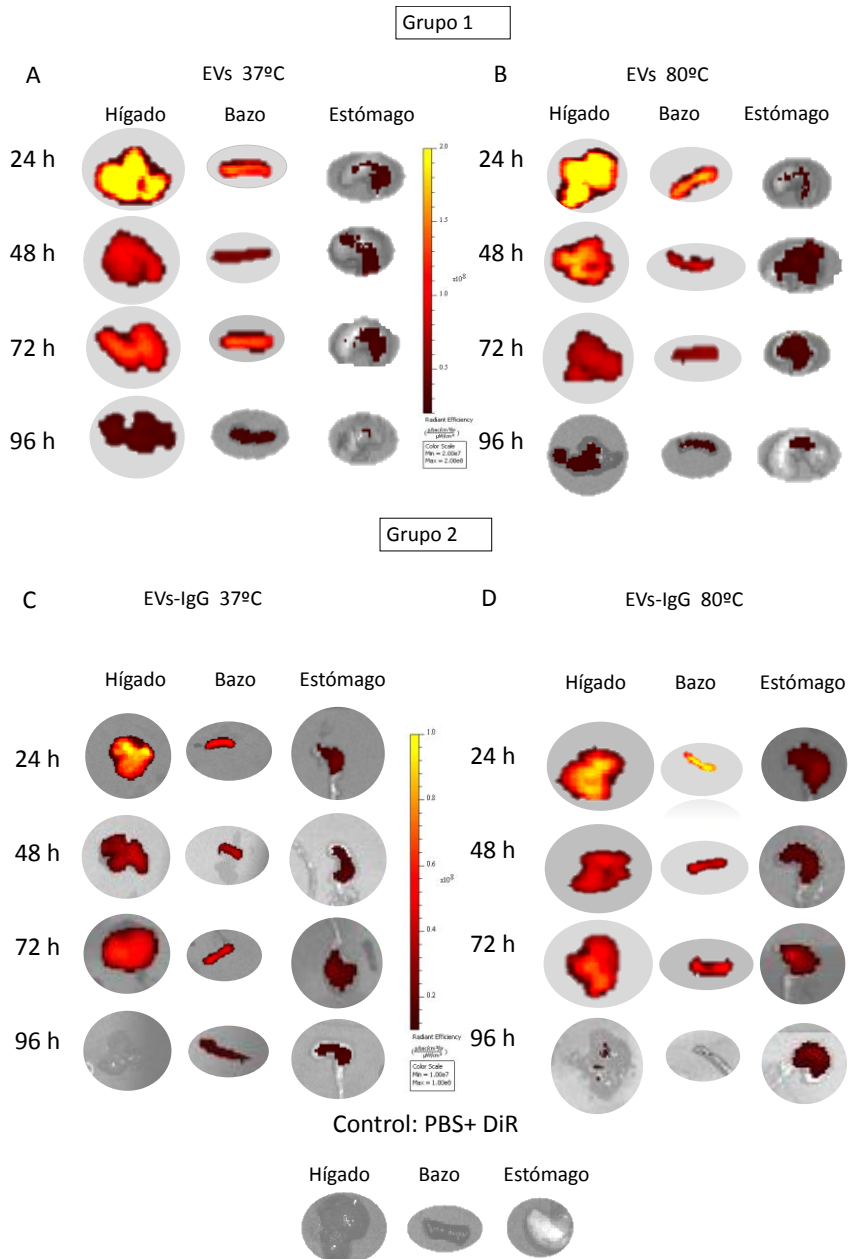
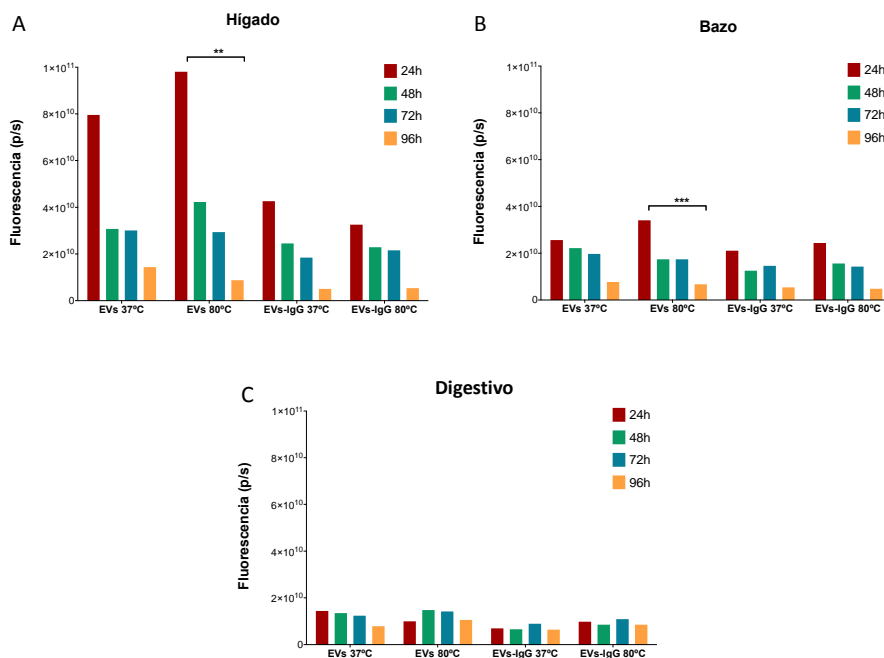


Figura 4.15.- Evaluación de hígado, bazo y aparato digestivo disecados. (A) Órganos de ratones CD1 inoculados con EVs de *T. cruzi* Pan4 a 37°C marcados con DiR. (B) Órganos con EVs de *T. cruzi* tratados a 80°C. (C) Órganos con ICs (EVs-IgGs) de *T. cruzi* a 37°C. (D) Órganos con ICs (EVs-IgGs) de *T. cruzi* tratados a 80°C. La barra de escala (parte lateral de cada grupo) se correlacionó con la intensidad de la señal, donde el amarillo indica una señal más alta y el rojo indica una señal más baja. Las señales máximas y mínimas se indican en la parte superior e inferior de la barra de escala, respectivamente.

En lo referente a la presencia de señal en algunos órganos, se podría sugerir, que son los macrófagos, como células fagocíticas los encargados de eliminar los EVs administradas, ya que los órganos con mayor número de macrófagos residentes, como son el hígado y el bazo son los que de una manera más eficiente acumulan las EVs inoculadas.



**Figura 4.16.- Niveles de distribución de las EVs e ICs de *T. cruzi* en órganos de 4 grupos de ratones en relación con el tratamiento y tiempo transcurrido. A) Hígado. B) Bazo. C) Estómago. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada a las 24 h, 48h, 72h y 96 h, en cada ratón sacrificado dentro de los 4 grupos de tratamiento (uno por tiempo y por grupo). Se consideró que las diferencias observadas son estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ . Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como  $*p \leq 0,05$  y  $**p \leq 0,01$ .**

La cuantificación “in vivo” de la señal fluorescente fue representada en las gráficas de la figura 4.16, donde se diferencian los cambios en la intensidad de la fluorescencia en cada órgano con respecto a la variable tiempo, en los 4 grupos experimentales.

En el perfil general de biodistribución de EVs, de los órganos analizados muestra cambios marcados durante las primeras 24 horas tras la inoculación, en el grupo tratado con EVs (grupo 1), en especial en el hígado, mientras que se detectaron cambios menores de fluorescencia en el bazo y el estómago. Sin embargo, en el grupo tratado con los ICs (grupo 2) la fluorescencia en todos los órganos fue menor, pero con predominio en el hígado.

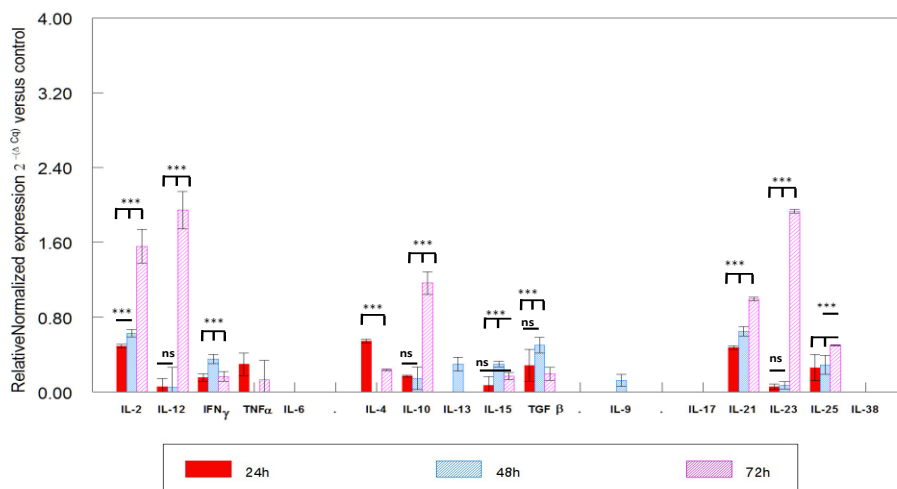
Nuestros resultados indican un patrón de distribución similar a las 24 horas al comparar los 4 grupos experimentales, mientras que a las 48 horas, la señal fluorescente comenzó a disminuir en el hígado y bazo. Sin embargo no ocurre lo mismo en el estómago ya que la señal aumentó fuertemente en las 48 h para el grupo de EVs tratadas a 80°C y a las 72 h para los ratones inyectados con IC.

### **4.3. Determinación de la expresión de interleucinas por PCR cuantitativa en tiempo real en órganos de ratón CD1 procedentes de animales inoculados por vía sanguínea.**

Tras evaluar los resultados obtenidos del estudio de la biodistribución de EVs e ICs en diversos órganos “ex vivo”, se diseñó un experimento con los mismos grupos de ratones e inóculos que los de los experimentos precedentes, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se evaluó los niveles de expresión de diversas interleucinas en hígado y bazo. Para ello muestras de órganos (hígado y bazo) de ratones eutanasiados y debidamente conservados en RNAlater fueron lisados. El RNA extraído, fue tratado con DNasa para evitar las posibles contaminaciones con DNA genómico, seguida de una retrotranscripción al objeto de obtener el cDNA a través de RT-qPCR, como se ha detallado anteriormente. Para verificar el cDNA, se realizó una PCR utilizando



cebadores que amplificaran el gen 18S del RNA ribosomal. A todos los cebadores se les evaluó su eficiencia a través de PCR convencional antes de realizar las RT-qPCRs. Los niveles de expresión de cada gen de interleucina, en cada tiempo estudiado fueron comparados con respecto a ratones control, co-normalizándose a través de la utilización del gen de referencia de la  $\beta$ -actina usado como “housekeeping”. Los resultados de los niveles de expresión obtenidos, se presentan en 8 gráficas que contienen los datos individuales para cada órgano, tratamiento, tiempos aplicados, e interleucinas agrupadas según el tipo respuesta inmunitaria que produce.



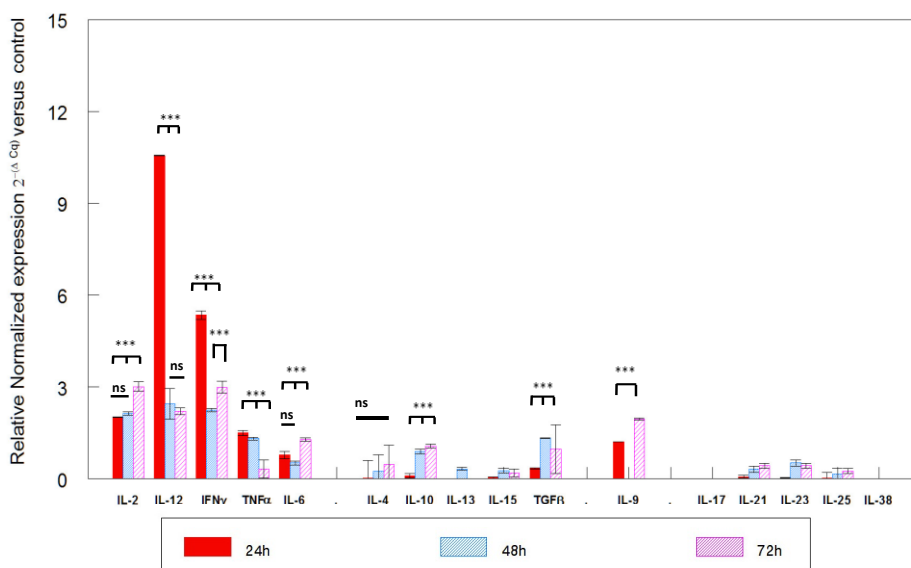
**Gráfica 4.7.-Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión normalizada de interleucinas en hígado de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi* (37°C).**

Se analizó un total de 16 interleucinas de los grupos Th1 (IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  Y TNF- $\alpha$ ); Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, IL-15, y TGF- $\beta$ ); Th17 (IL-17, IL-21 y IL-23 e IL-25) así como otras interleucinas como la IL-6, IL-9, IL-13 e IL-38. Los valores son la media de la expresión

## Resultados

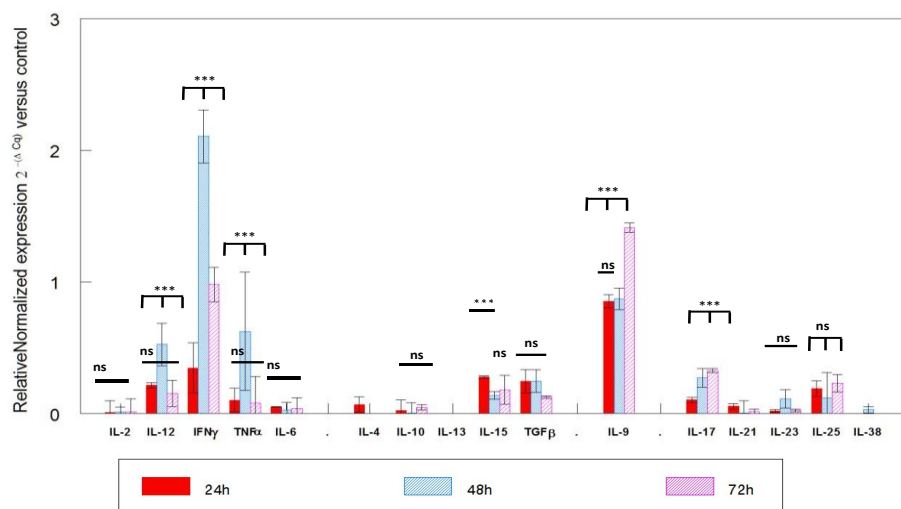
normalizada y la desviación estándar. Para el análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*,  $p < 0.001$  (\*\*\*) ,  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.05$  (\*) .

La gráfica 4.7 representa la gráfica de expresión de interleucinas en el hígado de los ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* (37 °C). Los colores de las barras de la gráfica representan las horas de tratamiento (24h 48h y 72h). Los resultados muestran en general el bajo nivel de expresión de la mayoría de las interleucinas en las primeras 24 y 48 hora del ensayo, sin embargo a las 72 horas es evidente el aumento del nivel de expresión de la IL-2, IL-12 que forman parte de la respuesta Th1, la IL-10 como parte de la respuesta Th2 y el aumento la IL-21, la IL-23 y la IL-25 que están dentro del grupo de la respuesta Th17. Las interleucinas que tienen altos valores de expresión son muy significativas con respecto a sus valores a las 24h y 48h. En esta gráfica no se detectó la expresión de IL-6, IL-17 y IL-38 en hígado.



**Gráfica 4.8.-** Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión normalizada de interleucinas en hígado de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, tratadas a 80°C.

La gráfica 4.8, representa la gráfica de expresión de interleucinas en el hígado de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* tratadas previo a su inoculación a 80°C. Los resultados muestran claramente un aumento en el nivel de expresión de las interleucinas de la respuesta Th1, pero con mayor relevancia la IL-12 y INF- $\gamma$  (respuesta Th1) durante las primeras 24 horas post inoculación (barra roja). El resto de las IL presentan bajos niveles de expresión con excepción de la IL-9 a las 24 y 72 horas. En este ensayo no se detectó la expresión de IL-17 y IL-38.

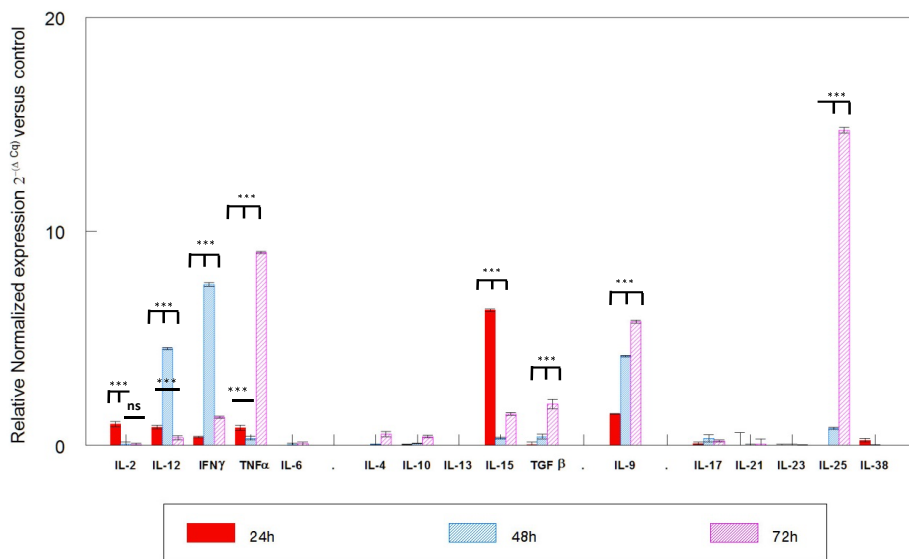


**Gráfica 4.9.- Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi* (37°C).**

Los resultados obtenidos para la expresión de interleucinas en bazo de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* (37°C) se representan en la gráfica de la gráfica 4.9. Las barras en celeste muestran un aumento en los niveles de expresión a las 48 horas para las

## Resultados

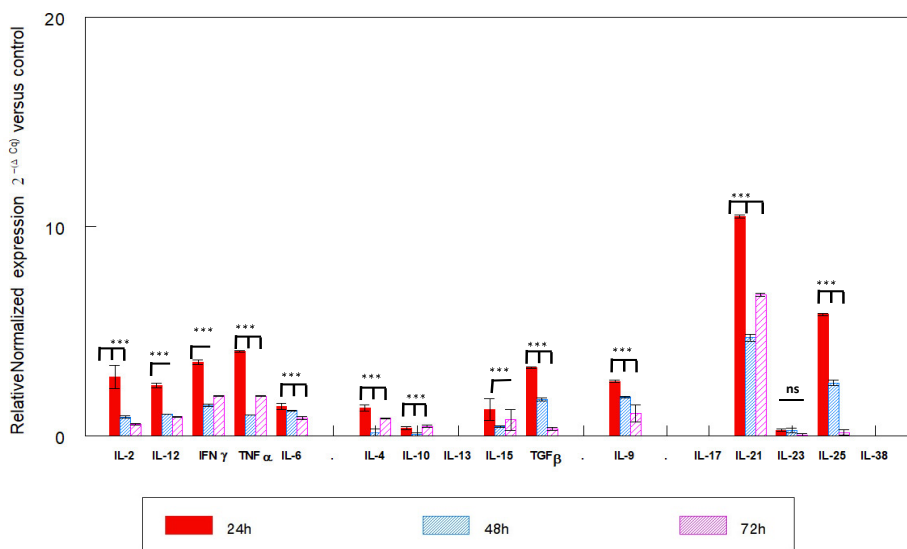
IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (respuesta Th1) y mostrando una posible regulación entre IL-12 y INF- $\gamma$ ) con valores estadísticamente significativos  $p < 0.001$  (\*\*\*). Por otro lado se observa altos valores de expresión para IL-9 en los tres tiempos analizados. En bazo se muestra la expresión de IL-17 pero no de la interleucina de la respuesta Th2 IL-13 quizás como consecuencia de la baja expresión de la IL-25.



**Gráfica 4.10.- Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, tratadas a 80°C.**

La gráfica 4.10, representa los resultados de la expresión de IL en bazo de ratones CD1 inoculados con EV tratadas a 80°C. Los resultados de la gráfica muestran altos valores para IL-12, INF- $\gamma$  a las 48 horas (barra celeste) TNF- $\alpha$  a las 72 horas (barra rosada). También se observa aumento para IL-15 durante las primeras 24 horas del experimento. Por otro lado el comportamiento de la expresión en la IL-9 muestra un incremento a medida que aumentan las horas del ensayo. Por último se

observa un notable aumento de la IL-25 a las 72 horas. Las significaciones estadística  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

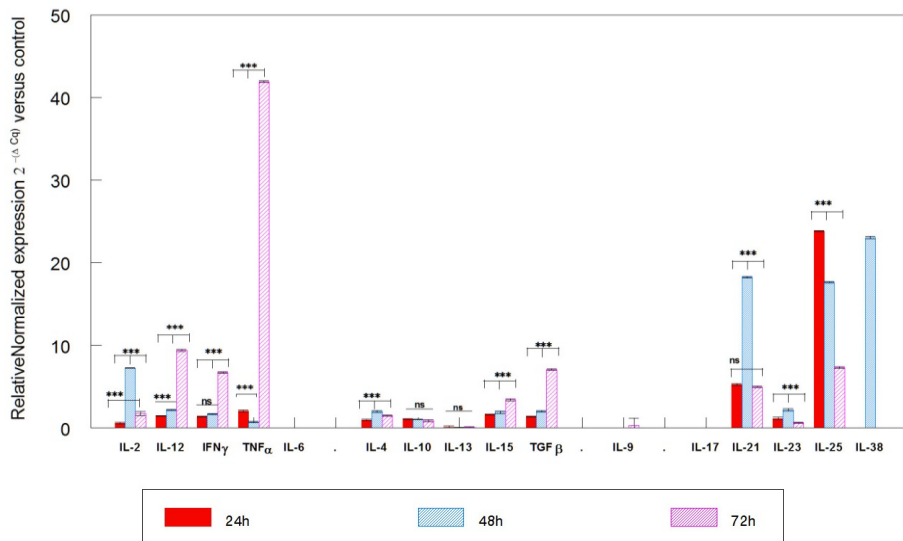


**Gráfica 4.11.- Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión normalizada de interleucinas en hígado de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, formando ICs (EVs- IgGs) a 37°C.**

En el segundo grupo de resultados que se presenta a continuación, se muestran graficas de hígado y bazo de ratones CD1 inoculados con EVs con tratamientos térmicos a 37 y 80°C unidas a IgGs, es decir formando ICs (EVs- IgGs).

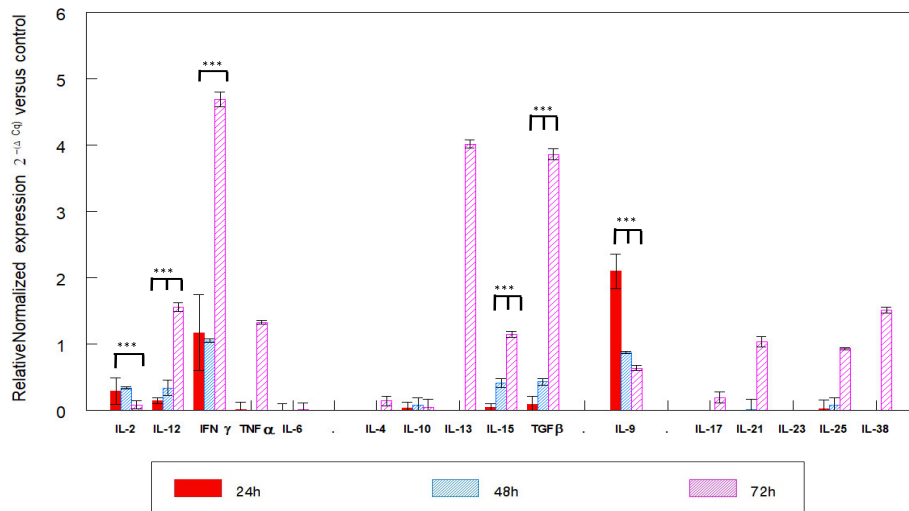
En la gráfica 4.11 (ICs formados por EVs en hígado a 37°C) se aprecian niveles ligeramente elevados a las 24 para la mayoría de la ILs, específicamente en las de las respuestas Th1 (IL-2, IL-12, INF-γ y TNF-α). También se observan niveles ligeramente altos para TGF-β y IL-9. Los niveles de expresión altos para IL-21 (respuesta Th17) y IL-25 se muestran a las 24 horas con una alta significación estadística.

## Resultados



**Gráfica 4.12.- Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en hígado de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigotes de *T. cruzi*, tratadas a 80°C y formando ICs (EVs- IgGs).**

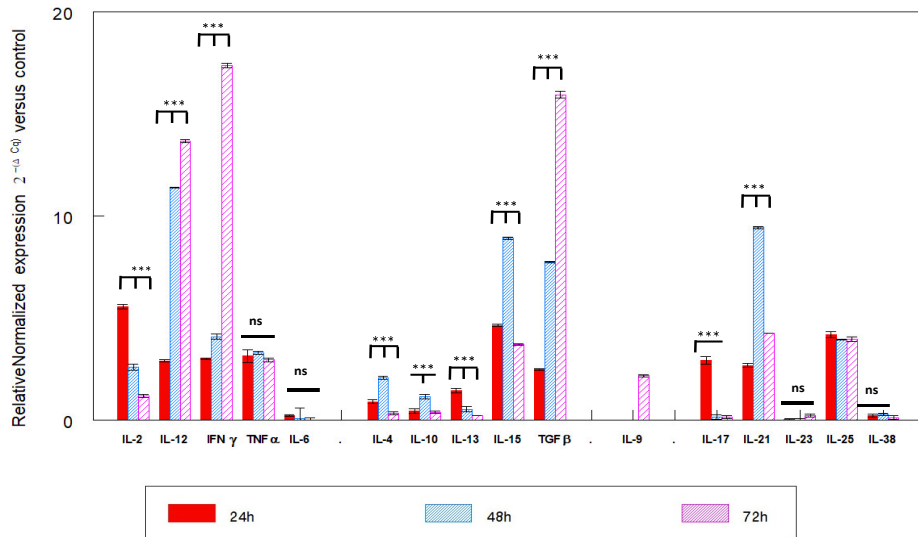
A diferencia de los resultados mostrados en la gráfica anterior, en la gráfica 4.12 (ICs formados con EVs previamente tratados a 80°C en hígado) refleja el efecto del tratamiento térmico, donde los valores de expresión son bajos a las 24- 48h tanto en las ILs del grupo Th1 mientras, que los niveles de TNF- $\alpha$  muestra nivel más alto de expresión a las 72 horas, así como en las ILs del grupo Th2. En esta grafica destacan los valores de expresión para las IL- 21, IL-25 y la IL-38 a las 48h post inoculación.



**Gráfica 4.13.- Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, tratadas a 37°C y formando ICs (EVs- IgGs).**

La inducción de respuesta inmune del IC formados con las EVs sin tratamiento térmico (37°C), en bazo es muy notoria para algunas ILs, destacando a las 24h la elevación de la IL-9, tal como lo muestra la gráfica 4.13, observándose niveles de expresión aumentados a las 72h para INF- $\gamma$ , IL-13 y TGF- $\beta$  con una significación estadística  $p < 0.001$  (\*\*\*). Sin embargo también se puede observar la baja expresión de ILs en las primeras 24 horas del ensayo.

## Resultados



**Gráfica 4.14.-** Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo de ratones CD1 inoculados con EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, tratadas a 80°C y formando ICs (EVs- IgGs).

Los resultados obtenidos en bazo, tras la inoculación de ICs con EVs sometidos a tratamiento térmico previo de 80°C, aparecen representados en la gráfica 4.14, muestran unos valores aumentados de la expresión de ILs tanto de respuesta Th1, Th2 como Th17. Sin embargo los aumentos más destacados son a las 72 horas para las IL-12, INF-  $\gamma$  y TGF-  $\beta$  con una alta significancia estadística  $p < 0.001$  (\*\*\*) .



#### 4.4. Caracterización de EVs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*.

Con el objetivo de describir las características específicas de las EVs de cada estadio de *T. cruzi* se aplicaron diferentes técnicas (DLS, Western blot, SEM TEM y AFM) que permitieron establecer comparaciones, similitudes y diferencias, que una vez analizadas fueron utilizadas para posteriores ensayos.

##### 4.4.1 Dinamic Light Scattering (DLS).

Para la medida y cálculos de los promedios de tamaño las EVs se resuspendió 100  $\mu$ L de EVs purificadas y cuantificadas sus proteínas previamente en 900  $\mu$ L PBS 1X filtrado por 0.22  $\mu$ m.

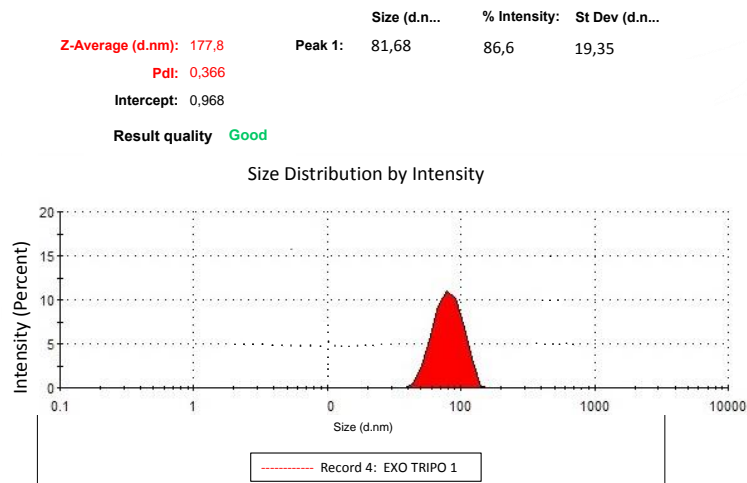
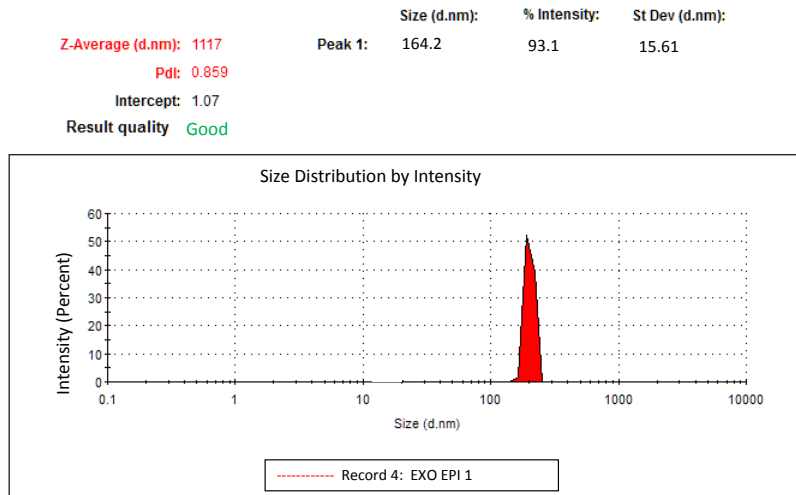


Figura 4.17.- Cuantificación del tamaño de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* Pan4, a través de DLS.

## Resultados



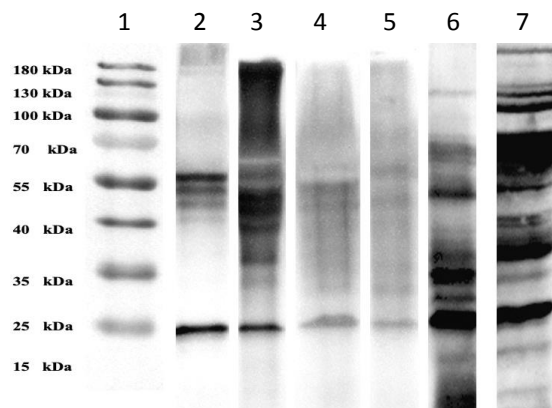
**Figura 4.18.-** Cuantificación del tamaño de EVs de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4, a través de DLS.

Se cuantificaron los tamaños de las EVs para ambas formas del parásito, identificando para los tripomastigotes una poblaciones de EVs, de 81.68 nm ( $96.3 \pm 11.3$ ) (Figura 4.17). Mientras que para las EVs obtenida de los epimastigotes se obtuvo una población media de 164.2 nm ( $172 \pm 10.4$ ) (Figura 4.18). El volumen de EVs utilizado para los ensayos de DLS fue de 20  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra que corresponde aproximadamente a  $8 \times 10^{10}$  nanopartículas/mL. Todas las medidas se realizaron por triplicado y como control del ensayo se utilizó PBS filtrado por 0.22  $\mu\text{m}$ .

### 4.4.2 Identificación de proteínas marcadoras de *T. cruzi* a través de Western blot.

En este apartado se presentan los resultados de la identificación a través de western blot, de dos proteínas cruciales en aspectos clave de la interacción parásito-célula. Estas proteínas participan en procesos de adhesión e invasión celular, con participación en la inmunomodulación del sistema inmune, cómo

es el caso de la trans-sialidasa y la cruzipaína (CP), la principal cisteín proteasa presente en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Se utilizaron EVs tanto de tripomastigotes como de epimastigotes y como control y al objeto de conocer la localización superficial en las EVs se realizaron tratamientos con la enzima proteinasa K. De igual manera se utilizaron lisados de ambas formas del parásito (tripomastigote y epimastigote) a fin de identificar en el patrón de proteínas la presencia de estas proteínas marcadoras. Como control de carga para cuantificación del ensayo se usó la calmodulina.

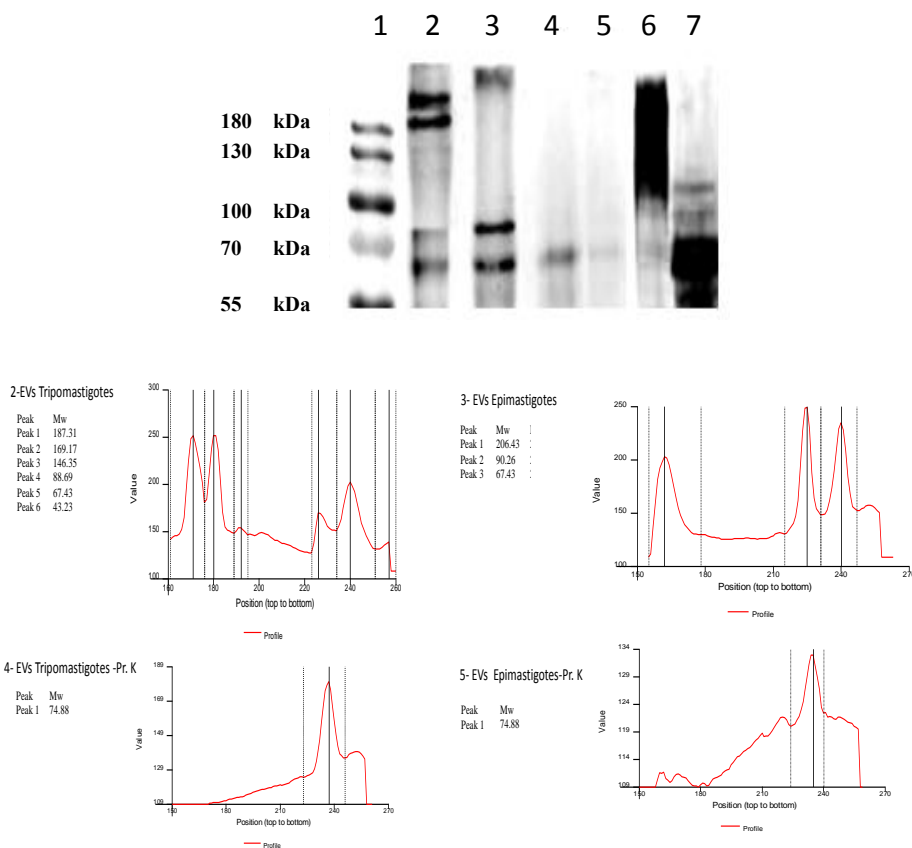


**Figura 4.19.- Identificación de proteínas totales de *T. cruzi* a través de Western Blot. Se utilizaron 30 µg de proteína para cada muestra cargada en los carriles. 1) Marcador de peso molecular, 2) EVs de tripomastigotes, 3) EVs de epimastigotes, 4) EVs de tripomastigotes tratados con proteinasa K, 5) EVs de epimastigotes tratados con proteinasa K, 6) lisado de tripomastigotes y 7) lisado de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4. Como anticuerpo primario se utilizó un inmunosuero (obtenido en ratón) diluido 1:100 en PBS estéril.**

En la figura 4.19 se utilizó inmunosuero de *T. cruzi* para el reconocimiento de proteínas totales. En las EVs tanto de tripomastigotes y epimastigotes se observan múltiples bandas (carriles 2 y 3) correspondientes al patrón de reconocimiento por parte de los anticuerpos del inmunosuero en las EVs. Lo que no ocurre en las EVs tratadas con proteinasa K (carriles 4 y 5), donde la

## Resultados

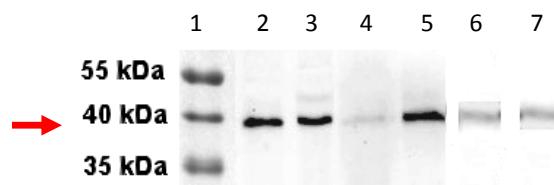
disminución de bandas respecto a las EVs no tratadas con la proteinasa K es notable, indicando la eliminación de dichas proteínas de la superficie de las EVs. En el lisado de ambas formas del parásito se pudo identificar bandas superior a 180 kDa hasta menos de 15 kDa (carril 6 y 7).



**Figura 4.20.- Identificación y cuantificación de la transialidasa a través de Western Blot. Se utilizó 30 µg de proteína para cada muestra depositada en los carriles. 1) Marcador de peso molecular, 2) EVs de tripomastigotes, 3) EVs de epimastigotes, 4) EVs de tripomastigotes tratados con proteinasa K, 5) EVs de epimastigotes tratados con proteinasa K, 6) lisado de tripomastigotes y 7) lisado de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4. La dilución del anticuerpo primario anti trans-sialidasa (mAb 39) obtenido en ratón fue de 1/1000.**

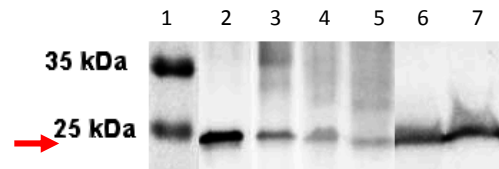
En la figura 4.20 se muestra la identificación de la trans-sialidasa por parte de anticuerpo monoclonal anti-transialidasa (mAb 39). Donde se detectaron

bandas que oscilan desde 187, 169, 146, 88, 67 y 43 kDa en las EVs de tripomastigotes (carril 2). En el carril 3 que corresponde a EVs de epimastigotes observamos 3 bandas de 206, 90 y 67 kDa. En los carriles 4 y 5 las EVs tratadas con proteinasa K, las bandas tanto de tripomastigote como epimastigotes son de 75 kDa. En los lisados de ambas formas se observan la identificación de múltiples bandas algunas de pesos moleculares menores que no fueron cuantificadas quizás a péptidos correspondientes a estas enzimas y aun en el Golgi o retículo endoplasmático (carriles 6 y 7).



**Figura 4.21.- Identificación de la cruzipaína a través de Western Blot.** Se utilizó 30 µg de proteína para cada muestra depositada en los carriles. 1) Marcador de peso molecular, 2) EVs de tripomastigotes, 3) EVs de epimastigotes, 4) EVs de tripomastigotes tratados con proteinasa K, 5) EVs de epimastigotes tratados con proteinasa K, 6) Lisado de tripomastigotes y 7) Lisado de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4. El anticuerpo primario anti-cruzipaína obtenido en conejo fue utilizado en dilución de 1:1000.

En la figura 4.21 se identifica una banda única que corresponde a la proteína cruzipaína (37 kDa). Se encuentra en EVs tanto de tripomastigotes como de epimastigotes (carriles 2 y 3), igual que en sus respectivos lisados (carriles 6 y 7). En las EVs tratadas con proteinasa K se observa una banda ligeramente reconocida, para los tripomastigotes (carril 4), pero en EVs de epimastigotes si se observa más marcada (carril 5).

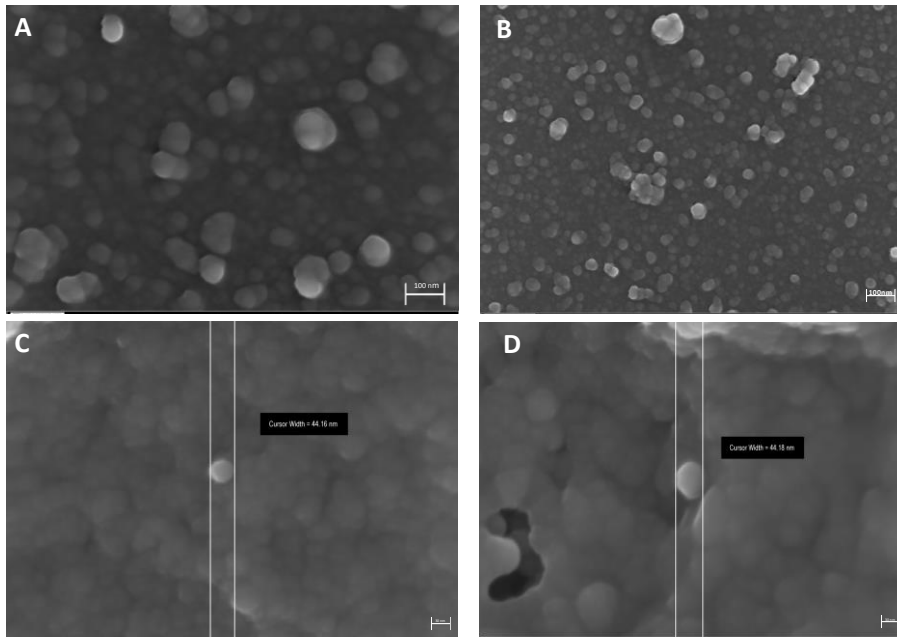


**Figura 4.22- Identificación de la proteína calmodulina (control de carga) a través de Western Blot. Se utilizó 30 µg de proteína para cada muestra depositada en los carriles. 1) Marcador de peso molecular, 2) EVs de tripomastigotes, 3) EVs de epimastigotes, 4) EVs de tripomastigotes tratados con proteinasa K, 5) EVs de epimastigotes tratados con proteinasa K, 6) Lisado de tripomastigotes y 7) Lisado de epimastigotes de *T. cruzi* Pan4. El anticuerpo primario anti-calmodulina obtenido en ratón (Abcam, ab2860) fue utilizado en dilución de 1:500.**

En la figura 4.22 se muestra la identificación de la proteína calmodulina con un peso molecular aproximadamente de 17 kDa. La misma se encuentra presente tanto en EVs de tripomastigotes y epimastigotes como en los lisados del parásito y como es de esperarse en las EVs tratadas con proteinasa K no se observa, ya que la presencia de esta proteína está vinculada a las membrana de las EVs, según observaciones previas de (Díaz Lozano et al. 2017).

#### **4.4.3 Caracterización de EVs de *T. cruzi* Pan 4 a través de microscopía (SEM, TEM y AFM).**

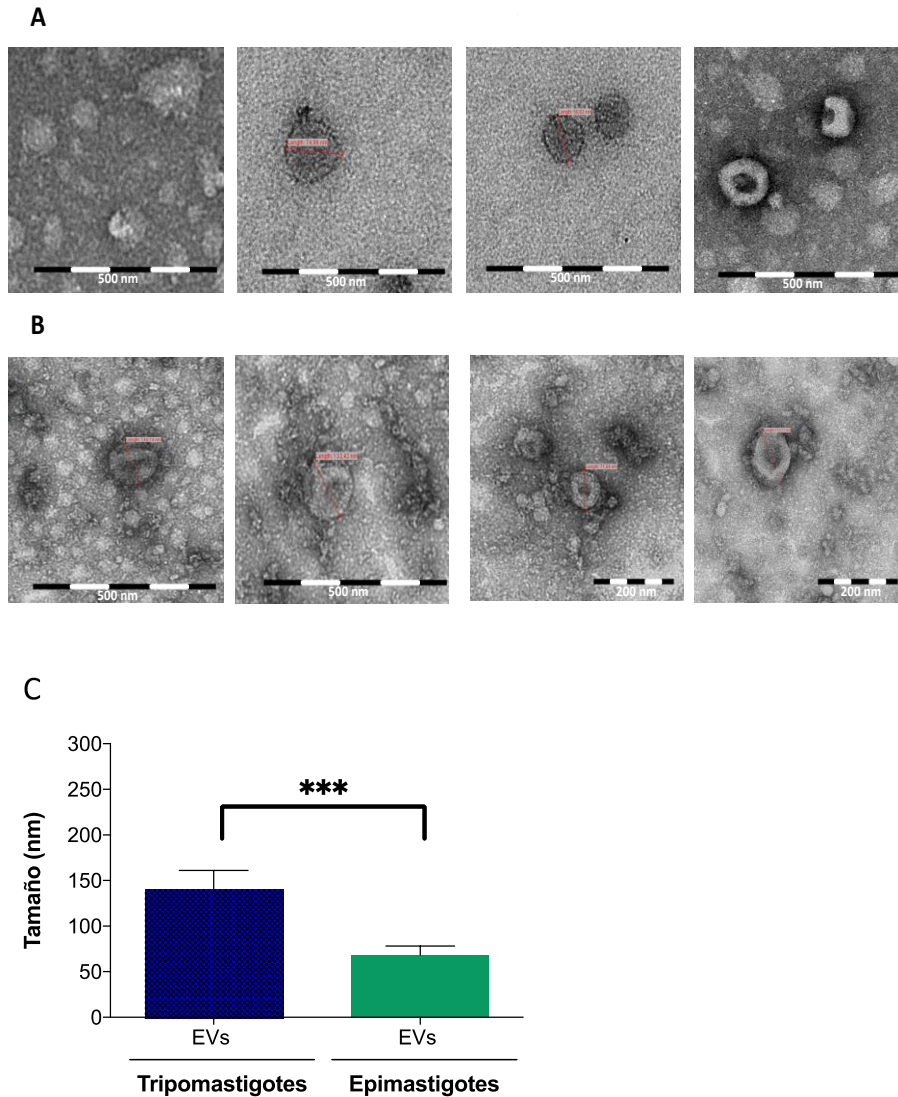
La caracterización a través de SEM, nos permitió poder observar tanto la morfología como los tamaño de las EVs purificadas procedentes del parásito.



**Figura 4.23.- Caracterización de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* a través de SEM. Las imágenes A y B muestran EVs de 80-100 nm (Barra de escala 100 nm), mientras que en las imágenes C y D tienen tamaños aproximados de 40 nm (Barra de escala de 30 nm).**

Los resultados de la figura 4.23 muestran EVs de tripomastigote de *T. cruzi* con morfología redondeada globosa carente de la zona hendida “cup shape” que ha sido descrita y en opinión de algunos autores es producto de las manipulaciones para la microscopía. Los tamaños oscilan entre 40 a  $100 \pm 10$  nm. Estas observaciones se realizaron por triplicado con muestras procedentes de diferentes aislamientos.

## Resultados



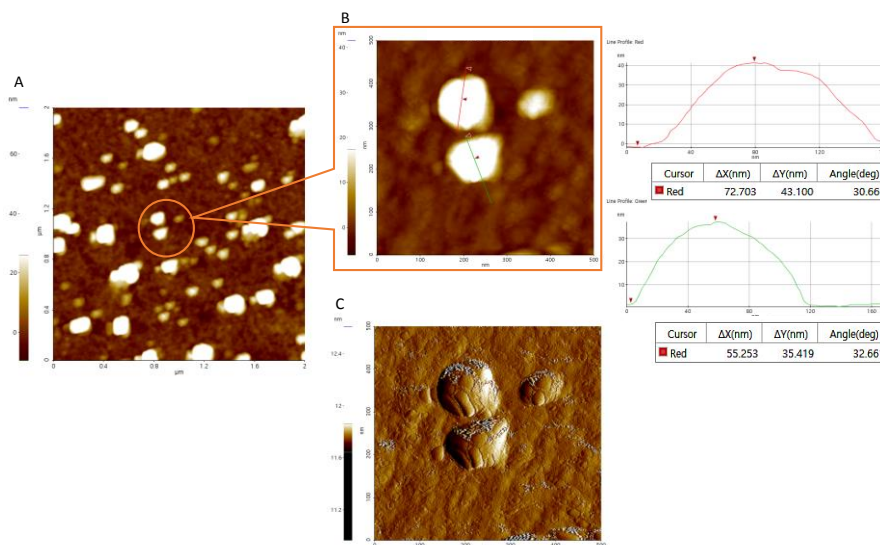
**Figura 4.24.-** Caracterización de EVs de *T. cruzi* Pan4 a través de TEM en tinción negativa. (A) EVs de epimastigotes. (B) EVs de tripomastigotes. (C) Medición del tamaño de las EVs para cada forma del parásito en (nm). (Barras de error: SD de tres réplicas biológicas independientes, valores p, de significación: \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

Para la caracterización de EVs mediante TEM se utilizó la técnica tinción negativa. Los resultados muestran las características específicas de tamaño de EVs de dos estadios del parásito (tripomastigote y epimastigotes). La figura 4.24A muestra que las EVs de los epimastigotes tienen un tamaño medio de



$68.03 \pm 9.98$  nm, mientras que las EVs de los tripomastigotes tienen un tamaño promedio de  $140.70 \pm 20.45$  nm (Figura 4.24B). La gráfica 4.24C, presenta la comparación entre los tamaños de las EVs con sus significancia estadística.

La microscopía de Fuerza Atómica (AFM) es un tipo de microscopia con un alto nivel de amplificación capaz de detectar las interacciones moleculares y de uso aun limitado en biología, que en los últimos años se ha usado en la caracterización de EVs.



**Figura 4.25.-** Imágenes de AFM de la altura de la partícula (Z- height). (A) EVs de tripomastigote de *T. cruzi*. (B) Zoom (Z- height) y perfiles de altura para cada una de la EVs. (C) Imagen de amplitud.

A través de los análisis de las EVs purificadas mediante AFM en modo de no contacto, se obtuvieron imágenes de nanopartículas homogéneas de tamaño aproximado entre 35-43 nm (Figura 4.25). Las imágenes de amplitud y

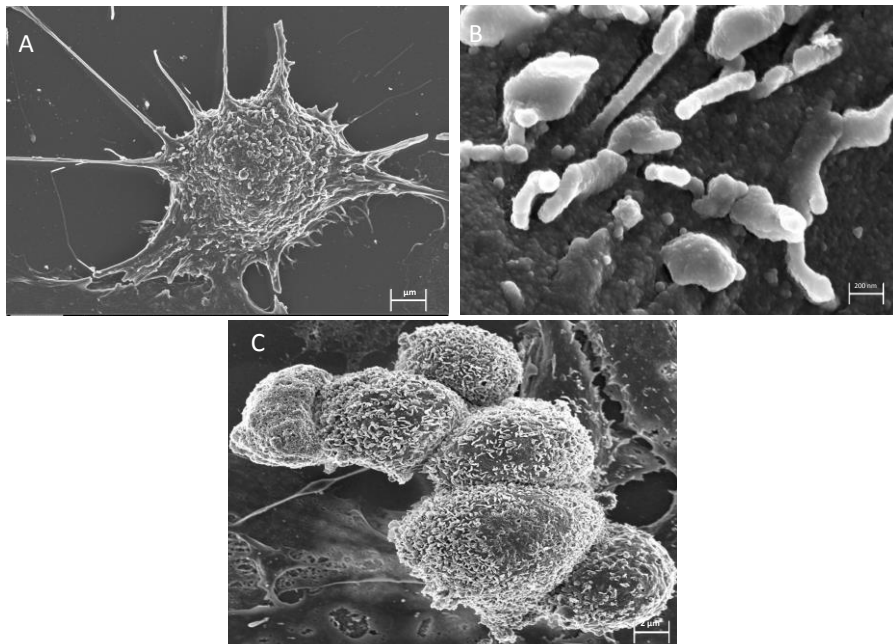
topografía (Figura b y Figura c) muestran detalles de longitud entre 55 a 72 nm.

#### **4.5 Estudios microscópicos de la interacción EVs- células**

Una vez caracterizadas las EVs de *T. cruzi* se llevaron a cabo una serie de estudios de la interacción EVs-célula, bajo Microscopia de barrido (SEM), Microscopia de Transmisión (TEM), microscopia confocal y de Fuerza Atómica (AFM). La captación de las EVs se realizó a diferentes tiempos y diferentes tipos de células.

##### **4.5.1 Estudio de la Interacción de las EVs con células Vero; Inmunolocalización de tripomastigotes de *T. cruzi* observación mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).**

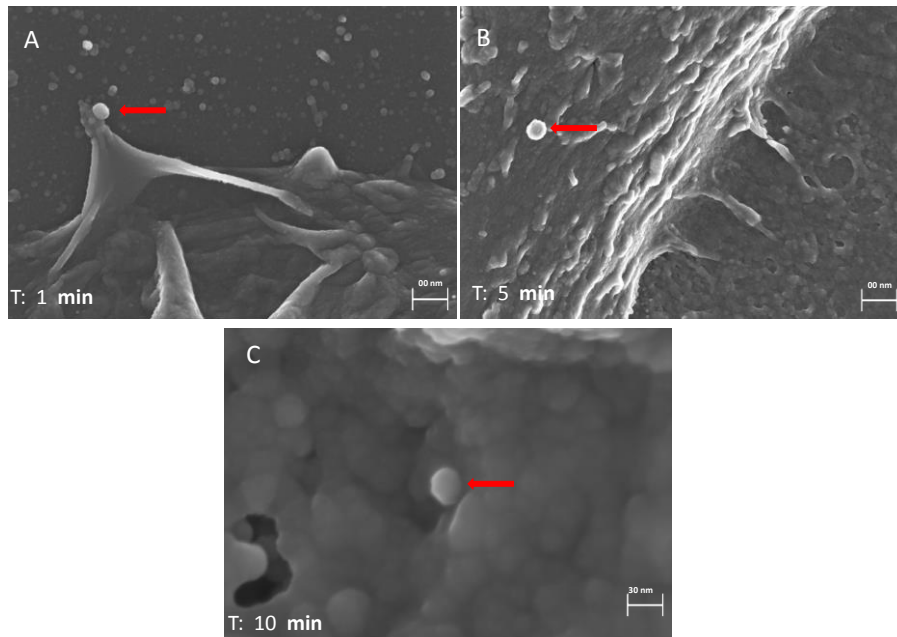
Para estudiar la interacción EVs-célula, se pusieron en contacto células Vero  $1 \times 10^4$  células con 30  $\mu\text{L}$  de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* correspondiente a aproximadamente 0.1  $\mu\text{g}$  proteína / $\mu\text{L}$ .



**Figura 4.26.- Identificación de la interacción célula Vero - EVs de *T. cruzi* a través de SEM (A), barra de escala de 1  $\mu\text{m}$ . (B) Filopodios producto de la interacción EVs-células, barra de escala de 200 nm. (C) Célula control, barra de escala 2  $\mu\text{m}$ .**

En la figura 4.26 se puede apreciar la presencia de múltiples proyecciones correspondientes a filopodios distribuidos de forma radial sobre la superficie de la célula tras la interacción de las EVs con las células. Los filopodios descritos como proyecciones citoplasmáticas formadas por filamentos de actina y con un movimiento altamente dinámico aumenta la superficie activa de la célula, facilitando posiblemente la interacción con EVs. La base de dichas proyecciones se ha considerado como el punto crítico, para el inicio de la endocitosis.

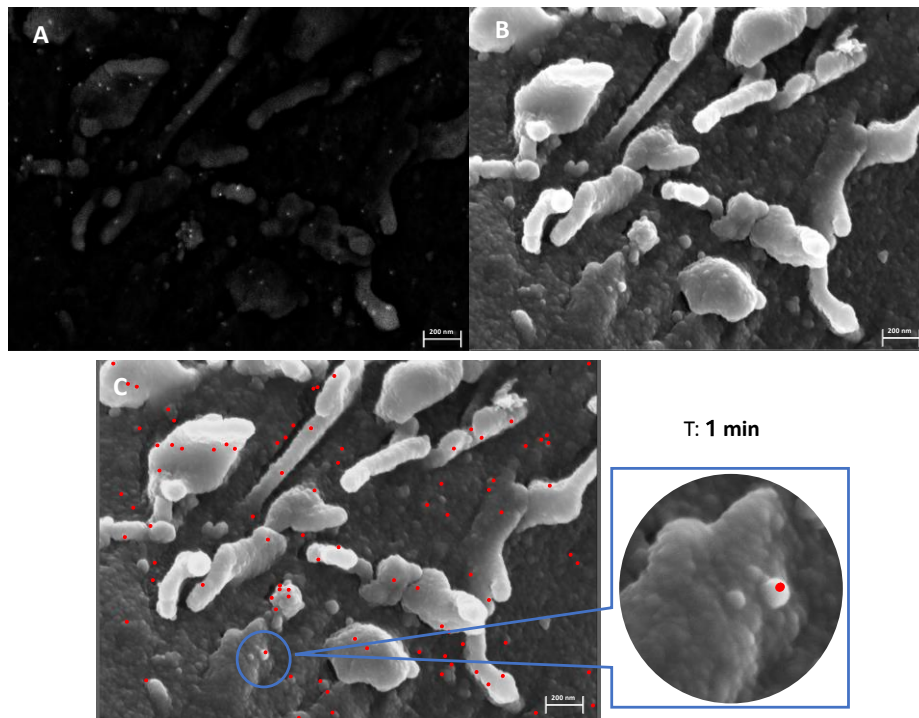
## Resultados



**Figura 4.27.- Estudio de la interacción de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* con células Vero a diferentes tiempos, observados mediante Microscopía de Barrido (SEM). (A) 1 minuto. (B) 5 minutos y (C) 10 minutos.**

Tal cual lo observamos en las figuras A con vista panorámica y B con mayor aumento donde se puede apreciar detalles de las prolongaciones que a su vez tiene a modo de micro proyecciones lo que facilitaría la superficie total de contacto con el ligando.

Para evaluar la forma progresiva de la captación de EVs por parte de la célula, se realizó la interacción EVs-célula a diferentes tiempos (1, 5 y 10 min). La figura 4.27 muestra imágenes donde se visualiza las EVs uniéndose a la protuberancias de la membrana celular y en algunos casos lo que parece ser inicio de proyecciones citoplasmáticas. (Figura 4.27A). Se observan EVs sobre la superficie de la célula a los 5 y 10 minutos de la interacción. En el minuto 10 se puede apreciar una EVs en lo que parece ser el inicio de una caveola (Figura 4.27B y 4.27C).

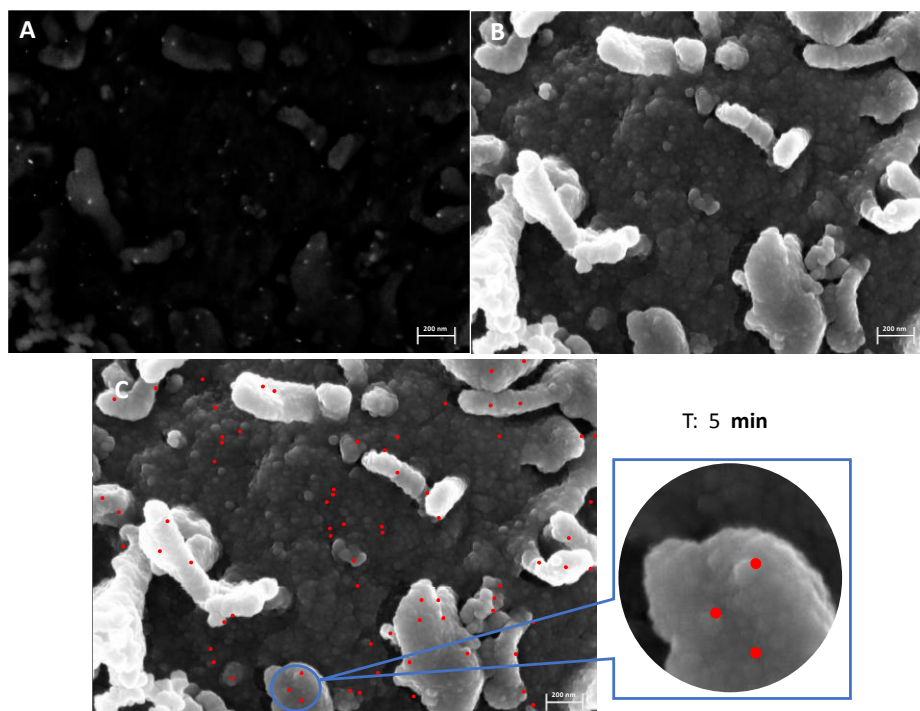


**Figura 4.28.-** Estudio de la interacción de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* con células Vero a diferentes tiempos, observados mediante Microscopía de Barrido (SEM). Observaciones mediante inmunomarcaje de las EVs de tripomastigote de *T. cruzi* interaccionando con las células Vero durante 1 minuto. Se observa la superficie de las células y las EVs marcadas con anticuerpos específicos ligados a oro. La detección de las partículas de oro se realizó mediante detectores STEM (BF/DF). Se utilizó un inmunosuero anti *T. cruzi* (elaborado en rata) diluido 1:50 y como anticuerpo secundario Anti-Rat IgG-Gold marcado con oro coloidal (10nm) (Sigma-Aldrich, G7035) en dilución 1:50. (A) Visualización del marcaje de EVs (partículas de oro en blanco sobre fondo negro). (B) Marcaje de EVs (imagen en blanco). (C) Visualización del marcaje de EVs con partículas de oro (partículas de oro en rojo). La barra de escala es de 200 nm.

Para confirmar que las EVs observadas por SEM, son específicamente de *T. cruzi* y no liberadas por las propias células Vero, se realizaron ensayos de inmunomarcaje usando un anticuerpo secundario anti-rata marcado con nanopartículas de oro coloidal de 10 nm, en tiempos de interacción (1, 5 y 10 minutos). El objetivo del experimento fue visualizar mediante el reconocimiento del anticuerpo primario anti-*T. cruzi*, la interacción EVs-célula. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados en la figura 4.28, muestran el inmunomarcaje de las EVs con las partículas de oro

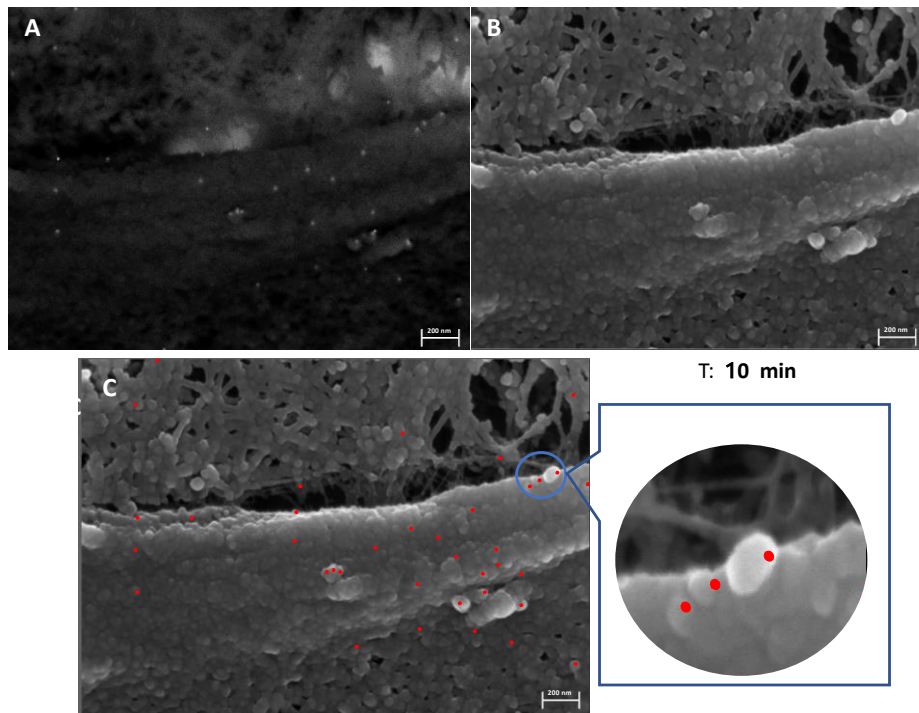
## Resultados

de 10 nm en el primer minuto de interacción. El número promedio de nano partículas que reconocen las EVs interaccionando con las células por  $\mu\text{m}^2$  fue de  $88.6 \pm 2.5$ .



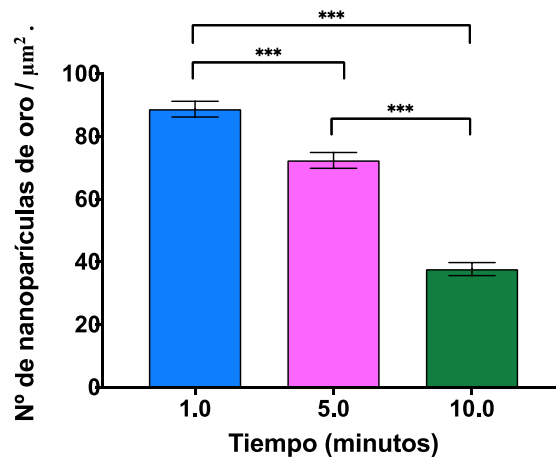
**Figura 4.29.- Estudio de la interacción de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* con células Vero a diferentes tiempos observados mediante Microscopía de Barrido (SEM). Observaciones mediante inmunomarcaje de las EVs de tripomastigote de *T. cruzi* interaccionando con las células Vero durante 5 minutos. La detección del oro se realizó mediante el uso de un detector STEM (BF/DF acoplado al equipo). Se utilizó un inmunosuero de anti *T. cruzi* (obtenido en rata) diluido 1:50 y como anticuerpo secundario marcado con oro coloidal Anti-Rat IgG-Gold (10nm) (Sigma-Aldrich, G7035) en dilución 1:50. Las imágenes A, B y C muestran la visualización del marcaje de la interacción EVs-células con diferentes contrastes (Barra de escala es de 200 nm), se muestra un zoom de como las partículas de oro aparecen ligadas a microesferas que correspondería a las EVs del parásito en los extremos de las proyecciones celulares.**

En la figura 4.29, se muestra la interacción EVs-célula, como se describe en la leyenda de la imagen, y donde a los 5 minutos el número de nano partículas de oro que se observan sobre la superficie de las células por  $\mu\text{m}^2$  fue de  $72.3 \pm 2.5$ .



**Figura 4.30.-** Estudio de la interacción de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* con células Vero a diferentes tiempos observados mediante Microscopía de Barrido (SEM). Observaciones mediante inmunomarcaje de las EVs de tripomastigote de *T. cruzi* interaccionando con las células Vero durante 10 minutos. La detección de oro se realizó mediante el uso de un detector STEM (BF/DF) acoplado al equipo. Se utilizó inmunosuero de anti *T. cruzi* (obtenido en rata) diluido 1:50 y un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal Anti-Rat IgG-Gold (10nm) (Sigma-Aldrich, G7035) en dilución 1:50. Las imágenes A, B y C muestran la visualización del marcaje de la interacción EVs- células en los diferentes contraste (Barra de escala de 200 nm).

En el ultimo tiempo de interacción (10 minutos) se observan un promedio de  $37.6 \pm 2.1$  partículas de oro cuantificadas en la superficie de la célula por  $\mu\text{m}^2$  (Figura 4.30).



Gráfica 4.15.- Cuantificación de las nanopartículas de oro coloidal identificando la interacción EVs-célula en tiempos de 1, 5 y 10 min.

Se utilizó un Anti-Rat IgG-Gold (10nm) (Sigma-Aldrich, G7035) diluido 1/50, reconociendo los anticuerpos del inmunosuero de *T. cruzi* (dilución 1/50). En el eje de las Y se representa el número de partículas por  $\mu\text{m}^2$  de la superficie celular. (Barra de error: DS de tres réplicas biológicas independientes, al menos 5 células por campo de visión; valores p. Análisis de varianza: \*,  $P < 0.1$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

Los resultados de la gráfica 4.15 muestra la cuantificación de nanopartículas de oro por  $\mu\text{m}^2$ , (ventanas de  $30 \mu\text{m}$ ). Se observa claramente que a medida que aumentaban los minutos de interacción de las células Vero con las EVs, el número de nano partícula de oro que reconocían el anticuerpo primario *T. cruzi*, sobre la superficie celular disminuían, indicando que se estaba produciendo el proceso de internalización de las EVs por parte de las células. El ensayo fue realizado por triplicado.



---

#### **4.5.2: Interacción EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* con células fagocítica a través de TEM.**

A la vista de los datos ya expuestos en esta tesis, en este apartado se presentan los resultados obtenidos del estudio de la observación de la interacción EVs-célula mediante Microscopia Electrónica de Transmisión, que aportan información más precisa del mecanismo de la interacción del secretoma particulado con la célula. Para ello debimos en primer lugar caracterizar el tamaño de las EVs secretadas por el parásito mediante tinción negativa bajo microscopía electrónica, así como corroborar la presencia de proteínas específicas del parásito que corresponden a marcadores de *T. cruzi* como las transialidasas y cruzipaína, mediante ensayos de inmunotransferencia mostrado en el apartado anterior.

Con el objetivo de demostrar dichos marcadores en la superficie de las EVs, se realizaron ensayos de inmunomarcaje con oro coloidal del anticuerpo anti-*trans* sialidasa (mAb 39) en EVs, sin tratar y tratadas con la enzima proteinasa K, a fin de denotar su presencia sobre la superficie de las EVs de epimastigotes y tripomastigotes.

## Resultados

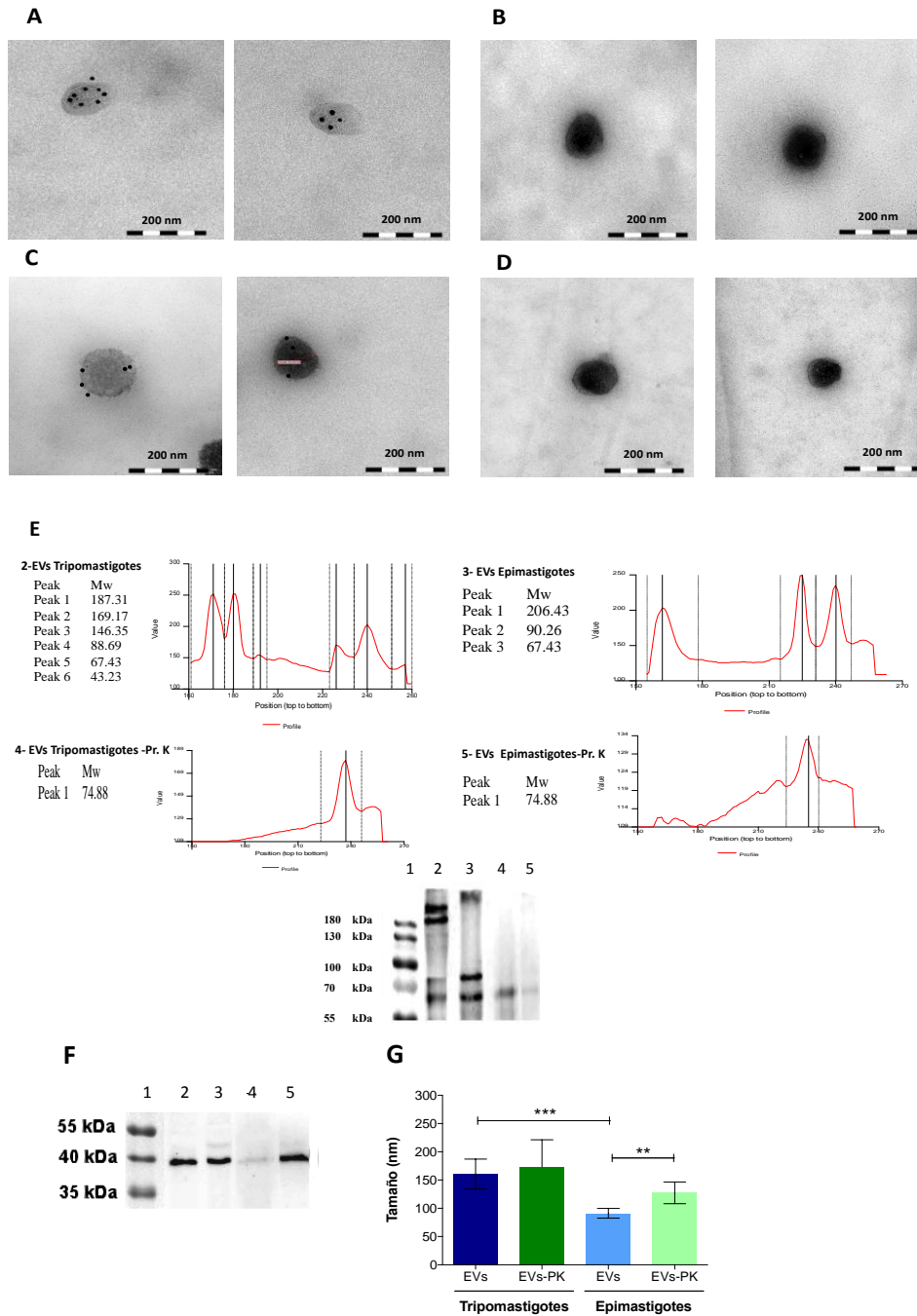


Figura 4.31.- Visualización del inmunomarcaje mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de EVs de *T. cruzi* con el anticuerpo primario Anti- *trans*-sialidasa (mAb 39) diluido 1:50 y un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal Anti-Mouse

**IgG-Gold (10 nm) (Sigma- Aldrich, 67777) diluido 1:50. (A) EVs de epimastigotes. (B) EVs de epimastigotes tratadas con proteinasa K. (C) EVs de tripomastigotes. (D) EVs de tripomastigotes tratadas con proteinasa K. (E) Imagen comparativa de la identificación de la trans-sialidasa por Western blot en EVs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*, (carril 2 y 3) sin tratamiento de proteinasa K y carril (4 y 5) con tratamiento y densitogramas. (F) Imagen comparativa de la identificación de la cruzipaina a través de Western Blot en EVs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*, (carril 2 y 3) sin tratamiento de proteinasa K y carril (4 y 5) con tratamiento del enzima. (G) Medidas del tamaño en nm de las EVs nativas y de las tratadas con proteinasa K. Datos de tres experimentos representativos. (Barra de error: DS de tres réplicas biológicas independientes; valores p. Análisis de varianza: ns, no significativo, \*, P< 0.1; \*\*, P< 0.01;\*\*\*, P<0,001).**

Los resultados muestran la presencia de las transialidasas en las EVs no tratadas tanto de epimastigotes (Figura 4.31A) como en las procedentes de tripomastigotes (Figura 4.31C), ya que conservaron su integridad y forma, mostrando tamaños y forma características ( $91.21 \pm 8.59$  y  $160.59 \pm 26.50$  nm respectivamente), si bien en los resultados anteriores, la tinción negativa mostró una mayor densidad de color, quizás sea consecuencia del efecto directo sobre los lípidos de la membrada del tetraóxido de osmio utilizado para la tinción.

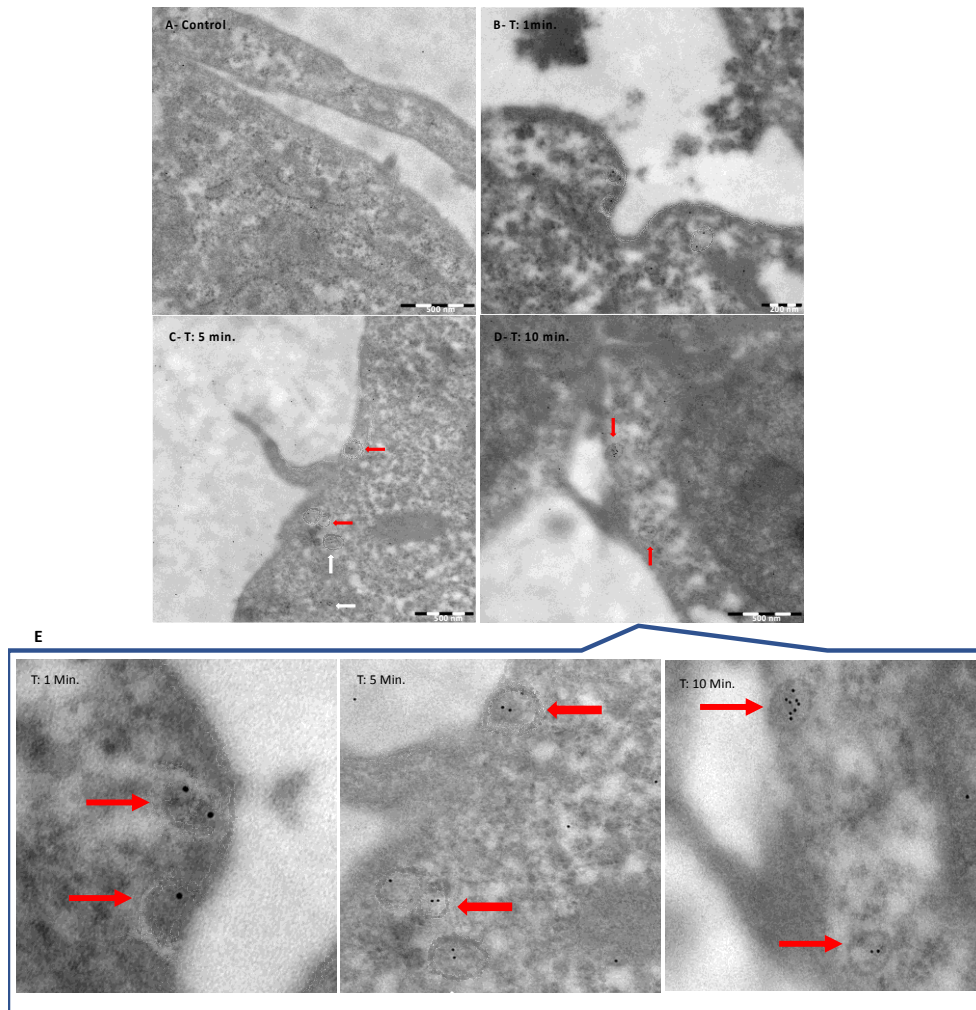
También se observó que las EVs no tratadas con la enzima proteinasa K mostraban el inmunomarcaje del anticuerpo anti-*trans*-sialidasa; mientras que en las tratadas, tanto de los epimastigotes (Figura 4.31B) como de los tripomastigotes (Figura 4.31D) mostraron una mayor turgencia con tamaños de ( $127.30 \pm 19.30$  y  $173.38 \pm 48.07$  nm respectivamente) y carentes del inmunomarcaje. El aumento de la turgencia podría deberse a que la enzima al afectar las proteínas de la membrana afecte indirectamente la rigidez y elasticidad de la bicapa lipídica que las envuelve.

Las proteínas de superficie (transialidasa) han sido digeridas y por lo tanto no hay reconocimiento del anticuerpo anti-*trans*-sialidasa. Es importante resaltar que las EVs tratados con proteinasa K conservaron una banda de un peso

## Resultados

---

molecular aproximado de 75 kDa (Figura 4.31E), posiblemente correspondiente a un dominio de las transialidasa o bien insertado en la membrana o de la zona interna del EVs no accesible a la acción proteolítica de la enzima. La figura 4.31F, muestra el reconocimiento de la cruzipaína a través de Western blot en EVs tanto de epimastigote como de tripomastigote, sin embargo en las EVs tratadas con proteinasa K se observa disminución del reconocimiento, quizás por las razones antes expuestas. La gráfica representada en la figura 4.31G muestra las diferencia de tamaño en las EVs nativas y tratadas con proteinasa K con sus significaciones estadísticas.



**Figura 4.32.-** Inmunomarcaje de la interacción EVs-célula durante 1, 5 y 10 minutos a través de TEM. Se utilizó EVs de tripomastigote de *T. cruzi* marcadas con inmunosuero anti-*T. cruzi* (elaborado en rata) diluido 1:25 y un anticuerpo secundario Anti -Rat- Gold con partículas de 18nm (Abcam ab105302) diluido 1:50. (A) El control del experimento son células sin la presencia de las EVs del parásito. (E) Zoom de las imágenes B, C y D.

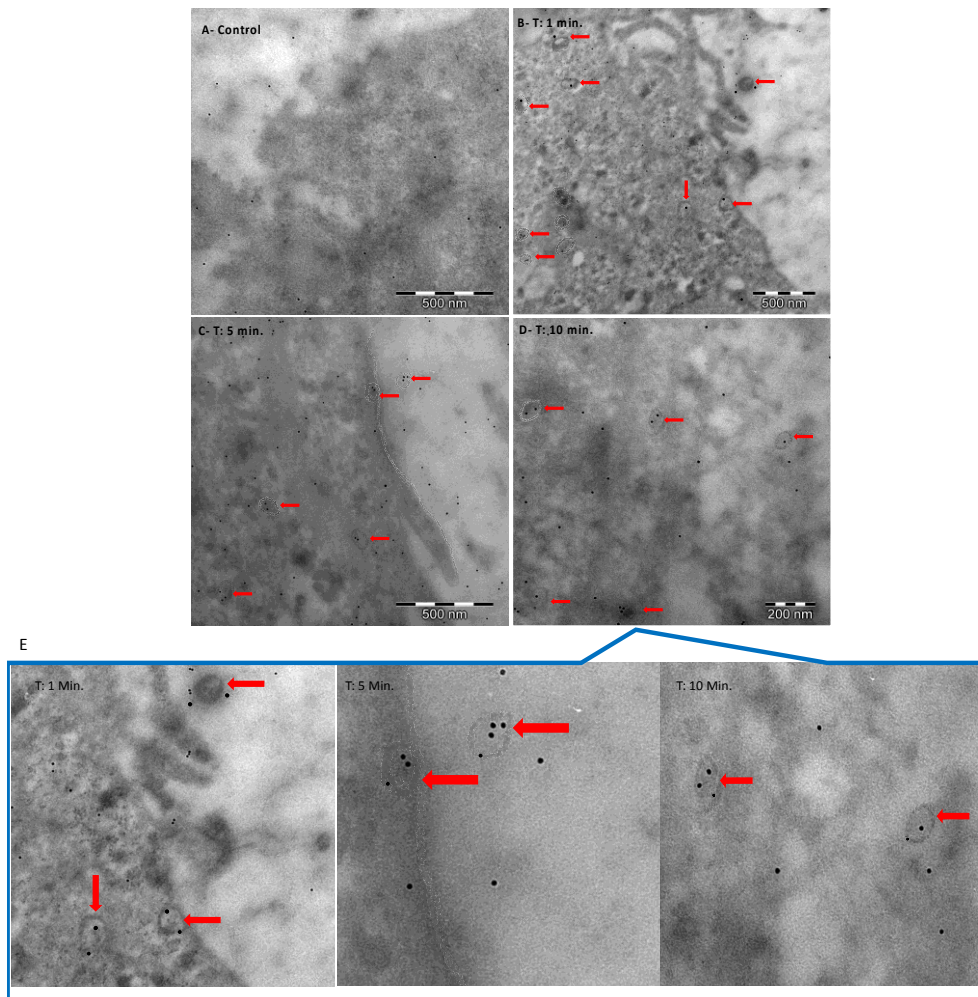
Al objeto de visualizar el mecanismo por el que se produce la internalización de las EVs-células RAW 264.7 se fijaron y se procedió a llevar a cabo un estudio mediante TEM. Las células RAW 264.7 son una línea celular de monocitos / macrófagos derivada de ratones BALB / c. Estas células se

## Resultados

---

describen como un modelo apropiado de macrófagos en el que mantienen su capacidad fagocítica, pinocitosis y fagocitosis. Las células Raw se interaccionaron con 30  $\mu\text{L}$  de EVs (0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de tripomastigotes de *T. cruzi*, durante 1, 5, y 10 minutos como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Las EVs fueron localizadas mediante inmunquímica por inmunomarcaje simple y con un doble anticuerpo.

Los resultados que se muestran en la figura 4.32 donde se utilizó inmunosuero anti-*T. cruzi* como anticuerpo primario, y un anticuerpo secundario anti ratón o rata dependiendo del experimento, marcados con partículas de oro de 10 nm. Se localizaron las EVs de los tripomastigotes en los límites de la membrana celular desde el primer minuto. A partir del minuto 5 se observan las EVs en la base de los filopodios o en caveolas que son considerados los principales puntos por donde se produce la internalización de las EVs. En el minuto 10 se observan las EVs ya en el interior de la célula.



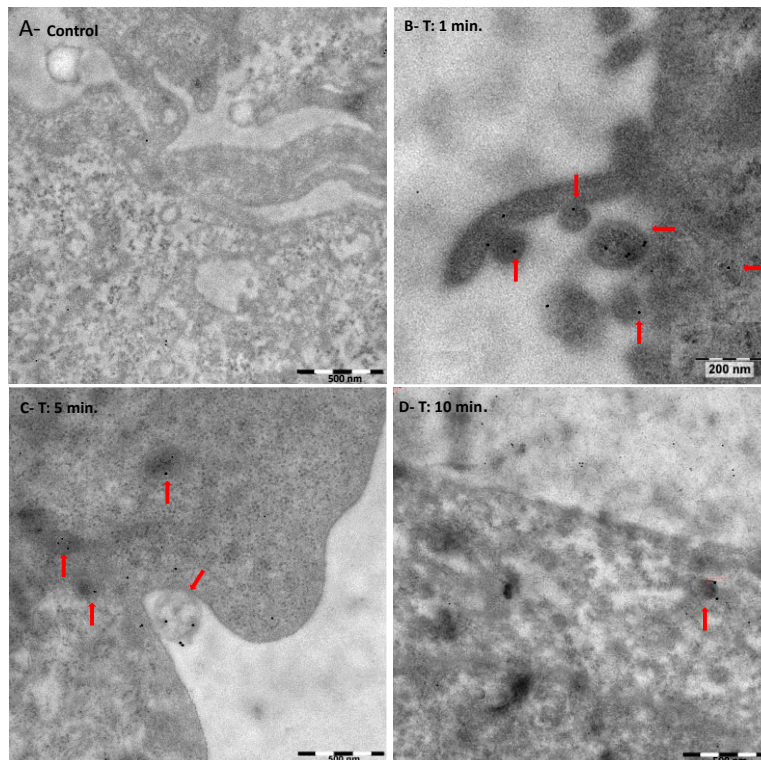
**Figura 4.33.-** Inmunomarcaje doble de la interacción EVs-célula durante 1, 5 y 10 minutos a través de microscopía TEM. Se utilizaron EVs de *T. cruzi*, marcadas con un inmunosuero anti-*T. cruzi* total (elaborado en rata ) dilución 1:50 y anti-*trans*-sialidasa (mAb- 39) (elaborado en ratón) diluido 1:50 o. Los anticuerpos secundarios fueron Anti-Rat- Gold de 18nm (Sigma-Aldrich, 67777) y Anti-Mouse IgG-Gold de 10 nm (Sigma-Aldrich, 67777) diluido 1:50. (A) El control del experimento son célula sin interaccionar con EVs. (E) Zoom de las imágenes B, C y D.

En estos ensayos también se visualizó la interacción EVs-célula con un doble marcaje para varios anticuerpos. En la figura 4.33 se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-*trans*-sialidasa (mAb 39) y un inmunosuero anti *T. cruzi*

## Resultados

---

total, reconocidos por partículas de oro coloidal de 10 y 18 nm respectivamente, al objeto de ver colocalización de ambos anticuerpos sobre la EVs al interactuar con los macrófagos. En el primer minuto se observaron las EVs interaccionando tanto con los filopodios de la células como en el interior del citoplasma celular (Figura 4.33B). A los 5 y 10 minutos se observan las EVs ya en el interior del macrófago con el doble marcaje (Figura 4.33C y 4.33D).



**Figura 4.34.- Inmunomarcaje doble de la interacción EVs-célula, durante 1, 5 y 10 minutos mediante TEM. Se utilizó un anticuerpo anti- *T. cruzi*, (elaborado en rata) diluido 1:50 y un anti-clatrina (elaborado en ratón) (Invitrogen, MA1-065) diluido 1:50 y como anticuerpos secundarios se utilizó anti-Rat- Gold de 18nm (Abcam, ab105302) diluido 1:50 y anti-Mouse IgG-Gold de 10 nm (Sigma- Aldrich, 67777) diluido 1:50. El control del experimento son célula sin EVs.**

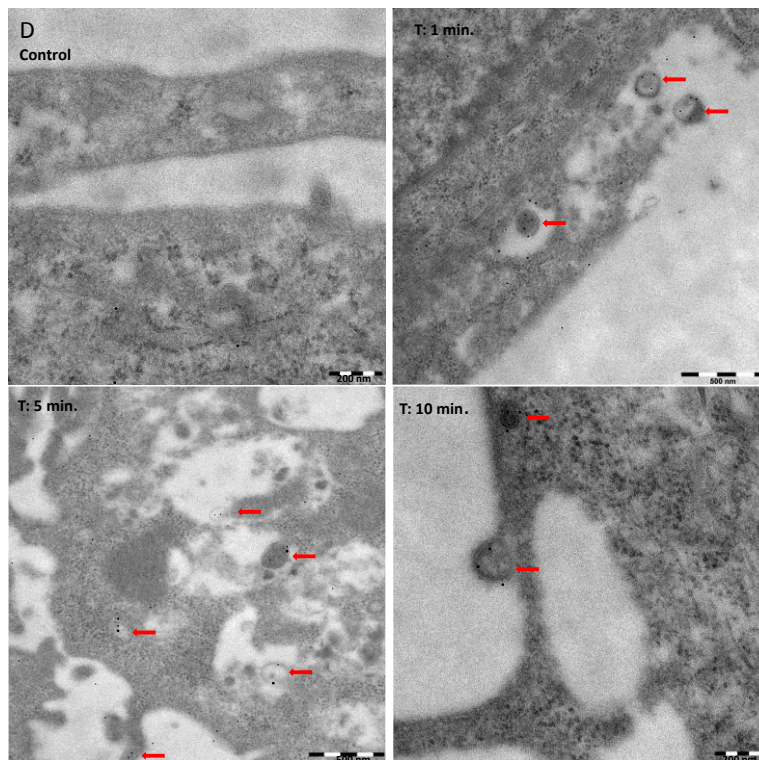


En la figura 4.34 la interacción EVs-célula inmunomarcadas con un doble anticuerpo, se visualizó con anti-clatrina así como con un inmunosuero anti-*T. cruzi* total. La colocalización se observó mediante partículas de oro de 10 y 18 nm respectivamente de los anticuerpos secundarios. Se pudo identificar EVs fusionadas con filopodios de la célula en el minuto 1 (Figura 4.34B). En el minuto 5 se observa un claro mecanismo de captación de la EVs por el macrófago por interacción con una invaginación de la membrana celular. Igualmente ya se visualizan EVs en el interior de la célula (Figura 4.34C). En el minuto 10 se observan las EVs ya en el interior de la célula receptora (Figura 4.34D). No se pudo observar acúmulo de partículas de oro de 10 nm correspondiente a los lugares de presencia de clatrina en las proximidades de los sitios de contacto y entrada de las EVs.

En la figura 4.35, de igual manera que en la figura anterior, se muestra el resultado de un doble inmunomarcaje con anti-caveolina y anti-*T. cruzi*. La inmunolocalización se hizo con partículas de oro de 10 y 18 nm ligadas al anticuerpo secundario.

En el primer minuto de interacción se observa las EVs internalizándose a través de los filopodios y formando vacuolas (caveolas) en el interior de la célula.

## Resultados



**Figura 4.35.-Inmunomarcaje doble de la interacción EVs-célula, durante 1, 5 y 10 minutos a través de TEM. Se utilizó EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, marcadas con un inmunosuero anti-*T. cruzi* (elaborado en rata) diluido 1:50 y anti-caveolina (obtenido en ratón) (Invitrogen MA3-600) diluido 1:50 y como anticuerpos secundarios Anti -Rat-Gold de 18nm (Abcam, ab105302) diluido 1:50 y anti-Mouse IgG-Gold de 10 nm (Sigma-Aldrich, 67777) diluido 1:50. El control del experimento son células sin EVs.**

En los minutos 5 y 10 se visualizan vacuolas con las EVs en su interior. Estos resultados señalan una posible participación directa de los filopodios en la captación de las EVs. En algunas de las imágenes se pueden observar partículas de oro de menor tamaño (10 nm) en las proximidades de los lugares de la interacción EVs-membrana celular. Observándose las EVs en el interior de caveolas, mientras que en otras parecen ser envueltas por proyecciones celulares que las capturan.

El experimento se realizó por duplicado con sus respectivos controles negativos (células sin EVs).

#### **4.5.3: Inmunolocalización y estudio de la interacción EVs-célula a través de microscopía láser confocal.**

En los experimentos de interacción EVs- célula se utilizaron exosomas procedentes de tripomastigotes de *T. cruzi*. La captación celular y el tráfico intracelular se visualizó mediante microscopía láser confocal. La vía de captación de los exosomas probablemente sea específica del tipo celular y muy posiblemente del origen de la EVs que interacciona con la célula .

En nuestros ensayos con microscopía confocal se utilizaron células Vero donde se estudió a nivel celular la entrada de las EVs mediante anticuerpos que reconocen proteínas asociadas a los microtubulos del citoesqueleto (actina y tubulina), proteínas ancladas en la membrana celular (clatrina y caveolina) y mediante Lyso-tracker un colorante acidotrópico que tiñe los compartimentos ácidos celulares, incluidos los lisosomas y fagolisosomas, lo que nos permitió detectar la actividad lisosomal asociada a vacuolas fagocíticas o autofagia. Mientras que las EVs fueron marcadas con colorantes lipofílicos de manera que se visualizaran en los diferentes planos de la microscopía confocal.

## Resultados

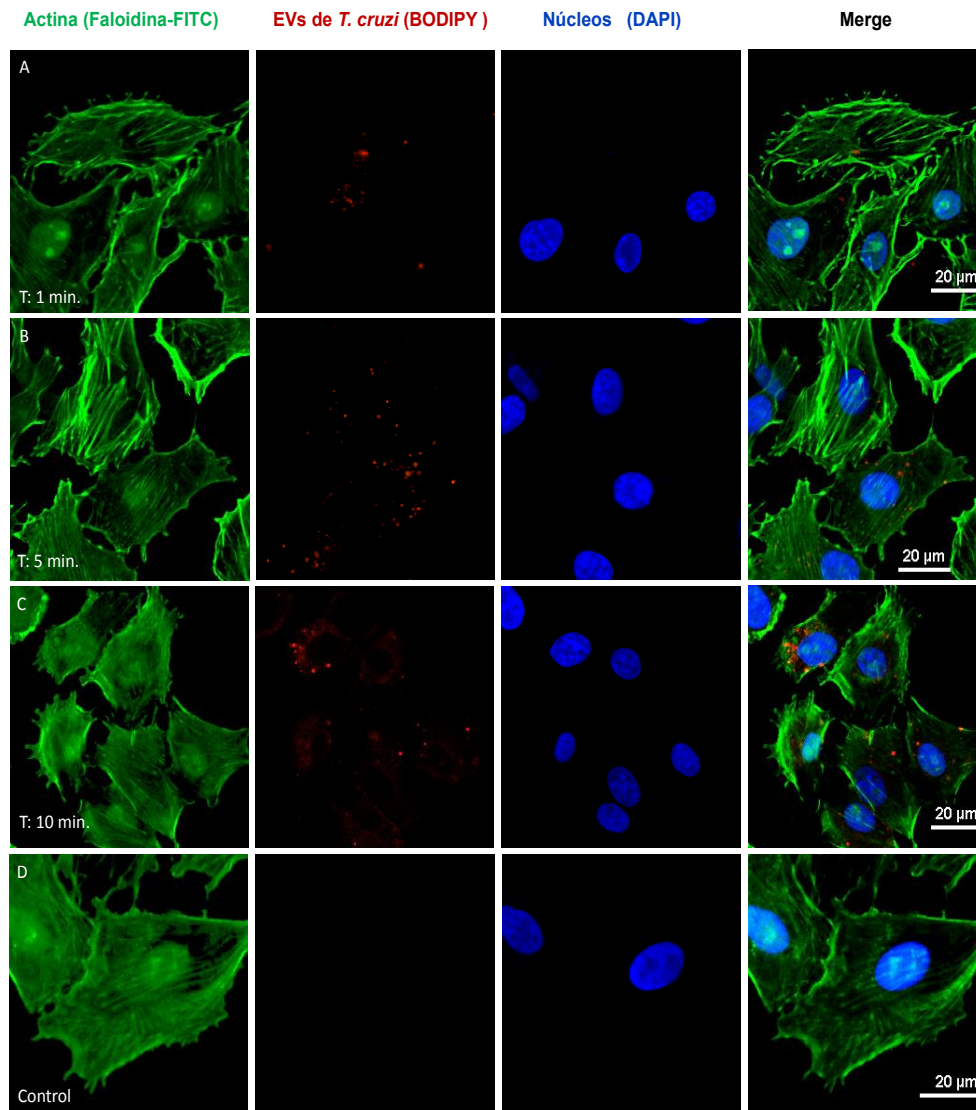
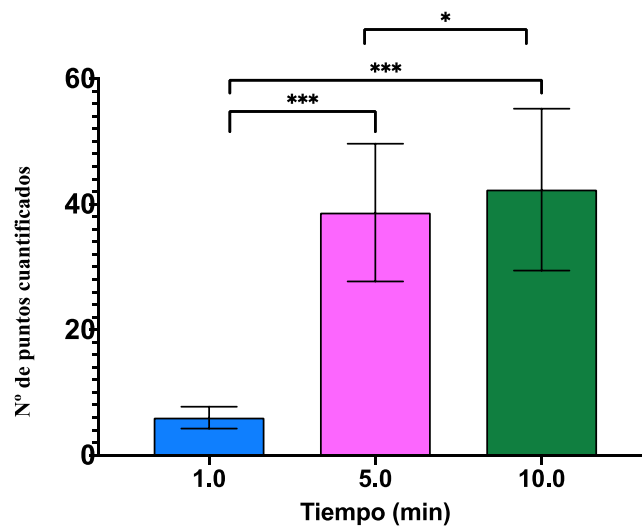


Figura 4.36.- Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero durante 1, 5 y 10 minuto a través de microscopia láser confocal. El citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina FITC (verde), las EVs fueron marcadas con Bodipy (rojo) y el ADN de las células con DAPI (azul). En el solapamiento de los tres canales se observó (Actina+ BODIPY + DAPI). Como control del ensayo se utilizó células Vero sin EVs. La barra de la escala es de 20 µm.

Los resultados de la Figura 4.36, muestran no solo la despolimerización de los filamentos de actina, ya descrito por nuestro grupo ((Retana Moreira, Rodríguez Serrano, and Osuna 2019), sino la interacción de las EVs de las formas infectivas del parásito con la célula, pudiéndose visualizar al menos los agregados de las EVs, gracias a que las EVs fueron marcadas con colorantes lipofílicos.

A través de este ensayo se pudo apreciar la captación de las EVs por parte de las células a medida que pasan los minutos, observándose, en primer lugar, la interacción con las membranas y la posterior acumulación de colorante rojo en el interior de la célula en las proximidades del núcleo, en el minuto 10.

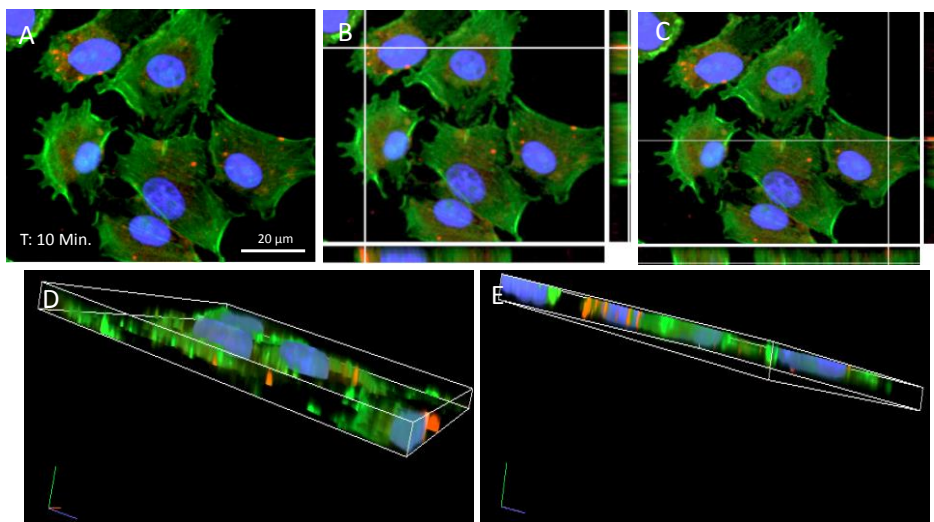


**Gráfica 4.16.-** Cuantificación de la captación de EVs en el interior de células Vero, en diferentes tiempo de interacción. El citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina FITC (verde), las EVs fueron marcadas con Bodipy (rojo) y el ADN de las células con DAPI (azul). Las vesículas se detectaron como manchas fluorescentes de Bodipy, limitada la visualización por la difracción de luz. Datos representativos de tres experimentos representativos. (Barra de error: DS de tres réplicas biológicas independientes, al menos 3 células por campo de visión; valores p. Análisis de varianza: ns, no significativo, \*,  $P < 0.1$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

## Resultados

---

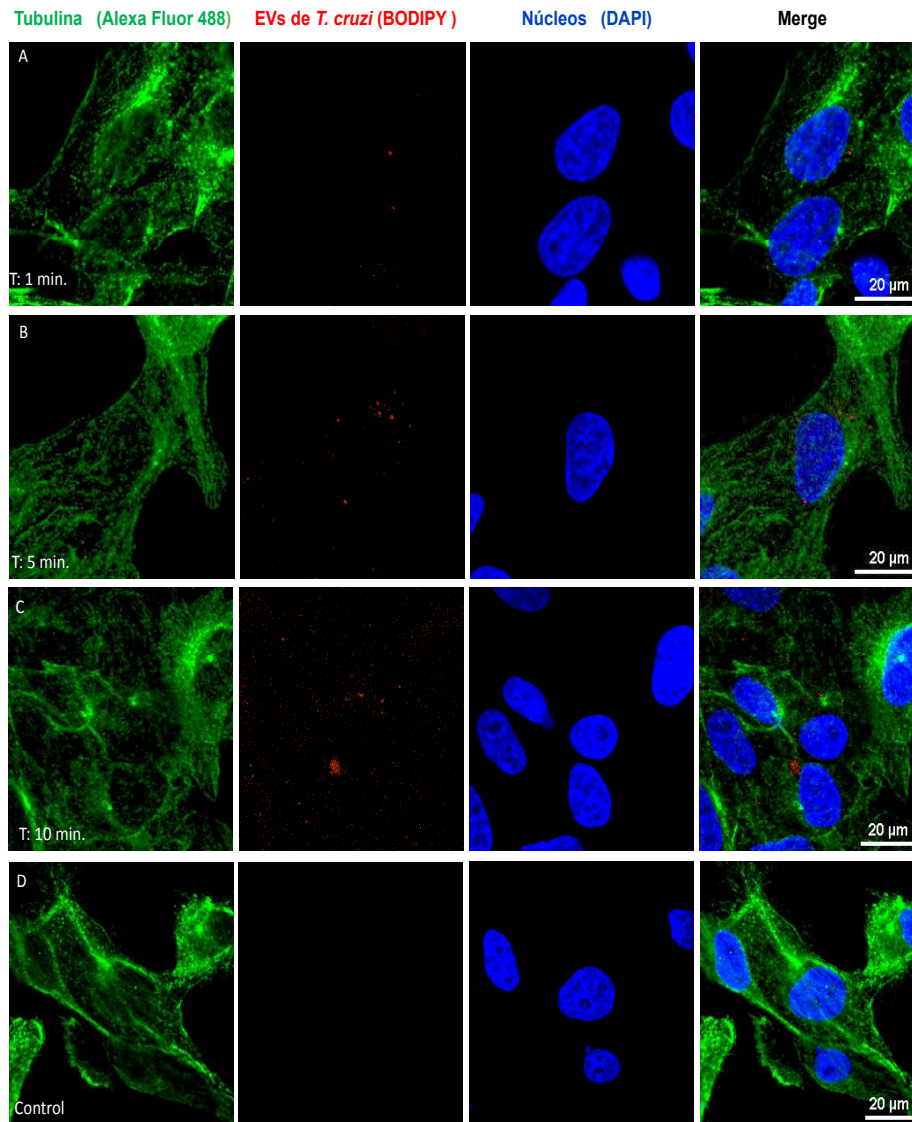
La Gráfica 4.16, muestra la cuantificación de EVs captadas por las células receptoras en los diferentes tiempos de interacción. Resultados que contrastan con los presentados en la Figura 4.37.



**Figura 4.37.- Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero a través de microscopía láser confocal. El citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina FITC. Las EVs fueron marcadas con BODIPY (rojo) y el ADN de las células con DAPI (azul). (A) corresponden 10 minutos, con sus planos proyecciones ortogonales (2D) (B y C). (D y E), sus planos Z (3D). La barra de la escala es de 20 µm.**

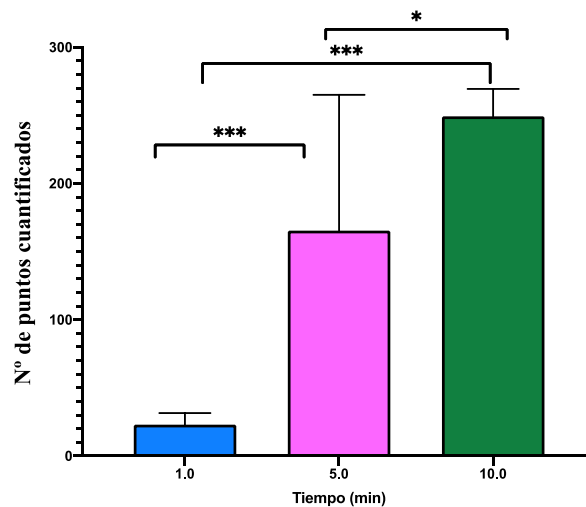
En la figura 4.37, se muestra la captación de EVs por la célula a los 10 minutos con sus proyecciones ortogonales (2D) y planos Z (3D), con la finalidad de visualizar las EVs ya sea en los bordes de la membrana plasmática, interior o área perinuclear de la célula y tener una visión más clara de las posibles interacciones con el citoesqueleto de actina.

En la figura 4.38, se observa la distribución de la  $\beta$ -tubulina en el citoplasma celular y la presencia de las EVs del parásito marcadas.



**Figura 4.38.-** Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero durante 1, 5 y 10 minutos a través de microscopía láser confocal. La red de túbulos de Tubulina fue visualizada con un anticuerpo frente a la  $\beta$ -tubulina y reconocido por un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (verde), las EVs fueron marcadas con BODIPY (rojo) y el ADN de las células con DAPI (azul). En el solapamiento de los tres canales o merge se observó (Tubulina + BODIPY + DAPI). Como control del ensayo se utilizó células Vero sin EVs. La barra de la escala es de 20  $\mu$ m.

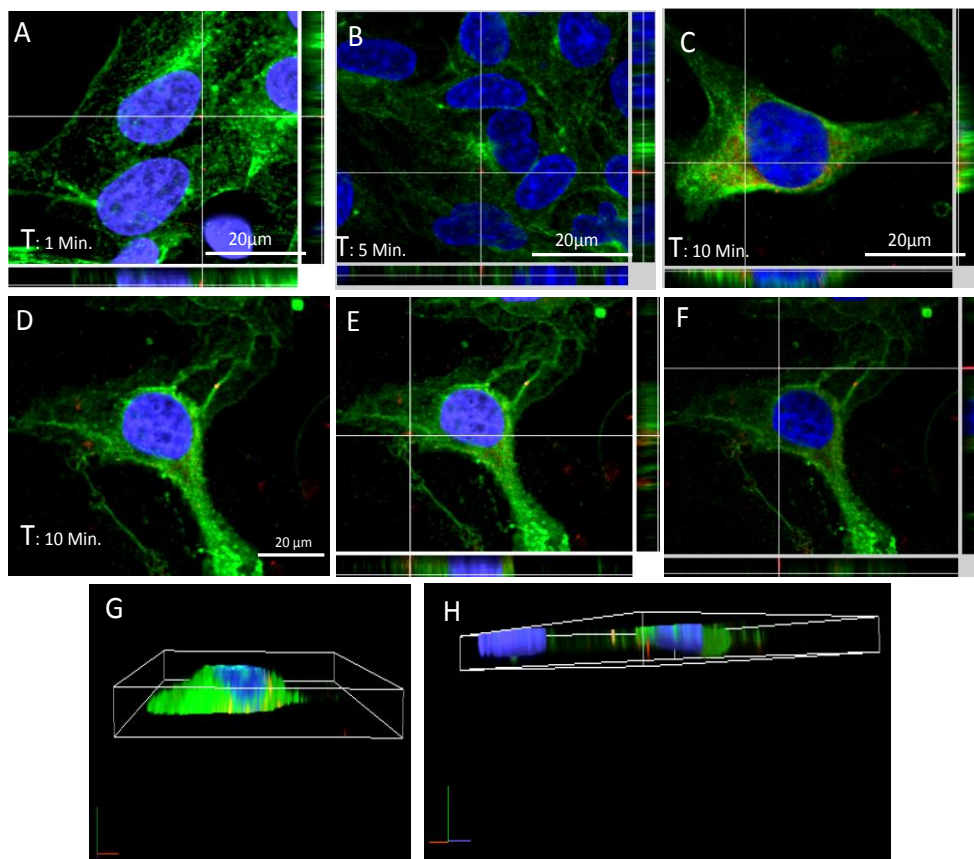
Se puede apreciar que en los sitios donde están presentes las vesículas marcadas en rojo, aparecen filamentos verdes más o menos desorganizados y agrupados, que corresponden a la red de filamentos de la  $\beta$ -tubulina, sobre todo, a los 10 min de la interacción (Figura 4.38C). Se puede observar de igual manera como las partículas “rojas” de menor tamaño (EVs), que se perciben en las imágenes y que no pueden observarse con más nitidez como consecuencia de que se encuentran en el límite de resolución de un microscopio óptico, aparecen siempre asociadas a la red de  $\beta$ -tubulina, posiblemente porque han migrado asociados a la red de tubulina a través del citoplasma.



**Gráfica 4.17.- Cuantificación de la captación de EVs en el interior de células Vero, en diferentes tiempo de interacción. Los microtubulos fueron visualizados con  $\beta$ -tubulina. Las vesículas se detectaron como manchas fluorescentes de BODIPY, limitadas por difracción de luz. Datos representativos de tres experimentos. (Barra de error: DS de tres réplicas biológicas independientes, al menos 3 células por campo de visión; valores p. Análisis de varianza: \*,  $P < 0.1$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).**



La gráfica 4.17, muestra la cuantificación de EVs captadas por las células en los diferentes tiempos de interacción.



**Figura 4.39.-** Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero a través de microscopia láser confocal. El citoesqueleto se visualizó con un anticuerpo frente a  $\beta$ -tubulina. Las EVs fueron marcadas con BODIPY (rojo) y el ADN de las células con DAPI (azul). (A-C) corresponden a 1, 5 y 10 minutos, con sus proyecciones ortogonales (2D). (D) Células a los 10 min de interacción con EVs con sus proyecciones ortogonales (2D) y planos Z (3D) (G y H). La barra de la escala es de 20  $\mu$ m.

## Resultados

---

La Figura 4.39, muestra a través de los planos Z (3D) la posible ubicación de las EVs internalizadas. Se ha realizado la visualización de las mismas en diferentes planos Z (5 planos apilados). Estas imágenes muestran cómo las nanopartículas aparecen ligadas e interaccionando con la red de la tubulina.

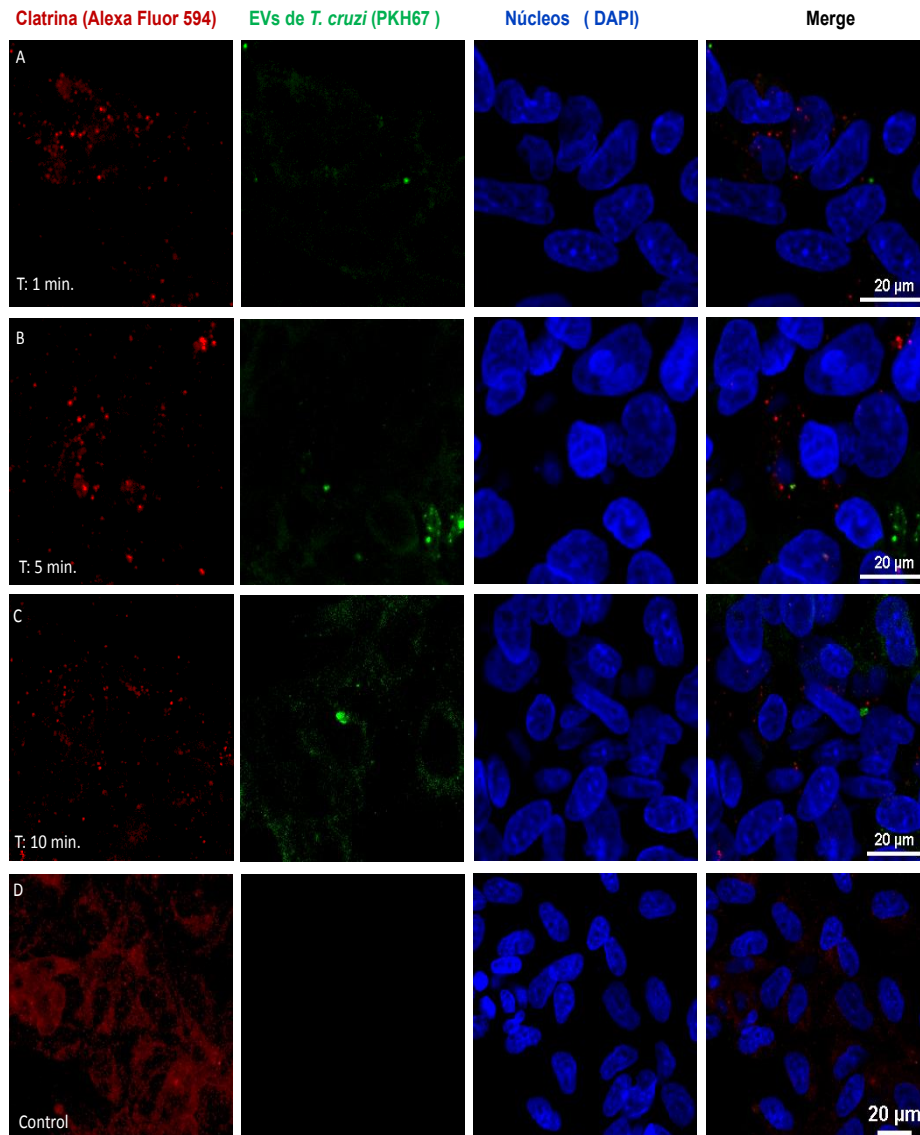
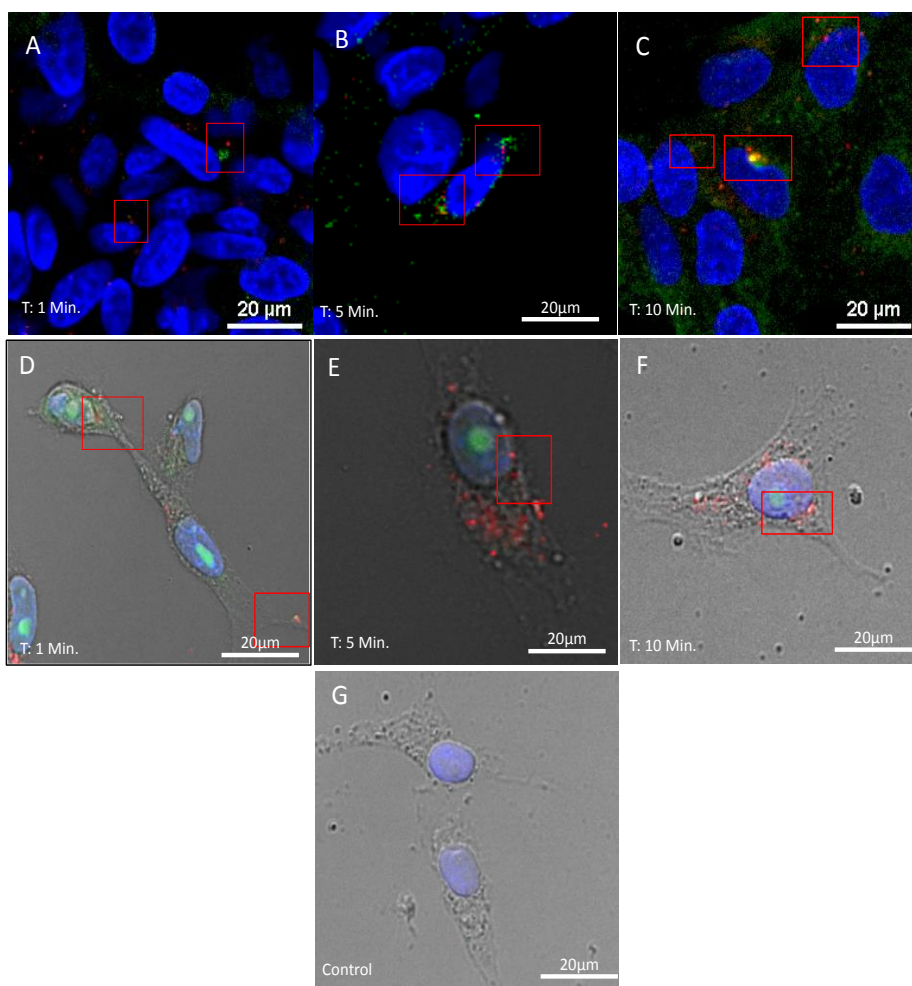


Figura 4.40.- Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero durante 1, 5 y 10 minutos a través de microscopia láser confocal. El anticuerpo primario anti-clatrina fue reconocida por un anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo), las EVs fueron marcadas con PKH67 (verde) y el ADN de las células con DAPI (azul). En el solapamiento de los tres canales o merge se observó (clatrina+ PKH67+ DAPI). Como control del ensayo se utilizó células Vero sin EVs. La barra de la escala es de 20 µm.

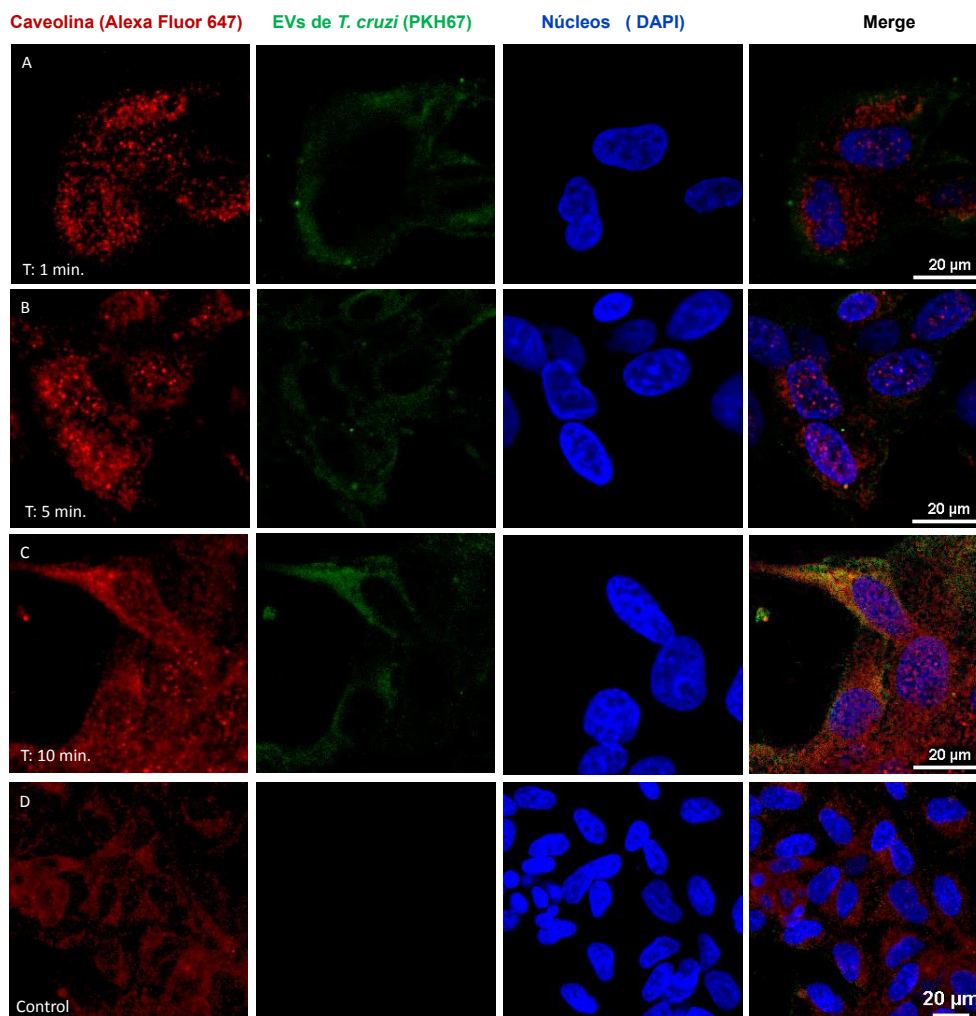
## Resultados

En la figura 4.40 se observa la presencia de clatrina en las membranas celulares e implicada en la formación de vesículas, participando en los procesos de endocitosis para el transporte de las partículas endocitadas hasta el endosoma donde se van a degradar. Distribuida de forma uniforme en el citoplasma de la célula y probablemente mediando en la endocitosis de las EVs que fueron internalizada por las células.



**Figura 4.41.-** Imágenes de confocal, con el anticuerpo anti-clatrina, visualizado con Alexa Fluor 594. Las EVs están marcada con PKH67 (verde). Se señala la captación e inmunolocalización de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero durante 1, 5 y 10 minutos(A-C) a través de confocal. (D-F) Confocal-DIC o campo claro. (G) Célula control. La barra de escala es de 20 μm.

En la Figura 4.41, se muestran imágenes comparativas de los puntos de captación de EVs por células Vero mediante confocal y campo claro (DIC) con el anticuerpo anti-clatrina.

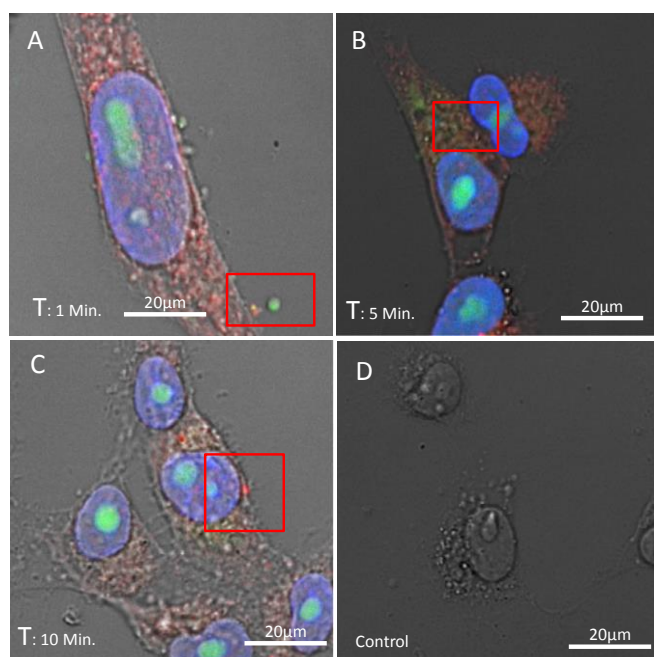


**Figura 4.42.-** Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero durante 1, 5 y 10 minutos a través de microscopía láser confocal. El anticuerpo primario anti caveolina-1 fue reconocida por el anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 (rojo), las EVs fueron marcadas con PKH67 (verde) y el ADN de las células con DAPI (azul). En el solapamiento de los tres canales se observó (caveolina+ PKH67+ DAPI). Como control del ensayo se utilizó células Vero sin EVs. La barra de la escala es de 20 µm.

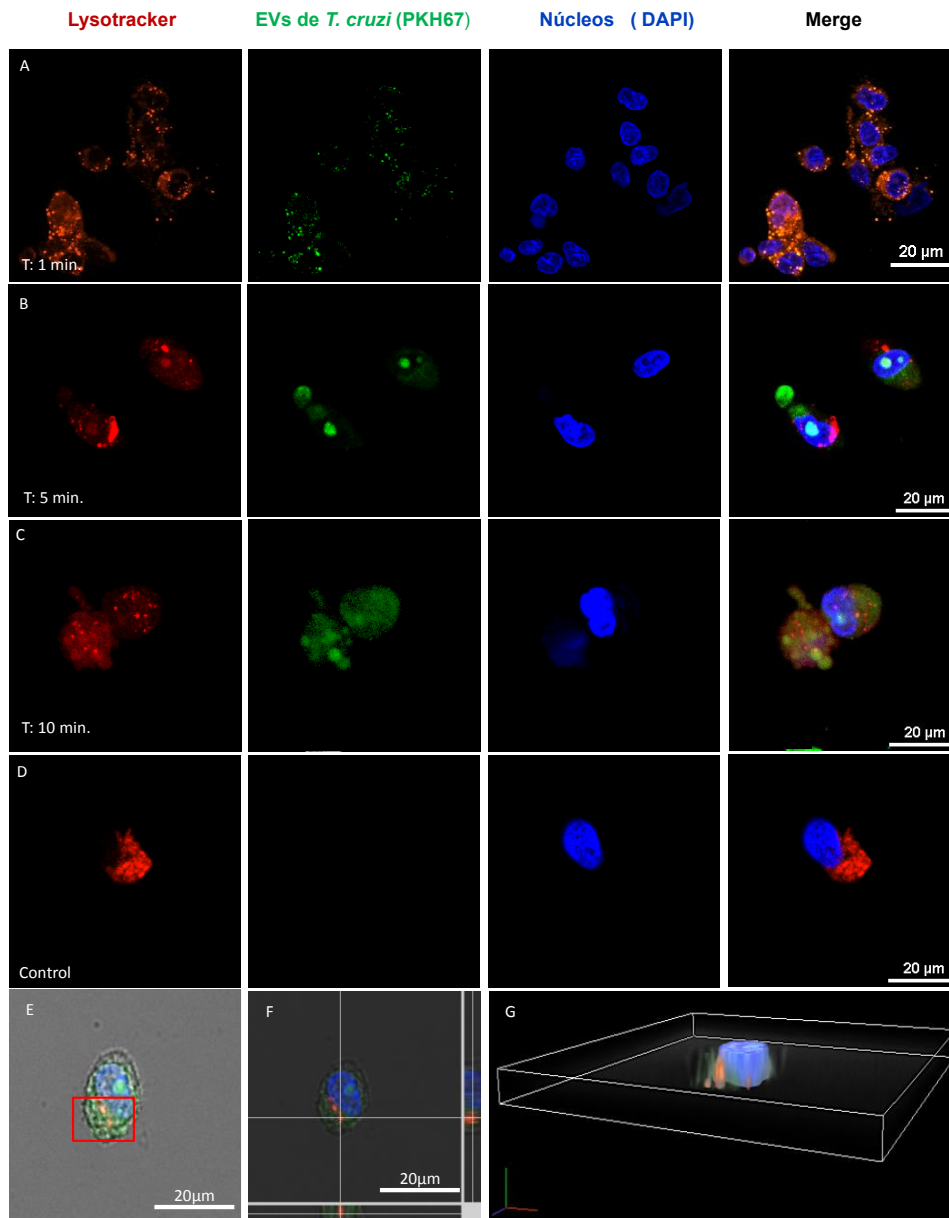
## Resultados

La figura 4.42, muestra como no es hasta los 10 min de la internalización donde se observa la interacción caveolina-EVs, apareciendo de color amarillo producto del solapamiento de las EVs y la caveolina (Figura 4.42C).

En la figura 4.43, se muestran imágenes de la captación de EVs por células Vero, mediante confocal con campo claro (DIC), con el anticuerpo anti-caveolina mostrando los puntos de interacción con la membrana plasmática.



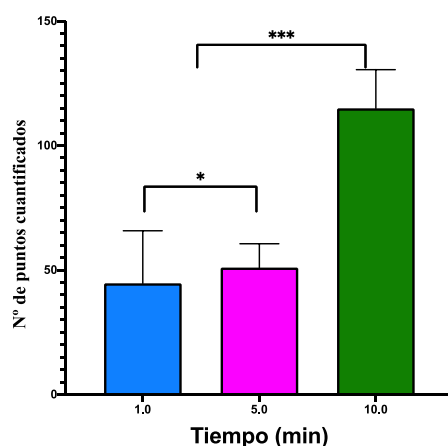
**Figura 4.43.-** Imágenes de confocal con el anticuerpo anti-caveolina, describiendo la captación e inmunolocalización de EVs de tripomastigote de *T. cruzi* por células Vero durante 1, 5 y 10 minutos. (A-C) Confocal DIC o campo claro en células Vero, el anti-caveolina fue visualizado con Alexa Fluor 647 (rojo), las EVs fueron marcadas con PKH67 (verde). (G) Célula control. La barra de la escala es de 20 μm.



**Figura 4.44.-** Localización y captación de EVs de tripomastigote de *T. cruzi*, por células Vero durante 1, 5 y 10 minutos (A-C) usando microscopia láser confocal con sonda fluorescente LysoTracker (rojo). EVs marcadas con PKH67 (verde); ADN de las células marcado con DAPI (azul). En el solapamiento de los tres canales se observó (LysoTracker + PKH67 + DAPI). (D) Control del ensayo: Células Vero sin EVs. (E) Punto de solapamiento entre EVs y LysoTracker observado con DIC o campo claro a los 10 min. (F) Proyecciones ortogonales (2D). (G) Plano Z (3D). La barra de la escala es de 20 µm.

## Resultados

Para complementar los ensayos anteriores se utilizó LysoTracker<sup>®</sup>, una sonda acidotrópica fluorescente para el marcaje y seguimiento de orgánulos ácidos (lisosomas) en células vivas. Los resultados muestran la presencia de un gran número de vesículas ácidas detectadas por el LysoTracker<sup>®</sup> al inicio de la interacción EVs- célula, indicando mayor actividad de captación EVs con una posible movilización de los lisosomas marcados que posteriormente se acumulan en la región perinuclear (Figura 4.44).



**Gráfica 4.18.-** Cuantificación de la captación de EVs en el interior de células Vero a través de la sonda LysoTracker, en diferentes tiempos de interacción. Las vesículas se detectaron como manchas fluorescentes de PKH67, limitadas por la difracción de luz. Datos representativos de tres experimentos. (Barra de error: SD de tres réplicas biológicas independientes, de al menos 3 células por campo de observación; valores p. Análisis de varianza: ns, no significativo; \*,  $P < 0.1$ ; \*\*\*,  $P < 0.01$ ).

La gráfica 4.18, muestra la cuantificación de EVs captadas y vinculadas a los lisosomas en las células receptoras en los diferentes tiempos de interacción.



#### **4.5.4: Estudio de la interacción EVs-célula receptora a través de Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).**

Con los resultados que presentamos en este apartado, complementamos los estudios previos de nuestro grupo de trabajo donde se han descrito las propiedades nanomecánicas y características de tamaño de EVs y de los inmunocomplejos que los forman a través de AFM.

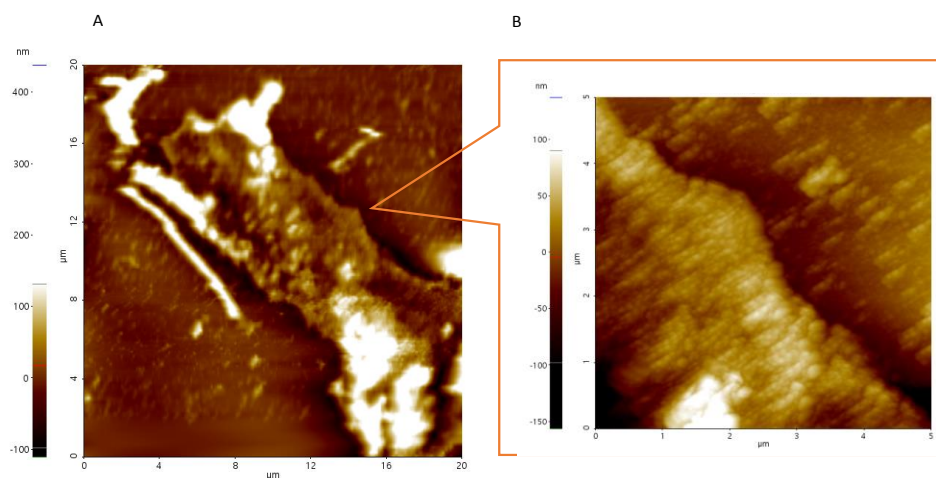
Con el fin de corroborar los resultados que se han obtenido con otras técnicas, en el estudio de la interacción de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* con células Vero y la captación de las mismas por parte de dichas células se empleó AFM.

La utilización de la técnica para la obtención de imágenes de células presentó dificultades desde el punto de vista técnico, debido a la naturaleza de las propias muestras y a que inicialmente, tratamos de realizar el experimento *in vivo* a pesar de que el microscopio de fuerza atómica requiere que las células estén fijas en una determinada posición para que el cantiléver del equipo las alcance y barra durante el escaneo. Tras intentar otros modos de medida, optamos por visualizar el contacto de la célula Vero-EVs, usando cantilevers NSC-14 ( $K = 5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  y Frecuencia de resonancia = 160 kHz) y usando el modo PinPoint™ como se ha descrito en Material y Métodos, que fue la clave para adquirir una topografía de manera reproducible y fiable, ya que se conserva la estructura e integridad de las células y evitó que éstas se desprendieran del cubreobjeto, donde fueron adheridas durante los diferentes tiempos de incubación con las EVs (5, 7.5 y 10 minutos).

## Resultados

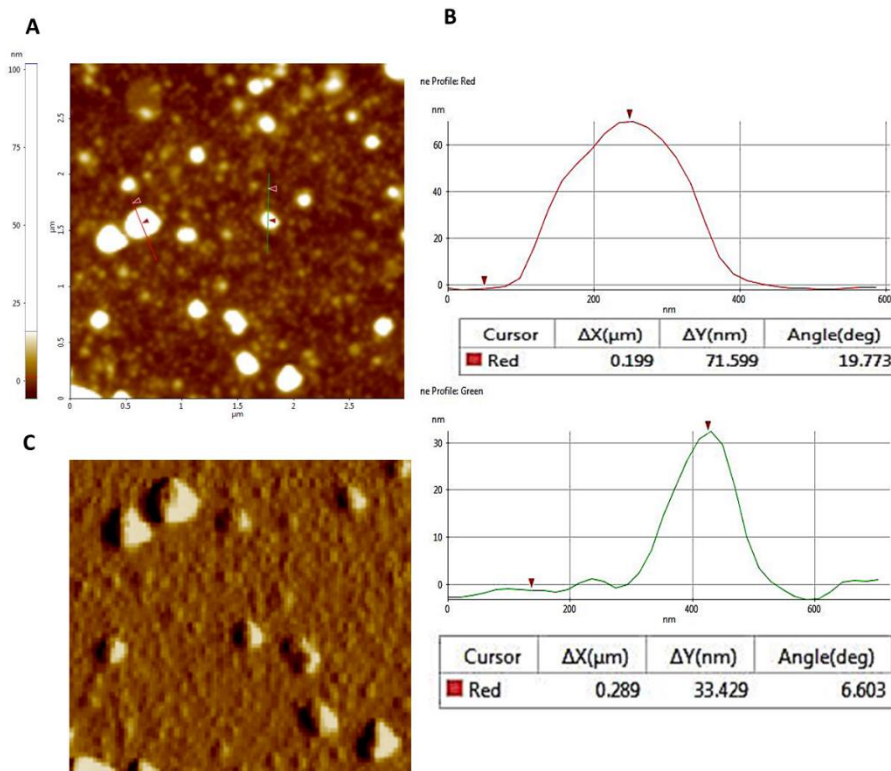
---

Para las medidas de las EVs, previa a los experimentos de interacción células-EVs, se utilizó el modo de no contacto (NCM) con ventanas de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  y de  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$  como se describe en Material y métodos.



**Figura 4.45.-** Imágenes de AFM (Z-Height). Células Vero fijada sobre cubreobjetos de cristal sin EVs (Control del experimento). (B) Zoom de la membrana plasmática de la célula.

Como control del experimento, y previo a los estudios de interacción, con las células fijadas, se obtuvieron imágenes que muestran las características topográficas y morfológicas de las células Vero en su forma nativa (sin EVs), realizando escaneos de  $20 \times 20 \mu\text{m}$  y de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  (Figura 4.45). Los resultados muestran células alargadas, con una altura aproximada de 400 nm, bordes bien definidos, regulares, y sin proyecciones citoplasmáticas.



**Figura 4.46.-** Imágenes de AFM (Z- Height). (A) EVs de tripomastigote de *T. cruzi* Pan4. (B) (Z-Height) y perfiles de altura para cada una de la EVs. (C) Imagen de amplitud.

De igual manera se observaron EVs depositadas sobre mica, obteniéndose imágenes de altura de aproximadamente de 30-70 nm, con forma redondeada y una superficie irregular (Figura 4.46).

Resultados

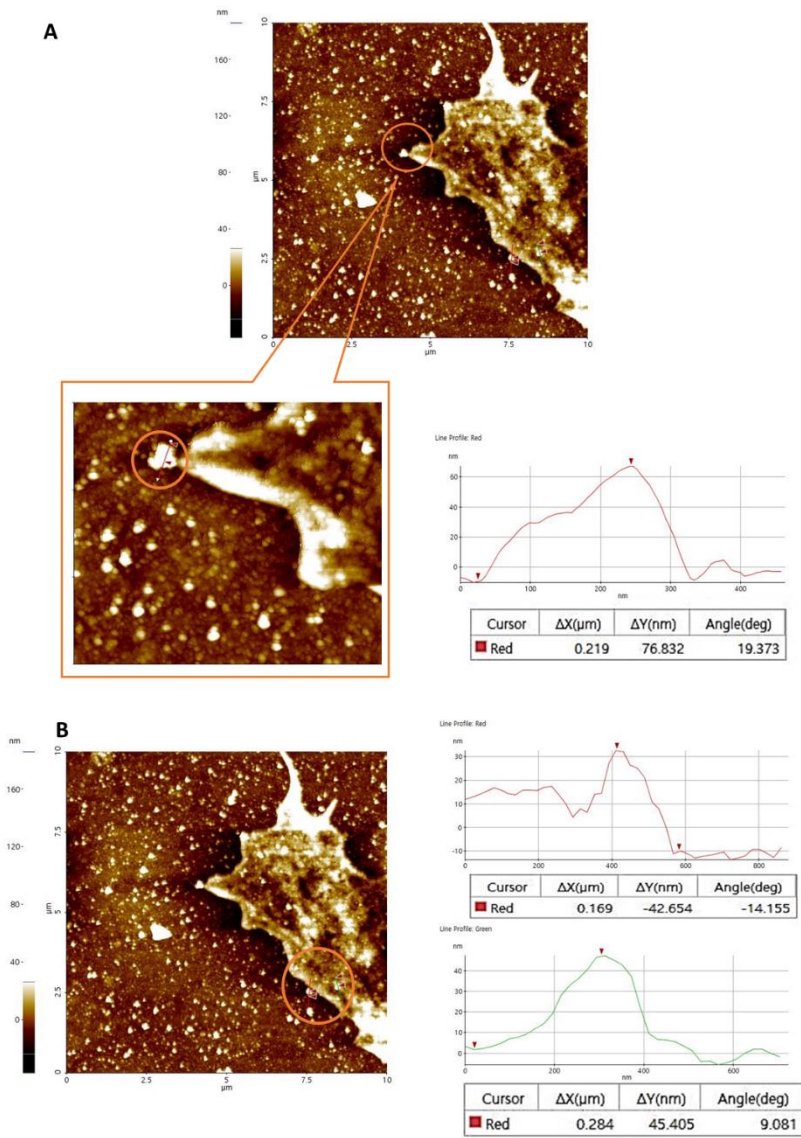


Figura 4.47.- Imagen de AFM (Z-Height). Captación de EVs por células Vero en los primero 5 minutos de Interacción. (A) Célula Vero interaccionando con un agregado formado por EVs con Zoom y perfil de altura. (B) EVs sobre superficie celular con sus perfiles de altura.

Una vez escaneadas las células y EVs por separado con sus respectivas medidas y características descritas se realizaron los experimentos de captación de las EVs. Se observó que durante los primeros 5 minutos de interacción se produce la formación de proyecciones de la membrana plasmática (Figura 4.47A). Asimismo, es reseñable la presencia de EVs en la superficie y en el borde de la membrana celular (Figura 4.47B), mostrando alteraciones en la topografía y características físicas de las células como es la presencia de microproyecciones citoplasmáticas sobre la superficie de la célula, donde se observan adheridas algunas EVs y donde los perfiles de altura nos permiten describir EVs de entre 42 y 45 nm de altura (línea roja y verde).

Resultados

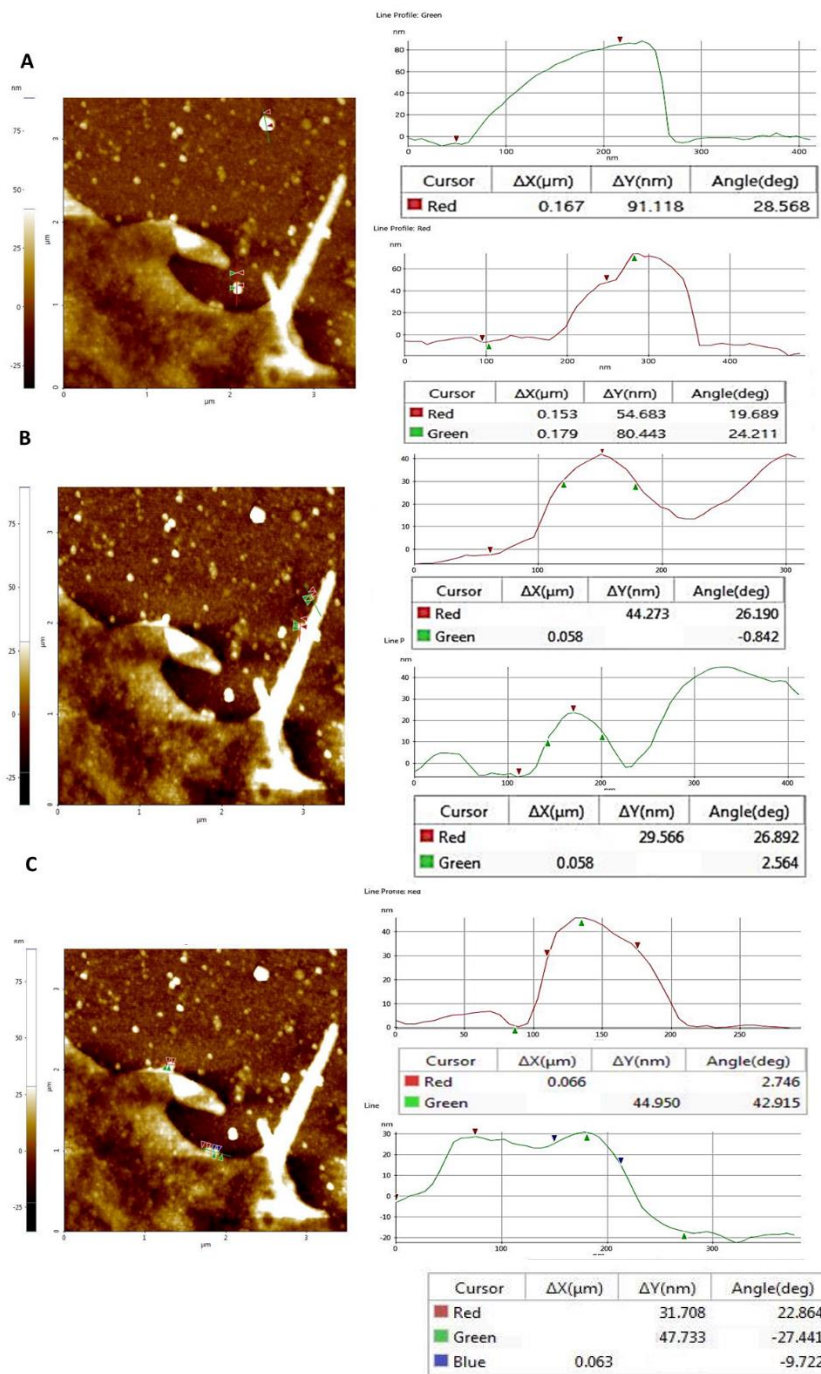
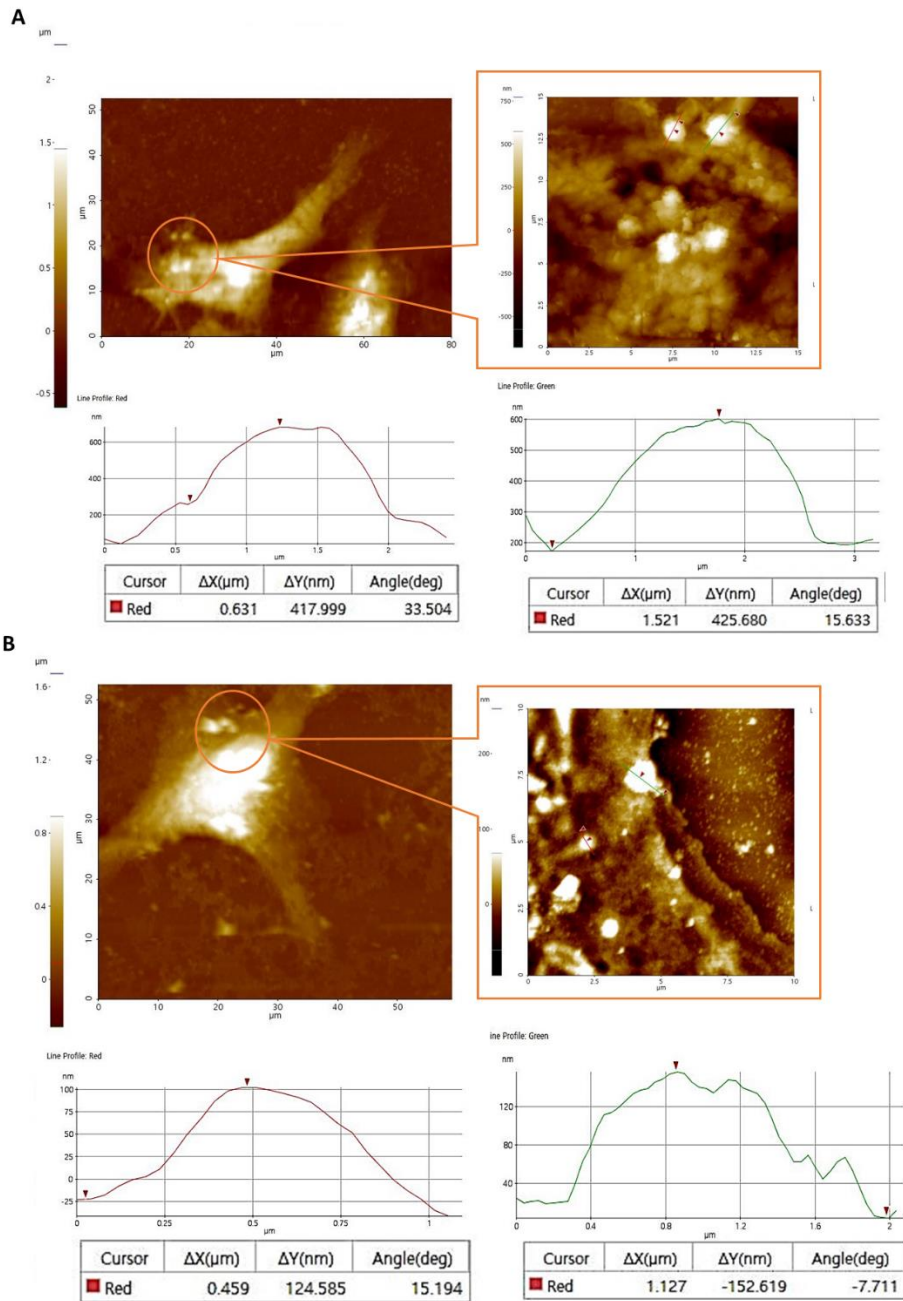


Figura 4.48.- Imagen de AFM (Z-Height). Captación de EVs por células Vero en los primero 5 minutos de interacción. (A) Agregados de EVs que no han interactuado con la célula con sus perfiles de altura. (B y C) EVs adheridas a las proyecciones citoplasmáticas o en contacto con la membrana con sus perfiles de altura.

La figura 4.48 muestra diferentes áreas de la célula interaccionando con EVs con tamaños aproximados entre 29-91 nm (ver perfil de altura). Sin embargo en la figura 4.48C, se observa EVs interaccionando con la membrana plasmática (perfiles de altura de 31 y 47 nm), rodeadas por proyecciones o filopodios en una posible endocitosis.

## Resultados



**Figura 4.49.-** Imágenes de AFM (Z-Height). Captación de EVs por células Vero durante 7.5 minutos de Interacción. (A) Célula Vero interactuando con EVs y zoom de EVs internas englobadas y cubiertas por la membrana plasmática, con perfiles de altura. (B) Célula con EVs localizadas en el borde interno de la membrana plasmática y zoom de EVs captadas con perfiles de altura.



Sin embargo, en la figura 4.49, se presentan los resultados de dos células captando EVs a los 7.5 minutos, con proyecciones y elevación de volumen causado por EVs posiblemente ya en su interior. El zoom de la figura 4.49A, muestra EVs con alturas entre 418 nm y 425 nm (ver perfiles de altura línea roja y verde) muy superiores a las descritas antes, posiblemente debido a que en este barrido, a los 7.5 min de incubación en el experimento, las EVs ya se encuentran envueltas por la membrana celular, aumentando sus dimensiones reales. Del mismo modo, la figura 4.49B, muestra un tamaño de EVs superior al medido antes del experimento de interacción y que se encuadra en valores entre 124 y 153 nm (líneas roja y verde). Si bien es cierto que son medidas mucho más discretas que las anteriores, podríamos sugerir que en este caso las EVs están en el borde de la célula y que el proceso de internalización no se haya completado.

Resultados

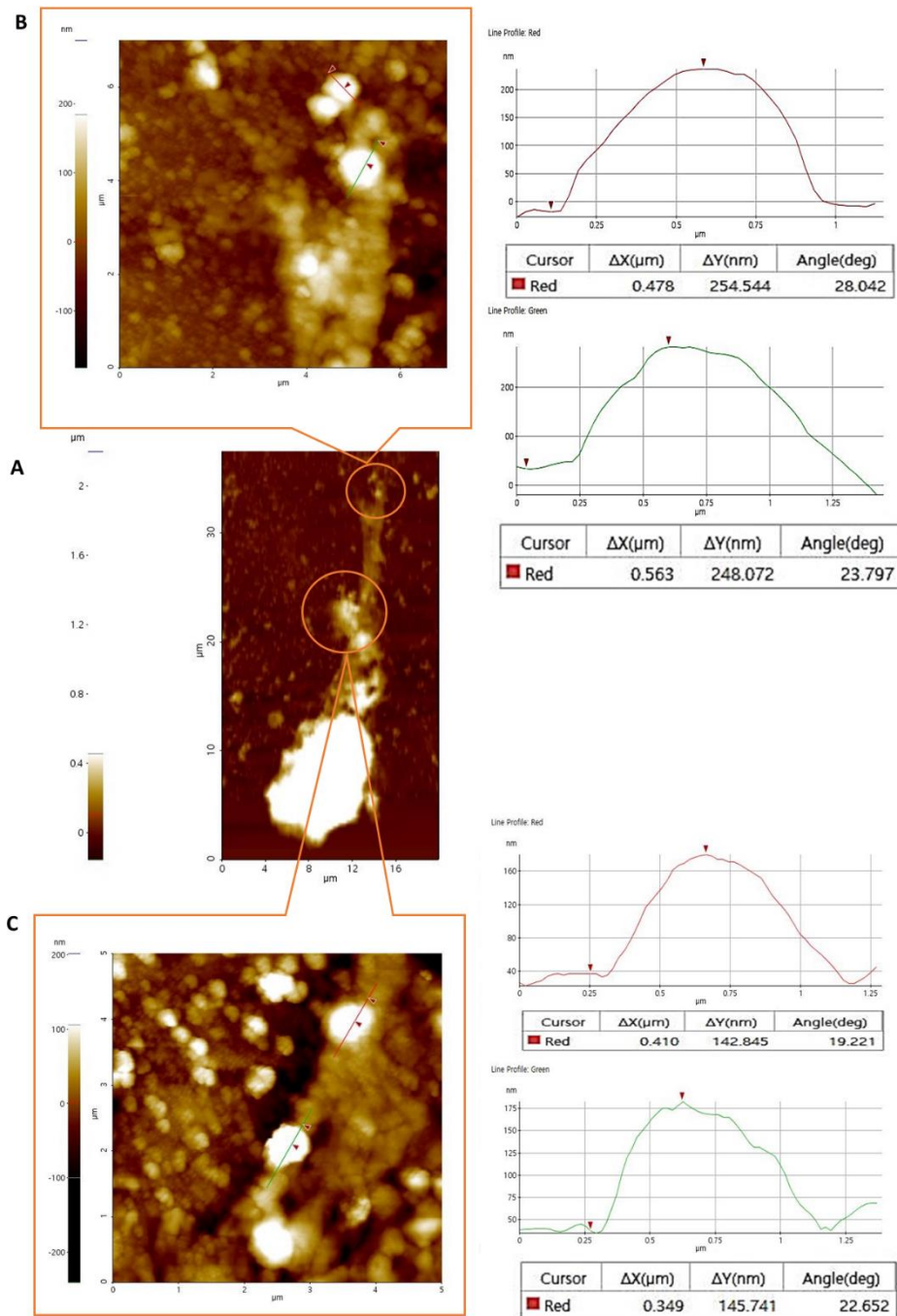
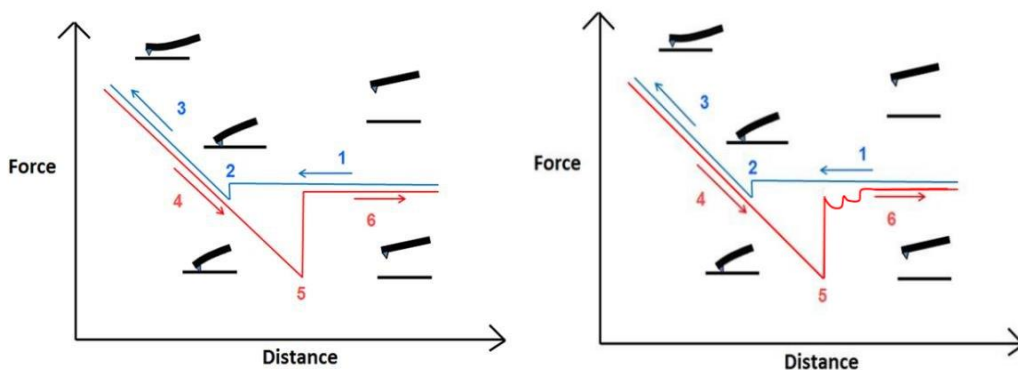


Figura 4.50.- Imágenes de AFM (Z-Height). Captación de EVs por células Vero durante 10 minutos de Interacción. (A) Célula Vero interaccionando con EVs. (B) Zoom de filopodio de la célula con EVs internas y perfiles de altura. (C) Zoom de borde de la membrana plasmática con EVs internas y perfiles de altura.

La figura 4.50, se corresponde con la última etapa del ensayo de captación de EVs por células Vero, mostrando los resultados tras 10 minutos de interacción entre ambas. Del mismo modo que en las imágenes correspondientes a la interacción a los 7.5 min, podemos observar células con proyecciones o filopodios a través de los cuales se internalizan las EVs. Los perfiles de altura muestran nuevamente valores superiores a los de las EVs, quizás por las razones que argumentamos anteriormente. En ambos casos, las EVs aún mantienen su forma y se distinguen claramente del resto del contenido celular (Figura 4.50B y Figura 4.50C).

#### **4.5.5. Estudio del reconocimiento molecular a través de AFM.**

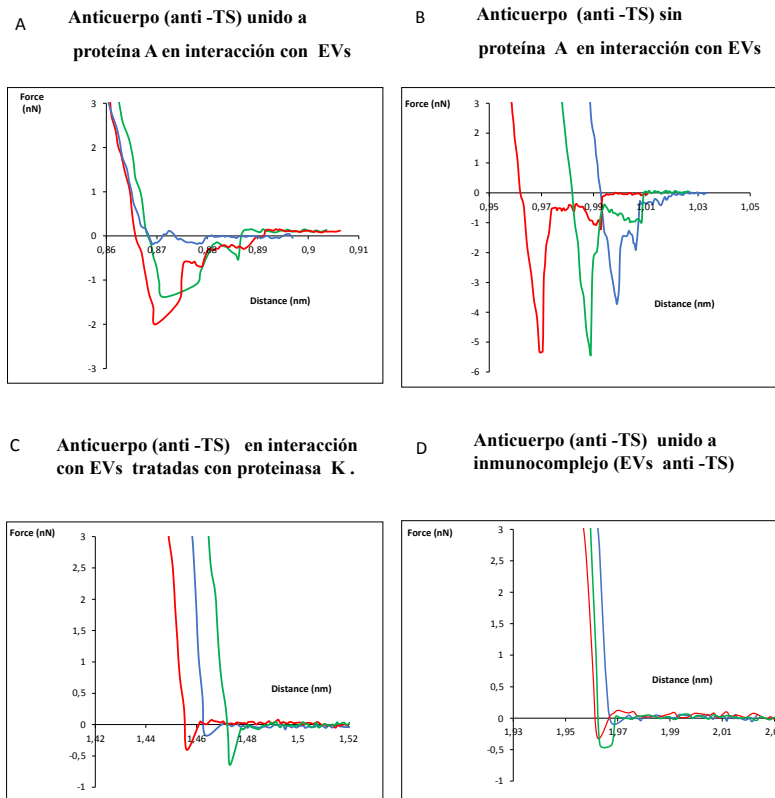
Con el objetivo de complementar los estudios de interacción célula-EVs se realizaron ensayos de reconocimiento molecular, que determinan la compatibilidad entre moléculas y predicen interacciones entre ellas para validar y complementar los resultados hasta ahora obtenidos. Dichos experimentos consistieron en acercar una molécula (anticuerpo anti-*trans* sialidasa) unida a través de un linker a la punta de AFM hasta la superficie de otra molécula fijada sobre el sustrato mica (exosomas) y observar las curvas F-d durante el barrido para ver si se producen signos de la interacción entre ambas. Para comprender e interpretar los resultados de dicho reconocimiento se muestra la gráfica F-d (Grafica 4.19).



**Gráfica 4.19.- Gráfica F-d resultado de la interacción punta-muestra (izquierda). Gráfica F-d resultado de un proceso de reconocimiento molecular visualizando la interacción entre dos moléculas.**

Para este estudio, se obtuvo un gran número de curvas de Fuerza (nN)-Z Altura (nm) (una curva por cada píxel en la imagen escaneada de 256x256 píxeles) para la interacción entre la punta funcionalizada con anticuerpo anti-trans-sialidasa y EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* depositadas en la superficie de una mica (ver capítulo Materiales y Métodos, apartado 3.7.3.4.2). Se utilizaron cantilevers NSC-36 de los que se han usado las puntas A y C: punta A:  $K=1\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$  y  $f=90\text{ kHz}$ ; punta C:  $K=0.6\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$  y  $f=65\text{ kHz}$ .

Las EVs de *T. cruzi*, utilizadas en estos experimentos tienen una gran cantidad de proteínas en su superficie que le permite interactuar con una serie de receptores y moléculas de adhesión e interacción huésped -parásito, como es el caso del anticuerpo anti-trans sialidasa (mAb-39). Al eliminar estas proteínas con el tratamiento con la enzima proteinasa K se pierden esos puntos de unión y reconocimientos con otras moléculas.



**Figura 4.51.-** Curvas de fuerza distancia (F-d) de retracción representativas entre (A) EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* Pan4 y anticuerpos anti-trans sialidasa utilizando puntas funcionalizadas con proteína A; (B) EVs y anticuerpos anti-trans sialidasa utilizando puntas funcionalizadas sin proteína A; (C) EVs después del tratamiento con proteinasa K y anticuerpos anti trans sialidasa y (D) Inmunocomplejo (EVs y anticuerpos anti Transialidasa) y anticuerpos anti-trans sialidasa.

En la Figura 4.51, se muestran las curvas fuerza distancia (F\_D) como resultado de la interacción de las puntas funcionalizadas con tres tipos de muestras: exosomas, exosomas tratados con proteinasa K e inmunocomplejos. La gráfica A de la figura 4.51, muestra los resultados del experimento de reconocimiento molecular entre la punta funcionalizada con proteína A para dirigir la unión del anticuerpo anti- transialidasa que posteriormente interviene en el reconocimiento de EVs depositadas sobre mica e interacciona con ellas. Las curvas F\_D extraídas de dichas interacciones muestran saltos de adhesión e interacción entre ambas moléculas desde 0.88 nm en adelante. Son varios

saltos sucesivos de altura aproximada 1nN o inferior que nos permiten afirmar que existe un proceso de reconocimiento molecular entre ambas.

La gráfica B presenta la misma unión pero sin proteína A. de manera que la curva F\_D presenta saltos más marcados localizados a 0.99, 1.01 y 1.00 nm para las gráficas roja, azul y verde, respectivamente. La fuerza correspondiente a estas tres interacciones visualizadas es de 1-2 nN. A pesar de que la interacción anticuerpo-exosoma es la misma que visualizamos en las gráficas A, de ello se podría deducir que la ausencia de proteína A produce una mayor fuerza en el acoplamiento entre el anticuerpo y las EVs.

Por otro lado, se han intentado reproducir los mismos procesos de reconocimiento molecular entre EVs tratadas con proteinasa K y el anticuerpo anti-trans sialidasa unido a la punta de AFM. En este caso, la gráfica C muestra curvas F\_D en las que no se visualiza la interacción o reconocimiento molecular exosoma-anticuerpo. Como podemos observar, no existen saltos de adhesión más allá del salto producido al no contacto de la punta, probablemente por la pérdida de proteínas en la membrana externa de las EVs, lo que disminuye o evita el acoplamiento entre el anticuerpo y los receptores o moléculas de reconocimiento que convierten esta parte del experimento en control negativo del mismo.

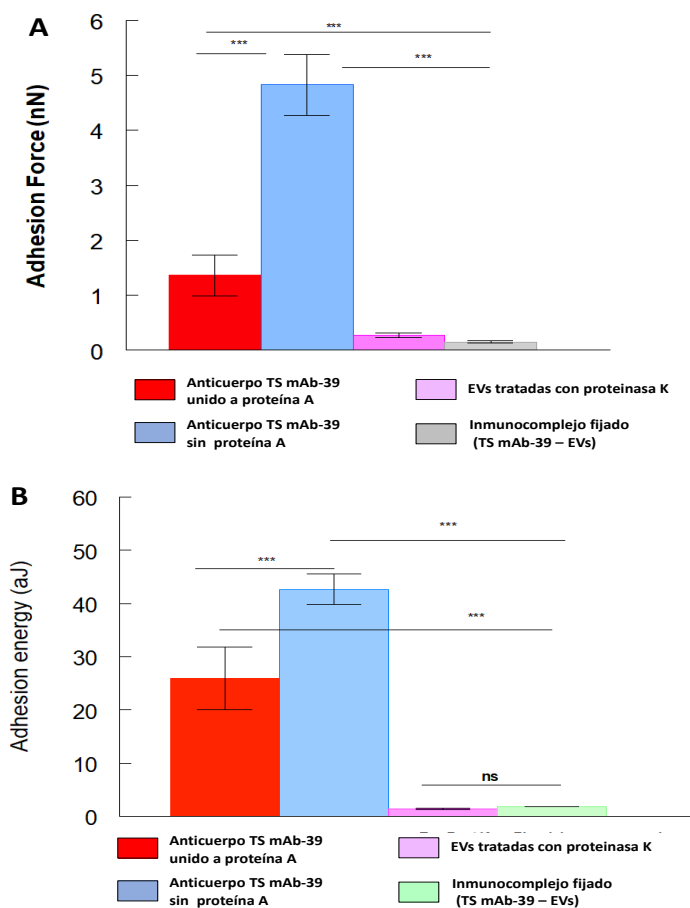
Por último, se intentó comprobar el resultado de los experimentos de interacción entre el mismo anticuerpo anti-*trans*-sialidasa con inmunocomplejos previamente formados y fijados depositados sobre mica que, sustituirían a las EVs de los tres experimentos anteriores (Gráfica D). Los inmunocomplejos estudiados en estos ensayos, son el resultado de la unión EVs-anticuerpo anti-TS, aunque desconocemos si toda la superficie de la EVs se haya cubierta por dichos anticuerpos, de manera que no exista posibilidad alguna de unión al antígeno (EVs) que acercamos con la punta del AFM funcionalizada o, si por el contrario, cabe la posibilidad de encontrar huecos

en la superficie que den lugar al proceso de interacción entre ambos. Además, si la unión anticuerpo-exosoma fuese un equilibrio dinámico también nos abriría la puerta a encontrar procesos de reconocimiento molecular entre el anticuerpo anti-trans sialidasa y el inmunocomplejo previamente formado y fijado.

La gráfica D muestra el resultado de estos experimentos en los que no se visualizan saltos de adhesión correspondientes al proceso de interacción entre ambas moléculas. Si bien es cierto que tras el salto al no contacto se observan algunas interacciones muy débiles (0.1 nN) entre 1.98 y 2.01 nm, por la intensidad de los mismos, podemos considerar que no es suficiente para afirmar que existan procesos de reconocimiento molecular entre el inmunocomplejo y el anticuerpo.

La Figura 4.52, muestra la Fuerza Máxima de adhesión (A) y el Trabajo de Adhesión (B), para todos los experimentos realizados. En ella se observa una menor adhesión para los exosomas, usando una punta funcionalizada con proteína A que cuando se usó una punta funcionalizada sin proteína A.

## Resultados



**Figura 4.52.-** Valores medios de la fuerza máxima de adhesión (A) y del trabajo de adhesión (B), respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando análisis de varianza (Barra de error: DS de tres réplicas biológicas independientes, valores p, ns: No significativo, \*,  $P < 0.1$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

También se observó una baja adhesión entre los exosomas tratados con proteinasa K y el inmunocomplejo fijo en los experimentos de control presentados. Por el contrario, la presencia de esas proteínas provocó un mayor trabajo de adhesión entre exosomas y punta funcionalizada con o sin proteína (Figura 4.52B), sugiriendo que la adhesión está dominada por enlaces con proteínas.



Capítulo 5  
DISCUSIÓN

---

## 5. Discusión

Actualmente la tripanosomiasis americana, conocida popularmente como enfermedad de Chagas (EC), es considerada la enfermedad parasitaria más importante de América Latina y una de las enfermedades desatendidas más comunes en todo el planeta. El número estimado de pacientes infectados con *T. cruzi* es de 6 a 8 millones, 120 millones de personas están en riesgo de infección y causa más de 2,000 muertes cada año (Coura and Vias 2010; Dias, Silveira, and Schofield 2002). La aparición de EC en regiones no endémicas genera una nueva realidad epidemiológica, ya que los movimientos migratorios han hecho que una enfermedad autóctona del Continente Americano, se haya convertido en un problema de salud global (Schmunis and Yadon 2010).

En el Continente Europeo se estima que pueden existir entre 100,000 y 200,000 casos. Los países más afectados son aquellos con una mayor presencia de población migrante, España con aproximadamente 68,000 casos y en menor cantidad Italia, Francia, Suiza, Suecia y Reino Unido, (Requena-Méndez et al. 2014).

En el caso concreto de mi país de origen, Panamá, las primeras investigaciones de la EC iniciaron en 1930 con la descripción de 3 casos clínicos (Miller 1931). Posteriormente se realizaron algunos estudios epidemiológicos y pruebas inmunológicas que reúnen los primeros datos sobre la incidencia del parásito en algunas áreas endémicas del país (Johnson and Kelsner 1937). No es hasta los estudios del Dr. Sousa cuando se comprende mejor la ecología y biología de vectores y reservorios, y se desarrollan métodos para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, permitiendo determinar la incidencia y distribución de la EC en áreas endémicas del País (Sousa 1972; Sousa and Johnson 1971). En

los últimos años algunos investigadores han hecho valiosas aportaciones que han permitido conocer aspectos eco-epidemiológicos de los ciclos de transmisión, taxonomía de los vectores, reservorios, dinámica de la patología chagásica en Panamá y tratamiento, identificando nuevos focos endémicos de la enfermedad (Blandon 1969; Brandao et al. 2008; Calzada et al. 2010; Saldaña et al. 2012; Saldaña, Sousa, and Orn 1995).

En 2010, el Departamento de Control de Vectores del Ministerio de Salud de Panamá informó la presencia de los dos vectores principales de la EC (*Rhodnius pallescens* y *Triatoma dimidiata*), y se diagnosticaron los primeros casos de EC en la comunidad de Chararé. Sin embargo, la tipificación genética de *T. cruzi* circulante en la zona no se habían estudiado hasta ahora.

La comunidad de Chararé, se localiza en una zona montañosa remota de difícil acceso en donde, además del bajo nivel socioeconómico de sus habitantes, se encuentran características eco-epidemiológicas favorables para la transmisión de múltiples patógenos, entre ellos *T. cruzi* (Tabla 4.1)(Calzada et al. 2010).

Desde la introducción de la primera prueba serológica para la enfermedad de Chagas en 1913, hasta nuestros días no se cuenta con un estándar de oro para el diagnóstico de la EC. La ausencia de un método serológico 100% confiable ha llevado a que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) considere necesaria la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* con al menos dos técnicas serológicas diferentes (Caballero et al. 2007) y usando de ser posible antígenos provenientes de dos áreas geográficas americanas diferentes.

En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se ha confirmado la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en las diferentes muestras obtenidas de los pacientes chagásicos crónicos de Panamá mediante pruebas comerciales como

ELISA recombinante Chagatest, (Wiener Lab, Argentina), pruebas rápidas inmunocromatográficas (SD Bioline Chagas AB (Abbott, Alemania)) y como ensayo complementario, una prueba de inmunotransferencia de un aislado de *T. cruzi* de Panamá, siguiendo la metodología descrita por Saldaña y colaboradores (Saldaña et al. 1995).

Los resultados obtenidos (Tabla 4.4), sugieren la existencia de una alta prevalencia de infección chagásica en esta zona rural de Panamá, en comparación con los porcentajes encontrados en estudios recientes en otras áreas endémicas, donde se demostraron menor sero prevalencias (Calzada et al. 2010).

Sin embargo, esta alta frecuencia de infección chagásica encontrada es consistente con estudios seroepidemiológicos llevados a cabo en otras regiones cercanas. Como describe Anez y colaboradores (2004), las regiones rurales de Venezuela llegan a tener una seropositividad del 56,8%, o como en la región de Arauca en Colombia, donde el 21,6% de los niños de 0 a 14 años eran positivos a la infección (Anez et al. 2004; Guhl 2007; Olivera et al. 2019).

De los datos de PCR positivos, se puede deducir que las muestras de sangre analizadas de los pacientes crónicos deben presentar formas sanguíneas circulantes del parásito tanto tripomastigotes o como formas amastigotas resultantes de la ruptura de células infectadas, o por la existencia de contaminación de ADN del Kinetoplasto del parásito debido a la destrucción de las formas del mismo y la consiguiente liberación del kDNA.

Entre los pacientes seropositivos diagnosticados en hospitales urbanos (ensayo ARCHITECT System Chagas), el 71,42% (20/28) presentaban un perfil clínico con cardiopatía evidenciada por ecocardiograma y radiografía de tórax, donde los datos de los pacientes de la comunidad rural endémica fueron remitidos a los servicios de salud para su evaluación clínica después del

diagnóstico serológico. Encontrándose 30/53 (56.6%) de pacientes considerados como chagásicos asintomáticos (Tabla 4.3).

En algunas muestras en las que las pruebas serológicas mostraron discrepancias en los resultados de positividad, la verificación por PCR de la presencia de kDNA confirmó la infección. Por lo tanto, esta técnica se debe incorporar en la confirmación del diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

Al objeto de explicar las diferencias existentes entre los distintos aislados, concernientes a infectividad, resistencia a fármacos, mayor o menor predilección del tipo celular infectado y patogenia. En

la actualidad, *T. cruzi* se divide en siete unidades discretas de tipificación (UDT), TcI-TcVI y Tcbat. Hoy día existe muchas controversias entre el genotipo de *T. cruzi* y las manifestaciones de la enfermedad de Chagas. La información disponible sugiere que las cepas de parásitos detectadas en pacientes, independientemente de la presentación clínica, reflejan la principal UDT que circula en los ciclos de transmisión doméstica de una región en particular (Zingales 2018).

En esta Tesis, se presentan los resultados de nuestras investigaciones relacionados a los UDT circulantes en Panamá, que como país centroamericano y área endémica para la EC, presenta características particulares en cuanto a eco-epidemiología y patología chagásica (Blandon 1969; Sousa 1971). Las variantes genéticas de *T. cruzi* circulante en vectores y pacientes agudos se han investigado parcialmente en Panamá (Saldaña et al. 2012; Samudio et al. 2007). Sin embargo, en estos estudios preliminares, solamente se detectó *T. cruzi* TcI (Brandao et al. 2008; Sousa et al. 2006), así como la tipificación de un aislado de *T. cruzi* de una zona rural que correspondía a la comarca de Arraiján (Cura et al. 2010). En Panamá, nuestros resultados representan es el primer estudio, dirigido a la

identificación de UDT de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes panameños. Estos hallazgos reflejan la diversidad genética de los parásitos, en infecciones naturales sin necesidad de su aislamiento o expansión, situación particularmente difícil en pacientes crónicos con muy bajas parasitemias (Sousa 1971; Sousa et al. 2006). Además, la genotipificación de aislados de parásitos cultivados puede conducir a una identificación errónea de genotipos menores en infecciones mixtas, ya que es más probable que las poblaciones que crecen a una tasa mayor sean las detectables mediante los métodos de tipificación disponibles.

Aunque la información sobre la distribución de UDT en diferentes áreas geográficas está aumentando, la asociación confirmada con las manifestaciones clínicas y la epidemiología de la EC es limitada. Con la aparición de nuevos focos de la EC en Panamá, es relevante proponer estudios ecológicos de *T. cruzi* en esta región del país con el objetivo de mejorar las medidas de vigilancia y control.

Uno de los objetivos de esta investigación, fue la identificación directa de UDT de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes chagásicos crónicos residentes en Chararé, una comunidad rural altamente endémica de Las Margaritas, distrito de Chepo, provincia de Panamá, y compararlas con las UDT detectadas en pacientes con enfermedad de Chagas en el área metropolitana de la ciudad de Panamá, población representativa de infectados por *T. cruzi* de las principales regiones endémicas del país.

En Panamá solo se había reportado la presencia de UDT1 por Sousa y colaboradores (2006), pero en este trabajo se han identificado cambios en las variantes circulantes de *T. cruzi* tanto de la población, como vectores y reservorios (Tabla 4.4).

Las manifestaciones clínicas de la infección chagásica en Panamá son principalmente cardíacas durante las fases aguda y crónica de la enfermedad, sin evidencia de que la forma digestiva se desarrolle durante las últimas etapas de la infección (Sousa and Dawson 1976).

El patrón de la EC en Panamá parece ser similar al de otras regiones como Venezuela, Colombia u otros países de Centroamérica, donde predominan las manifestaciones cardíacas (Coura et al. 1999; Cura et al. 2010; Ruíz-Sánchez et al. 2005). En este sentido, y en base a las diversas condiciones ecológicas existentes en Panamá, es probable que, como en otras regiones del norte de Sudamérica, estén en circulación UDT distintas de TcI, tanto en vectores como en reservorios. Las condiciones eco-epidemiológicas, no del todo conocidas en esta región, podrían explicar la existencia de diferentes UDT. La importación de animales infectados, o la llegada de vectores foráneos son mucho más complejas, ya que la zona es remota y de difícil acceso.

Un estudio en Colombia (Panesso-Gómez et al. 2018) detectó la presencia de acalasia esofágica asociada a la EC, inducida por TcI, presente en pacientes diagnosticados de esta patología. Por otro lado, en Colombia, se han notificado pacientes chagásicos con afectación cardíaca y gastrointestinal mixta. La genotipificación de las muestras de tejido mostró tanto TcI en el esófago afectado como TcII en las muestras de corazón (Mantilla et al. 2010). De manera similar, se han informado infecciones mixtas en insectos que involucran diferentes UDT (UDT II, III y IV) (Carrasco et al. 2012). Aunque en Colombia se ha descrito UDT I en la mayoría de los pacientes, insectos vectores y reservorios, también se ha descrito la existencia de cepas de UDTII en pacientes chagásicos crónicos (Mantilla et al. 2010). Asimismo, en Venezuela, en ecotopos similares a los evaluados en Panamá, se han detectado

infecciones humanas causadas por cepas TcI y TcII e infecciones mixtas en tejido cardíaco con cepas UDT I, II, III y IV (Carrasco et al. 2012; Dario et al. 2016).

Estudios similares sugieren que las poblaciones de *T. cruzi* genéticamente relacionadas existen posiblemente en las mismas áreas geográficas o adyacentes y podrían estar involucradas en la determinación del desarrollo de la misma forma clínica de la enfermedad. Un estudio realizado por Vago y colaboradores (2,000), encontró cepas multiclonales en el corazón y el esófago de pacientes infectados, evidenciando los primeros datos de un posible tropismo tisular diferencial humano (Vago et al. 2000). En nuestro estudio observamos tres pacientes con infecciones mixtas (casos 31, 33 y 36) (Tabla 4.3), dos de los cuales (casos 31 y 36) tenían manifestaciones cardíacas mientras que el otro paciente (caso 33) era asintomático. El caso 33 correspondía a una paciente de 14 años, por lo que no se puede descartar la posibilidad de desarrollar enfermedad cardíaca en un futuro en ausencia de tratamiento. Por otro lado, teniendo en cuenta la hipótesis del histotropismo, no podemos descartar que los otros pacientes estudiados (48) alberguen genotipos diferentes al Tc I, que no se pudieron detectar en sangre periférica en las muestras tomadas. El seguimiento de los pacientes que residen en esta localidad, y especialmente de los pacientes pertenecientes a las familias que presentan infecciones mixtas, sería de gran interés para conocer si otros genotipos distintos al TcI pueden surgir en diferentes períodos de vida a lo largo de la historia natural de su infección crónica (Ledezma et al. 2020).

Investigaciones realizadas en el Gran Chaco, Argentina, revelaron infecciones mixtas de TcV / TcVI en humanos y TcI / TcVI en cánidos de áreas rurales, demostrando asociaciones significativas entre TcV con humanos y TcVI con



perros. También encontraron TcIII, TcI y TcV en perros y describieron por primera vez TcIII en humanos en esta área, lo que sugiere que hay contacto con mamíferos salvajes o que Tc III puede estar involucrado en un ciclo doméstico (Monje-Rumi et al. 2015).

En consecuencia, los estudios experimentales realizados en perros con *T. cruzi* Y (Tc II) o Col (TcI) han demostrado que la infección por *T. cruzi* puede ser causada por diferentes cepas y de diferentes UDT que favorecen formas clínicas variables en la EC crónica, por lo que se puede evaluar la respuesta inmune y las lesiones cardíacas. La cepa Col (TcI) escapa a la respuesta inmune aguda del huésped, pasa desapercibida para las células mononucleares de sangre periférica, por lo tanto, parasita los órganos más rápidamente. Por el contrario, la cepa Y (TcII), inicia la respuesta inmunitaria específica en la fase aguda, lo que ayuda a controlar la lesión miocárdica en la fase crónica temprana (Duz et al. 2014). De manera similar, los estudios experimentales en ratones se refieren a la heterogeneidad de la EC desde diversos aspectos como daño orgánico, tropismo parasitario, respuesta inmune, fase de infección y cepa (Sales-Campos et al. 2014, 2015; Santi-Rocca et al. 2017).

Los estudios realizados por Minning y colaboradores (Minning et al. 2011), usando “microarrays” para el análisis comparativo de genomas de poblaciones de parásitos cultivados, han revelado que hay mucha más diversidad genotípica entre parásitos de *T. cruzi* que no se pueden entender utilizando métodos de genotipaje tradicionales. En particular, dentro de Tc I, los resultados de tipificación, junto con estudios basados en análisis de microsatélites de cepas de Tc I, indican que hay sustancialmente más diversidad genética entre las cepas de Tc I que entre otras UDT (Llewellyn et al. 2009). En consecuencia, se necesitarían más investigaciones sobre

aislamientos de Panamá para afirmar la variabilidad intra-UDT de los genotipos de Tc I circulantes y sus posibles ciclos de transmisión.

Tomando en cuenta que la reproducción de *T. cruzi* es principalmente clonal, con eventos ocasionales de intercambio genético que conducen a la aparición de genotipos híbridos, con notable heterogeneidad genética, *T. cruzi* podría explicar parcialmente su amplia gama de características biológicas, características eco-epidemiológicas y el amplio espectro de manifestaciones clínicas de la EC (Zingales et al. 2012).

Actualmente, no se ha observado una correlación clara entre la reactividad de las pruebas de serodiagnóstico y la diversidad molecular de *T. cruzi*. En cambio, las discrepancias entre la sensibilidad de las pruebas serológicas pueden reflejar respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos del parásito (Martin et al. 2014).

El diagnóstico se basa en la detección serológica de anticuerpos anti- *T. cruzi*, utilizando pruebas serológicas convencionales, como inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia (IFA) e inmunotransferencia. Estas pruebas detectan anticuerpos contra lisados de parásitos completos, antígenos excretados / secretados por tripomastigotes (TESA) o proteínas recombinantes. La OMS, recomienda resultados positivos de dos ensayos serológicos distintos para confirmar un diagnóstico de infección por *T. cruzi*, tal cual como hemos mostrado en nuestra investigación (Tabla 4.4). Ninguna prueba serológica para la EC tiene suficiente sensibilidad y especificidad para usarse sola; un diagnóstico confirmado se basa en resultados concordantes en al menos dos pruebas que utilizan diferentes antígenos y / o formatos (Afonso, Ebell, and Tarleton 2012). Existe evidencia de que la sensibilidad de los ensayos serológicos puede

diferir según la fuente geográfica de las muestras. Estudios en esta dirección, han descrito como dos pruebas de diagnóstico rápido diferentes, mostraron sensibilidades de 87,5% y 90% en muestras de Bolivia en comparación con 30% y 54% con las de Perú (Verani et al. 2009). Las muestras utilizadas para la evaluación serológica con pruebas rápidas coincidieron por triplicado con ELISA comercial, IFA y ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA) y, por lo tanto, pueden representar una sobreestimación de la sensibilidad de las pruebas evaluadas (Afonso et al. 2012). También se ha observado una menor sensibilidad para algunos ensayos en muestras de Panamá (Caballero E. et al. 2019; Umezawa et al. 2004) y México (Padilla-Raygoza et al. 2008). Estas diferencias pueden ser causadas por variaciones en las cepas de *T. cruzi* que habitan en estos diferentes rangos geográficos, ya que la variación antigénica entre cepas o la infectividad de las cepas pueden alterar la calidad o cantidad de la respuesta de anticuerpos, lo que lleva a sensibilidades diferentes a las pruebas de serodiagnóstico (Martin et al. 2014).

En este contexto a través de los años se han utilizado un gran número de preparaciones antigénicas para el serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi* (Kesper N. et al. 2000; Umezawa, Nascimento, and Stolf 2001). De ellas los antígenos excretorios-secretorios de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) parecen proporcionar una buena sensibilidad y especificidad como reactivos para el diagnóstico de la EC. Dentro de estos componentes se encuentran las transialidasas secretadas al medio de cultivo (Umezawa et al. 1996).

En nuestra investigación se utilizaron tres pruebas serológicas diferentes con antígenos recombinantes para las formas tripomastigote y epimastigote del parásito, mostrando una seroreactividad de 50 % (53/106) (Tabla 4.4).

Como se ha indicado previamente, para el diagnóstico de infecciones crónicas se prefieren pruebas serológicas que utilicen antígenos derivados de los parásitos, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos (Bautista-López et al. 2017).

Debido a la heterogeneidad y diferente especificidad descrita para las pruebas comerciales en el diagnóstico de la EC, junto al análisis de los sueros con las tres pruebas recomendadas por la OPS, evaluamos los títulos de anticuerpos. Dichos anticuerpos se enfrentaron a extractos del parásito, así como a los componentes antigénicos de los inmunocomplejos (IC) de los sueros chagásicos, formados por exovesículas ligadas a inmunoglobulinas del paciente (Díaz Lozano et al. 2017), tras la disociación de EVs de anticuerpos, mediante ensayos de ELISA y Western blot. Los resultados presentados en el apartado 4.1.6, indican que los sueros de los pacientes chagásicos crónicos tienen una mayor reactividad a las proteínas totales procedentes de los extractos del parásito, así como a los antígenos procedentes, ya sea de los IC circulantes o de las EVs de las formas tripomastigote de *T. cruzi*, que con los antígenos de las pruebas comerciales empleadas (Gráficas 4.1, 4.2 y 4.3).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito en EVs de *T. cruzi* la presencia de diferentes proteínas, incluida la familia de proteínas multigénicas MASP (Díaz Lozano et al. 2017).

De igual forma en este mismo artículo se demostró la presencia de IC circulantes en los sueros de los pacientes donde están presentes EVs con antígenos específicos del parásito. Dichos IC, contienen los epítomos del péptido señal de las MASP, un péptido común en todas las proteínas MASP inmaduras y que aparece tanto en pacientes asintomáticos, como con manifestaciones crónicas (cardíacas y digestivas). Las MASP constituyen una familia multigénica con más de 3000 genes específica de *T. cruzi* y carente de

ortólogos incluso en otros trypanosomatidos (De Pablos et al. 2016a). Por otra parte las EVs del parásito purificadas y el péptido señal de las MASP al igual que el péptido C terminal de dichas proteínas inhiben la acción del complemento (De Pablos et al. 2016a). Dichos antígenos son detectables en las EVs del parásito por parte de los sueros de pacientes con patologías digestivas por *T. cruzi*. Las EVs del parásito llevan proteínas inmaduras específicas del parásito, aun no procesadas quizás como consecuencia del estrés en el aparato de Golgi. Estas EVs pueden ser reconocidas por los sueros de los pacientes, las cuales podrían usarse en el diagnóstico y pronóstico del desarrollo de las patologías digestivas de la EC (Díaz Lozano et al. 2017).

En nuestros ensayos, se emplearon IC circulantes de sueros de pacientes con manifestaciones clínicas principalmente cardíacas o indeterminados, todos en fase crónica de la enfermedad (Tabla 4.2 y Tabla 4.3). Los sueros procedían de 23 enfermos con diferente situación diagnóstica, que variaban desde pacientes claramente positivos a sueros que fueron ELISA, Western blot y técnicas inmunocromatográficas negativas. En todos ellos, cuando se aislaron los IC de los sueros y se enfrentaron al suero anti-*T. cruzi*, reconocieron antígenos del parásito en dichos IC formados por las EVs. Estos resultados mostraron una elevada respuesta a los antígenos de las EVs, lo que puede constituir un método de diagnóstico en aquellos casos donde los métodos tradicionales no son capaces de demostrar la parasitación por *T. cruzi*.

De igual forma se pudo comprobar como los anticuerpos de los pacientes chagásicos crónicos, reconocían a los antígenos presentes en las EVs liberadas “in vitro” por las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (Figura 4.6). En este sentido ambas formas de detección, ya sea través de los antígenos de los IC circulantes del suero de los pacientes, formados por las EVs o los antígenos de las EVs liberadas por las formas del parásito, podrían contribuir a un

diagnostico inmunológico en la EC y en especial en aquellos casos en donde con otras pruebas se obtengan resultados dudosos.

El estudio de la diferente respuesta inmune del hospedador y en particular la respuesta de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas (Igs) ha sido considerado como un posible marcador de eliminación de los parásitos sanguíneos y o de la progresión de la patología de la EC.

Así (Brodskyn et al. 1989), llevaron a cabo una transferencia pasiva de suero inmune a ratones infectados y con parasitemia de tripomastigotes circulantes sanguíneos, dicha transferencia condujo a la eliminación rápida de los parásitos circulantes. La inoculación de las fracciones IgG1 e IgG2 acarreo la eliminación de los parásitos. Concluyendo que el “aclaramiento” inmune de *T. cruzi* se debe, en opinión de estos autores, al isotipo IgG y particularmente en la subclase IgG2.

Por otra parte (Spinella, Liegeard, and Hontebeyrie-Joskowicz 1992) llevaron a cabo estudios en ratones infectados y estudiaron el perfil de reconocimiento por parte de los diferentes isotipos de IgGs, a fin de poder detectar antígenos específicos ligados a los diferentes isotipos. Los resultados obtenidos indican, que los niveles de la subclase anti-*T. cruzi* IgG1, podrían ser considerados en la búsqueda de biomarcadores prometedores para predecir la gravedad de la miocardiopatía crónica por EC.

Otros autores (Georg et al. 2017), encontraron una correlación inversa entre los títulos de IgG1 anti-*T. cruzi* y gravedad de la enfermedad cardíaca, mientras que se detectaron títulos de IgG3 en todos los pacientes infectados por *T. cruzi*, lo que indicaría una falta de correlación de esta subclase de IgG con la progresión de la enfermedad. Estos datos sugieren que los niveles de anti-*T. cruzi* IgG1 podrían ser considerados como una herramienta adecuada

para la identificación temprana de la progresión de la enfermedad cardíaca, mientras que la IgA se puede considerarse como un marcador de la EC gastrointestinal crónica y aguda, al igual que las IgM (Primavera et al. 1990). A una conclusión similar llegaron (Cordeiro et al. 2001), donde encontraron como las IgG1 e IgG2 fueron las principales subclases en el diagnóstico de la EC, mientras que IgG1 e IgG3 fueron las predominantes con actividad lítica de las formas tripomastigotes. La reactividad de IgG2 frente a las formas epimastigotes fue mayor en los casos indeterminados y cardíacos que en los pacientes digestivos. Además, un nivel bajo de las IgG1 e IgG3 con capacidad lítica se asoció con los pacientes con cardiopatía. Por otro lado, un nivel alto de IgG1 líticos, se asoció con la mayoría de los pacientes indeterminados lo que indica que el estudio de dichas subclases puede usarse para predecir el riesgo de enfermedad cardíaca.

Al objeto de poder conocer las Igs que constituyen los IC circulantes, se disociaron los IC de las EVs de 23 sueros y se llevó a cabo el estudio de las diferentes inmunoglobulinas. Se encontró predominantemente IgG2 e IgG4 ligados a las EVs (Gráfica 4.4), mientras que la IgG3 aparecía ligada de forma minoritaria.

En investigaciones realizadas por (Verçosa et al. 2007), se describió las diferentes afinidades de las subclases de IgGs de sueros de pacientes con diferentes patologías chagásicas a diferentes antígenos recombinantes. Observando cómo las IgG2 tienen una mayor afinidad hacia los antígenos recombinantes flagelar (FRA), en los enfermos con cardiopatía, frente a la menor afinidad que muestran los pacientes indeterminados, sugiriendo estos autores que la afinidad de este isotipo de inmunoglobulina (IgG2) podría constituir un marcador de la progresión cardíaca en la enfermedad de Chagas. La afinidad mostrada por las IgG2 para el FRA (Krieger et al. 1992), del cual

no se describe la secuencia, ni el mapeado de epítomos y la que encontramos en las EVs formadoras de los IC, podría indicar que estas EVs secretadas, o bien llevan dicho antígeno o presentan epítomos comunes capaces de ser reconocidos por las IgG2. Hay que precisar que la liberación de las EVs por parte de los parásitos se lleva a cabo a través de la bolsa del flagelo y esta observación al microscopio óptico, quizás por error de la observación o falta de resolución, pudiera llevar a considerar dicho antígeno como un antígeno flagelar.

El predominio de reconocimiento de las subclases IgG1 e IgG3 identificado para antígenos recombinantes citoplasmáticos (CRA) y antígenos recombinantes flagelar (FRA) no es diferente, de las respuestas inmunes humorales identificadas para antígenos fijados, antígenos vivos e incluso antígenos de *T. cruzi* purificados (Michailowsky et al. 2003). Se sabe que, en el caso de parásitos vivos, estas subclases son capaces de activar el sistema del complemento, contribuyendo así a la resistencia del huésped a la infección (Cordeiro et al. 2001).

Dentro de los diferentes subclases de las IgGs son las IgG1 e IgG3, las que presenta una mayor capacidad de unión al C1q y posterior activación de complemento, mientras que la IgG2 muestra una capacidad moderada de unión al C1, aunque capaz asimismo, de disparar el mecanismo de lisis mediado por la unión antígeno-anticuerpo, mientras que la IgG4 prácticamente no se fija al complemento, con lo que no activa este mecanismo de eliminación de células y patógenos, mediado por la unión de los anticuerpos a las membranas del agente patógeno. Como ya hemos indicado se ha demostrado que el isotipo IgG1, está presente en altas concentraciones en pacientes que no muestran síntomas de la enfermedad y, por tanto, puede utilizarse para



predecir el riesgo de daño cardíaco en la EC (Cordeiro et al. 2001). Otro estudio, realizado por Romeiro et al. (Romeiro, Takehara, and Mota 1984) mostró que el isotipo IgG2 también exhibe actividad lítica.

Por otro lado los ensayos donde utilizan antígenos complejos han proporcionado evidencias de una respuesta inmune humoral más fuerte en pacientes que muestran formas graves de enfermedad, en comparación con aquellos que no muestran síntomas o que tienen una miocardiopatía leve (Gusmão et al. 1982). Sin embargo, no hay evidencia de qué isotipos pueden estar involucrados en la inmunopatología de las formas graves de la EC, posiblemente debido a la naturaleza compleja de los antígenos utilizados, que evita la detección de variaciones en la especificidad de los anticuerpos, para diferentes formas clínicas de la enfermedad. Otras investigaciones han sugerido que hay una asociación entre el reconocimiento de un antígeno específico y el estado clínico del paciente. Por tanto, se puede sugerir que el uso de antígenos purificados en lugar de antígenos fijos de *T. cruzi*, pueden revelar una respuesta de la subclase específica que lo reconoce (Verçosa et al. 2007).

Algunas interleucinas estimulan la expansión de las células B pre comprometidas con una subclase específica. Así, se demostró que el IFN- $\gamma$  induce la secreción de IgG2 humana por las células B que llevan la IgG2 tras la incubación con la misma "in vitro" (Kawano and Noma 1996). Mientras otras interleucinas, como la IL-4 e IL-13 son inductoras de anticuerpos IgG4 e IgE (King and Nutman 1993), y la IL-10 es un factor de cambio para IgG1 e IgG3 (Brière et al. 1994).

Las respuestas mediadas por las IgG, dependen en gran medida del tipo de respuesta inmunitaria generadas, dado que son marcadoras de la respuesta inmune que levanta el antígeno (Hjelholt et al. 2013), a su vez dependen de la

naturaleza del mismo antígeno. Esto dirige la respuesta inmune a una subclase o subclases de IgGs específicas, cuya función difiere mucho entre ellas. Por otra parte el perfil de IgGs de cada individuo es determinado por los alotipos heredados y puede influir potencialmente en la manifestación clínica de la respuesta inmune, que en última instancia difiere entre individuos y poblaciones, jugando a su vez un papel importante la glicosilación del Fc, (Vidarsson, Dekkers, and Rispen 2014).

De igual manera y usando el suero de los pacientes, se evaluó y tipificó la afinidad de las diferentes subclases a un antígeno total, constituido por un extracto de las formas tripomastigotes. También se evaluó posteriormente por ELISA las diferentes afinidades de los distintos isotipos de las inmunoglobulinas. Observamos mayor afinidad de los anticuerpos para la IgG2 e IgG4 seguida de Ig A, IgM e Ig E, lo que sugeriría una estimulación antigénica continua, por la presencia de los altos niveles de IgM. Y es de sorprender y a pesar de ser enfermos cardíacos, los elevados niveles de reconocimiento antigénico por parte de la IgA, como se ha comentado anteriormente, que podría constituir un marcador de afección intestinal. Podemos pensar que las diferentes UDTs encontradas en estos pacientes pueden ser una explicación, a pesar de que la mayoría de las afecciones son cardíacas. Por lo tanto, no se descarta un compromiso gastrointestinal y que aumentarían los niveles de estas inmunoglobulinas. Es común que la detección de IgM ocurra en pacientes con Chagas agudo, pero en el caso de nuestros resultados, son contradictorios con pacientes crónicos, a menos que estén sufriendo repetidos contactos con el parásito como consecuencia de reinfecciones.

En el apartado 4.1.7 de nuestros resultados, presentamos el reconocimiento antigénico en las EVs de las formas tripomastigotes y tanto por un inmunosuero frente a *T. cruzi*, como por parte de las diferentes inmunoglobulinas formadoras de los IC circulantes en el suero de los pacientes chagásicos crónicos. Se observa claramente la presencia de un grupo de bandas de diversos tamaños que reconocen las proteínas procedentes de EVs tanto del parásito, como EVs de los sueros de los pacientes, reconocidas por el inmunosuero. En el perfil antigénico destaca una banda de aproximadamente 80 kDa, reconocida en todas las preparaciones con EVs (Figura 4.6 y Figura 4.7). De igual manera también se estudió el reconocimiento por parte de las subclases de IgGs procedentes de un pool de los sueros (Figuras 4.8, 4.9, 4.10 y 4.11). Destaca para la IgG1 una banda comprendida entre 77 y 80 kDa, que no es reconocida por la IgG2, la cual reconoce a una banda de unos 69 kDa; para la IgG3 sería una banda de 60 kDa y para la IgG4 de 84, y 64 kDa. Lo que demuestra que la respuesta inmune de las diferentes subclases está determinada por la naturaleza de los diferentes antígenos. Lo anterior concuerda con el estudio de Ramirez y colaboradores, quienes indican que las EVs son capaces de modular el sistema inmunológico de los pacientes infectados y por lo tanto proporcionan pistas importantes sobre la patofisiología de la EC (Ramirez et al. 2017). En todos los casos el control del lisado de las formas tripomastigotes proporcionó un perfil de bandas positivo. A fin de poder concluir con la naturaleza de los diferentes antígenos harán falta futuros estudios donde se puedan identificar por secuenciación los diferentes antígenos reconocidos.

Las EVs han sido asociadas a la inmunomodulación y a la supresión de las respuestas inmunitarias activas de las células T al inducir la interrupción en del ciclo celular (Nunes et al. 2013). También se ha propuesto que las

proteínas del parásito secretadas en estas EVs están implicadas en la adaptación metabólica al entorno del huésped y la invasión de tejidos, en donde las proteasas pueden desempeñar un papel importante (McKerrow et al. 2006). En los últimos años se ha revelado que las EVs liberadas por *T. cruzi* son productos de secreción del parásito, las cuales proporcionan un mecanismo para empaquetar y proteger “un conjunto de moléculas cargo” lo que permiten en definitiva la posterior absorción y entrada del parásito en las células huésped (Coakley, Maizels, and Buck 2015).

El contenido o “carga” son proteínas que se consideran marcadores pan-EV (es decir, comunes para la mayoría de los EV), y las modificaciones postraduccionales de dichas proteínas reflejan específicamente la localización de la vesícula, el origen celular y el mecanismo de secreción. En general, las EVs son ricas en proteínas del citoesqueleto, citosólicas, chaperonas de choque térmico y de membrana plasmática, así como en proteínas implicadas en el tráfico de vesículas, mientras que las proteínas de orgánulos intracelulares son menos abundantes (Yáñez-Mó et al. 2015).

En estudios previos, se ha descrito que durante la infección tanto el parásito como las células hospedadoras liberan EVs y las EVs del parásito, al menos, confieren protección contra el ataque del complemento (Díaz Lozano et al. 2017; De Pablos et al. 2016a), facilitando la invasión de *T. cruzi* a las células de mamíferos (Cestari et al. 2012). Otros autores, han mostrado algunas características de las EVs liberadas por *T. cruzi* asociadas con la virulencia del parásito, las cuales estarían involucradas en la transferencia de material genético entre los parásitos y las células huésped, y capaces de activar receptores tipo Toll (TLR) en los macrófagos para así inducir la producción y liberación de citoquinas (Bayer-Santos et al. 2013).

Al objeto de conocer la biodistribución en los diferentes órganos de las EVs e IC (EVs-IgG) en un modelo animal, se llevó a cabo el seguimiento y biodistribución de las EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* en ratones CD1, a lo largo del tiempo, posterior a la administración intravenosa de las mismas. Las EVs luego de ser aisladas “in vitro”, algunas fueron sometidas a tratamientos térmicos (80°C) e interaccionadas con anticuerpos de un suero de ratón anti-*T. cruzi*, a fin de formar IC, para luego marcarse con un colorante lipófilo en el infrarrojo cercano (DiR).

Nuestros resultados (Figura 4.12) muestran la biodistribución de forma comparativa de las EVs e IC “in vivo” donde se demuestra cómo se ve afectada la distribución y depósito de las EVs por el tratamiento térmico. El perfil general de biodistribución de EVs se mantuvo prácticamente sin cambios durante las primeras 24 horas con un ligero incremento de fluorescencia en los dos grupos EVs y IC-EVs. Sin embargo, a partir de las 48 horas se detectaron cambios (disminución de la media de fluorescencia) en el grupo de ratones sin tratamiento térmico, tanto por parte de las EVs como de los IC con respecto a los tratados térmicamente (Figura 4.12a y Figura 4.12c). Lo que podría indicar que algunos o los componentes de las EVs al inactivarse por calor evitan que sean procesados por las células o permiten que dichas EVs permanezcan en los tejidos sin integrarse en las células. En este sentido, los niveles de fluorescencia mostrados por las EVs formando IC, fue mayor que cuando se inocularon con EVs libres, quizás debido a que las partes Fc de los anticuerpos que integran el IC favorezcan la opsonización y captación de las EVs-IgGs. Lo que parecería mostrar la participación activa de las inmunoglobulinas del hospedador, en la interacción EVs-célula facilitando de una forma más rápida la integración y permanencia en los tejidos.

En el seguimiento de la biodistribución de EVs en los diferentes órganos a lo largo del tiempo, observamos que los tejidos donde se produjo la mayor captación de fluorescencia, fue donde existe la mayor concentración de macrófagos tisulares, (células de Kúpffer en el hígado o los macrófagos esplénicos fundamentalmente en la cápsula del bazo), primeramente el hígado, seguido por el bazo y tracto gastrointestinal (Figura 4.14 y Figura 4.15) (Wiklander et al. 2015).

La intensidad de fluorescencia del hígado y bazo fue mayor a las 24h en las EVs que tenían tratamiento térmico (80 °C) en comparación con los no tratados, Figuras 4.15. La fluorescencia se mantuvo significativamente alta durante 24 h y 48 h, detectándose fluorescencia aparte del hígado y bazo en el aparato digestivo. Mientras que los niveles de fluorescencia (ROI) de los que se inocularon con IC (EVs- IgG) tanto en bazo como en hígado fueron menos sensibles, lo que parecería indicar que hay mayor captación por parte de las células en las preparaciones donde se incluyen las inmunoglobulinas.

Es importante resaltar que algunos estudios indican la rápida absorción de EVs por el sistema reticuloendotelial (SER), sugiriendo que la función principal de las EVs posiblemente sea, el intercambio de información tanto con células vecinas en el lugar de la liberación, como con las células del sistema inmunológico, ya que, como se ha comentado antes las EVs participan en muchos procesos de regulación inmunológica (Smyth et al. 2015), lo que quizás explica los resultados obtenidos. Todos estos eventos implican la participación de la inmunidad innata y adquirida en la rápida absorción de EVs, donde los factores del complemento podrían jugar un papel importante, en especial cuando las EVs provienen de un organismo diferente al propio sistema inmune. En este sentido los anticuerpos ejercen un rol primordial, ya

que se ligan a la fracción C1 de la cascada de complemento, donde las EVs se unen a proteínas del complemento *in vitro* e *in vivo* (Aung et al. 2011).

A fin de poder penetrar y establecerse en el interior de las células en las que parasita y se multiplica como amastigotas, *T. cruzi* ha desarrollado una variedad de estrategias que implican la presencia de un gran número de moléculas de la superficie celular del parásito (Alves and Colli 2007; Paranaíba et al. 2019). Estas moléculas incluyen miembros de una serie de proteínas tales como las *trans*-sialidasas (TS / gp85); las mucinas; las proteínas de la superfamilia de MASP y proteasas implicadas en la adhesión e invasión a la célula por las formas infectivas del parásito (Cuevas, Cazzulo, and Sánchez 2003).

Publicaciones previas han mostrado como algunas de esas moléculas pueden actuar como agentes pro inflamatorios durante la respuesta inmune innata, lo que lleva a la producción de óxido nítrico (NO), IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  a través de la estimulación de los TLR2 por parte de los macrófagos (Almeida and Camargo 2000). Por otro lado gran parte de los principales componentes de la superficie del parásito, como son las glicoproteínas TS / gp85, las mucinas, los glicoinositolfosfolípidos, glicosilfosfatidilinositol (GPI), las proteasas de superficie GP63, se han encontrado en las EVs del tripomastigote (Paranaíba et al. 2019), al igual que las MASP (Díaz Lozano et al. 2017; De Pablos et al. 2016b).

Con el objetivo de conocer la respuesta inmune, que son capaces de inducir las diferentes preparaciones de las EVs usadas en los estudios de biodistribución, se evaluó la expresión de un panel de interleucinas correspondientes a las respuestas inmune Th1/ Th2 /Th17/ Th9. Los estudios se realizaron a lo largo de 24, 48 y 72 h de la inoculación de las EVs, en hígado y bazo que son los órganos donde vimos que se depositan mayormente.

Durante el inicio de la infección en la EC, el sistema inmunológico innato juega un papel importante en el control de la replicación y diseminación del parásito en los tejidos del huésped, con la participación de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 y la participación de células inmunes como macrófagos, NK y células dendríticas (Zanluqui 2015). Más adelante en la infección, se desarrolla la inmunidad adaptativa, que potencia la inmunidad innata. Se establece una respuesta T helper 1 (Th1) polarizada fuerte y persistente contra los parásitos intracelulares (Hoft et al. 2000), y una respuesta inmune anti- *T. cruzi* CD8 que se centra en los epítomos inmunodominantes del parásito. Estas respuestas de las células T son importantes para controlar la parasitemia, el parasitismo tisular y la activación de las células B policlonales con la producción de anticuerpos. Sin embargo, debido a los mecanismos inmunes de evasión de *T. cruzi*, esta intensa respuesta no logra eliminar la infección parasitaria, lo que lleva a su persistencia y desarrollo de la fase crónica de la EC (Lovo-Martins et al. 2018).

Estudios en modelos experimentales en ratón han demostrado que los macrófagos, las células dendríticas y las NK, desempeñan un papel importante en el control de los parásitos a través de una reacción inflamatoria intensa, acompañada de una regulación positiva de citocinas y quimiocinas (Tanowitz 2012), (Machado et al. 2012). Estos macrófagos son activados induciéndose la liberación de citocinas, cruciales para la estimulación de la inmunidad innata (Almeida et al. 2000).

En las gráficas del apartado 4.3 se observa un aumento de la respuesta Th1 en hígado y en bazo (Gráficas 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10), donde se observa un aumento relativo de la IL2, IL12 en hígado, mientras que en bazo es más manifiesta el un aumento considerable de la IL12 IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  a las 48 h de la inoculación. En este sentido en bazo la respuesta Th2 es menos potente, mientras que en



hígado es más elevada en especial a las 72 h, con un aumento de la IL-10, quizás para compensar la subida de la IL-12, que es una interleucina reguladora de la expresión del Interferón gamma (IFN $\gamma$ ). De igual forma se puede observar cómo mientras en el bazo hay una elevación de la respuesta Th9 desde las primeras horas (24h), en hígado dicha respuesta no se observa. Pero en su lugar hay un aumento de la respuesta Th17, en especial de las interleucinas IL-21, IL-23 e IL-25. Como ya se conoce, la IL-23 es una interleucina capaz de mantener la respuesta de las células Th17, no induciendo directamente la IL-17 (Stritesky, Yeh, and Kaplan 2008). La IL-23 induce la diferenciación de las células “naive” CD4+ T en células T helper (Th17/ThIL-17) que van a producir IL-17 y IL-25 (Iwakura and Ishigame 2006). En definitiva la IL-23 “estimula” y mantiene las células capaces de producir la IL-17 (Gomez-Samblas et al. 2018). La diferenciación de Th17 está mediada por los factores de transcripción ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$ , que dependen de STAT-3 y requieren de la intervención de la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, TGF- $\beta$ . La IL-17 ha sido considerada como una interleucina clave, capaz de aumentar en los primeros momentos de la infección por *T.cruzi*, incluso de ser producida por células linfoides ROR  $\gamma$ t negativas (Bermejo et al. 2013). La IL-17 es inducida por algunas de las moléculas enzimáticas que portan las EVs de los Tripanosomas como son las transialidasas (Guedes et al. 2010; Miyazaki et al. 2010). Por otra parte la IL-21 que aparece aumentada en hígado, tiene efectos reguladores en las células del sistema inmune, incluidas las células NK, y las células T citotóxicas que pueden destruir las células infectadas (Parrish-Novak et al. 2000, 2002). La IL-21 y su receptor IL-21R, es una interleucina pleotrópica, se expresa en gran medida en órganos parasitados tanto en humanos como en modelos murinos con enfermedades parasitarias (Solaymani-Mohammadi, Eckmann, and Singer 2019), a la IL-21, también se la ha correlacionado con

la gravedad de la EC en pacientes crónicos (Natale et al. 2018). El papel del IL-21 / IL-21R en la patología crónica de la EC y los mecanismos por los cuales la vía de señalización IL-21 / IL-21R pueden mediar la patogénesis de las infecciones agudas y crónicas por *T. cruzi*, aún no están claros, bien pudiera ser que los mecanismos involucrados en la elevación de dicha interleucina, se deba a que las EVs del parásito interactúan con las células hepáticas de Kupffer. Sin embargo, el perfil de interleucinas que aparece en los órganos de los animales cuando fueron inoculados con las EVs “inactivadas” por calor no están relacionada a cuando fueron inoculados con EVs sin calentamiento previo. Las EVs “inactivadas” muestran en hígado un perfil típicamente Th1 donde las IL-2 aumenta a lo largo del tiempo al igual que la IL-6, mientras que la IL-12 e  $INF\ \gamma$ , aumenta desde las primeras 24 h, mientras el  $TNF\alpha$  disminuye con el paso del tiempo. En bazo, el perfil de interleucinas asociadas a una Th1 se incrementa a las 48h e especial la IL-12 e  $INF\ \gamma$  y e  $TNF\ \alpha$  a las 72 h, si bien la IL-6 permanece baja en todo momento, lo que contrasta con la IL-12, y la inducida por la IL-12, el  $INF\ \gamma$  que aumenta como ya se ha señalado a las 48 h. Es de destacar que el  $TNF\alpha$  se dispara bruscamente a las 72 h de la inoculación. Dentro de la respuesta Th2, es IL-15 la que aparece muy aumentada a las 24h, mientras que el  $TNF\ \beta$  aumenta de una manera discreta a lo largo de los días post inoculación. Sorprendentemente la IL-9 correspondiente a la Th 9, va aumentando hasta mostrar niveles relativamente elevados al igual que ocurre con la IL-25 perteneciente al grupo de las Th17. La regulación de la expresión de la interleucina IL-9, una citocina tradicionalmente considerada Th2, y actualmente la única perteneciente a la Th9, sigue sin estar del todo claro, pero (Angkasekwinai et al. 2010) encontraron como las células T que expresan IL-9 generadas “in vitro” en presencia de  $TGF\ \beta$  e IL-4, expresan altos niveles de ARNm para el receptor

IL-17RB y el receptor de la IL-25. El tratamiento de estas células con IL-25 potencia la expresión de IL-9 “in vitro”. Lo que indicaría que la elevación de esta interleucina conlleva al incremento de la respuesta Th9 (IL-9). Situación similar ocurre con la IL-15, también una citocina Th2 que eleva el número de eosinófilos y que aparece regulada cuando se incrementan los niveles de IL-9, en las parasitosis intestinales por nemátodos (Gomez-Samblas et al. 2017).

Cuando la inoculación de los ratones se realizó con EVs formando IC, el perfil de respuesta en el bazo fue combinada, h1 Th2 y Th9 (Graficas 4.13 y 4.14). En ella aparece una elevación de IL-12, seguida del aumento como corresponde, de la respuesta IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  que es una Th1. Un perfil clásico donde la elevación de la IL-12 potencia la producción del IFN $\gamma$  y este al del TNF $\alpha$  (Mehta et al. 2017; Okamura et al. 1998). Por otra parte, la elevación de estas interleucinas Th1, implica una regulación por parte de la Th2 con el aumento de TGF  $\beta$  (Park, Letterio, and Gorham 2007) y de la IL-13 (Bian et al. 2015), donde una posible regulación de la IL-13 se ejerce por parte del aumento de IFN  $\gamma$  (Daines and Khurana Hershey 2002). En este sentido el aumento observado de la Interleucina IL-9 conllevaría a la elevación de la IL-15, e indirectamente a la elevación de la IL-13, como ya ha sido mencionado, en definitiva un aumento de una Th2. Las respuestas Th17 reflejadas por el aumento de la IL-17, IL-21 e IL-25 permanecen discretas, no manifestándose la expresión de la IL-23.

La interleucina-38 (IL-38), que aparece en el perfil de expresión de las interleucinas expresadas tras la inducción con los IC, es un miembro de la familia de la interleucina-1 (IL-1), importante para la inflamación y la defensa del huésped. Esta citocina se le ha denominado también como IL-1F10 en humanos. La IL-38 es producida por células que se unen al receptor de IL-1 tipo I. Se expresa en el epitelio basal de la piel, en las células B proliferantes

de la amígdala, en el bazo y en otros diferentes tejidos. Esta citocina juega un papel importante en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa. La IL-38 descubierta recientemente se la considera un inhibidor potencial de las familias de receptores IL-1 y tipo “Toll”. De manera que ejerce propiedades antiinflamatorias, especialmente en los macrófagos, al inhibir la secreción de citocinas pro inflamatorias, lo que conduce a una maduración reducida de los linfocitos T-Th17. Se produce en condiciones como apoptosis, necrosis o inflamación, aunque aún se desconoce la función biológica de la IL-38. Además, aún no se ha identificado su receptor, aunque se han propuesto tres receptores candidatos: IL-1R1, IL-36R e IL-1RAPL1 (Garraud et al. 2018). La IL-38 inhibe la producción de citocinas de células Th17 como la IL-17 e IL-22. También se ha encontrado que inhibe la producción de IL-8 inducida por IL-36 $\gamma$ , inhibiendo así las respuestas inflamatorias (Yuan et al. 2015).

El perfil de expresión de las citocinas a nivel hepático cuando la inoculación se realizó con IC, muestra si se nos permite decir, un perfil más clásico a lo esperado (Gráficas 4.11 y 4.12). Aparece una elevación de las respuestas Th1 en las primeras 24 h de la inoculación, con aumento de la IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-6, acompañado de elevación de una respuesta Th2, con una discreta elevación de IL-4, IL-10, IL-15 y aumento de la respuesta de la TGF $\beta$ . De igual manera ocurre con la respuesta Th1, en las primeras 24 horas de la inoculación. Es importante destacar la elevación de la IL-9 y en especial de las IL-21 e IL-25. Ambas como ya se comentó, con posibilidades de compensar una respuesta inflamatoria que no se ve reflejada con la expresión de IL-17 y donde no se manifiesta ni la expresión de IL-17 ni la IL-38 como ocurría en el bazo donde si se detectó su expresión. El destacado aumento de la TGF $\beta$  que aparece tanto en bazo como en hígado, de forma más discreta, junto a IL-13 que se expresaría para intentar compensar la fuerte respuesta

inflamatoria Th1 que se observa (Grunwell et al. 2018; Moriwaki et al. 2011). La elevada expresión de IL-9 en bazo con la inoculación del IC (EVs-IgGs), podría también facilitar la disminución de la respuesta inflamatoria Th1, semejante a los que ocurre en otras enfermedades como la tuberculosis, donde una respuesta IL-9 se asocia con una respuesta inmunitaria Th1 elevada y donde la administración exógena de IL-9 lleva aparejada la reducción de los niveles de expresión del mRNA del IFN  $\gamma$  (Wu et al. 2008).

Actualmente se ha descrito como las células tratadas con IL-9 reducen drásticamente las fibras de estrés de actina, inhiben la contractilidad, reduciendo o inhibiendo la potencial migración de las células, al igual que bloquean la acción sobre el citoesqueleto que ejerce el IFN- $\gamma$  (Das et al. 2019). Es importante mencionar, como ya se ha descrito en trabajos previos, que el citoesqueleto de actina se desorganiza de forma temporal, por la acción que ejerce las EVs de *T. cruzi*, (Retana Moreira, Rodríguez Serrano, and Osuna 2019), lo que indica una posible expresión de la IL-9. La IL-9 es una molécula clave que regula la diferenciación de las células Th17 y la función de las células Treg productoras entre otras del TNF $\beta$ . En este sentido la IL-9, producida predominantemente por células Th17, se asocia con el TGF- $\beta$ 1 para diferenciar células T CD4 + vírgenes en células Th 17 y células en las que esta mantenida su expresión por la acción de la IL-23. De esta forma la IL-9 facilita las funciones supresoras de las células Treg FoxP3 + CD4 + “in vitro” y la ausencia de señalización de IL-9 debilitaría la actividad supresora de las Tregs “in vivo”, lo que provoca un aumento de las células efectoras (Elyaman et al. 2009).

El mecanismo de los efectos de IL-9 sobre la Th17 y Tregs es a través de la activación de la señalización y se realiza mediante los receptores STAT3 y

STAT5, por lo que destaca el papel de la IL-9, como regulador frente a los mecanismos protectores de las respuestas inmunitarias

Curiosamente la elevación de la expresión de las IL-21, IL-25 e IL-38 aparece en el bazo de los animales a los que se le administraron los IC (EVs-IGGs) (Gráfica 4.13 y 4.14).

Cuando se compara la expresión tras la inoculación con IC formados con EVs “inactivadas” por calor e IC no inactivados, vemos que a nivel hepático la expresión de las Th1 no varía sustancialmente salvo, una elevada expresión del TNF $\alpha$  en los IC con EVs tratadas térmicamente (Gráfica 4.11 y 4.12). Mostrando una marcada elevación de la IL-38, que no aparece en los IC (IgGs-EVs) no tratados, lo que parecería mostrar que alguno de los componentes sensibles a la temperatura, impiden la elevación de la expresión de esta interleucina, o que la elevación de la expresión del TNF $\alpha$  es la responsable de dicha sobreexpresión, al igual que la pleotrópica IL-21 y en especial la IL-25 inductora de una Th2. De hecho en un estudio donde se induce la fibrosis pulmonar mediante bleomicina, (Xu et al. 2021), vieron como la expresión de IL-38 atenuó la inflamación pulmonar y el daño por fibrosis, disminuyendo la producción de citocinas pro inflamatorias y profibróticas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, la proteína quimio atrayente de monocitos-1 y el TNF- $\alpha$ . Con seguridad un mecanismo inverso de regulación debe tener lugar donde los elevados niveles de TNF $\alpha$  disparen la expresión de la IL-38 a fin de compensarlos.

El desarrollo de inflamación cardíaca en la EC se ha asociado con una alta producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y una baja producción de IL-10 durante la fase aguda de la infección, independientemente de la cepa utilizada en la infección experimental (Guedes et al. 2007), por lo que la elevación de la inducción por el hígado de IL-38 podría tener efectos beneficiosos en la EC cardíaca.

La expresión de interleucinas en bazo cuando se inocularon las muestras de IC produjo perfiles de expresión diferentes, ya que se observa elevación en ambos tipos de muestras inoculadas a las 72 h, de la IL-12, IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ . La expresión es más marcada para las correspondientes a la respuesta Th1, para aquellos ratones donde se inocularon los IC con las EVs tratadas por calor. También se observó una elevación de la IL-2, que se produce en macrófagos activados por virus, bacterias y protozoos intracelulares, y pertenece a la respuesta Th1 (Komastu, Ireland, and Reiss 1998), dando como resultado la proliferación de células NK y potenciando la respuesta Th1 y INF- $\gamma$  en una respuesta Th1 pro inflamatoria. En estos ratones se pudo a su vez comprobar como la respuesta Th2 aparece más elevada cuando se inocularon los IC con EVs (no tratadas por calor). Los niveles de expresión de IL-4, IL-15 y TGF $\alpha$  fueron significativamente más altos en los tratados por calor que en los no tratados, con órdenes de magnitud de unas 5 veces. Es importante resaltar también la elevación de las IL-17, IL-21 y la IL-25 que incrementa su expresión desde las primeras 24h, tras la inoculación de los IC formados con las EVs “inactivadas”, por lo que parece indicar que este inóculo levanta una fuerte respuesta inflamatoria Th1/Th17. Dicha respuesta se intenta compensar con la elevación de la Th2 y en concreto IL-4, IL-10, IL-13, IL-15 y TGF $\beta$ . Así como una elevación de la Th9 que también se manifiesta en los IC no tratados térmicamente.

Se conoce que el desarrollo de inflamación cardíaca se asocia con una alta producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y una baja producción de IL-10 durante la fase aguda de la infección, independientemente de la cepa utilizada en la infección experimental (Guedes et al. 2007).

La IL-10 es una citocina involucrada en los mecanismos inmunomoduladores durante la EC crónica. La capacidad de producir IL-10 en la fase crónica puede

ser importante para modular el delicado equilibrio entre las citocinas inflamatorias y antiinflamatorias que evitan el daño tisular. Un aspecto importante de las EVs es su capacidad para modular los eventos en la fase crónica de la enfermedad debido a la producción de IL-10 por las células T y B (Nogueira et al. 2015).

En conjunto con modelos experimentales de infección por *T. cruzi* se ha demostrado que en la fase aguda tras la infección de los animales, se desencadena una respuesta inflamatoria, con producción de citocinas inflamatorias Th1, como IFN-gamma y TNF-alfa, que deben activar las células para eliminar el parásito (Teixeira, Gazzinelli, and Silva 2002). Otros estudios en la fase aguda de la EC también han demostrado la producción de citocinas inflamatorias, la cual se ha asociado con el control de los parásitos (Dutra et al. 2014).

Las citocinas producidas durante la infección por *T. cruzi* (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  TGF- $\beta$  e IL-10) son capaces de inducir o regular la producción de quimiocinas en macrófagos y a los miocitos cardíacos infectados. Dichas interleucinas también afectan la proliferación de células T, para dar una respuesta Th1 / Th2 (Machado et al. 2000). Otras investigaciones han sugerido que las quimiocinas contribuyen a la patogenia de la infección por *T. cruzi* debido a sus efectos sobre la migración y activación de leucocitos (Machado et al. 2012).

Estudios de proteómica han revelado que las EVs de diferentes cepas de *T. cruzi* pueden desencadenar diversas respuestas inmunológicas innatas y por lo tanto, diferentes patrones inmunológicos en modelos murinos. Incluso se ha demostrado que las EVs pueden presentar tropismos intrínsecos por algún órgano en particular (Ribeiro et al. 2018). Adicionalmente, las EVs de distintas cepas de *T. cruzi* conocidas (Yu Yu, Colombiana CL-14 y cepa Y)



muestran diferentes propiedades biológicas y de inmunomodulación, (Nogueira et al. 2015; Ribeiro et al. 2018). Por lo tanto, la cantidad y quizás el contenido de las EV, podría ser uno de los factores involucrados en la infectividad de las diferentes cepas de *T. cruzi* y la inmunopatología de la EC, ya que esas estructuras contienen una serie de componentes con actividades pro inflamatorias (Nogueira et al. 2015).

Por último y no menos importante, estudios han demostrado que la IL-17 juega un papel importante en la EC humana, así como en el desarrollo de infección por *T. cruzi* en modelos murinos, lo que sugiere una asociación entre la cardioprotección y la expresión de IL-17 (Sousa et al. 2017). En respuesta a la infección por *T. cruzi*, la IL17-A induce una rápida cascada pro inflamatoria de quimiocinas y citocinas que facilita el reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos necesarios para el control temprano del patógeno por parte del sistema inmunológico. En la fase crónica de la enfermedad, varios estudios sugieren que la progresión clínica de la miocardiopatía de Chagas implica la sobreexpresión de IL-17 por células Th17 y células B incluso R $\gamma$ T - y células B circulantes (Strauss et al. 2020).

De hecho, durante la infección por *T. cruzi*, solo una producción equilibrada de citocinas inflamatorias (Th 1) y antiinflamatorias (Th 2 / reguladoras) permiten controlar la propagación del parásito sin comprometer la integridad de los tejidos del huésped. La descripción de Th17, y la producción de IL-17, ha impulsado la revisión sobre los mecanismos que median la protección y la inmunopatología de la infección con protozoos intracelulares (Amezcu Vesely et al. 2020). Lo que, sumado a los datos obtenidos en nuestros estudios, con los elevados niveles y producción de IL9, IL21, IL25 y en especial la IL38 llevan a un completo replanteamiento de la homeostasis inmunológica de la EC.

En conjunto, los hallazgos de este estudio refuerzan el concepto de que un delicado equilibrio entre las citocinas reguladoras e inflamatorias representa un elemento clave en el establecimiento de las distintas formas de la EC crónica, ya sea en modelos experimentales murinos como humanos.

Para la caracterización de las EVs de *T. cruzi* Pan4, empleadas durante el desarrollo de los diferentes experimentos de esta Tesis, previamente se utilizaron los protocolos de cultivo, liberación y purificación establecidos por nuestro grupo de investigación con algunas modificaciones (Díaz Lozano et al. 2017; De Pablos et al. 2016b; Retana Moreira et al. 2019).

En nuestro laboratorio se estableció la centrifugación diferencial como método de elección para la purificación de EVs, ya que es considerada la técnica estándar de oro para el aislamiento de EVs. Johnstone y colaboradores (1987), fueron los primeros en desarrollar la centrifugación diferencial para aislar EVs del medio de cultivo de reticulocitos (Johnstone et al. 1987). Posteriormente Thery (2001) la optimizó con un conjunto de centrifugaciones crecientes de  $300 \times g$  a más de  $100,000 \times g$  para descartar las células vivas / muertas y restos celulares (cuerpos apoptóticos) y posteriormente separar los EVs. Este es el protocolo más utilizado para la purificación de EVs a partir de medios de cultivo celular o fluidos corporales (sangre, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo) (Théry et al. 2001).

Es importante mencionar que las EVs de ambas formas del parásito (tripomastigotas y epimastigotas), una vez obtenidas, purificadas y cuantificadas fueron utilizadas para ensayos de ELISA, inmunización de animales, Western Blot, experimentos de microscopía de diferentes resolución (confocal, SEM, TEM y AFM) de manera que fue elemental e indispensable su caracterización.

La evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las EVs, como el tamaño, la forma, la carga superficial, la densidad y la elasticidad, es necesaria para determinar sus interacciones biológicas y por tanto, la determinación precisa de estas, por lo que muchos de estos procedimientos y técnicas, se han utilizado de forma rutinaria durante todo el proceso de experimentación (Gurunathan et al. 2019).

Con el objetivo de describir las características específicas de las EVs de cada estadio de *T. cruzi* se utilizó como se ha indicado la técnica de “Dynamic light scattering” (DLS), una herramienta muy útil para evaluar la distribución y el tamaño de los EVs. La mayor ventaja del método DLS es su capacidad para medir partículas que van desde 1 nm a 6 µm (Szatanek et al. 2017). Esta técnica fue utilizada para determinar los tamaños aproximados de las EVs tanto de tripomastigotes como epimastigotes empleadas en los diferentes experimentos (Figura 4.17 y Figura 4.18).

Para realizar la caracterización de las proteínas marcadoras del parásito asociadas con los EV, como lo son la *trans*-sialidasa y la cruzipaína, se realizaron ensayos de inmunotransferencia que permitieron caracterizar mediante este procedimiento el contenido proteínico de las EVs de los tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* (Figuras del apartado 4.2.2).

Como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, la superficie celular de *T. cruzi* está cubierta por una amplia gama de moléculas que incluyen miembros de la familia proteica *trans*-sialidasa (TS/ gp85), glicoproteínas similares a mucina, proteínas de la superfamilia de proteínas asociadas a mucina (MASP) y proteasas implicadas en la adhesión e invasión a la célula del huésped por las formas infectivas del parásito, como es el caso de la cruzipaína (Czp) (Brossas et al. 2017a; Ferrão et al. 2015). Estudios de

proteómica indican variaciones en el contenido de las EVs de tripomastigotes y epimastigotes de las distintas cepas (Brossas et al. 2017a; Nogueira et al. 2015; Ribeiro et al. 2018), para lo cual se utilizaron anticuerpos específicos en la identificación de las proteínas (Figura 4.19) *trans*-sialidasa (Figura 4.20), cruzipaína (Figura 4.21) y calmodulina (Figura 4.22).

Al comparar nuestros resultados de los perfiles de expresión de proteínas de las EVs de la cepa Pan4 con los identificados por Ribeiro y colaboradores en las cepas YuYu y Y, encontramos patrones de reconocimientos muy homogéneos tanto para las proteínas totales como para la *trans*-sialidasa y cruzipaína (Ribeiro et al. 2018).

La identificación de estas proteínas, *trans*-sialidasa y cruzipaínas en EVs de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* Pan4, fue crucial en nuestros ensayos de inmunotransferencia, ya que a partir de allí nos planteamos nuevos experimentos de inmunomarcaje para el análisis y estudio de los mecanismos de captación en la interacción EVs-célula.

Los métodos para caracterizar las EVs se ha expandido a medida que ha aumentado el interés en estas. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, la microscopía electrónica (ME) sigue siendo el método más adecuado para la visualización de las EVs con una resolución suficiente para evaluar su morfología, así como la discriminación entre ellos y los posibles contaminantes que a menudo se encuentran en los aislamientos de EVs (cuerpos apoptóticos proteínas precipitadas, lipoproteínas y / o partículas virales, etc.) (Kotrbová et al. 2019). La caracterización de las EVs de *T. cruzi* Pan4 se realizó a través de SEM (Figura 4.23) identificando tamaños muy similares a las descritas para otras cepas (Nogueira et al. 2015; Ribeiro et al. 2018). Por otro lado la microscopía electrónica de transmisión (TEM) sigue siendo el método estándar de oro para la visualización de estas nanopartículas

(Kotrbová et al. 2019). A través de TEM mediante tinción negativa, nos permitió caracterizar las EVs de tripomastigotes y epimastigotes comparándolas con sus respectivos tamaños y formas (Figura 4.24). Si bien es cierto que la caracterización morfológica y estructural de las EVs se realiza principalmente por técnicas de inmunotransferencia con biomarcadores individuales, análisis de seguimiento de nanopartículas, DLS (evalúan la distribución del tamaño de las EVs) y microscopía electrónica, menos del 10% del trabajo realizado con EVs ha empleado microscopía de fuerza atómica (AFM) (Gardiner et al. 2016). En comparación con las otras técnicas, la AFM puede al mismo tiempo medir la distribución del tamaño de las vesículas, mapear sus propiedades mecánicas con precisión manométrica y también utilizarse para el análisis funcional del contenido de proteínas de la membrana externa de EVs, a través de puntas recubiertas de anticuerpos. Además, mediante el uso de superficies recubiertas de anticuerpos específicos (mica y vidrio), se pueden capturar diferentes subpoblaciones de EVs y analizarlas por AFM (Parisse et al. 2017).

Una característica importante de la técnica AFM en nuestros ensayos incluye, su capacidad para medir muestras en sus condiciones nativas con una preparación de muestras minimizada, es decir solo 10  $\mu$ L de EVs depositadas sobre el sustrato (mica), lo que facilitó la caracterización de las EVs en este trabajo (Szatanek et al. 2017).

Mediante esta técnica caracterizamos las EVs de tripomastogotes de *T. cruzi*, registrando las interacciones entre el “cantilaver” y la superficie de la muestra mostrándonos la topografía tridimensional (3D) y tamaño aproximadamente entre 30-100 nm (Figura 4.25).

Las células parecen captar las EV mediante una variedad de vías endocíticas, incluida la endocitosis dependiente de clatrina, y vías independientes de la clatrina como la captación mediada por caveolina, macropinocitosis, fagocitosis e internalización y/o vertido de sus componentes mediada por las balsas de lípidos de la membrana celular (Mulcahy, Pink, and Carter 2014). De hecho, parece probable que una población heterogénea de EVs puede entrar en una célula a través de más de una ruta. El mecanismo de captación utilizado por las EVs puede depender de las proteínas y glicoproteínas que se encuentran en la superficie tanto de la vesícula como de la célula diana (Mulcahy et al. 2014).

En esta Tesis Doctoral se presentan resultados que analizan y describen los posibles mecanismos por la cual las EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* son internalizada por la célula receptora (Célula Vero y RAW 264.7), haciendo uso de diversas técnicas de microscópicas. Las células Vero son una línea celular que derivan de un cultivo procedente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), utilizadas en la investigación a nivel de biología celular (Ammerman, Beier-Sexton, and Azad 2008). Las células Vero fueron utilizadas tanto para cultivo de las formas tripomastigotas como para el estudio de los mecanismos de internalización de EVs que discutiremos a continuación. Sin embargo las células RAW 264.7 son una línea celular de monocitos / macrófagos derivada de ratones BALB / c que se originaron a partir de la línea celular transformada con el virus de la leucemia de Abelson (Taciak et al. 2018). Estas células se describen como un modelo apropiado de macrófagos que mantienen su capacidad fagocítica, pinocitosis y fagocitosis (Taciak et al. 2018), por lo cual fueron empleadas para estudiar la interacción EVs- célula y las posibles vías de captación.

Con el fin de comprobar la adhesión de EVs de tripomastigotes de *T. cruzi*, la ubicación física y las interacciones con la superficie de las células se evaluaron estas interacciones en tres tiempos (1, 5 y 10 minutos), utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 4.26). Se observó la presencia de vesículas en forma redondeada con el tamaño esperado para los EVs (30–100 nm) en la superficie de su membrana plasmática (Figura 4.27)

Para comprender si las interacciones físicas ocurrieron preferentemente entre EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* y células Vero, observamos cuidadosamente su interacción con la superficie de las células Vero en un experimento piloto (Figura 4.27), viendo algunos cambios morfológicos de la célula, como la aparición de proyecciones citoplasmáticas en su superficie que la mostraba con forma rugosa. En los resultados obtenidos observamos la unión de las EVs a la superficie celular, pero sin la certeza de que eran EVs de *T. cruzi*, ya que podían ser EVs procedente de la célula. Posteriormente se decidió hacer un inmunomarcaje con oro coloidal para corroborar la adhesión específica de las EVs de tripomastigotes de *T. cruzi* a la célula Vero.

Una vez las EVs fueron inmunomarcadas, se observó su ubicación física y la adhesión a la superficie celular de forma más clara y específica, además los cambios en la morfología celular inducidos por el tratamiento con EVs fueron particularmente obvios al ver la formación de los filopodios (Figura 4.28) y donde las partículas de oro del inmunomarcaje se detectaron y visualizaron con los detectores STEM (BF/DF) acoplados al microscopio. Cómo ha sido descrito, los filopodios son protuberancias celulares formadas por filamentos de actina que escanean constantemente el entorno. Su movimiento altamente dinámico aumenta la superficie efectiva de una célula y facilita la interacción con ligandos extracelulares. Además, la base filopodial es un área de remodelación

activa de actina y, por lo tanto, un punto crítico para la endocitosis. La posibilidad de que las EVs entren en las células a través de los filopodios es, por tanto, plausible (Heusermann et al. 2016).

En estos experimentos las células mostraron microvellosidades o estructuras similares a filopodios y lamelopodios en la superficie celular con EVs en los diferentes tiempos de tratamiento. Sin embargo estos resultados indican que los EVs son más propensos a unirse y ser internalizados por la superficie de la célula a medida que aumenta el tiempo de interacción (Cronemberger-Andrade et al. 2020).

Con el inmunomarcaje con oro coloidal quedó demostrado que las EVs de *T. cruzi* son internalizados eficientemente por las células Vero en los diferentes tiempos de contacto (Figuras 4.28, 4.29 y 4.30).

Luego de la adhesión celular, se cuantificó el número de partícula/ $\mu^2$  para cada tiempo respectivamente, observando una disminución de EVs marcadas sobre la superficie celular con el paso del tiempo lo que podría indicar una entrada en las células de forma muy rápida (Gráfica 4.15).

En resumen, los resultados son consistentes en relación a la interacción EVs-célula, ya que fue visualizada a través de los cambios morfológicos observados en las células y a través de la cuantificación del número de EVs adherentes e internalizados según los tiempos de interacción. Estos resultados indican que los EVs tienen un tropismo celular visible que contribuyó a la adhesión y captación por la célula receptora, ya que en algunos casos se observa la formación de hendiduras a modo de invaginaciones en la superficie celular, posiblemente debido a la formación de caveolas (Figura 4.27C)

Es importante mencionar que el mecanismo propuesto de internalización celular eficiente es probable que pueda atribuirse a los siguientes tres aspectos: (i) componentes lipídicos, ya que la composición proteica única de los EVs



promueve su internalización en las células. Algunas evidencias indican que la unión ligando-receptor juega un papel importante en la promoción de la internalización celular. (ii) Hay algunos ligandos de direccionamiento expresados en EVs que son responsables de la internalización celular. (iii) La interacción única de las proteínas con el mismo papel que las integrinas de las EVs con la endocitosis mediada por clatrina ECM, relacionada con la célula podría mediar la captación de las EVs en células específicas del órganos diana, en una internalización celular eficiente como describe Hoshino para otras EVs (Hoshino et al. 2015; Lan et al. 2020)

En esta Tesis Doctoral también se realizaron un conjunto de experimentos para analizar si las EVs de *T. cruzi* integran su carga de manera heterotípica a las células de mamíferos mediante microscopía confocal. Como se describe en el apartado de resultados, las células Vero cultivadas en presencia de las EVs marcadas, incorporaron señales fluorescentes detectables durante un período de hasta 10 minutos. Especulamos sobre la posibilidad de que la incorporación de las EVs por las células Vero pudiera ser consecuencia de la complementariedad de varios mecanismos.

Como se ha descrito en algunas investigaciones con microscopía láser confocal la captación de EVs se puede visualizar directamente. El método más común para detectar la absorción de EVs implica el uso de colorantes lipofílicos fluorescentes que permite teñir las membranas de EVs como el PKH67 y DiD. (Tian et al. 2010).

Las proteínas marcadoras de EVs como la tetraspanina CD63 (Verweij et al. 2018), una de proteínas más abundantes en las EVs de mamíferos (Andreu and Yáñez-Mó 2014) no pueden ser usadas para el caso de las EVs de *T. cruzi*, por carecer de dichas proteínas tanto el parasito como las EVs liberadas por él. Estas estrategias permiten etiquetar las EVs a partir de su biogénesis

temprana y rastrearlos durante su liberación o absorción. Además, tienen una vida media más larga, lo que permite realizar experimentos de seguimiento de EVs *in vivo*, como hemos hecho en los capítulos anteriores. También se han desarrollado EVs portando luciferasa, principalmente para la obtención de imágenes de captación de EVs *in vivo* (Hikita et al. 2018). Sin embargo, dado que el tamaño de EV está por debajo del límite de resolución de la mayoría de las técnicas ópticas, todas estas técnicas no logran cuantificar la absorción de EV, ya que un grupo de EVs podría representar un solo punto en la imagen (Toribio et al. 2019). También se debe tenerse en cuenta que los estudios basados en la microscopía de fluorescencia, tienen una resolución limitada porque la longitud de onda de la luz visible es de aproximadamente 390-700 nm; por lo tanto, no se pueden distinguir las EV individuales o grupos de vesículas de menos de 390 nm de diámetro (Mulcahy et al. 2014)

Para discriminar claramente entre la unión de EV a la superficie celular y su captación, se requieren imágenes con mayor resolución, tal y como hemos hecho en nuestros experimentos al complementar con otras microscopías como TEM y AFM.

Durante los últimos años, se han desarrollado diferentes enfoques para la aplicación de imágenes ópticas a evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de vesículas extracelulares. Estos enfoques varían desde métodos de ingeniería genética para incorporar proteínas bioluminiscentes como proteína verde fluorescente (GFP), hasta marcar directamente las EVs con colorantes lipofílicos fluorescentes como lo hemos descrito y realizado en nuestros experimentos con PKH67 y Bodipy. Actualmente, la integración de fluoróforos lipofílicos, como dialquilcarbocianina o colorantes PKH, en la membrana exosomal representa la metodología de etiquetado más utilizada, debido a su simplicidad y bajo costo (González et al. 2021).

En nuestros estudios para descartar el marcaje inespecífico del colorante PKH67 y Bodipy a la célula, se realizaron varias centrifugaciones y lavados a 100.000 x g.

Otra consideración importante es que los distintos tipos de colorantes pueden conducir a diferentes patrones de tinción celular después de la absorción. Los colorantes lipofílicos se asocian con lípidos; por tanto, su destino está ligado a la membrana y al citosol, respectivamente. Algunos de los puntos son más brillantes que otros, lo que sugiere que pueden representar grumos de EVs agregados (Sung et al. 2020).

Actualmente existe mucha controversia acerca del mecanismo por el cual los EVs se incorporan a órganos y tejidos específicos. Por lo tanto, es importante dilucidar cómo se internalizan los EVs en las células después de la interacción EVs-célula. Es posible que la endocitosis sea el principal mecanismo de captación de EVs. La endocitosis se puede dividir en al menos cuatro vías, que incluyen endocitosis dependiente de caveolas, endocitosis dependiente de clatrina, macropinocitosis y fagocitosis, y se ha descrito que estas vías son importantes para la captación de EVs. Sin embargo, se desconoce si el mecanismo de captación de EVs es diferente dependiendo de los tejidos o del tipo de células con el que interactúa (Horibe et al. 2018).

Investigaciones en este sentido indican que la capacidad de captación de EVs es diferente según el tipo de célula receptora, es decir que las EVs secretadas de cualquier origen, se incorporan de forma no selectiva en las células receptoras y que el mecanismo de captación de las EVs es diferente dependiendo de la célula (Horibe et al. 2018).

Para que las EVs se unan y estimulen la célula, ya sea desde el exterior a través de las vías tradicionales de transducción de señales, o después de fusionarse, las EVs deben interactuar con la célula. Estudios de proteómica indican que

EVs que tienen alto contenido de actina, y proteínas asociadas a la actina, incluyendo componentes de la maquinaria de polimerización, mecanoenzimas de miosina, proteínas que estabilizan o despolimerizan microfilamentos, y proteínas asociadas a actina que participan en la regulación de las integrinas, que se unen estrechamente a la matriz extracelular, favoreciendo la unión de las EVs a la matriz extracelular en ubicaciones específicas de células, órganos o tejidos (Holliday, Faria, and Rody 2019). Otros investigadores sugirieron que las integrinas tienen un papel en el direccionamiento celular específico de los EVs de vertebrados. En particular, los EVs que expresan ITG $\alpha_v\beta_5$  parecen unirse específicamente a las células de Kupffer, mediando el tropismo hepático, mientras que los ligandos ITG $\alpha_6\beta_4$  exosomal e ITG $\alpha_6\beta_1$  se unen a los fibroblastos y las células epiteliales residentes en los pulmones, lo que regula el tropismo pulmonar. Estos mismos autores también describen que las EVs de vertebrados, que tienen alto contenido en tetraspaninas (TSPAN) (CD9, CD63, CD81, CD82, CD151) desempeñan un “rol” importante en la fusión exosomal con la célula diana. La mayoría de las TSPAN también ejecutan su función en cooperación con las integrinas (van Dongen et al. 2016; Jones et al. 2018). En el caso de las EVs de *T. cruzi*, la ausencia de TSPAN debe ser sustituida por otra serie de moléculas, que se encuentren en la superficie de la EVs y tengan un papel de “linkers” con las membranas de la célula a la que interaccionan. Pudiendo sugerirse que una de las proteínas que deben jugar este papel, podrían ser las transialidasas, cuyo “rol” en los procesos de adhesión a la membrana ya fueron descritos (Alves and Colli 2007; da Fonseca et al. 2019; Nardy et al. 2016), proteínas que como vimos en los experimentos del tratamiento de las EVs con proteinasa K, se encuentran en mayor proporción en la superficie de las EVs. Es importante resaltar que en algunos experimentos la vía de captación utilizada por la célula

receptora es la macropinocitosis y que esto va a depender, como ya se mencionó antes, del tipo de célula (Fitzner et al. 2011).

En nuestros experimentos se utilizaron células Vero para el estudio de la captación de EVs provenientes de tripomastigote de *T. cruzi* en diferentes tiempos de interacción. Para seguir el destino de los EVs, se marcaron suspensiones de EVs purificados con el colorante PKH67 y Bodipy y se agregaron a cultivos primarios de células Vero. Después de incubar los EVs durante 1, 5 y 10 minutos a 37 ° C, las células se fijaron y analizaron mediante microscopía láser confocal. Observamos una internalización eficaz de los EVs por parte de las células y observamos que las EVs estaban adheridos tanto a la superficie celular en los primeros minutos de la interacción como dentro de la célula a medida que pasaban los minutos de contacto.

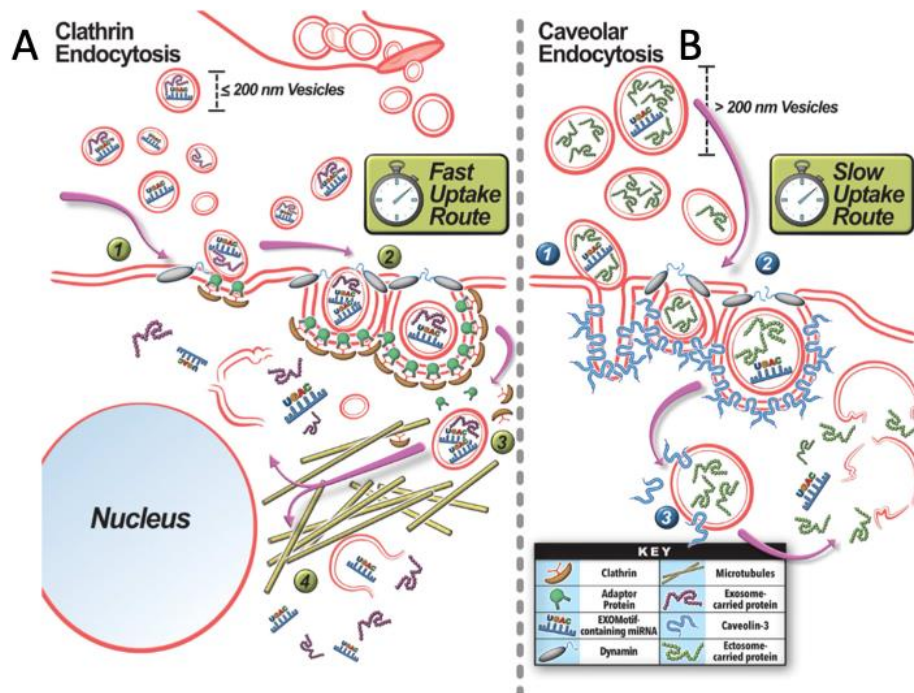
Al objeto de seguir el proceso de captación y entrada se utilizaron anticuerpos que marcaron diversas proteínas celulares (actina, tubulina, clatrina y caveolina) permitiendo observar cambios morfológicos y estructurales como es la formación de filopodios, que también identificamos por otras técnicas, y la despolimerización de los filamentos de actina como se observa en la figura 4.37 y tal como ya había sido descrito previamente (Retana Moreira et al. 2019). Estos resultados también indican que la capacidad de captación de EVs es diferente según el tiempo de interacción y que se incorporaron de manera eficiente en las células al observar diferentes planos 2D y 3D de las células (Figura 4.37).

Luego comparamos la capacidad de captación de EVs en células Vero al marcar el citoesqueleto con anti -tubulina y encontramos que la captación de EVs marcados con Bodipy se incrementaba igualmente en el orden del tiempo, (Figura 4.38).

En los experimentos con actina y tubulina se analizó la reorganización de los microtúbulos y se cuantificaron las EVs marcando con los colorantes lipofílicos, ya que ambos etiquetados dieron resultados equivalentes, como se muestra en las gráficas 4.17 y 4.18.

Existen muchos estudios que entran en controversia con respecto a si la captación de las EVs es específica del tipo celular y si implica fusión de membranas o endocitosis. Por tanto, son necesarios más estudios que evalúen otras vías como las dependientes de clatrina y caveolina con el objetivo de esclarecer los mecanismos implicados en la captación de EVs (Svensson et al. 2013).

La ruta endocítica mejor estudiada en células de mamíferos es la endocitosis mediada por clatrina, que se caracteriza por una invaginación creciente de la membrana plasmática y la formación de fosas y vesículas recubiertas de clatrina. Además la cubierta de clatrina, da forma a una estructura enrejada y facilita la flexión de la membrana plasmática, muchos otros factores citosólicos están involucrados en la endocitosis mediada por clatrina y contribuyen al inicio, progresión, escisión o desensamblaje de las vesículas recubiertas de clatrina (Figura 5.1) (Bittel and Jaiswal 2019; McMahon and Boucrot 2011; Tobys et al. 2020a)



**Figura 5.1.- Endocitosis (A) dependientes de clatrina o (B) dependientes de caveolina.**  
 (A) Las vesículas más pequeñas se absorben preferentemente mediante endocitosis mediada por clatrina. (1) La internalización se produce en un sitio para el acoplamiento de EV con la membrana plasmática donde el ensamblaje de vesículas recubiertas de clatrina puede ocurrir por la deformación de la membrana con la ayuda de las proteínas adaptadoras asociadas a EV y clatrina. (2) Dynamin-2 se recluta en el hoyo de clatrina donde forma una estructura en forma de collar para pellizcar el cuello del endosoma. (3) Posteriormente, el endosoma internalizado se desenvuelve y la vesícula se transporta a través de microtúbulos a la región perinuclear. (4) Allí se libera la carga de vehículos eléctricos.  
 (B) Las vesículas más grandes tienden a favorecer la vía de endocitosis caveolar. Las invaginaciones caveolares en la membrana se crean mediante la oligomerización de las proteínas caveolina. (1) Una vez que la EV encuentra unas caveolas que conducen a la internalización, se conecta con las caveolas. (2) En este sitio se reclutan proteínas como Dynamin-2 y EHD2 para pellizcar el endosoma caveolar. (3) Posteriormente, el endosoma caveolar se transmite de manera independiente de los microtúbulos y libera la carga de EV en el citoplasma. La tasa de internalización mediada por clatrina se compara con la tasa de endocitosis mediada por receptores y es más rápida que la endocitosis mediada por caveolas (Bittel and Jaiswal 2019).

Investigaciones relacionadas a la captación de EVs por diferentes células han mostrado que la vía de captación de los EVs depende de la activación de los

receptores en las células receptoras. Estudios basados en datos experimentales que utilizan inhibidores selectivos, herramientas moleculares y marcadores especiales de endocitosis, han llegado a la conclusión que la endocitosis y macropinocitosis mediadas por clatrina pueden estar implicadas en la captación de las EVs en diferentes tipos de células. Ambas vías pueden estar mediadas por la activación de receptores (Rappoport, Simon, and Benmerah 2004). La endocitosis mediada por clatrina implica la ingestión de receptores asociados con sus ligandos, mientras que la macropinocitosis se produce debido a ondulaciones de la membrana, desencadenadas por receptores tirosina quinasas. Específicamente para la célula, muchos tipos de proteínas y azúcares de la superficie de las EVs, pueden unirse a diferentes receptores, induciendo una señalización compleja. La vía de captación que depende de la señalización es posiblemente específica del tipo de célula. Es decir, al menos dos tipos de activación de señalización pueden estar involucradas en la captación de EVs (Tian et al. 2014).

En consecuencia, la cadena pesada de caveolina-1 y clatrina son fundamentales para mediar la endocitosis dependiente de caveolas y la endocitosis dependiente de clatrina, respectivamente. Para seguir indagando acerca de la capacidad de las células Vero de captación de EVs, examinamos estas dos posibilidades o vías a través de los experimentos de confocal con anti-clatrina y anti-caveolina, utilizando el mismo protocolo de tiempos de interacción entre las EVs y la célula receptora. Observamos una internalización eficiente correlacionada con el tiempo (Figura 4.40 y Figura 4.42). Algunos estudios describen que la captación eficiente de las EVs está asociada con una expresión abundante de caveolina-1 en las células Vero (Horibe et al. 2018). A través de estos estudios se sabe que las EVs se incorporan a las células por endocitosis y su capacidad de captación es



diferente dependiendo del nivel de expresión de la molécula relacionada con la endocitosis. Como hemos mencionado ya, la endocitosis tiene vías dependientes de caveolas y dependientes de clatrina, y la expresión de caveolina-1 está implicada en la endocitosis dependiente de caveolas en los diferentes tipos de células receptoras. También se ha descrito que la macropinocitosis está involucrada en la captación de EVs en otros tipos de células, proporcionando más pruebas de que el mecanismo de captación de EVs es diferente dependiendo del tipo de célula con la que interacciona (Horibe et al. 2018).

Nuestros experimentos de microscopía láser confocal permiten la visualización del intercambio de EVs con la célula Vero desde el primer contacto hasta cuando se acumulan en la región perinuclear en el minuto 10, (Figura 4.42) lo que sugiere una acumulación en los compartimentos posiblemente endolisosomales de las células.

Para finalizar nuestros ensayos con microscopía laser confocal utilizamos la sonda Lyso-tracker para verificar el ingreso al citosol de las células Vero las EVs marcadas (Figura 4.44). En consecuencia, las EVs mostraron un bajo porcentaje de colocalización en las células, ya que posiblemente este sea un mecanismo alternativo utilizado por las EVs de *T. cruzi*, en conjunción con otra de las vías ya mencionadas.

Se analizaron los resultados indicando una superposición significativa entre los dos fluoróforos, lo que sugiere que las EVs fueron etiquetados eficientemente por el tinte PKH67 (Figura 4.44). De hecho, la fluorescencia dentro de una sola EVs muestra co-localización entre los colorantes, lo que sugiere que la preparación la EVs contiene EVs intactos rodeados por membranas, lo que es un control del etiquetado e integridad de la membrana de las EVs durante los ensayos. Los resultados indican que se encontraron

EVs (amarillos) dentro de las células, lo que es sinónimo de co-localización. El análisis mediante Fiji también indicó un moderado nivel de internalización (Gráfica 4.19). Se observaron puntos verdes que pueden representar EVs dentro de la vía endocítica. En una investigación publicada por (Eliaz et al. 2017) se determinó que cuando los EVs se incuban con células, no se acumulan en la superficie celular, sino que entran en las células en minutos y se transportan como vesículas intactas dentro de los endosomas. La mayoría de estos EVs internalizados se mueven hacia los compartimentos lisosomales (Heusermann et al. 2016).

Los resultados demuestran una clara localización de los EVs cerca o dentro de los lisosomas y establecen que es posible que esta sea uno de los mecanismos a través de la cual los EVs de *T. cruzi* puedan ser captados por las células receptoras, pero quizás no el más eficiente.

Tomados en conjunto nuestros resultados, se puede sugerir que las EVs de *T. cruzi* al interactuar con las células Vero siguen diferentes rutas intracelulares que alcanzan distintos compartimentos subcelulares. Sin embargo, se valoraron otros enfoques experimentales para validar esta suposición.

Para contrastar y complementar los resultados de captación de EVs de microscopía confocal, se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el reconocimiento de anticuerpos específicos como anti- *trans*-sialidasa y otros ya analizados por confocal como la clatrina y caveolina, pero en ensayos con inmunocalización con nanopartículas de oro coloidal.

Con el fin de obtener datos definitivos y confirmatorios de los mecanismos de captación de las EVs por la célula receptora realizamos una serie de experimentos utilizando células Raw 264.7, ya que se sabe que son un modelo

de macrófagos y tienen gran capacidad de pinocitosis y fagocitosis (Taciak et al. 2018).

El inmunomarcaje con TEM utilizando anticuerpos anti-*trans*-sialidasa, mostró el reconocimiento de proteínas en la superficie de las EVs.

En resultados de inmunotransferencia ya analizados en este capítulo, se identificó anticuerpos con reconocimiento en EVs nativas y tratadas con la enzima proteinasa K, demostrando la diferencia entre la presencia y ausencia de proteínas en la superficie de las EVs.

A través TEM también se ha realizado el inmunomarcaje con el anticuerpo anti- *trans*-sialidasa (mAb 39) en EVs y EVs tratadas con proteinasa K.

Las EVs no tratadas presentaron tamaños consistentes con los rangos descritos previamente por otros estudios (Bautista-López et al. 2017).

El tratamiento con proteinasa-K evidenció una modificación de la morfología y tamaño de las EVs como consecuencia de la pérdida de la integridad de las proteínas de la superficie, en comparación con las EVs no tratadas que mantuvieron su membrana intacta (Figura 4.31).

Con marcaje simple con partículas oro coloidal de 18 nm para anticuerpos anti-*T. cruzi* total se hizo la colocación de EVs interaccionando con la membrana plasmática en los primeros minutos y posteriormente se observaron en el interior de las células Vero (Figura 4.32). Con estos mismos protocolos se realizó la interacción de EVs con macrófagos, con doble marcaje para el anticuerpo anti-*trans*-sialidasa con partículas de 10 y 18 nm, se pudieron observar las EVs de *T. cruzi* interaccionando con la membrana celular en el primer minuto y de igual manera en el interior de la célula, pasado los 10 min (Figura 4.33). Para el anticuerpo anti-clatrina se obtuvieron resultados compatibles con una posible fagocitosis (Figura 4.34)

En el caso del anticuerpo anti-caveolina, se observa las EVs interaccionando en los primeros minutos con la membrana celular y, posteriormente, dentro de estructuras que se asemejan a caveolas y otras vesículas intracelulares distribuidas a lo largo el cuerpo celular (figura 4.35)

Estos resultados sugieren que la captación de EVs de *T. cruzi* por las células podrían ser por vías simultáneas, es decir por endocitosis mediada por clatrina y probablemente por medio de macropinocitosis, tal como se describe en varios estudios de procesos cancerosos y autoinmunes (Fitzner et al. 2011; Tian et al. 2014; Tobys et al. 2020b).

No obstante, con la posibilidad de visualizar de forma directa y con resolución nanométrica muestras biológicas, en nuestro caso EVs de *T. cruzi*, utilizamos Microscopía de Fuerza Atómica. Aplicando condiciones *in vivo*, casi fisiológicas, fue un desafío debido a las dificultades experimentales que este tipo de estudios representan. Sin embargo en nuestros ensayos la aplicación directa en la observación tanto de EVs con características ya descritas, como de células Vero observadas con alta resolución espacio-tiempo (Figuras 4.45 y Figura 4.46) proporcionó amplia información, tanto de las funciones celulares como de morfogénesis a escala nanométrica de filopodios, bordes de membranas, formaciones de hendiduras y endocitosis en células (Henderson, Haydon, and Sakaguchi 1992; Thomas et al. 2013). En este trabajo, hemos planteado el estudio de la interacción EVs-célula mediante AFM, con el fin de profundizar en el mecanismo a través del cual se produce la captación de las EVs por la célula receptora e intentar una mejor comprensión de los procesos detallados de la dinámica y morfología de la misma (Zhang et al. 2017).

Los resultados del análisis de imágenes obtenidas a diferentes tiempos de incubación muestran, en general, bordes irregulares de la membrana y

extensión o retracción de los filopodios durante al menos 10 minutos de contacto, ya que la adición de las EVs activa la dinámica de la membrana en el borde por donde entran en contacto con la célula (Figura 4.47).

Pasados varios minutos de interacción entre EVs y células, la formación de filopodios es más evidente y pronunciada (Figura 4.48). Específicamente, la altura del borde de interacción se incrementó y se hizo más sobresaliente (alturas entre 30-90 nm). Además, aparecieron algunas EVs en la superficie celular, lo que implica que los eventos de captura están ocurriendo posiblemente, por endocitosis o fagocitosis, tal y como inducen a pensar algunas imágenes (Figura 4.49) y que puede existir una despolimerización de actina en la superficie celular consecuencia de la formación de los filopodios (alturas de borde de célula entre 30-50 nm) y ya observados con EVs de *T. cruzi* (Figura 4.48C) (Retana Moreira et al. 2019).

Por lo tanto, el estudio mediante AFM de los experimentos de interacción de EVs en el borde de la membrana celular, permitió visualizar directamente la dinámica morfológica que se origina en las mismas, a partir de la despolimerización de actina y que ya conocemos por estudios previos con EVs (Garcia-Silva et al. 2014), así como la formación de los filopodios por la interacción que se produce para su respectiva internalización (Heusermann et al. 2016; Reclusa et al. 2020). Asimismo, hemos observado la dinámica de captación en el centro de las células donde posiblemente las EVs ya estén internalizadas y cubiertas por la membrana celular, debido a que las alturas de las mismas aumentan (400-425 nm), tal y como se observa en la Figura 4.49A, a medida que progresan los minutos de interacción EVs-célula, las exovesículas se internalizan y se observan estructuras que pasan a ser cada vez menos visibles debido a que la membrana celular las recubre. Sin embargo, esta idea contrasta con los resultados observados en los primeros minutos de

interacción donde se muestran crecimientos de protuberancias en dirección vertical en la superficie celular ya observados en SEM y en la superficie de la membrana, además de la aparición de una estructura granular en los bordes (Figura 4.49B). En algunas zonas, también se observó la formación de pequeñas hendiduras relacionados con la actividad celular para la captación e internalización de las EVs.

Por tanto, podemos sugerir que los hoyos o hendiduras observados en la superficie celular están estrechamente asociados con un proceso de recepción de exovesículas por endocitosis, que se puede explicar atendiendo al análisis de los perfiles de altura en la figura 4.50. En dichos gráficos, se muestra claramente un incremento de altura al transcurrir algunos minutos desde el inicio del experimento, que podría justificar la internalización de las EVs y la formación de protuberancias, lo que nos lleva a plantearnos la hipótesis de que un significado biológico de la endocitosis puede ser la formación de filopodios para endocitar las EVs. No obstante, debemos mencionar que algunos autores sugieren la idea de que la mayoría de esas protuberancias se producen por la interacción con microvesículas y que las hendiduras podrían ser causadas por la fusión de EVs con la membrana plasmática. (Casado, Del Val Toledo Lobo, and Paño 2017).

En la bibliografía existen opiniones divergentes, como ya hemos discutido, sobre el método por el cual se produce la internalización de las EVs, ya sea por fusión, endocitosis mediada por receptores, macropinocitosis o fagocitosis. Sin embargo, los dos primeros métodos pueden representar mecanismos viables para la captación de EVs en nuestros experimentos.

Una vez analizada la interacción EVs-célula a través de AFM y, para una mejor comprensión de las interacciones intermoleculares, fue fundamental profundizar en el estudio de las interacciones entre moléculas (EVs-

anticuerpos). En este sentido, los experimentos de Reconocimiento Molecular llevados a cabo funcionalizando las puntas de AFM con un anticuerpo, lo que nos proporcionó información para establecer relaciones y comparaciones en los procesos de interacción entre anticuerpos, IC y EVs.

En resumen, los resultados de este trabajo han demostrado que la técnica de espectroscopia de fuerzas de AFM se puede utilizar para estudiar las interacciones dinámicas entre las EVs y anticuerpos, así como para localizar el tipo de molécula involucrada en esas interacciones (proteínas) que no pueden ser detectadas por otras vías.

En este sentido, el análisis de las curvas de Fuerza Distancia (F-D) comienza desde la distancia infinita entre ambas moléculas que deben interactuar, hasta el momento en que la punta se acerca a la muestra con una fuerza creciente y ambas entran en contacto. La atracción de la punta funcionalizada con un anticuerpo anti-*trans*-sialidasa hacia la superficie de una muestra depositada sobre mica (EVs o IC, según el caso) requiere grandes fuerzas, lo que provoca la flexión del cantilever. La retracción de la punta produce un salto (picos en la curva) que indica que se ha producido la separación entre la punta y la muestra y que nos da idea de la magnitud de esa interacción, ya que esto significa la ruptura del enlace entre dos moléculas que interactúan. La longitud específica del pico indica la fuerza que se puede atribuir a una interacción específica. En este sentido, podemos establecer diferentes resultados para los tres tipos de experimentos propuestos. La gráfica 4.19, es un ejemplo que nos permite comprender como es la correspondencia entre las curvas F-D y los procesos de reconocimiento entre moléculas que tienen lugar en nuestros experimentos.

Posteriormente, el análisis exhaustivo de las curvas F-D nos ha permitido comparar fuerzas de interacción entre moléculas y, por tanto, concluir acerca del trabajo de adhesión realizado en los distintos experimentos.

La fiabilidad de las fuerzas de adhesión medidas se eleva cuando comparamos varias muestras y varias repeticiones de las mismas. Asimismo, los resultados obtenidos tanto en experimentos de control como de bloqueo realizados con IC y EVs tratados con proteinasa K, han sido significativos para concluir que dichas fuerzas de adhesión no existen en ninguno de estos casos (Figura 4.51C y 4.51D), como se comprueba tras registrar varios cientos de curvas de fuerza, en diferentes localizaciones de esas muestras.

Para los estudios de interacción se utilizaron tres tipos de muestras: EVs, EVs tratados con proteinasa K e IC (IgG-EVs) fijados, los cuales presentan una morfología superficial bastante diferente entre ellas, como se muestra en la Figura 4.51. También se utilizaron puntas funcionalizadas con anti-*trans*-sialidasa (mAb 39) y se probaron diferentes formas de unión de dicho anticuerpo con el linker (PEG), con y sin proteína A de *Staphylococcus aureus*, con el objetivo de diferenciar si la direccionalidad de dicha unión al linker mejoraba en un caso frente a otro. Los EVs tienen proteínas de superficie del grupo de las TS (grupos I-III) (Bautista-López et al. 2017; Brossas et al. 2017b; Paranaiba et al. 2019), entre otras, mientras que estas mismas EVs, después de ser tratadas con proteinasa K, presentan una superficie plana y lisa (Figura 4.51C) al eliminar las proteínas de superficie con el tratamiento enzimático. Las interacciones EVs-anticuerpo podrían estar determinadas por la presencia de estas proteínas de superficie con sus respectivos receptores de membrana, que están presentes en las EVs de *T. cruzi* (Bayer-Santos et al. 2013; Nardy et al. 2016; Nogueira et al. 2015; Ribeiro et al. 2018), un hecho notable que hace que la morfología de la



superficie juegue un papel importante en las interacciones entre las EVs y el anticuerpo. Más concretamente, en los experimentos llevados a cabo en este trabajo, estas proteínas son la razón de la existencia de áreas específicas de contacto y, en consecuencia, de la existencia de interacción EVs-anticuerpos. Todo lo dicho anteriormente, nos permite concluir que la morfología y alteraciones en la superficie de las EVs tiene un fuerte impacto en las curvas de F\_D obtenidas y, por tanto, en la fuerza de adhesión entre moléculas. Los diferentes perfiles de las curvas F\_D, con más saltos de adhesión en el caso de EVs sin tratamiento con proteinasa K (Figura 4.51A y 4.51B) muestran una mayor interacción EVs-anticuerpo, posiblemente debido a la presencia de un gran número de este tipo de proteínas antigénicas en la superficie, por tanto en estos casos podemos afirmar que existen procesos de reconocimiento entre moléculas, mientras que esto no es posible ni visible en la misma medida para los EVs tratados con proteinasa K o en el inmunocomplejo fijado (Figura 4.51C y 4.51D).

La Figura 4.52, muestra la Fuerza Máxima de adhesión y el Trabajo de Adhesión para todos los experimentos realizados. Se observó una menor adhesión a los EVs cuando se utilizó una punta funcionalizada con proteína A, si lo comparamos con el experimento en el que se usó una punta funcionalizada directamente con el anticuerpo sin la proteína A. También se observó una baja, casi nula, adhesión entre los EVs tratados con proteinasa K y en el inmunocomplejo fijado en los experimentos de control. Estos resultados apoyan la conclusión de que la interacción entre las EVs y el anticuerpo anti-transialidasa está mediada por las proteínas de superficie como la TS. Por el contrario, la presencia de esas proteínas provocó un mayor trabajo de adhesión entre EVs y anticuerpos con o sin proteína A (Figura 4.52B), sugiriendo que la adhesión está dominada por enlaces establecidos con las

proteínas de superficie de las EVs. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que al eliminar esas proteínas de la superficie (EVs tratados con proteinasa K) o bloquear la unión con más anticuerpos (inmunocomplejo fijado), disminuye notablemente la adhesión, pero no elimina por completo la posibilidad de unión a los anticuerpos (Figuras 4.52A y 4.52B), lo que indica que también tienen lugar algunas interacciones inespecíficas entre las superficies de estas moléculas (Anticuerpo-Inmunocomplejo).

Debemos añadir que también se ha observado una adhesión ligeramente más fuerte entre el inmunocomplejo no fijado y el anticuerpo anti transialidasa cuando llevamos a cabo un intento de bloqueo o experimentos de control. Aunque podríamos afirmar que no existen sitios específicos para el proceso de unión entre un inmunocomplejo y un anticuerpo, en principio, las interacciones entre los IC fijados o no y el anticuerpo anti transialidasa no deberían tener lugar. Sin embargo, la unión rápida e inespecífica no puede verse obstaculizada cuando los anticuerpos no ocupan por completo la superficie de un inmunocomplejo y estas posiciones de unión no están bloqueadas. A pesar de estos resultados, las fuerzas de atracción y, en consecuencia, la fuerza de adhesión para el inmunocomplejo no fijado disminuyeron en comparación con los experimentos con EVs (Figura 4.51A y 4.51B con respecto a la Figura 4.52A y 4.52B).

A pesar de que existe bibliografía (Saha, Bender, and Gizeli 2003) que apunta hacia la posibilidad de que en una comparativa de las cinéticas de equilibrio y determinación de constante de unión de la IgG a las proteínas G y A, se apunta a que la constante de asociación entre IgG y Proteína G es cuatro veces mayor que entre IgG y la Proteína A.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que este anticuerpo constituye el único inhibidor submicromolar conocido de la actividad catalítica de TS, y

## Discusión

---

que reconoce las TS de *T. cruzi* con alta especificidad y afinidad subnanomolar (Buschiazzo et al. 2012), de ahí que lo hayamos utilizado en nuestros experimentos.

# Capítulo 6

## CONCLUSIONES

---

## Conclusiones

1. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en la zona rurales Chararé, República de Panamá, sobre parasitación de *T. cruzi*, revelan que el 42.3 % de los individuos estudiados fueron positivos por al menos tres de las técnicas de diagnóstico recomendadas. En dichos estudios se puso de manifiesto que las pruebas molecular por PCR del ADN circulante en suero constituye una técnica de confirmación y de nuevos diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Dichos pacientes se pueden considerar crónicos dado que no se evidenció la presencia de formas tripomastigotes en las muestras de sangre analizadas.

El ADN circulante de los pacientes permitió la identificación de las unidades discretas de (UDTs), lo que confirma que la TcI es la principal causante de la parasitación en esta región. Sin embargo se han evidenciado por primera vez en el área Centroamérica la existencia de otras UDTs que afectan a humanos, (Tc II, Tc V y Tc VI) que pudieran alterar el cuadro clínico en los pacientes.

La presencia de dichas cepas podría correlacionarse por ser un área geográfica de bioconexión humana y animal entre América del norte donde se encuentra TcI y Sur América donde coexisten las 6 diferentes UDT descritas en la bibliografía.

Las condiciones sociodemográficas donde se desenvuelve la población humana estudiada podrían ser determinante para los elevados porcentajes de parasitación encontrados.

2. Los ensayos inmunoenzimático en los que se usaron los antígenos procedentes de los exosomas liberados *in vitro* por las formas infectante de *T. cruzi*, mostraron una elevada positividad para todo los

sueros de los pacientes crónicos estudiados, incluidos aquellos en lo que otras pruebas comerciales inmunológicas mostraron resultados dudosos o negativos. Por lo cual dichos antígenos presentes en los exosomas podrían ser utilizados como antígenos confirmatorios de la parasitación por *T. cruzi*.

3. En los sueros de los pacientes analizados se confirma la presencia de inmunocomplejos formados por EVs- inmunoglobulina del hospedador. Dicha EVs contienen antígenos del parásito que son reconocidas por anticuerpos anti- *T. cruzi*, lo que confirmaría de una manera directa la presencia de parásitos en los enfermos chagásicos crónicos y podría constituir una técnica confirmatoria de la parasitación.
4. El aislamiento y posterior disgregación de los inmunocomplejos encontrados en los sueros de los pacientes chagásicos, confirman que las inmunoglobulinas que corresponden a la subclase IgG2 e IgG4, son las que se encuentran de forma mayoritaria ligados a dichas exovesículas.
5. El pool de sueros chagásicos crónicos de los pacientes panameños, reconocen una banda de aproximadamente 80 kDa en las exovesículas circulantes en los sueros de los pacientes crónicos, que también es reconocida en los exosomas de *T. cruzi* liberados *in vitro*.
6. La administración de exosomas de *T. cruzi* liberados *in vitro* e inoculados vía intravenosa en ratones CD1 y el estudio de la biodistribución en los diferentes órganos, muestra que

mayoritariamente y de forma rápida se acumulan tanto en hígado como en bazo. Como posible consecuencia de la captación por parte de las células del sistema reticuloendotelial existentes en dichos órganos. Detectándose en menor medida en otros órganos pertenecientes al aparato digestivo especialmente estómago e intestinos.

7. Los mayores índices de fluorescencia correspondiente a los exosomas marcados con un colorante fluorescente, fue en aquellas formulaciones donde los exosomas fueron tratados térmicamente a fin de inactivar el “carga” que portan.
  
8. Cuando la inoculación a los ratones se realizó con exovesículas, o inmunocomplejos formados *in vitro* con inmunoglobulinas G purificadas de ratones inmunizados frente al parásito, se pudo comprobar que la “inactivación” por calor de los exosomas, hace que los niveles de fluorescencia se mantengan en los órganos por más tiempo. Lo que sugeriría que la captación de las exovesículas es un proceso en el que participa no solo la célula, sino también los componentes de las propias exovesículas.

En los grupos experimentales en donde se administró bajo la formulación de inmunocomplejos la captación y depósito en los órganos en los que se deposita, fue más rápida que cuando la inoculación se llevó a cabo con exosomas libres, incluido aquellos que se depositaron nivel de la pared intestinal, lo que podría indicar una facilitación de la captación favorecida por las inmunoglobulinas.

9. El tipo de respuesta inmune que levantan las exovesículas en los órganos hígado y bazo podrían recordar la respuesta que muestran los individuos afectados por la enfermedad de Chagas.

Dicha respuesta depende del tipo de formulación administrada y del órgano. Observándose que las exovesículas “nativas” e “inactivadas por calor” levantan una respuesta inflamatoria Th1 con elevación de IL-2, IL-12, al igual que en bazo en donde se inducen la expresión relativa de IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Dicha elevación de Th1 contrasta con la baja expresión de la respuesta Th2 en bazo, destacando en hígado la expresión de las IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  y en el bazo IL-15 y TGF- $\beta$ . Cabe destacar en este último órgano una elevada respuesta Th9 desde las primeras 24 horas post inoculación. La respuesta Th17 se manifiesta con una elevación de IL-17 e IL-25 en bazo, mientras que en hígado se muestra la expresión de IL-21 e IL-23, junto a la IL-25.

10. Cuando las EVs fueron pre tratadas térmicamente se aprecia la elevada respuesta Th1 con una mayor expresión de las IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , este ultimo fundamentalmente en bazo. En dicho órgano se destaca la mayor expresión relativa de la IL-15 y TGF- $\beta$  correspondientes a una respuesta Th2 compensatoria. Los niveles de expresión de Th9 se observa más claramente en bazo que en hígado, al igual que la elevación de la IL-25, interleucina reguladora de la expresión de la IL-15.

11. La inoculación de las EVs bajo la formulación de inmunocomplejos reveló, en hígado que las mayores tasas de expresión se producen en las primeras horas tras la inoculación, destacando la respuesta Th1 acompañada de una respuesta Th2 con elevación de IL-4, IL-15 y



TGF- $\beta$  en hígado. Al igual que ocurría anteriormente se produce expresión de IL-9 y una mayor expresión de IL-21 y IL-25, mientras que en bazo, mayoritariamente pero retrasada en el tiempo se expresa una respuesta inflamatoria Th1 acompañada de el incremento IL-13, IL-15 y TGF- $\beta$ , respuestas Th2 compensatorias para la Th1, al igual que ocurría cuando se inocularon las exosomas libres, donde la respuesta Th9 se produjo en las primeras horas de la inoculación. Cabe destacar la expresión de IL-17 en bazo, que hasta este momento no había sido detectada. De igual manera, nuestros resultados denotan la expresión de IL-21, IL-25, e IL-38, esta última, a la que se le atribuyen efectos antiinflamatorios.

La mayor expresión de interleucinas que se produce en el hígado, podría ser consecuencia de la facilitación de la captación por parte de las células de Kupffer en dicho órgano ejercida por las inmunoglobulinas.

12. La formulación de inmunocomplejos con exosomas tratados térmicamente demuestran la existencia de una elevada expresión de respuesta Th1 en los dos órganos estudiados, con aumento de las interleucinas marcadoras de la respuesta Th1 en hígado, específicamente el TNF- $\alpha$ . Como respuesta Th2 se aprecian una elevación en bazo de TGF- $\beta$  y la elevación de IL-17 en bazo que asemejaría la respuesta que se describe para los enfermos chagásicos. Curiosamente destaca en hígado la elevación de la expresión de la IL-25 y IL-38. La primera estimula una respuesta Th2 y la IL-38, a la cual se le atribuye la función biológica de inhibir las respuestas inflamatorias que se producen en especial de la Th1. De estos resultados podría concluirse que una formulación basada en

inmunocomplejos formados con exosomas inactivados por calor podrían constituir un método de estimulación de interleucinas que pudiesen favorecer la homeostasis inmunológica en la enfermedad de Chagas.

13. Al evaluar la respuesta inducida por las exosomas o exosomas formando inmunocomplejos, se encontró que la respuesta inmune en general que levantan es cuantitativamente menor, en comparación a cuando los exosomas fueron “inactivados” por calor, lo que indicaría que algunos componentes termolábiles en los exosomas, son capaces de inhibir la respuesta inmune, constituyendo un mecanismo inmunomodulador del parásito frente a la respuesta inmune del hospedador

14. . La caracterización por diferentes instrumentación en la que se incluye la microscopia óptica confocal, Microscopia Electrónica de Transmisión, Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Fuerza Atómica y tras la puesta a punto de una nueva metodología que permite el reconocimiento de dos antígenos simultáneamente mediante anticuerpos con doble marcaje con oro coloidal, procedimos a estudiar los mecanismos e interacción de exosomas de *Trypanosoma cruzi* con las células. De los cuales se concluye, que tras la interacción de los exosomas con las membranas celulares, se inducen la aparición de lamelas o cavidades en la superficie membranal de la célula, próximas a los exosomas del parásito, teniendo lugar algunas de estas interacciones en la base de filopodios como proceso previo a un mecanismo de entrada. Dicha internalización puede considerarse que tiene lugar mediante diferentes mecanismos, entre las que se

encuentran la fagocitosis y pinocitosis, que llevarían a la internalización de los exosomas cuando entran en contacto con la membrana de la célula.

15. Con los estudios de microscopia laser confocal se confirma una serie de alteraciones celulares: i) La desorganización del citoesqueleto de actina. ii) La interacción de los exosomas marcados o sus agregados con filamentos de tubulina. iii) La participación tanto de la clatrina como caveolina celulares, lo que confirmarían los mecanismos de internalización observados por Microscopía Electrónica de Transmisión. iv) La intervención de los lisosomas celulares y la acumulación de los exosomas marcadas, y del colorante de marcaje de los mismos en el citoplasma celular, lo que podría indicar la liberación del cargo de los exosomas en el interior de los fagolisosomas.

16. Con objeto de complementar el trabajo de interacción de exosoma-célula, se han llevado a cabo estudios de reconocimiento molecular de algunas de las proteínas implicadas en la adhesión de los exosomas a las membranas de las células, entre las que se encuentran las trans-sialidasa. Al objeto de reconocer específicamente dichas proteínas en las membranas de los exosomas, los cantilevers del microscopio de Fuerza Atómica con anticuerpos monoclonales frente a dicha enzima. Poniéndose de manifiesto que existe un reconocimiento y unión específica con una fuerte fuerza de adhesión entre el anticuerpo y los exosomas, lo que no ocurre cuando las proteínas de la superficie de los exosomas fueron eliminadas tras el tratamiento con proteasas, lo que demostraría que parte del epítipo reconocido de dicha enzima se encuentran en la superficie de los exosomas.

# Capítulo 7

## BIBLIOGRAFÍA

---

## REFERENCIAS

1. Abad-Franch, Fernando, Fernando A. Monteiro, Nicolás Jaramillo O., Rodrigo Gurgel-Gonçalves, Fernando Braga Stehling Dias, and Liléia Diotaiuti. 2009. "Ecology, Evolution, and the Long-Term Surveillance of Vector-Borne Chagas Disease: A Multi-Scale Appraisal of the Tribe Rhodniini (Triatominae)." *Acta Tropica* 110(2–3):159–77.
2. Abras, Alba, Montserrat Gállego, Carmen Muñoz, Natalia A. Juiz, Juan Carlos Ramírez, Carolina I. Cura, Silvia Tebar, Anna Fernández-Arévalo, María-Jesús Pinazo, Leonardo De La Torre, Elizabeth Posada, Ferran Navarro, Paula Espinal, Cristina Ballart, Montserrat Portús, Joaquim Gascón, and Alejandro G. Schijman. 2016. "Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American Migrants in Barcelona (Spain)." *Parasitol Int* 66(2):83-88.
3. Abras, Alba, Montserrat Gállego, Teresa Llovet, Silvia Tebar, Mercedes Herrero, Pere Berenguer, Cristina Ballart, Carmen Martí, and Carmen Muñoz. 2016. "Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change?" *J Clin Microbiol* 54(6):1566-1572.
4. Adade, Camila M., Isabelle R. S. Oliveira, Joana A. R. Pais, and Thaís Souto-Padrón. 2013. "Melittin Peptide Kills *Trypanosoma cruzi* Parasites by Inducing Different Cell Death Pathways." *Toxicon* 69:227-39.
5. Affranchino, JoséL. L., Carlos F. Ibañez, Alejandro O. Luquetti, Anis Rassi, Maria B. Reyes, Roberto A. Macina, Lena Åslund, Ulf Pettersson, and Alberto C. C. Frasch. 1989. "Identification of a *Trypanosoma cruzi* Antigen That Is Shed during the Acute Phase of Chagas' Disease." *Molecular and Biochemical Parasitology* 34(3):221–28.

## Referencias

---

6. Afonso, Anna M., Mark H. Ebell, and Rick L. Tarleton. 2012. "A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(11).
7. Akers, Johnny C., David Gonda, Ryan Kim, Bob S. Carter, and Clark C. Chen. 2013. "Biogenesis of Extracellular Vesicles (EV): Exosomes, Microvesicles, Retrovirus-like Vesicles, and Apoptotic Bodies." *Journal of Neuro-Oncology* 113(1):1–11.
8. Alberto Toso, M., U. Felipe Vial, and Norbel Galanti. 2011. "Transmisión de La Enfermedad de Chagas Por Vía Oral." *Revista Medica de Chile* 139(2):258–66.
9. Almeida, Igor C., Maristela M. Camargo, Daniela O. Procópio, Luiz S. Silva, Angela Mehlert, Luiz R. Travassos, Ricardo T. Gazzinelli, and Michael A. J. Ferguson. 2000. "Highly Purified Glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* Are Potent Proinflammatory Agents." *EMBO Journal* 19(7):1476–85.
10. Al-Nedawi, Khalid, Brian Meehan, and Janusz Rak. 2009. "Microvesicles: Messengers and Mediators of Tumor Progression." *Cell Cycle* 8(13):2014–18.
11. Alonso-Padilla, Julio, Nuria Cortés-Serra, María Jesús Pinazo, María Elena Bottazzi, Marcelo Abril, Fabiana Barreira, Sergio Sosa-Estani, Peter Jay Hotez, and Joaquim Gascón. 2019. "Strategies to Enhance Access to Diagnosis and Treatment for Chagas Disease Patients in Latin America." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 17(3):145–57.
12. Álvarez-Hernández, D. A., G. A. Franyuti-Kelly, R. Díaz-López-Silva, A. M. González-Chávez, D. González-Hermosillo-Cornejo, and R. Vázquez-López. 2018. "Chagas Disease: Current Perspectives on a Forgotten Disease." *Revista Médica Del Hospital General de México* 81(3):154–64.

13. Alves, Maria Júlia M. and Walter Colli. 2007. "Trypanosoma cruzi: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival." *IUBMB Life* 59(4-5):274-9
14. Alves, Maria Julia Manso, Rebeca Kawahara, Rosa Viner, Walter Colli, Eliciane Cevolani Mattos, Morten Thaysen-Andersen, Martin Røssel Larsen, and Giuseppe Palmisano. 2017. "Comprehensive Glycoprofiling of the Epimastigote and Trypomastigote Stages of *Trypanosoma cruzi*." *Journal of Proteomics* 6;151:182-192.
15. Amezcua Vesely, María Carolina, Constanza Rodríguez, Adriana Gruppi, and Eva Virginia Acosta Rodríguez. 2020. "Interleukin-17 Mediated Immunity during Infections with *Trypanosoma cruzi* and Other Protozoans." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1866(5):165706.
16. Ammerman, Nicole C., Magda Beier-Sexton, and Abdu F. Azad. 2008. "Growth and Maintenance of Vero Cell Lines." *Current Protocols in Microbiology* Appendix 4:Appendix 4E.
17. Andreu, Zoraida and María Yáñez-Mó. 2014. "Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function." *Frontiers in Immunology* 16;5:442.
18. Anez, Nestor, Gladys Crisante, Flavia Maia da Silva, Agustina Rojas, Hugo Carrasco, Eufrosina S. Umezawa, Anna Maria S. Stolf, Jose Luis Ramirez, and Marta M. G. Teixeira. 2004. "Predominance of Lineage I among *Trypanosoma cruzi* Isolates from Venezuelan Patients with Different Clinical Profiles of Acute Chagas' Disease." *Tropical Medicine and International Health* 9(12):1319–26.
19. Angkasekwinai, Pornpimon, Seon Hee Chang, Manoj Thapa, Hiroshi Watarai, and Chen Dong. 2010. "Regulation of IL-9 Expression by IL-25 Signaling." *Nature Immunology* 11(3):250–56.
20. Aranda, Patrick S., Dollie M. LaJoie, and Cheryl L. Jorcyk. 2012. "Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality." *Electrophoresis* 33(2):366–69.

21. Arraud, N., R. Linares, S. Tan, C. Gounou, J. M. Pasquet, S. Mornet, and A. R. Brisson. 2014. "Extracellular Vesicles from Blood Plasma: Determination of Their Morphology, Size, Phenotype and Concentration." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12(5):614–27.
22. Aung, Thiha, Bjoern Chapuy, Daniel Vogel, Dirk Wenzel, Martin Oppermann, Marlen Lahmann, Toni Weinhage, Kerstin Menck, Timo Hupfeld, Raphael Koch, Lorenz Trümper, and Gerald G. Wulf. 2011. "Exosomal Evasion of Humoral Immunotherapy in Aggressive B-Cell Lymphoma Modulated by ATP-Binding Cassette Transporter A3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(37):15336–41.
23. Avila, Herbert A., David S. Sigman, Lee M. Cohen, Robert C. Millikan, and Larry Simpson. 1991. "Polymerase Chain Reaction Amplification of *Trypanosoma Cruzi* Kinetoplast Minicircle DNA Isolated from Whole Blood Lysates: Diagnosis of Chronic Chagas' Disease." *Molecular and Biochemical Parasitology* 48(2):211–21.
24. Balaj, Leonora, Ryan Lessard, Lixin Dai, Yoon-Jae Cho, Scott L. Pomeroy, Xandra O. Breakefield, and Johan Skog. 2011. "Tumour Microvesicles Contain Retrotransposon Elements and Amplified Oncogene Sequences." *Nature Communications* 2(1):180.
25. Basso, Beatriz. 2013. "Modulation of Immune Response in Experimental Chagas Disease." *World Journal of Experimental Medicine* 3(1):1.
26. Bautista-López, Norma L., Momar Ndao, Fabio Vasquez Camargo, Takeshi Nara, Takeshi Annoura, Darryl B. Hardie, Christoph H. Borchers, and Armando Jardim. 2017. "Characterization and Diagnostic Application of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released from Infected Mammalian Cells" edited by Y.-W. Tang. *Journal of Clinical Microbiology* 55(3):744–58.
27. Bayer-Santos, Ethel, Clemente Aguilar-Bonavides, Silas Pessini Rodrigues,



- 
- Esteban Maurício Cordero, Alexandre Ferreira Marques, Armando Varela-Ramirez, Hyungwon Choi, Nobuko Yoshida, José Franco da Silveira, and Igor C. Almeida. 2013. "Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins." *Journal of Proteome Research* 12(2):883–97.
28. Bebelman, Maarten P., Martine J. Smit, D. Michiel Pegtel, and S. Rubina Baglio. 2018. "Biogenesis and Function of Extracellular Vesicles in Cancer." *Pharmacology and Therapeutics* 188:1–11.
29. Bermejo, Daniela A., Shaun W. Jackson, Melisa Gorosito-Serran, Eva V. Acosta-Rodriguez, Maria Carolina Amezcua Vesely, Blythe D. Sather, Akhilesh K. Singh, Socheath Khim, Juan Mucci, Denny Liggitt, Oscar Campetella, Mohamed Oukka, Adriana Gruppi, and David J. Rawlings. 2013. "*Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Initiates a Program Independent of the Transcription Factors ROR $\gamma$ t and Ahr That Leads to IL-17 Production by Activated B Cells." *Nature Immunology* 14(5):514–22.
30. Bern, Caryn, Diana L. Martin, and Robert H. Gilman. 2011. "Acute and Congenital Chagas Disease." *Advances in Parasitology*. Vol. 75. Academic Press. 19–47.
31. Bern, Caryn. 2015. "Chagas' Disease" edited by D. L. Longo. *New England Journal of Medicine* 373(5):456–66.
32. Bhattacharyya, Tapan, Emily A. Mills, and Michael A. Miles. 2015. "Prospects for *T. cruzi* Lineage-Specific Serological Surveillance of Wild Mammals." *Acta Tropica* 151:182–86.
33. Bian, Fang, Flavia L. Barbosa, Rosa M. Corrales, Flavia S. A. Pelegriño, Eugene A. Volpe, Stephen C. Pflugfelder, and Cintia S. de Paiva. 2015. "Altered Balance of Interleukin-13/Interferon-Gamma Contributes to Lacrimal Gland Destruction and Secretory Dysfunction in CD25 Knockout Model of Sjögren's Syndrome." *Arthritis Research and Therapy* 17(1).

## Referencias

---

34. Bittel, Daniel C. and Jyoti K. Jaiswal. 2019. "Contribution of Extracellular Vesicles in Rebuilding Injured Muscles." *Frontiers in Physiology* 18;10:828.
35. Blanc, Lionel and Michel Vidal. 2010. "Reticulocyte Membrane Remodeling: Contribution of the Exosome Pathway." *Current Opinion in Hematology* 17(3):177–83.
36. Blandon, R. 1969. "Tránsito Esofágico En Pacientes Con Enfermedad de Chagas En Panamá." *Arq Aastroenterol* 6:189–96.
37. Bonfim-Melo, Alexis, Eden R. Ferreira, Pilar T. V. Florentino, and Renato A. Mortara. 2018. "Amastigote Synapse: The Tricks of *Trypanosoma cruzi* Extracellular Amastigotes." *Frontiers in Microbiology* 27;9:1341.
38. Bonney, Kevin M. and David M. Engman. 2015. "Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Looking Back, Looking Ahead." *American Journal of Pathology* 185(6):1537–47.
39. Bonney, Kevin M., Daniel J. Luthringer, Stacey A. Kim, Nisha J. Garg, and David M. Engman. 2019. "Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 14:421–47.
40. Bosseno, Marie France, Christian Barnabé, Ezequiel Magallón Gastélum, Felipe Lozano Kasten, Janine Ramsey, Bertha Espinoza, and Simone Frédérique Brenière. 2002. "Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico." *Journal of Clinical Microbiology* 40(2):627–32.
41. Brandao, Adeilton, Franklyn Samudio, Octavio Fernandes, Jose E. Calzada, and Octavio E. Sousa. 2008. "Genotyping of Panamanian *Trypanosoma cruzi* Stocks Using the Calmodulin 3'UTR Polymorphisms." *Parasitology Research* 102(3):523–26.
42. Brenière, Simone Frédérique, Etienne Waleckx, and Christian Barnabé. 2016. "Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory" edited by A. Debrabant. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(8):e0004792.

- 
43. Brenière, Simone Frédérique, Marie France Bosseno, Ezequiel Magallón-Gastelúm, Eloy Gualberto Castillo Ruvalcaba, Margarita Soto Gutierrez, Eloy Christian Montaña Luna, Jorge Tejada Basulto, Françoise Mathieu-Daudé, Annie Walter, and Felipe Lozano-Kasten. 2007. "Peridomestic Colonization of *Triatoma Longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma Barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a Rural Community with Active Transmission of *Trypanosoma Cruzi* in Jalisco State, Mexico." *Acta Tropica* 101(3):249–57.
  44. Brière, Francine, Christine Servet-Delprat, Jean Michel Bridon, Jean Marie Saint-Remy, and Jacques Banchereau. 1994. "Human Interleukin 10 Induces Naive Surface Immunoglobulin D+ (SIgD+) B Cells to Secrete IgG1 and IgG3." *Journal of Experimental Medicine* 179(2):757–62.
  45. Brisse, Sylvain, Jan Henriksson, Christian Barnabé, Emmanuel J. P. Douzery, Dirk Berkvens, Myrna Serrano, Maria Ruth C. De Carvalho, Gregory A. Buck, Jean Claude Dujardin, and Michel Tibayrenc. 2003. "Evidence for Genetic Exchange and Hybridization in *Trypanosoma Cruzi* Based on Nucleotide Sequences and Molecular Karyotype." *Infection, Genetics and Evolution* 2(3):173–83.
  46. Brodskyn, C. I., A. M. M. Silva, H. A. Takehara, and I. Mota. 1989. IgG Subclasses Responsible for Immune Clearance in Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol* 67 (Pt 6):343-8.
  47. Brossas, Jean Yves, Julián Ernesto Nicolás Gulin, Margarita Maria Catalina Bisio, Manuel Chapelle, Carine Marinach-Patrice, Mallaury Bordessoules, George Palazon Ruiz, Jeremy Vion, Luc Paris, Jaime Altcheh, and Dominique Mazier. 2017. "Secretome Analysis of *Trypanosoma cruzi* by Proteomics Studies." *PLoS ONE* 12(10).
  48. Bullard, Jared, Kerry Dust, Duane Funk, James E. Strong, David Alexander, Lauren Garnett, Carl Boodman, Alexander Bello, Adam Hedley, Zachary Schiffman, Kaylie Doan, Nathalie Bastien, Yan Li, Paul G. Van Caesele, and

- Guillaume Poliquin. 2020. "Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples." *Clinical Infectious Diseases* 71(10):2663–66.
49. Burgos, Juan M., Jaime Altcheh, Margarita Bisio, Tomas Duffy, Helder M. S. Valadares, María Elena Seidenstein, Romina Piccinali, Jorge M. Freitas, Mariano J. Levin, Liliana Macchi, Andrea M. Macedo, Hector Freilij, and Alejandro G. Schijman. 2007. "Direct Molecular Profiling of Minicircle Signatures and Lineages of *Trypanosoma cruzi* Bloodstream Populations Causing Congenital Chagas Disease." *International Journal for Parasitology* 37(12):1319–27.
50. Burgos, Juan Miguel, Mirta Diez, Carlos Vigliano, Margarita Bisio, Marikena Risso, Tomás Duffy, Carolina Cura, Betina Brusses, Liliana Favaloro, María Susana Leguizamon, Raul Horacio Lucero, Ruben Laguens, Mariano Jorge Levin, Roberto Favaloro, and Alejandro Gabriel Schijman. 2010. "Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation." *Clinical Infectious Diseases* 51(5):485–95.
51. Buschiazzo, Alejandro, Romina Muiá, Nicole Larrieux, Tamara Pitcovsky, Juan Mucci, and Oscar Campetella. 2012. "*Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase in Complex with a Neutralizing Antibody: Structure/Function Studies towards the Rational Design of Inhibitors." *PLoS Pathogens* 8(1):e1002474.
52. Bustamante, Juan M. and Rick L. Tarleton. 2014. "Potential New Clinical Therapies for Chagas Disease." *Expert Review of Clinical Pharmacology* 7(3):317–25.
53. Caballero, Zuleima C., Octavio E. Sousa, Waldelania P. Marques, Amadeo Saez-Alquezar, and Eufrosina S. Umezawa. 2007. "Evaluation of Serological Tests to Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine

- 
- Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* Spp.” *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 14(8):1045–49.
54. Caballero, Zuleima, Ricardo Correa, Marilda S. Nascimento, Alcibiades Villarreal, Alejandro Llanes, and Norival Kesper, JR. 2019. “High Sensitivity and Reproducibility of In-house ELISA s Using Different Genotypes of *Trypanosoma cruzi*.” *Parasite Immunology* 41(7):e12627.
55. Caccia, Dario, Matteo Dugo, Maurizio Callari, and Italia Bongarzone. 2013. “Bioinformatics Tools for Secretome Analysis.” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1834(11):2442–53.
56. Caldas, Ivo S., Elda G. Santos, and Rômulo D. Novaes. 2019. “An Evaluation of Benznidazole as a Chagas Disease Therapeutic.” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20(15):1797–1807.
57. Calzada, José E., Vanesa Pineda, Juan D. Garisto, Franklyn Samudio, Ana Maria Santamaria, and Azael Saldaña. 2010. “Human Trypanosomiasis in the Eastern Region of the Panama Province: New Endemic Areas for Chagas Disease.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82(4):580–82.
58. Carlier, Yves and Faustino Torrico. 2003. “Congenital Infection with *Trypanosoma Cruzi*: From Mechanisms of Transmission to Strategies for Diagnosis and Control.” *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(6):767–71.
59. Carnino, Jonathan M., Heedoo Lee, and Yang Jin. 2019. “Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles from Broncho-Alveolar Lavage Fluid: A Review and Comparison of Different Methods.” *Respiratory Research* 20(1):240.
60. Carrasco, Hernán J., Maikell Segovia, Martin S. Llewellyn, Antonio Morocoima, Servio Urdaneta-Morales, Cinda Martínez, Clara E. Martínez, Carlos Garcia, Marlenes Rodríguez, Raul Espinosa, Belkisyolé A. de Noya,

- Zoraida Díaz-Bello, Leidi Herrera, Sinead Fitzpatrick, Matthew Yeo, Michael A. Miles, and M. Dora Feliciangeli. 2012. “Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(6):e1707.
61. Casado, Santiago, Maria Del Val Toledo Lobo, and Carlos Luis Paíno. 2017. “Dynamics of Plasma Membrane Surface Related to the Release of Extracellular Vesicles by Mesenchymal Stem Cells in Culture.” *Scientific Reports* 7(1):1–9.
62. Catalá, SS, DM Maida, H. Caro-Riaño, N. Jaramillo, and J. Moreno. 2004. “Changes Associated with Laboratory Rearing in Antennal Sensilla Patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 99(1):25–30.
63. Ceballos, L. A., M. V. Cardinal, G. M. Vazquez-Prokopec, M. A. Lauricella, M. M. Orozco, R. Cortinas, A. G. Schijman, M. J. Levin, U. Kitron, and R. E. Gürtler. 2006. “Long-Term Reduction of *Trypanosoma cruzi* Infection in Sylvatic Mammals Following Deforestation and Sustained Vector Surveillance in Northwestern Argentina.” *Acta Tropica* 98(3):286–96.
64. Cestari, I., E. Ansa-Addo, P. Deolindo, J. M. Inal, and M. I. Ramirez. 2012. “*Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles.” *The Journal of Immunology* 188(4):1942–52.
65. Chagas, Carlos and Carlos Chagas. 1909. “Nova Tripanozomíaze Humana: Estudos Sobre a Morfolojia e o Ciclo Evolutivo Do Schizotrypanum Cruzi n. Gen., n. Sp., Ajente Etiolojico de Nova Entidade Morbida Do Homem.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 1(2):159–218.
66. Chocair, E. Sabbaga, V. Amato Neto, M. Shiroma, and G. M. Goes. 1981. “Kidney Transplantation: A New Way of Transmitting Chagas Disease.” *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 23(6):280-2.

- 
67. Choudhuri, Subhadip and Nisha Jain Garg. 2020. "PARP1-CGAS-NF-KB Pathway of Proinflammatory Macrophage Activation by Extracellular Vesicles Released during *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease" *PLOS Pathogens* 16(4):e1008474.
68. Coakley, Gillian, Rick M. Maizels, and Amy H. Buck. 2015. "Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections." *Trends in Parasitology* 31(10):477–89.
69. Conteh, Lesong, Thomas Engels, and David H. Molyneux. 2010. "Socioeconomic Aspects of Neglected Tropical Diseases." *The Lancet* 375(9710):239–47.
70. Cordeiro, F. D., O. A. Martins-Filho, M. O. Da Costa Rocha, S. J. Adad, R. Corrêa-Oliveira, and A. J. Romanha. 2001. "Anti-*Trypanosoma cruzi* Immunoglobulin G1 Can Be a Useful Tool for Diagnosis and Prognosis of Human Chagas' Disease." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8(1):112–18.
71. Cordero-Montoya, Gabino, A. Laura Flores-Villegas, Paz María Salazar-Schettino, Mauro O. Vences-Blanco, Maya Rocha-Ortega, Ana E. Gutiérrez-Cabrera, Eréndira Rojas-Ortega, and Alex Córdoba-Aguilar. 2019. "The Cost of Being a Killer's Accomplice: *Trypanosoma cruzi* Impairs the Fitness of Kissing Bugs." *Parasitology Research* 118(9):2523-2529.
72. Coura, José Rodrigues and João Carlos Pinto Dias. 2009. "Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Disease: 100 Years after Its Discovery." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104(suppl 1):31–40.
73. Coura, José Rodrigues and Pedro Albajar Vias. 2010. "Chagas Disease: A New Worldwide Challenge." *Nature* 465(7301 SUPPL.):S6–7.
74. Coura, José Rodrigues, Angela Cristina Verissimo Junqueira, Marcio Neves Boia, and Octavio Fernandes. 1999. "Chagas Disease: From Bush to Huts and Houses. Is It the Case of the Brazilian Amazon?" *Memorias Do Instituto*

*Oswaldo Cruz* 94(SUPPL. 1):379–84.

75. Coura, José Rodrigues, Pedro Albajar Viñas, and Angela Cv Junqueira. 2014. “Ecoepidemiology, Short History and Control of Chagas Disease in the Endemic Countries and the New Challenge for Non-Endemic Countries.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109(7):856–62.
76. Cronemberger-Andrade, André, Patrícia Xander, Rodrigo Pedro Soares, Natália Lima Pessoa, Marco Antônio Campos, Cameron C. Ellis, Brian Grajeda, Yifat Ofir-Birin, Igor Correia Almeida, Neta Regev-Rudzki, and Ana Claudia Torrecilhas. 2020. “*Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:99.
77. Cuervo, Patricia, Elisa Cupolillo, Iris Segura, Nancy Saravia, and Octavio Fernandes. 2002. “Genetic Diversity of Colombian Sylvatic *Trypanosoma cruzi* Isolates Revealed by the Ribosomal DNA.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97(6):877–80.
78. Cuevas, Ileana C., Juan J. Cazzulo, and Daniel O. Sánchez. 2003. “Gp63 Homologues in *Trypanosoma cruzi*: Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection.” *Infection and Immunity* 71(10):5739–49.
79. Cura, Carolina I., Ana M. Mejía-Jaramillo, Tomás Duffy, Juan M. Burgos, Marcela Rodriguero, Marta V. Cardinal, Sonia Kjos, Rodrigo Gurgel-Gonçalves, Denis Blanchet, Luis M. De Pablos, Nicolás Tomasini, Alexandre da Silva, Graciela Russomando, Cesar A. Cub. Cuba Cuba, Christine Aznar, Teresa Abate, Mariano J. Levin, Antonio Osuna, Ricardo E. Gürtler, Patricio Diosque, Aldo Solari, Omar Triana-Chávez, and Alejandro G. Schijman. 2010. “*Trypanosoma cruzi* I Genotypes in Different Geographical Regions and Transmission Cycles Based on a Microsatellite Motif of the Intergenic Spacer



- of Spliced-Leader Genes.” *International Journal for Parasitology* 40(14):1599–1607.
80. Cura, Carolina I., Tomas Duffy, Raúl H. Lucero, Margarita Bisio, Julie Péneau, Matilde Jimenez-Coello, Eva Calabuig, María J. Gimenez, Edward Valencia Ayala, Sonia A. Kjos, José Santalla, Susan M. Mahaney, Nelly M. Cayo, Claudia Nagel, Laura Barcán, Edith S. Málaga Machaca, Karla Y. Acosta Viana, Laurent Brutus, Susana B. Ocampo, Christine Aznar, Cesar A. Cuba Cuba, Ricardo E. Gürtler, Janine M. Ramsey, Isabela Ribeiro, John L. VandeBerg, Zaida E. Yadon, Antonio Osuna, Alejandro G. Schijman, Edward Valencia Ayala, Sonia A. Kjos, José Santalla, Susan M. Mahaney, Nelly M. Cayo, Claudia Nagel, Laura Barcán, Edith S. Málaga Machaca, Karla Y. Acosta Viana, Laurent Brutus, Susana B. Ocampo, Christine Aznar, Cesar A. Cuba Cuba, Ricardo E. Gürtler, Janine M. Ramsey, Isabela Ribeiro, John L. VandeBerg, Zaida E. Yadon, Antonio Osuna, and Alejandro G. Schijman. 2015. “Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(5): e0003765.
81. D’Ávila, Daniella Alchaar, Lúcia Maria C Galvão, Giovane R. Sousa, Constança Britto, Otacilio C. Moreira, and Egler Chiari. 2018. “Monitoring the Parasite Load in Chronic Chagas Disease Patients: Comparison between Blood Culture and Quantitative Real Time PCR.” *PloS One* 13(11):e0208133.
82. Da Fonseca, Leonardo Marques, Kelli Monteiro da Costa, Victoria de Sousa Chaves, Célio Geraldo Freire-De-Lima, Alexandre Morrot, Lucia Mendonça-Previato, Jose Osvaldo Previato, and Leonardo Freire-De-Lima. 2019. “Theft and Reception of Host Cell’s Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidases and Mucin-like Molecules on Chagas’ Disease Immunomodulation.” *Frontiers in Immunology* 10:164.
83. Da Silveira, J. Franco, Paulo A. Abrahamsohn, and Walter Colli. 1979.

- “Plasma Membrane Vesicles Isolated from Epimastigote Forms of *Trypanosoma cruzi*.” *Biochim Biophys Acta* 19;550(2):222-32.
84. Daines, Michael O. and Gurjit K. Khurana Hershey. 2002. “A Novel Mechanism by Which Interferon- $\gamma$  Can Regulate Interleukin (IL)-13 Responses. Evidence for Intracellular Stores of IL-13 Receptor  $\alpha$ -2 and Their Rapid Mobilization by Interferon- $\gamma$ .” *Journal of Biological Chemistry* 277(12):10387–93.
85. Dario, Maria Augusta, Marina Silva Rodrigues, Juliana Helena Da Silva Barros, Samanta Cristina Das Chagas Xavier, Paulo Sérgio D’Andrea, André Luiz Rodrigues Roque, and Ana Maria Jansen. 2016. “Ecological Scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU Characterization of a Fatal Acute Chagas Disease Case Transmitted Orally (Espírito Santo State, Brazil).” *Parasites & Vectors* 9(1):477.
86. Das, Sreya, Srisathya Srinivasan, Ankita Srivastava, Sushant Kumar, Gargi Das, Suman Das, Alka Dwivedi, Atharva Karulkar, Khushi Makkad, Richa Bilala, Ankit Gupta, Abhijeet Sawant, Chitra Nayak, Prakriti Tayalia, and Rahul Purwar. 2019. “Differential Influence of IL-9 and IL-17 on Actin Cytoskeleton Regulates the Migration Potential of Human Keratinocytes.” *The Journal of Immunology* 202(7):1949–61.
87. De Bona, Elidiana, Kárita Cláudia Freitas Lidani, Lorena Bavia, Zahra Omidian, Luiza Helena Gremski, Thaisa Lucas Sandri, and Iara J. de Messias Reason. 2018. “Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?” *Frontiers in Immunology* 9:1842.
88. De Freitas, Jorge M., Luiz Augusto-Pinto, Juliana R. Pimenta, Luciana Bastos-Rodrigues, Vanessa F. Gonçalves, Santuza M. R. Teixeira, Egler Chiari, Ângela C. V Junqueira, Octavio Fernandes, Andréa M. Macedo, Carlos Renato Machado, and Sérgio D. J. Pena. 2006. “Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*”. *PLoS Pathogens* 2(3):e24.

- 
89. De Pablos, Luis Miguel, Isabel María Díaz Lozano, Maria Isabel Jercic, Markela Quinzada, Maria José Giménez, Eva Calabuig, Ana Margarita Espino, Alejandro Gabriel Schijman, Inés Zulantay, Werner Apt, and Antonio Osuna. 2016. “The C-Terminal Region of *Trypanosoma cruzi* MASPs Is Antigenic and Secreted via Exovesicles.” *Scientific Reports* 6:27293.
90. Deatheragea, Brooke L. and Brad T. Cooksona. 2012. “Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: A Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life”. *Infection and Immunity* 80(6):1948–57.
91. Deolindo, Poliana, Ingrid Evans-Osses, and Marcel Ivan Ramirez. 2013. “Microvesicles and Exosomes as Vehicles between Protozoan and Host Cell Communication.” *Biochemical Society Transactions*. Vol. 41. Portland Press 252–57.
92. Deregibus, Maria Chiara, Federico Figliolini, Sergio D’Antico, Paola Maria Manzini, Chiara Pasquino, Michela De Lena, Ciro Tetta, Maria Felice Brizzi, and Giovanni Camussi. 2016. “Charge-Based Precipitation of Extracellular Vesicles.” *International Journal of Molecular Medicine* 38(5):1359–66.
93. Deville, Sarah, Pascale Berckmans, Rebekka Van Hoof, Ivo Lambrichts, Anna Salvati, and I. Nelissen. 2021. “Comparison of Extracellular Vesicle Isolation and Storage Methods Using High-Sensitivity Flow Cytometry.” *PLoS One* 16(2): e0245835.
94. Dias, João Carlos Pinto and Vicente Amato Neto. 2011a. “Prevenção Referente Às Modalidades Alternativas de Transmissão Do *Trypanosoma cruzi* No Brasil.” *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(SUPPL. 2):68–72.
95. Dias, João Carlos Pinto and Vicente Amato Neto. 2011b. “Prevenção Referente Às Modalidades Alternativas de Transmissão Do *Trypanosoma cruzi* No

- Brasil.” *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44 Suppl 2:68-72.
96. Dias, João Carlos Pinto, A. C. Silveira, and C. J. Schofield. 2002. “The Impact of Chagas Disease Control in Latin America: A Review.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97(5):603–12.
97. Díaz Lozano, Isabel María, Luis Miguel De Pablos, Silvia Andrea Longhi, María Paola Zago, Alejandro Gabriel Schijman, and Antonio Osuna. 2017. “Immune Complexes in Chronic Chagas Disease Patients Are Formed by Exovesicles from *Trypanosoma cruzi* Carrying the Conserved MASP N-Terminal Region.” *Scientific Reports* 7(1):44451.
98. Díaz, Martha L. and Clara I. González. 2014. “Enfermedad de Chagas Agudo: Transmisión Oral de *Trypanosoma cruzi* Como Una Vía de Transmisión Re-Emergente.” *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud* 177–88.
100. Díaz, Sebastián, Francisco Panzera, Nicolás Jaramillo-O, Ruben Pérez, Rosina Fernández, Gustavo Vallejo, Azael Saldaña, Jose E. Calzada, Omar Triana, and Andrés Gómez-Palacio. 2014. “Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the Rhodnius (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group.” edited by P. L. Oliveira. *PloS One* 9(2):e87493.
101. Dopico, Eva, Rodrigo Pimenta Del-Rei, Bertha Espinoza, Itziar Ubillos, Nilson Ivo Tonin Zanchin, Elena Sulleiro, Zaira Moure, Paola Alejandra Fiorani Celedon, Wayner Vieira Souza, Edimilson Domingos da Silva, Yara Miranda Gomes, and Fred Luciano Neves Santos. 2019. “Immune Reactivity to *Trypanosoma cruzi* Chimeric Proteins for Chagas Disease Diagnosis in Immigrants Living in a Non-Endemic Setting.” *BMC Infectious Diseases* 19(1):251.
102. Dragovic, Rebecca A., Christopher Gardiner, Alexandra S. Brooks, Dionne S.

- 
- Tannetta, David J. P. Ferguson, Patrick Hole, Bob Carr, Christopher W. G. Redman, Adrian L. Harris, Peter J. Dobson, Paul Harrison, and Ian L. Sargent. 2011. "Sizing and Phenotyping of Cellular Vesicles Using Nanoparticle Tracking Analysis." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7(6):780–88.
103. Dutra, Walderez O., Cristiane A. S. Menezes, Luisa M. D. Magalhães, and Kenneth J. Gollob. 2014. "Immunoregulatory Networks in Human Chagas Disease NIH Public Access." *Parasite Immunol* 36(8):377–87.
104. Duz, Ana Luiza Cassin, Paula Melo De Abreu Vieira, Bruno Mendes Roatt, Rodrigo Dian Oliveira Aguiar-Soares, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Flávia Carvalho Bitencourt de Oliveira, Levi Eduardo Soares Reis, Washington Luiz Tafuri, Vanja Maria Veloso, Alexandre Barbosa Reis, and Cláudia Martins Carneiro. 2014. "The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* Experimental Infections Induce Distinct Immune Responses and Cardiac Fibrosis in Dogs." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109(8):1005–13.
105. Ebner, Andreas, Ferry Kienberger, Gerald Kada, Cordula M. Stroh, Manfred Geretschläger, A. S. M. Kamruzzahan, Linda Wildling, W. Travis Johnson, Brian Ashcroft, Jeremy Nelson, Stuart M. Lindsay, Hermann J. Gruber, and Peter Hinterdorfer. 2005. "Localization of Single Avidin-Biotin Interactions Using Simultaneous Topography and Molecular Recognition Imaging." *ChemPhysChem* 6(5):897–900.
106. Echeverría, Luis Eduardo, Rachel Marcus, Gabriel Novick, Sergio Sosa-Estani, Kate Ralston, Ezequiel Jose Zaidel, Colin Forsyth, Antonio Luiz P. Ribeiro, Iván Mendoza, Mariano Luis Falconi, Jorge Mitelman, Carlos A. Morillo, Ana Cristina Pereiro, María Jesús Pinazo, Roberto Salvatella, Felipe Martinez, Pablo Perel, Álvaro Sosa Liprandi, Daniel José Piñeiro, and Gustavo Restrepo Molina. 2020. "WHF IASC Roadmap on Chagas Disease." *Global Heart* 15(1):26.

107. Eickhoff, Christopher Steven, Brian Anthony Dunn, Nicole Lea Sullivan, and Daniel Fredric Hoft. 2013. "Comparison of the Infectivity of *Trypanosoma cruzi* Insect-Derived Metacyclic Trypomastigotes after Mucosal and Cutaneous Contaminative Challenges." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108(4):508–11.
108. Eliaz, Dror, Sriram Kannan, Hadassa Shaked, Gil Arvatz, Itai Dov Tkacz, Lior Binder, Hiba Waldman Ben-Asher, Uthman Okalang, Vaibhav Chikne, Smadar Cohen-Chalamish, and Shulamit Michaeli. 2017. "Exosome Secretion Affects Social Motility in *Trypanosoma brucei*" edited by K. L. Hill. *PLOS Pathogens* 13(3):e1006245.
109. Elyaman, Wassim, Elizabeth M. Bradshaw, Catherine Uyttenhove, Valérie Dardalhon, Amit Awasthi, Jaime Imitola, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka, Jacques Van Snick, Jean Christophe Renauld, Vijay K. Kuchroo, and Samia J. Khoury. 2009. "IL-9 Induces Differentiation of TH17 Cells and Enhances Function of FoxP3+ Natural Regulatory T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31):12885–90.
110. Evans-Osses, Ingrid, Andres Mojoli, Marcia Holsbach Beltrame, Denise Endo Da Costa, Wanderson Duarte Darocha, Thirumalaisamy P. Velavan, Iara De Messias-Reason, and Marcel Ivan Ramirez. 2014. "Differential Ability to Resist to Complement Lysis and Invade Host Cells Mediated by MBL in R4 and 860 Strains of *Trypanosoma cruzi*." *FEBS Letters* 588(6):956–61.
111. Feng, Du, Wen Long Zhao, Yun Ying Ye, Xiao Chen Bai, Rui Qin Liu, Lei Fu Chang, Qiang Zhou, and Sen Fang Sui. 2010b. "Cellular Internalization of Exosomes Occurs through Phagocytosis." *Traffic* 11(5):675–87.
112. Ferrão, Patrícia Mello, Claudia Masini d'Avila-Levy, Tania Cremonini Araujo-Jorge, Wim Maurits Degraeve, Antônio da Silva Gonçalves, Luciana Ribeiro Garzoni, Ana Paula Lima, Jean Jacques Feige, Sabine Bailly, Leila Mendonça-Lima, and Mariana Caldas Waghabi. 2015. "Cruzipain Activates

- 
- Latent TGF- $\beta$  from Host Cells during *T. Cruzi* Invasion.” *PloS One* 10(5):e0124832.
113. Ferreira, Cláudio Santos, Prazeres Conceição Martinho, Vicente Amato Neto, and Roseana Rodrigues Bressane Cruz. 2001. “Pasteurization of Human Milk to Prevent Transmission of Chagas Disease.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 43(3):161–62.
114. Ferreira, Éden R., Alexis Bonfim-Melo, Renato A. Mortara, and Diana Bahia. 2012. “*Trypanosoma cruzi* Extracellular Amastigotes and Host Cell Signaling: More Pieces to the Puzzle.” *Frontiers in Immunology* 3:363.
115. Ferrer, Elizabeth. 2015. “Molecular techniques for the diagnosis of Chagas disease.” 27:359–71.
116. Filigheddu, Maria Teresa, Miguel Górgolas, and José Manuel Ramos. 2017. “Enfermedad de Chagas de Transmisión Oral.” *Medicina Clinica* 148(3):125–31.
117. Fitzner, Dirk, Mareike Schnaars, Denise van Rossum, Gurumoorthy Krishnamoorthy, Payam Dibaj, Mostafa Bakhti, Tommy Regen, Uwe-Karsten Hanisch, and Mikael Simons. 2011. “Selective Transfer of Exosomes from Oligodendrocytes to Microglia by Macropinocytosis.” *Journal of Cell Science* 124:447–58.
118. Florell, Scott R., Cheryl M. Coffin, Joseph A. Holden, James W. Zimmermann, John W. Gerwels, Bradley K. Summers, David A. Jones, and Sancy A. Leachman. 2001. “Preservation of RNA for Functional Genomic Studies: A Multidisciplinary Tumor Bank Protocol.” *Modern Pathology* 14(2):116–28.
119. Flores-Chavez, Maria Delmans, Vittorio Sambri, Volkmar Schottstedt, Fernando Aparicio Higuera-Escalante, Dieter Roessler, Monica Chaves, Tina Laengin, Alfredo Martinez, and Bernhard Fleischer. 2018. “Evaluation of the Elecsys Chagas Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific

- Antibodies in a Multicenter Study in Europe and Latin America.” *Journal of Clinical Microbiology* 56(5):e01446-17.
120. Flores-Ferrer, Alheli, | Olivier Marcou, | Etienne Waleckx, Eric Dumonteil, and Sébastien Gourbière. 2018. “Evolutionary Ecology of Chagas Disease; What Do We Know and What Do We Need?” *Evolutionary Applications* 11:470–87.
121. Frasc, A. C. C. and M. B. Reyes. 1990. “Diagnosis of Chagas Disease Using Recombinant DNA Technology.” *Parasitology Today* 6(4):137–39.
122. Fridberg, Alina, Kathryn T. Buchanan, and David M. Engman. 2007. “Flagellar Membrane Trafficking in Kinetoplastids.” *Parasitology Research* 100(2):205–12.
123. Galvao, Clever, Rodolfo Caravallo, Dayse Da Silva Rocha, and José Jurberg. 2003. “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(1):1.
124. Garcia, Eloi S., Fernando A. Genta, Patricia de Azambuja, and Günter A. Schaub. 2010. “Interactions between Intestinal Compounds of Triatomines and *Trypanosoma cruzi*.” *Trends in Parasitology* 26(10):499–505.
125. Garcia, Eloi S., Norman A. Ratcliffe, Miranda M. Whitten, Marcelo S. Gonzalez, and Patricia Azambuja. 2007. “Exploring the Role of Insect Host Factors in the Dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* Interactions.” *Journal of Insect Physiology* 53(1):11–21.
126. Garcia-Silva, Maria R., Florencia Cabrera-Cabrera, Roberta Ferreira Cura Das Neves, Thaís Souto-Padrón, Wanderley De Souza, and Alfonso Cayota. 2014. “Gene Expression Changes Induced by *Trypanosoma cruzi* Shed Microvesicles in Mammalian Host Cells: Relevance of tRNA-Derived Halves.” *BioMed Research International* 2014:1–11.
127. Gardiner, Chris, Dolores Di Vizio, Susmita Sahoo, Clotilde Théry, Kenneth



- 
- W. Witwer, Marca Wauben, and Andrew F. Hill. 2016. "Techniques Used for the Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey." *Journal of Extracellular Vesicles* 5(1):32945.
128. Garisto-Risco, Juan D., Azael Saldaña, Salomón Zebede, and José E. Calzada. 2009. "Cardiac Disease in Seropositive Chagasic Patients in Panama." *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 62(8):947–48.
129. Garraud, Thomas, Mathilde Harel, Marie Astrid Boutet, Benoit Le Goff, and Frédéric Blanchard. 2018. "The Enigmatic Role of IL-38 in Inflammatory Diseases." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 39:26–35.
130. Gascon, Joaquim, Caryn Bern, and María-Jesús Pinazo. 2010. "Chagas Disease in Spain, the United States and Other Non-Endemic Countries." *Acta Tropica* 115(1–2):22–27.
131. Georg, Ingebourg, Alejandro Marcel Hasslocher-Moreno, Sergio Salles Xavier, Marcelo Teixeira de Holanda, Eric Henrique Roma, and Maria da Gloria Bonecini-Almeida. 2017. "Evolution of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibody Production in Patients with Chronic Chagas Disease: Correlation between Antibody Titers and Development of Cardiac Disease Severity." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11(7):e0005796.
132. Gómez, Lina Andrea, Fredy R. S. Gutierrez, and Oscar Andres Peñuela. 2019. "*Trypanosoma cruzi* Infection in Transfusion Medicine." *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 41(3):262–67.
133. Gomez-Samblas, M., D. Bernal, A. Bolado-Ortiz, S. Vilchez, F. Bolás-Fernández, A. M. Espino, M. Trelis, and A. Osuna. 2018. "Intraperitoneal Administration of the Anti-IL-23 Antibody Prevents the Establishment of Intestinal Nematodes in Mice." *Scientific Reports* 8(1):7787.
134. Gomez-Samblas, M., J. J. García-Rodríguez, M. Trelis, D. Bernal, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Santoyo-Gonzalez, S. Vilchez, A. M. Espino, F. Bolás-Fernández, and A. Osuna. 2017. "Self-Adjuvanting C18 Lipid Vinyl Sulfone-

- PP2A Vaccine: Study of the Induced Immunomodulation against *Trichuris muris* Infection.” *Open Biology* 7(4).
135. Gonçalves, Camila Silva, Andrea Rodrigues Ávila, Wanderley de Souza, Maria Cristina M. Motta, and Danielle Pereira Cavalcanti. 2018. “Revisiting the *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis: Morphological and Ultrastructural Analyses during Cell Differentiation.” *Parasites & Vectors* 11(1):83.
136. Gonçalves, Marinei F., Eufrosina S. Umezawa, Alejandro M. Katzin, Wanderley de Souza, Maria Julia M. Alves, Bianca Zingales, and Walter Colli. 1991. “*Trypanosoma cruzi*: Shedding of Surface Antigens as Membrane Vesicles.” *Experimental Parasitology* 72(1):43–53.
137. Gonzalez, Alexandre, Jesús Lozano, and Eduardo Fonseca. 2007. “Análisis de Proteínas Mediante Electroforesis e Inmunotransferencia (Western Blot).” *Piel* 22:252–58.
138. González, María Isabel, Mario González-Arjona, Ana Santos-Coquillat, Javier Vaquero, Elena Vázquez-Ogando, Antonio de Molina, Héctor Peinado, Manuel Desco, and Beatriz Salinas. 2021. “Covalently Labeled Fluorescent Exosomes for In Vitro and In Vivo Applications.” *Biomedicines* 9(1):81.
139. Gottdenker, Nicole L., José E. Calzada, Azäel Saldaña, and C. Ronald Carroll. 2011. “Association of Anthropogenic Land Use Change and Increased Abundance of the Chagas Disease Vector *Rhodnius pallescens* in a Rural Landscape of Panama.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84(1):70–77.
140. Grassart, Alexandre, Aaron T. Cheng, Sun Hae Hong, Fan Zhang, Nathan Zenzer, Yongmei Feng, David M. Briner, Gregory D. Davis, Dmitry Malkov, and David G. Drubin. 2014. “Actin and Dynamin2 Dynamics and Interplay during Clathrin-Mediated Endocytosis.” *Journal of Cell Biology* 205(5):721–35.

- 
141. Grunwell, Jocelyn R., Samantha M. Yeligar, Susan Stephenson, Xiao Du Ping, Theresa W. Gauthier, Anne M. Fitzpatrick, and Lou Ann S. Brown. 2018. "TGF- $\beta$ 1 Suppresses the Type I IFN Response and Induces Mitochondrial Dysfunction in Alveolar Macrophages." *The Journal of Immunology* 200(6):2115–28.
142. Guarneri, Alessandra Aparecida and Marcelo Gustavo Lorenzo. 2017. "Triatomine Physiology in the Context of Trypanosome Infection." *Journal of Insect Physiology* 97:66–76.
143. Guedes, Paulo Marcos Da Matta, Fredy R. S. Gutierrez, Flavia L. Maia, Cristiane M. Milanezi, Grace K. Silva, Wander R. Pavanelli, and João S. Silva. 2010. "IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(2):e604.
144. Guedes, Paulo MM, Vanja M. Veloso, Marcelo V Caliari, Cláudia M. Carneiro, Sheler M. Souza, Marta de Lana, Egler Chiari, Maria T. Bahia, and Lúcia MC Galvão. 2007. "*Trypanosoma cruzi* High Infectivity in Vitro Is Related to Cardiac Lesions during Long-Term Infection in Beagledogs." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102(2):141–47.
145. Guhl, Felipe. 2007. "Chagas Disease in Andean Countries." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102(suppl 1):29–38.
146. Guo, Shang Chun, Shi Cong Tao, and Helen Dawn. 2018. "Microfluidics-Based on-a-Chip Systems for Isolating and Analysing Extracellular Vesicles." *Journal of Extracellular Vesicles* 7(1):1508271.
147. Gurunathan, Sangiliyandi, Min-Hee Kang, Muniyandi Jeyaraj, Muhammad Qasim, and Jin-Hoi Kim. 2019. "Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes." *Cells* 8(4):307.
148. Gusmão, R. D., J. M. Rezende, A. Rassi, A. A. Gam, and F. A. Neva. 1982.

- “Antibody Levels to *Trypanosoma cruzi* in Infected Patients with and without Evidence of Chronic Chagas’ Disease.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31(3 I):452–58.
149. Guzmán-Gómez, Daniel, Aracely López-Monteón, María de la Soledad Lagunes-Castro, Carolina Álvarez-Martínez, Manuel Jesús Hernández-Lutzon, Eric Dumonteil, and Angel Ramos-Ligonio. 2015. “Highly Discordant Serology against *Trypanosoma cruzi* in Central Veracruz, Mexico: Role of the Antigen Used for Diagnostic.” *Parasites & Vectors* 8(1):466.
150. György, Bence, Tamás G. Szabó, Mária Pásztói, Zsuzsanna Pál, Petra Misják, Borbála Aradi, Valéria László, Eva Pállinger, Erna Pap, Agnes Kittel, György Nagy, András Falus, and Edit I. Buzás. 2011. “Membrane Vesicles, Current State-of-the-Art: Emerging Role of Extracellular Vesicles.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(16):2667–88.
151. Henderson, E., P. G. Haydon, and D. S. Sakaguchi. 1992. “Actin Filament Dynamics in Living Glial Cells Imaged by Atomic Force Microscopy.” *Science* 257(5078):1944–46.
152. Heusermann, Wolf, Justin Hean, Dominic Trojer, Emmanuelle Steib, Stefan von Bueren, Alexandra Graff-Meyer, Christel Genoud, Katrin Martin, Nicolas Pizzato, Johannes Voshol, David V. Morrissey, Samir E. L. Andaloussi, Matthew J. Wood, and Nicole C. Meisner-Kober. 2016. “Exosomes Surf on Filopodia to Enter Cells at Endocytic Hot Spots, Traffic within Endosomes, and Are Targeted to the ER.” *Journal of Cell Biology* 213(2):173–84.
153. Hikita, Tomoya, Mamiko Miyata, Risayo Watanabe, and Chitose Oneyama. 2018. “Sensitive and Rapid Quantification of Exosomes by Fusing Luciferase to Exosome Marker Proteins.” *Scientific Reports* 8(1):1–14.

- 
- 154.Hinterdorfer, Peter, Ferry Kienberger, Anneliese Raab, Hermann J. Gruber, W. Baumgartner, Gerald Kada, Christian Riener, Susanne Wielert-Badt, Cordula Borken, and Hansgeorg Schindler. 2000. "Poly(Ethylene Glycol): An Ideal Spacer for Molecular Recognition Force Microscopy/Spectroscopy." *Single Molecules* 1(2):99–103.
- 155.Hjelholt, Astrid, Gunna Christiansen, Uffe S. Sørensen, and Svend Birkelund. 2013. "IgG Subclass Profiles in Normal Human Sera of Antibodies Specific to Five Kinds of Microbial Antigens." *Pathogens and Disease* 67(3):206–13.
- 156.Hoare, Cecil A. and Franklin G. Wallace. 1966. "Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: A New Terminology." *Nature* 212(5068):1385–86.
- 157.Hoft, Daniel F., Anita R. Schnapp, Christopher S. Eickhoff, and Stanford T. Roodman. 2000. "Involvement of CD4+ Th1 Cells in Systemic Immunity Protective against Primary and Secondary Challenges with *Trypanosoma cruzi*." *Infection and Immunity* 68(1):197–204.
- 158.Holliday, L. Shannon, Lorraine Perciliano de Faria, and Wellington J. Rody. 2019. "Actin and Actin-Associated Proteins in Extracellular Vesicles Shed by Osteoclasts." *International Journal of Molecular Sciences* 21(1):158.
- 159.Horibe, Sayo, Toshihito Tanahashi, Shoji Kawauchi, Yoshiki Murakami, and Yoshiyuki Rikitake. 2018. "Mechanism of Recipient Cell-Dependent Differences in Exosome Uptake." *BMC Cancer* 18(1):47.
- 160.Hoshino, Ayuko, Bruno Costa-Silva, Tang Long Shen, Goncalo Rodrigues, Ayako Hashimoto, Milica Tesic Mark, Henrik Molina, Shinji Kohsaka, Angela Di Giannatale, Sophia Ceder, Swarnima Singh, Caitlin Williams, Nadine Soplop, Kunihiro Uryu, Lindsay Pharmer, Tari King, Linda Bojmar, Alexander E. Davies, Yonathan Ararso, Tuo Zhang,

- Haiying Zhang, Jonathan Hernandez, Joshua M. Weiss, Vanessa D. Dumont-Cole, Kimberly Kramer, Leonard H. Wexler, Aru Narendran, Gary K. Schwartz, John H. Healey, Per Sandstrom, Knut Jørgen Labori, Elin H. Kure, Paul M. Grandgenett, Michael A. Hollingsworth, Maria De Sousa, Sukhwinder Kaur, Maneesh Jain, Kavita Mallya, Surinder K. Batra, William R. Jarnagin, Mary S. Brady, Oystein Fodstad, Volkmar Muller, Klaus Pantel, Andy J. Minn, Mina J. Bissell, Benjamin A. Garcia, Yibin Kang, Vinagolu K. Rajasekhar, Cyrus M. Ghajar, Irina Matei, Hector Peinado, Jacqueline Bromberg, and David Lyden. 2015. "Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis." *Nature* 527(7578):329-35.
- 161.Hotez, Peter J., Laila Woc-Colburn, and Maria Elena Bottazzi. 2014. "Neglected Tropical Diseases in Central America and Panama: Review of Their Prevalence, Populations at Risk and Impact on Regional Development." *International Journal for Parasitology* 44(9):597–603.
- 162.Howard, EJ, X. Xiong, Y. Carlier, S. Sosa-Estani, and P. Buekens. 2014. "Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis." *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 121(1):22–33.
- 163.Inal, M., Marcel I. Ramirez Igor Cestari, Ephraim Ansa-Addo, Poliana Deolindo, Igor Cestari, Jameel M. Inal, and Marcel I. Ramirez. 2012. "*Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles." *The Journal of Immunology* 188(188):1942–52.
- 164.Iwakura, Yoichiro and Harumichi Ishigame. 2006. "The IL-23/IL-17 Axis in Inflammation." *Journal of Clinical Investigation* 116(5):1218–22.
- 165.Izeta-Alberdi, Amaia, Carlos N. Ibarra-Cerdeña, David A. Moo-Llanes, and Janine M. Ramsey. 2016. "Geographical, Landscape and Host Associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and Lineages." *Parasites and*

- Vectors* 9(1):1–20.
- 166.J., Barreto-de-Albuquerque, Silva-dos-Santos D., Pérez A.R., Berbert L.R., de Santana-van-Vliet E., Farias-de-Oliveira D.A., Moreira O.C., Roggero E., de Carvalho-Pinto C.E., Jurberg J., Cotta-de-Almeida V., Bottasso O., Savino W., and de Meis J. 2015. “*Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(6):e0003849.
- 167.Jackson, Andrew P., Michael A. Quail, and Matthew Berriman. 2008. “Insights into the Genome Sequence of a Free-Living Kinetoplastid: *Bodo Saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa).” *BMC Genomics* 9:594.
- 168.Jadli, Anshul S., Noura Ballasy, Pariya Edalat, and Vaibhav B. Patel. 2020. “Inside(Sight) of Tiny Communicator: Exosome Biogenesis, Secretion, and Uptake.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 467(1–2):77–94.
- 169.Jansen, Ana Maria, Ana Paula Santos De Pinho, Cristiane Varella Lisboa, Elisa Cupolillo, Regina Helena Mangia, and Octavio Fernandes. 1999. “The Sylvatic Cycle of *Trypanosoma cruzi*: A Still Unsolved Puzzle.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94(SUPPL. 1):203–4.
- 170.Ji, Mi Jung, Jae Sang Noh, Byung Ki Cho, Young Shik Cho, Sun Joo Kim, and Byoung Su Yoon. 2009. “SD Bioline Chagas Ab Rapid Korean Source.” *Korean Journal of Laboratory Medicine* 29(1):48–52.
- 171.Johnson, Carl M. and Raymond A. Kelsner. 1937. “The Incidence of Chagas’ Disease in Panama as Determined by the Complement-Fixation Test 1.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* s1-17(3):385–92.
- 172.Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987. “Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. Association of

- Plasma Membrane Activities with Released Vesicles (Exosomes).” *The Journal of Biological Chemistry* 262(19):9412–20.
173. Jones, Leandra B., Courtnee’ R. Bell, Kartz E. Bibb, Linlin Gu, Mamie T. Coats, and Qiana L. Matthews. 2018. “Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition.” *Biomedicines* 6(3):79.
174. Kalluri, Raghu and Valerie S. LeBleu. 2020. “The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes.” *Science* 367(6478).
99. Kárita C. F. Lidani, Lorena Bavia, Altair R. Ambrosio, and Iara J. De Messias-Reason. 2017. “The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*.” *Front Microbiol* 20;8:607.
175. Katzin, V. J., N. Anasco, E. L. D. De Isola, and S. M. Gonzalez Cappa. 1983. “Characterization of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Differentiated from Epimastigotes. A Comparative Study between Both Stages.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 25(2):55–61.
176. Kawano, Y. and T. Noma. 1996. “Role of Interleukin-2 and Interferon- $\gamma$  in Inducing Production of IgG Subclasses in Lymphocytes of Human Newborns.” *Immunology* 88(1):40–48.
177. Kemmerling, Ulrike, Antonio Osuna, Alejandro Gabriel Schijman, and Carine Truyens. 2019. “Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review about the Interactions between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses.” *Frontiers in Microbiology* 10:1854.
178. Kesper N., Jr, K. A. De Almeida, A. M. S. Stolf, and E. S. Umezawa. 2000. “Immunoblot Analysis of Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens as a Tool for the Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains and Isolates.” *Journal of Parasitology* 86(4):862–67.
179. Kieran, Troy J., Nicole L. Gottdenker, Christina P. Varian, Azael Saldaña,



- Nicolas Means, Darlisha Owens, Jose E. Calzada, and Travis C. Glenn. 2017. "Blood Meal Source Characterization Using Illumina Sequencing in the Chagas Disease Vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) in Panamá." *Journal of Medical Entomology* 54(6):1786–89.
180. King, C. L. and T. B. Nutman. 1993. "IgE and IgG Subclass Regulation by IL-4 and IFN-Gamma in Human Helminth Infections. Assessment by B Cell Precursor Frequencies." *The Journal of Immunology* 151(1):458–65.
181. Klein, Dionne C. G., Cordula M. Stroh, Henriette Jensenius, Maarten van Es, A. S. M. Kamruzzahan, Amalia Stamouli, Hermann J. Gruber, Tjerk H. Oosterkamp, and Peter Hinterdorfer. 2003. "Covalent Immobilization of Single Proteins on Mica for Molecular Recognition Force Microscopy." *ChemPhysChem* 4(12):1367–71.
182. Kollien, Astrid and Günter Schaub. 2000. "The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae." *Parasitology Today* 16(9):381–87.
183. Komastu, Takashi, Derek D. C. Ireland, and Carol Shoshkes Reiss. 1998. "IL-12 and Viral Infections." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 9(3–4):277–85.
184. Kotrbová, Anna, Karel Štěpka, Martin Maška, Jakub Jozef Pálenik, Ladislav Ilkovic, Dobromila Klemová, Marek Kravec, František Hubatka, Zankruti Dave, Aleš Hampl, Vítězslav Bryja, Pavel Matula, and Vendula Pospíchalová. 2019. "TEM ExosomeAnalyzer: A Computer-Assisted Software Tool for Quantitative Evaluation of Extracellular Vesicles in Transmission Electron Microscopy Images." *Journal of Extracellular Vesicles* 8(1):1560808.
185. Kowalska, Alicja, Piotr Kowalski, and Miguel Ángel Torres Torres. 2011. "Chagas Disease – American Trypanosomiasis." *Polish Annals of Medicine* 18(1):156–67.

186. Krieger, M. A., E. Almeida, W. Oelemann, J. J. Lafaille, J. B. Pereira, H. Krieger, M. R. Carvalho, and S. Goldenberg. 1992. "Use of Recombinant Antigens for the Accurate Immunodiagnosis of Chagas' Disease." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46(4):427–34.
187. Lan, Yanhua, Qianrui Jin, Huizhi Xie, Chengxi Yan, Yi Ye, Xiaomin Zhao, Zhuo Chen, and Zhijian Xie. 2020. "Exosomes Enhance Adhesion and Osteogenic Differentiation of Initial Bone Marrow Stem Cells on Titanium Surfaces." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:1216.
188. Laulagnier, K., H. Vincent-Schneider, S. Hamdi, C. Subra, D. Lankar, and M. Record. 2005. "Characterization of Exosome Subpopulations from RBL-2H3 Cells Using Fluorescent Lipids." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35(2):116–21.
189. Ledezma, Alexa Prescilla, Roberto Blandon, Alejandro G. Schijman, Alejandro Benatar, Azael Saldaña, and Antonio Osuna. 2020. "Mixed Infections by Different *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units among Chagas Disease Patients in an Endemic Community in Panama". *PLOS ONE* 15(11):e0241921.
190. Lee, Bruce Y., Kristina M. Bacon, Maria Elena Bottazzi, and Peter J. Hotez. 2013. "Global Economic Burden of Chagas Disease: A Computational Simulation Model." *The Lancet Infectious Diseases* 13(4):342–48.
191. Lent, H. and P. Wygodzinsky. 1979. "Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and Their Significance as Vectors of Chagas' Disease." *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163(3):123–520.
192. Leshem, Benny, Daniella Yogev, and David Fiorentini. 1999. "Heat Inactivation of Fetal Calf Serum Is Not Required for in Vitro Measurement of Lymphocyte Functions." *Journal of Immunological Methods*

- 223(2):249–54.
193. Lewis, Michael D., Martin S. Llewellyn, Matthew Yeo, Nidia Acosta, Michael W. Gaunt, and Michael A. Miles. 2011. “Recent, Independent and Anthropogenic Origins of *Trypanosoma cruzi* Hybrids.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(10):e1363.
194. Lidani, Kárita C. F., Lorena Bavia, Altair R. Ambrosio, and Iara J. de Messias-Reason. 2017. “The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*.” *Frontiers in Microbiology* 8:607.
195. Lidani, Kárita Cláudia Freitas, Fabiana Antunes Andrade, Lorena Bavia, Flávia Silva Damasceno, Marcia Holsbach Beltrame, Iara J. Messias-Reason, and Thaisa Lucas Sandri. 2019. “Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem.” *Frontiers in Public Health* 7:166.
196. Lisboa, Cristiane Varella, Rafael Veríssimo Monteiro, Andreia Fonseca Martins, Samantha Cristina, Chagas Xavier, Santos Lima, and Ana Maria Jansen. 2015. “Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in Free-Ranging Population of Lion Tamarins (*Leontopithecus* Spp): An 11-Year Follow-Up.” *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 110(3):394–402.
197. Llewellyn, Martin S., Michael A. Miles, Hernan J. Carrasco, Michael D. Lewis, Matthew Yeo, Jorge Vargas, Faustino Torrico, Patricio Diosque, Vera Valente, Sebastiao A. Valente, and Michael W. Gaunt. 2009. “Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection” edited by E. C. Holmes. *PLoS Pathogens* 5(5):e1000410.
198. Llewellyn, Martin S., Michael D. Lewis, Nidia Acosta, Matthew Yeo, Hernan J. Carrasco, Maikell Segovia, Jorge Vargas, Faustino Torrico, Michael A. Miles, and Michael W. Gaunt. 2009. “*Trypanosoma cruzi* IIc:

- Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(9):e510.
- 199.Lovo-Martins, Maria Isabel, Aparecida Donizette Malvezi, Nágela Ghabdan Zanluqui, Bruno Fernando Cruz Lucchetti, Vera Lúcia Hideko Tatakihara, Patricia Alves Mörking, Admilton Gonçalves de Oliveira, Samuel Goldenberg, Priscilla Fanini Wowk, and Phileno Pinge-Filho. 2018. “Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages.” *Frontiers in Immunology* 9:896.
- 200.M. P. Wyllie and M. I. Ramirez. 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).
- 201.Macedo, A. M. and S. D. J. Pena. 1998. “Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease.” *Parasitology Today* 14(3):119–24.
- 202.Macêdo, Vanize. 1999. “Indeterminate Form of Chagas Disease.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94(SUPPL. 1):311–16.
- 203.Machado, Fabiana S., Gislâine A. Martins, Júlio C. S. Aliberti, Fabiola L. A. C. Mestriner, Fernando Q. Cunha, and João S. Silva. 2000. “*Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity.” *Circulation* 102(24):3003–8.
- 204.Machado, Fabiana S., Walderez O. Dutra, Lisia Esper, Kenneth J. Gollob, Mauro M. Teixeira, Stephen M. Factor, Louis M. Weiss, Fnu Nagajyothi, Herbert B. Tanowitz, and Nisha J. Garg. 2012. “Current Understanding of

- Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease.” *Seminars in Immunopathology* 34(6):753–70.
205. Maganto-Garcia, Elena, Carmen Punzon, Cox Terhorst, and Manuel Fresno. 2008. “Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 Is Required for *Trypanosoma cruzi* Internalization and Replication in Macrophages.” *Traffic* 9(8):1299–1315.
206. Mandacaru, Samuel C., Rayner M. L. Queiroz, Marcos R. Alborghetti, Lucas S. de Oliveira, Consuelo M. R. de Lima, Izabela M. D. Bastos, Jaime M. Santana, Peter Roepstorff, Carlos André O. Ricart, and Sébastien Charneau. 2019. “Exoproteome Profiling of *Trypanosoma cruzi* during Amastigogenesis Early Stages.” *PLoS ONE* 14(11):e0225386.
207. Mantilla, Julio C., German A. Zafra, Andrea M. Macedo, and Clara Isabel González. 2010. “Mixed Infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian Cardiomyopathic Patient.” *Human Pathology* 41(4):610–13.
208. Marcilla, Antonio, Lorena Martin-Jaular, Maria Trelis, Armando de Menezes-Neto, Antonio Osuna, Dolores Bernal, Carmen Fernandez-Becerra, Igor C. Almeida, and Hernando A. del Portillo. 2014. “Extracellular Vesicles in Parasitic Diseases.” *Journal of Extracellular Vesicles* 3:25040.
209. Martin, Diana L., Morgan Marks, Gerson Galdos-Cardenas, Robert H. Gilman, Brook Goodhew, Lisbeth Ferrufino, Anthony Halperin, Gerardo Sanchez, Manuela Verastegui, Patricia Escalante, Cesar Naquira, Michael Z. Levy, and Caryn Bern. 2014. “Regional Variation in the Correlation of Antibody and T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi*.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90(6):1074–81.
210. Martinez, Felipe, Eduardo Perna, Sergio V Perrone, and Alvaro Sosa Liprandi. 2019. “Chagas Disease and Heart Failure: An Expanding Issue Worldwide.” *European Cardiology Review* 14(2):82.

211. Martínez, Ignacio, Alejandra Cervantes-Landín, and Bertha Espinoza. 2013. "Diagnóstico Molecular de La Enfermedad de Chagas." *Gaceta Medica de Mexico* 149(3):363-5.
212. Martínez, Ignacio, Benjamín Noguera, Fernando Martínez-Hernández, and Bertha Espinoza. 2013. "Microsatellite and Mini-Exon Analysis of Mexican Human DTU I *Trypanosoma cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 13(3):181–87.
213. Mathivanan, Suresh and Richard J. Simpson. 2009. "ExoCarta: A Compendium of Exosomal Proteins and RNA." *Proteomics* 9(21):4997–5000.
214. Mathivanan, Suresh, Hong Ji, and Richard J. Simpson. 2010. "Exosomes: Extracellular Organelles Important in Intercellular Communication." *Journal of Proteomics* 73(10):1907–20.
215. Mathivanan, Suresh, Justin W. E. Lim, Bow J. Tauro, Hong Ji, Robert L. Moritz, and Richard J. Simpson. 2010. "Proteomics Analysis of A33 Immunoaffinity-Purified Exosomes Released from the Human Colon Tumor Cell Line LIM1215 Reveals a Tissue-Specific Protein Signature." *Molecular and Cellular Proteomics* 9(2):197–208.
216. Mayor, Satyajit and Richard E. Pagano. 2007. "Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(8):603–12.
217. McKelvey, Kelly J., Katie L. Powell, Anthony W. Ashton, Jonathan M. Morris, and Sharon A. McCracken. 2015. "Exosomes: Mechanisms of Uptake." *Journal of Circulating Biomarkers* 4(7).
218. McKerrow, James H., Conor Caffrey, Ben Kelly, P'ng Loke, and Mohammed Sajid. 2006. "Proteases in parasitic diseases." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1(1):497–536.

219. McMahon, Harvey T. and Emmanuel Boucrot. 2011. "Molecular Mechanism and Physiological Functions of Clathrin-Mediated Endocytosis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(8):517-33.
220. Mehta, Nehal N., Heather L. Teague, William R. Swindell, Yvonne Baumer, Nicole L. Ward, Xianying Xing, Brooke Baugous, Andrew Johnston, Aditya A. Joshi, Joanna Silverman, Drew H. Barnes, Liza Wolterink, Rajan P. Nair, Philip E. Stuart, Martin Playford, John J. Voorhees, Mrinal K. Sarkar, James T. Elder, Katherine Gallagher, Santhi K. Ganesh, and Johann E. Gudjonsson. 2017. "IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  Synergism May Provide a Link between Psoriasis and Inflammatory Atherogenesis." *Scientific Reports* 7(1):1–11.
221. Melo, Sonia A., Linda B. Luecke, Christoph Kahlert, Agustin F. Fernandez, Seth T. Gammon, Judith Kaye, Valerie S. LeBleu, Elizabeth A. Mittendorf, Juergen Weitz, Nuh Rahbari, Christoph Reissfelder, Christian Pilarsky, Mario F. Fraga, David Piwnica-Worms, and Raghu Kalluri. 2015. "Glypican-1 Identifies Cancer Exosomes and Detects Early Pancreatic Cancer." *Nature* 523(7559):177–82.
222. Méndez, E., O. E. Sousa, and A. Y. de. Turner. 1997. "Caracterización, biología y ecología de los Triatominos panameños (Hemiptera: Reduviidae)." *Scientia (Panamá)* 12(2):7–66.
223. Messenger, Louisa A. and Caryn Bern. 2018. "Congenital Chagas Disease: Current Diagnostics, Limitations and Future Perspectives." *Current Opinion in Infectious Diseases* 31(5):415–21.
224. Michailowsky, Vladimir, Keith Luhrs, Manoel Otávio C. Rocha, David Fouts, Ricardo T. Gazzinelli, and Jerry E. Manning. 2003. "Humoral and Cellular Immune Responses to *Trypanosoma cruzi*-Derived Paraflagellar Rod Proteins in Patients with Chagas' Disease." *Infection and Immunity* 71(6):3165–71.

225. Miles, M. A., M. S. Llewellyn, M. D. Lewis, M. Yeo, R. Baleela, S. Fitzpatrick, M. W. Gaunt, and I. L. Mauricio. 2009. "The Molecular Epidemiology and Phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and Parallel Research on *Leishmania*: Looking Back and to the Future." *Parasitology* 136(12):1509–28.
226. Miller, Isabella V. and Thomas G. P. Grunewald. 2015. "Tumour-Derived Exosomes: Tiny Envelopes for Big Stories." *Biology of the Cell* 107(9):287–305.
227. Miller, John W. 1931. "Chagas' Disease in Panama: Report of Three Cases." *Southern Medical Journal* 24(7):645–47.
228. Minning, Todd A., D. Brent Weatherly, Stephane Flibotte, and Rick L. Tarleton. 2011. "Widespread, Focal Copy Number Variations (CNV) and Whole Chromosome Aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* Strains Revealed by Array Comparative Genomic Hybridization." *BMC Genomics* 12(1):139.
229. Miyazaki, Yoshiyuki, Shinjiro Hamano, Seng Wang, Yohei Shimano, Yoichiro Iwakura, and Hiroki Yoshida. 2010. "IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection." *The Journal of Immunology* 185(2):1150–57.
230. Moncayo, Alvaro and A. C. Silveira. 2017. "Current Epidemiological Trends of Chagas Disease in Latin America and Future Challenges: Epidemiology, Surveillance, and Health Policies." *American Trypanosomiasis Chagas Disease* 59–88.
231. Moncayo, Alvaro. 2003. "Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98(5):577–91.
232. Monje-Rumi, María M., Cecilia Pérez Brandán, Paula G. Ragone, Nicolás



- Tomasini, Juan J. Lauthier, Anahí M. Alberti D'Amato, Rubén O. Cimino, Viviana Orellana, Miguel A. Basombrío, and Patricio Diosque. 2015. "Trypanosoma cruzi Diversity in the Gran Chaco: Mixed Infections and Differential Host Distribution of TcV and TcVI." *Infection, Genetics and Evolution* 29:53–59.
- 233.Montaner, Sergio, Alicia Galiano, MarÃ-ã Trelis, Lorena Martin-Jaular, Hernando A. del Portillo, Dolores Bernal, and Antonio Marcilla. 2014. "The Role of Extracellular Vesicles in Modulating the Host Immune Response during Parasitic Infections." *Frontiers in Immunology* 5:433.
- 234.Morales-Kastresana, Aizea, Bill Telford, Thomas A. Musich, Katherine McKinnon, Cassandra Clayborne, Zach Braig, Ari Rosner, Thorsten Demberg, Dionysios C. Watson, Tatiana S. Karpova, Gordon J. Freeman, Rosemarie H. Dekruyff, George N. Pavlakis, Masaki Terabe, Marjorie Robert-Guroff, Jay A. Berzofsky, and Jennifer C. Jones. 2017. "Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry." *Scientific Reports* 7(1):1878.
- 235.Morelli, Adrian E., Adriana T. Larregina, William J. Shufesky, Mara L. G. Sullivan, Donna Beer Stolz, Glenn D. Papworth, Alan F. Zahorchak, Alison J. Logar, Zhiliang Wang, Simon C. Watkins, Louis D. Faló, and Angus W. Thomson. 2004. "Endocytosis, Intracellular Sorting, and Processing of Exosomes by Dendritic Cells." *Blood* 104(10):3257–66.
- 236.Moriwaki, Atsushi, Koichiro Matsumoto, Yuko Matsunaga, Satoru Fukuyama, Takafumi Matsumoto, Keiko Kan-o, Naotaka Noda, Yukari Asai, Yoichi Nakanishi, and Hiromasa Inoue. 2011. "IL-13 Suppresses Double-Stranded RNA-Induced IFN- $\lambda$  Production in Lung Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404(4):922–27.
- 237.Mulcahy, Laura Ann, Ryan Charles Pink, and David Raul Francisco Carter. 2014. "Routes and Mechanisms of Extracellular Vesicle Uptake."

*Journal of Extracellular Vesicles* 3(1):24641.

238. Muñoz-Saravia, Silvia Gilka, Annkathrin Haberland, Gerd Wallukat, and Ingolf Schimke. 2012. "Chronic Chagas' Heart Disease: A Disease on Its Way to Becoming a Worldwide Health Problem: Epidemiology, Etiopathology, Treatment, Pathogenesis and Laboratory Medicine." *Heart Failure Reviews* 17(1):45–64.
239. Nabi, Ivan R. and Phuong U. Le. 2003. "Caveolae/Raft-Dependent Endocytosis." *Journal of Cell Biology* 161(4):673–77.
240. Nardy, Ana F. F. R., Celio G. Freire-de-Lima, Ana R. Pérez, and Alexandre Morrot. 2016. "Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance." *Frontiers in Microbiology* 7:348.
241. Natale, María A., Gonzalo A. César, María G. Alvarez, Melisa D. Castro Eiro, Bruno Lococo, Graciela Bertocchi, María C. Albareda, and Susana A. Laucella. 2018. "Trypanosoma cruzi-Specific IFN- $\gamma$ -Producing Cells in Chronic Chagas Disease Associate with a Functional IL-7/IL-7R Axis" edited by W. O. Dutra. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(12):e0006998.
242. Neves, Roberta F. C., Anne C. S. Fernandes, José R. Meyer-Fernandes, and Thais Souto-Padrón. 2014. "Trypanosoma cruzi-Secreted Vesicles Have Acid and Alkaline Phosphatase Activities Capable of Increasing Parasite Adhesion and Infection." *Parasitology Research* 113(8):2961–72.
243. Nishimura, A., Y. Ueno, S. Fujiwara, H. Nushida, and Y. Tatsuno. 1997. "An Autopsy Case of Sudden Death Due to Chagas' Disease." *Nihon Hoigaku Zasshi The Japanese Journal of Legal Medicine* 51(1):39–43.
244. Nogueira, Paula M., Kleber Ribeiro, Amanda C. O. Silveira, João H. Campos, Olindo A. Martins-Filho, Samantha R. Bela, Marco A. Campos, Natalia L. Pessoa, Walter Colli, Maria J. M. Alves, Rodrigo P. Soares, and

- 
- Ana Claudia Torrecilhas. 2015. "Vesicles from Different *Trypanosoma cruzi* Strains Trigger Differential Innate and Chronic Immune Responses." *Journal of Extracellular Vesicles* 4:28734.
245. Nunes, Maria Carmo Pereira, Andrea Beaton, Harry Acquatella, Caryn Bern, Ann F. Bolger, Luis E. Echeverría, Walderez O. Dutra, Joaquim Gascon, Carlos A. Morillo, Jamarly Oliveira-Filho, Antonio Luiz Pinho Ribeiro, and Jose Antonio Marin-Neto. 2018. "Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association." *Circulation* 138(12):e169–209.
246. Nunes, Marise Pinheiro, Bárbara Fortes, João Luiz Silva-Filho, Eugênia Terra-Granado, Leonardo Santos, Luciana Conde, Isadora de Araújo Oliveira, Leonardo Freire-de-Lima, Marina Vieira Martins, Ana Acacia Sá Pinheiro, Christina Maeda Takyia, Célio Geraldo Freire-de-Lima, Adriane Regina Todeschini, George Alexandre DosReis, and Alexandre Morrot. 2013. "Inhibitory Effects of *Trypanosoma cruzi* Sialoglycoproteins on CD4+ T Cells Are Associated with Increased Susceptibility to Infection" edited by H. B. Tanowitz. *PLoS ONE* 8(10):e77568.
247. Oeyen, Eline, Kurt Van Mol, Geert Baggerman, Hanny Willems, Kurt Boonen, Christian Rolfo, Patrick Pauwels, An Jacobs, Karin Schildermans, William C. Cho, and Inge Mertens. 2018. "Ultrafiltration and Size Exclusion Chromatography Combined with Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation for the Isolation and Characterisation of Extracellular Vesicles from Urine." *Journal of Extracellular Vesicles* 7(1):1490143.
248. Okamura, Haruki, Shin Ichiro Kashiwamura, Hiroko Tsutsui, Tomohiro Yoshimoto, and Kenji Nakanishi. 1998. "Regulation of Interferon- $\gamma$  Production by IL-12 and IL-18." *Current Opinion in Immunology*

- 10(3):259–64.
- 249.Olajide, Joshua Seun and Jianping Cai. 2020. “Perils and Promises of Pathogenic Protozoan Extracellular Vesicles.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:371.
- 250.Olivera, Mario J., Johana A. Fory, Julián F. Porras, and Giancarlo Buitrago. 2019. “Prevalence of Chagas Disease in Colombia: A Systematic Review and Meta-Analysis” edited by S. Gourbiere. *PLoS One* 14(1):e0210156.
- 251.OPS. 2006. “OPS.” *Organización Panamericana de La Salud*. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OMS, Montevideo, Uruguay. OPS/HDM/CD/425-06.
- 252.OPS-MINSA-CSS. 2013. “Guía Para El Abordaje Integral de La Enfermedad de Chagas En La República de Panamá.” Retrieved June 2, 2015 ([http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/guia\\_chagas\\_ops-minsa-css.pdf](http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/guia_chagas_ops-minsa-css.pdf)).
- 253.Organization, World Health. 2015. “Chagas Disease in Latin America: An Epidemiological Update Based on 2010 Estimates.” *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section d’hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 90(6):33–43.
- 254.Osuna, A., A. Jimenez-Ortiz and J. Lozano. 1979. “Medios de Cultivo Para La Obtención de Formas Metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.” *Rev Ibér Parasitol* 39:129–33.
- 255.Osuna, A., G. Ortega, F. Gamarro, S. Castanys, and M. C. Mascaró. 1984. “Some Factors Affecting the in Vitro Invasion of HeLa Cells by *Trypanosoma cruzi*.” *International Journal for Parasitology* 14(3):253–57.
- 256.Osuna, A., G. Ortega, F. Gamarro, S. Castanys, and M. C. Mascaró. 1984.

- “Some Factors Affecting the in Vitro Invasion of HeLa Cells by *Trypanosoma cruzi*.” *International Journal for Parasitology* 14(3):253–57.
257. Padilla-Raygoza, Nicolás, Luz Gibbons, Sergio Sosa-Estani, Eric Dumonteil, Fernando Althabe, José M. Belizán, Jaime del Cid-Lemus, Dominique Schneider, Miriam Rubi Gamboa-León, Pierre Buekens, Olivia Almendares, Jean-Philippe Chippaux, Jackeline Alger, and María L. Cafferata. 2008. “Use of a Rapid Test on Umbilical Cord Blood to Screen for *Trypanosoma cruzi* Infection in Pregnant Women in Argentina, Bolivia, Honduras, and México.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79(5):755–59.
258. Panesso-Gómez, Santiago, Paula Pavia, Iván Enrique Rodríguez-Mantilla, Paola Lasso, Luis A. Orozco, Adriana Cuellar, Concepción J. Puerta, Belén Mendoza De Molano, and John M. González. 2018. “*Trypanosoma cruzi* Detection in Colombian Patients with a Diagnosis of Esophageal Achalasia.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98(3):717–23.
259. Paranaíba, Larissa F., Alessandra A. Guarneri, Ana C. Torrecilhas, Maria N. Melo, and Rodrigo P. Soares. 2019. “Extracellular Vesicles Isolated from *Trypanosoma cruzi* Affect Early Parasite Migration in the Gut of *Rhodnius Prolixus* but Not in *Triatoma Infestans*.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 114(11):190217.
260. Parisse, P., I. Rago, L. Ulloa Severino, F. Perissinotto, E. Ambrosetti, P. Paoletti, M. Ricci, A. P. Beltrami, D. Cesselli, and L. Casalis. 2017. “Atomic Force Microscopy Analysis of Extracellular Vesicles.” *European Biophysics Journal* 46(8):813–20.
261. Park, Il Kyoo, John J. Letterio, and James D. Gorham. 2007. “TGF- $\beta$ 1 Inhibition of IFN- $\gamma$ -Induced Signaling and Th1 Gene Expression in CD4+

- T Cells Is Smad3 Independent but MAP Kinase Dependent.” *Molecular Immunology* 44(13):3283–90.
- 262.Parolini, Isabella, Cristina Federici, Carla Raggi, Luana Lugini, Simonetta Palleschi, Angelo De Milito, Carolina Coscia, Elisabetta Iessi, Mariantonia Logozzi, Agnese Molinari, Marisa Colone, Massimo Tatti, Massimo Sargiacomo, and Stefano Fais. 2009. “Microenvironmental PH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 284(49):34211–22.
- 263.Parrish-Novak, Julia, Donald C. Foster, Richard D. Holly, and Christopher H. Clegg. 2002. “Interleukin-21 and the IL-21 Receptor: Novel Effectors of NK and T Cell Responses.” *Journal of Leukocyte Biology* 72(5):856–63.
- 264.Parrish-Novak, Julia, Stacey R. Dillon, Andrew Nelson, Angie Hammond, Cindy Sprecher, Jane A. Gross, Janet Johnston, Karen Madden, Wenfeng Xu, Jim West, Sara Schrader, Steve Burkhead, Mark Heipel, Cameron Brandt, Joseph L. Kuijper, Janet Kramer, Darrell Conklin, Scott R. Presnell, Jon Berry, Faith Shiota, Susan Bort, Kevin Hambly, Sherri Mudri, Chris Clegg, Margaret Moore, Francis J. Grant, Catherine Lofton-Day, Teresa Gilbert, Fenella Raymond, Andrew Ching, Lena Yao, Deb Smith, Philippa Webster, Theodore Whitmore, Mark Maurer, Kenneth Kaushansky, Rick D. Holly, and Don Foster. 2000. “Interleukin 21 and Its Receptor Are Involved in NK Cell Expansion and Regulation of Lymphocyte Function.” *Nature* 408(6808):57–63.
- 265.Pereira, Karen Signori, Flávio Luis Schmidt, Ana M. A. Guaraldo, Regina M. B. Franco, Viviane L. Dias, and Luiz A. C. Passos. 2009. “Chagas’ Disease as a Foodborne Illness.” *Journal of Food Protection* 72(2):441–46.
- 266.Pérez-Ayala, A., J. A. Pérez-Molina, F. Norman, B. Monge-Maillo, M. V.

- Faro, and R. López-Vélez. 2011. "Gastro-Intestinal Chagas Disease in Migrants to Spain: Prevalence and Methods for Early Diagnosis." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 105(1):25–29.
267. Pérez-Molina, José A. and Israel Molina. 2018. "Chagas Disease." *The Lancet* 391(10115):82–94.
268. Pinazo, Maria Jesús, M. Carmen Thomas, Jacqueline Bua, Alina Perrone, Alejandro Gabriel Schijman, Rodolfo Jorge Viotti, Janine M. Ramsey, Isabela Ribeiro, Sergio Sosa-Estani, Manuel Carlos López, and Joaquim Gascon. 2014. "Biological Markers for Evaluating Therapeutic Efficacy in Chagas Disease, a Systematic Review." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 12(4):479–96
269. Pineda, Vanessa, Edilma Montalvo, Dayra Alvarez, a. M. Santamaría, Jose Eduardo Calzada, and Azael Saldaña. 2008. "Feeding Sources and Trypanosome Infection Index of *Rhodnius Pallescens* in a Chagas Disease Endemic Area of Amador County, Panama." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 50(0816):113–16.
270. Prata, Aluizio. 2001. "Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease." *Lancet Infectious Diseases* 1(2):92–100.
271. Primavera, K. S., E. S. Umezawa, B. A. Peres, M. E. Camargo, and S. Hoshino-Shimizu. 1990. "Chagas' disease: IgA, IgM and IgG Antibodies to *T. cruzi* Amastigote, Trypomastigote and Epimastigote Antigens in Acute and in Different Chronic Forms of the Disease." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 32(3):172–80.
272. Ramirez, M. I., P. Deolindo, I. J. de Messias-Reason, Emma A. Arigi, H. Choi, I. C. Almeida, and I. Evans-Osses. 2017. "Dynamic Flux of Microvesicles Modulate Parasite-Host Cell Interaction of *Trypanosoma cruzi* in Eukaryotic Cells." *Cellular Microbiology* 19(4):e12672.
273. Rappoport, Joshua Z., Sanford M. Simon, and Alexandre Benmerah. 2004.

- “Understanding Living Clathrin-Coated Pits.” *Traffic* 5(5):327-37.
- 274.Rassi, Anis, Anis Rassi, and José Antonio Marin-Neto. 2010. “Chagas Disease.” *The Lancet* 375(9723):1388–1402.
- 275.Reclusa, Pablo, Peter Verstraelen, Simona Taverna, Muthukumar Gunasekaran, Marzia Pucci, Isabel Pintelon, Nathalie Claes, Diego de Miguel-Pérez, Riccardo Alessandro, Sara Bals, Sunjay Kaushal, and Christian Rolfo. 2020. “Improving Extracellular Vesicles Visualization: From Static to Motion.” *Scientific Reports* 10(1):1–9.
- 276.Repetto, Ernestina Carla, Rony Zachariah, Ajay Kumar, Andrea Angheben, Federico Gobbi, Mariella Anselmi, Ahmad Al Rousan, Carlota Torrico, Rosa Ruiz, Gabriel Ledezma, Maria Chiara Buoninsegna, Mohammed Khogali, Rafael Van Den Bergh, Gianfranco De Maio, Ada Maristella Egidi, Barbara Maccagno, Silvia Garelli, and Mauricio Martins Rodrigues. 2015. “Neglect of a Neglected Disease in Italy: The Challenge of Access-to-Care for Chagas Disease in Bergamo Area.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(9):e0004103.
- 277.Requena-Méndez, Ana, Pere Albajar-Viñas, Andrea Angheben, Peter Chiodini, Joaquim Gascón, and José Muñoz. 2014. “Health Policies to Control Chagas Disease Transmission in European Countries.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(10):e3245.
- 278.Retana Moreira, Lissette, Fernando Rodríguez Serrano, and Antonio Osuna. 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):e0007163.
- 279.Ribeiro, Kleber Silva, Camilla Ioshida Vasconcellos, Rodrigo Pedro Soares, Maria Tays Mendes, Cameron C. Ellis, Marcela Aguilera-Flores, Igor Correia de Almeida, Sergio Schenkman, Leo Kei Iwai, and Ana



- Claudia Torrecilhas. 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):1463779.
- 280.Riera, Cristina, Mireia Verges, Laura Iniesta, Roser Fisa, Montserrat Gállego, Silvia Tebar, and Montserrat Portús. 2012. "Identification of a Western Blot Pattern for the Specific Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Human Sera." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(3):412.
- 281.Robbins, Paul D. and Adrian E. Morelli. 2014. "Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles." *Nature Reviews Immunology* 14(3):195–208.
- 282.Rodriguez, Indra G. and Jose R. Loaiza. 2017. "American Trypanosomiasis, or Chagas Disease, in Panama: A Chronological Synopsis of Ecological and Epidemiological Research." *Parasites & Vectors* 10(1):459.
- 283.Roellig, Dawn M., Emily L. Brown, Christian Barnabé, Michel Tibayrenc, Frank J. Steurer, and Michael J. Yabsley. 2008. "Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* Isolates, United States." *Emerging Infectious Diseases* 14(7):1123–25.
- 284.Rojas, Lyda Z., Marija Glisic, Laura Pletsch-Borba, Luis E. Echeverría, Wichor M. Bramer, Arjola Bano, Najada Stringa, Asija Zaciragic, Bledar Kraja, Eralda Asllanaj, Rajiv Chowdhury, Carlos A. Morillo, Oscar L. Rueda-Ochoa, Oscar H. Franco, and Taulant Muka. 2018. "Electrocardiographic Abnormalities in Chagas Disease in the General Population: A Systematic Review and Meta-Analysis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(6):e0006567.
- 285.Romaña, Christine A., Daniel Brunstein, Anne Collin-Delavaud, Octavio

- Sousa, and Eduardo Ortega-Barría. 2003. "Public Policies of Development in Latin America and Chagas' Disease." *Lancet (London, England)* 362(9383):579.
- 286.Romeiro, S. A., H. Takehara, and I. Mota. 1984. "Isotype of Lytic Antibodies in Serum of Chagas' Disease Patients." *Clinical and Experimental Immunology* 55(2):413–18.
- 287.Rossi, Izadora Volpato, Maria Alice Ferreira Nunes, Sandra Vargas-Otalora, Thalita Camelo da Silva Ferreira, Mauro Cortez, and Marcel Ivan Ramirez. 2021. "Extracellular Vesicles during TriTryps Infection: Complexity and Future Challenges." *Molecular Immunology* 132:172–83.
- 288.Royo, Felix, Clotilde Théry, Juan M. Falcón-Pérez, Rienk Nieuwland, and Kenneth W. Witwer. 2020. "Methods for Separation and Characterization of Extracellular Vesicles: Results of a Worldwide Survey Performed by the ISEV Rigor and Standardization Subcommittee." *Cells* 9(9):1955.
- 289.Ruíz-Sánchez, Rosario, María Paula De León, Vivian Matta, Pedro A. Reyes, R. López, David Jay, and Victor M. Monteón. 2005. "Trypanosoma cruzi Isolates from Mexican and Guatemalan Acute and Chronic Chagasic Cardiopathy Patients Belong to Trypanosoma Cruzi I." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100(3):281–83.
- 290.Saha, K., F. Bender, and E. Gizeli. 2003. "Comparative Study of IgG Binding to Proteins G and A: Nonequilibrium Kinetic and Binding Constant Determination with the Acoustic Waveguide Device." *Analytical Chemistry* 75(4):835–42.
- 291.Salazar, Alexander, Alejandro G. Schijman, and Omar Triana-Chávez. 2006. "High Variability of Colombian Trypanosoma cruzi Lineage I Stocks as Revealed by Low-Stringency Single Primer-PCR Minicircle Signatures." *Acta Tropica* 100(1–2):110–18.
- 292.Saldaña, A., O. E. Sousa, and A. Orn. 1995. "Immunoparasitological

- Studies of *Trypanosoma cruzi* Low Virulence Clones from Panama: Humoral Immune Responses and Antigenic Cross-Reactions with *Trypanosoma rangeli* in Experimentally Infected Mice.” *Scandinavian Journal of Immunology* 42(6):644–50.
- 293.Saldaña, Azael, Ana María Santamaría, Vanessa Pineda, Vanessa Vásquez, Nicole L. Gottdenker, and José E. Calzada. 2018. “A Darker Chromatic Variation of *Rhodnius Pallescens* Infected by Specific Genetic Groups of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* from Panama.” *Parasites & Vectors* 11(1):423.
- 294.Saldaña, Azael, Franklyn Samudio, Aracelis Miranda, Lissette M. Herrera, Sara P. Saavedra, Lorenzo Cáceres, Vicente Bayard, and José E. Calzada. 2005. “Predominance of *Trypanosoma rangeli* Infection in Children from a Chagas Disease Endemic Area in the West-Shore of the Panama Canal.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100(7):729–31.
- 295.Saldaña, Azael, Vanessa Pineda, Inri Martinez, Giovanna Santamaria, Ana Maria Santamaria, Aracelis Miranda, and Jose E. Calzada. 2012. “A New Endemic Focus of Chagas Disease in the Northern Region of Veraguas Province, Western Half Panama, Central America.” *PLoS One* 7(4):e34657.
- 296.Sales-Campos, Helioswilton, Henrique Borges Kappel, Cristiane Pontes Andrade, Tiago Pereira Lima, Mardén Estevão Mattos, Alessandra de Castilho, Dalmo Correia, Luis Eduardo Ramirez Giraldo, and Eliane Lages-Silva. 2014. “A DTU-Dependent Blood Parasitism and a DTU-Independent Tissue Parasitism during Mixed Infection of *Trypanosoma cruzi* in Immunosuppressed Mice.” *Parasitology Research* 113(1):375–85.
- 297.Sales-Campos, Helioswilton, Henrique Borges Kappel, Cristiane Pontes Andrade, Tiago Pereira Lima, Alessandra De Castilho, Luis Eduardo

- Ramirez Giraldo, and Eliane Lages-Silva. 2015. "Trypanosoma cruzi DTU TcII Presents Higher Blood Parasitism than DTU TcI in an Experimental Model of Mixed Infection." *Acta Parasitologica* 60(3):435–41.
- 298.Samoil, Vitalie, Maude Dagenais, Vinupriya Ganapathy, Jerry Aldridge, Anastasia Glebov, Armando Jardim, and Paula Ribeiro. 2018. "Vesicle-Based Secretion in Schistosomes: Analysis of Protein and MicroRNA (MiRNA) Content of Exosome-like Vesicles Derived from *Schistosoma mansoni*." *Scientific Reports* 8(1):1–16.
- 299.Samudio, Franklyn, Eduardo Ortega-Barría, Azael Saldaña, and Jose Calzada. 2007. "Predominance of *Trypanosoma cruzi* I among Panamanian Sylvatic Isolates." *Acta Tropica* 101(2):178–81.
- 300.Sánchez, Laura Viviana and Juan David Ramírez. 2013. "Congenital and Oral Transmission of American Trypanosomiasis: An Overview of Physiopathogenic Aspects." *Parasitology* 140(2):147–59.
- 301.Santi-Rocca, Julien, Fernando Fernandez-Cortes, Carlos Chillón-Marinas, María Luisa González-Rubio, David Martin, Núria Gironès, and Manuel Fresno. 2017. "A Multi-Parametric Analysis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Common Pathophysiologic Patterns beyond Extreme Heterogeneity of Host Responses." *Scientific Reports* 7(1):8893.
- 302.Santos, Fred Luciano Neves, Wayner Vieira de Souza, Michelle da Silva Barros, Mineo Nakazawa, Marco Aurélio Krieger, and Yara de Miranda Gomes. 2016. "Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 94(5):1034–39.
- 303.Schaub, G. A. 1989. "*Trypanosoma cruzi*: Quantitative Studies of Development of Two Strains in Small Intestine and Rectum of the Vector *Triatoma Infestans*." *Experimental Parasitology* 68(3):260–73.
- 304.Schijman, A. 2000. "Early Diagnosis of Recurrence of *Trypanosoma cruzi*

- Infection by Polymerase Chain Reaction after Heart Transplantation of a Chronic Chagas' Heart Disease Patient." *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 19(11):1114–17.
- 305.Schijman, Alejandro G., Margarita Bisio, Liliana Orellana, Mariela Sued, Tomás Duffy, Ana M. Mejia Jaramillo, Carolina Cura, Frederic Auter, Vincent Veron, Yvonne Qvarnstrom, Stijn Deborggraeve, Gisely Hajar, Inés Zulantay, Raúl Horacio Lucero, Elsa Velazquez, Tatiana Tellez, Zunilda Sanchez Leon, Lucia Galvão, Debbie Nolder, María Monje Rumi, José E. Levi, Juan D. Ramirez, Pilar Zorrilla, María Flores, Maria I. Jercic, Gladys Crisante, Néstor Añez, Ana M. De Castro, Clara I. Gonzalez, Karla Acosta Viana, Pedro Yachelini, Faustino Torrico, Carlos Robello, Patricio Diosque, Omar Triana Chavez, Christine Aznar, Graciela Russomando, Philippe Büscher, Azzedine Assal, Felipe Guhl, Sergio Sosa Estani, Alexandre DaSilva, Constança Britto, Alejandro Luquetti, and Janis Ladzins. 2011. "International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(1):e931.
- 306.Schmunis, Gabriel A. 1999. "Prevention of Transfusional Trypanosoma Cruzi Infection in Latin America". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1:93-101.
- 307.Schmunis, Gabriel A. and Zaida E. Yadon. 2010. "Chagas Disease: A Latin American Health Problem Becoming a World Health Problem." *Acta Tropica* 115(1–2):14–21.
- 308.Schofield, C.J., Grijalva, M.J., Diotaiuti, L. 2009. "Distribución de Los Vectores de La Enfermedad de Chagas En Países 'No Endémicos': La Posibilidad de Transmisión Vectorial Fuera de América Latina." *Enf. Emerg* 1:20–27.
- 309.Shao, Huilin, Hyungsoon Im, Cesar M. Castro, Xandra Breakefield, Ralph

- Weissleder, and Hakho Lee. 2018. "New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles." *Chemical Reviews* 118(4):1917–50.
310. Shen, Beiyi, Ning Wu, Ming Yang, and Stephen J. Gould. 2011. "Protein Targeting to Exosomes/Microvesicles by Plasma Membrane Anchors." *Journal of Biological Chemistry* 286(16):14383–95.
311. Sicuri, Elisa, José Muñoz, María Jesús Pinazo, Elizabeth Posada, Joan Sanchez, Pedro L. Alonso, and Joaquim Gascon. 2011. "Economic Evaluation of Chagas Disease Screening of Pregnant Latin American Women and of Their Infants in a Non Endemic Area." *Acta Tropica* 118(2):110–17.
312. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150(1):76–85.
313. Smyth, Tyson, Max Kullberg, Noeen Malik, Peter Smith-Jones, Michael W. Graner, and Thomas J. Anchordoquy. 2015. "Biodistribution and Delivery Efficiency of Unmodified Tumor-Derived Exosomes." *Journal of Controlled Release* 199:145–55.
314. Solaymani-Mohammadi, Shahram, Lars Eckmann, and Steven M. Singer. 2019. "Interleukin (IL)-21 in Inflammation and Immunity During Parasitic Diseases." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9:401.
315. Soltis, R. D., D. Hasz, M. J. Morris, and I. D. Wilson. 1979. "The Effect of Heat Inactivation of Serum on Aggregation of Immunoglobulins." *Immunology* 36(1):37–45.
316. Sousa, Giovane R., Juliana A. S. Gomes, Marcos Paulo S. Damasio, Maria Carmo P. Nunes, Henrique S. Costa, Nayara I. Medeiros, Rafaelle C. G. Fares, Ana Thereza Chaves, Rodrigo Corrêa-Oliveira, and Manoel Otávio C. Rocha. 2017. "The Role of Interleukin 17-Mediated Immune Response

- in Chagas Disease: High Level Is Correlated with Better Left Ventricular Function” edited by E. A. Eugenin. *PLoS One* 12(3):e0172833
- 317.Sousa, O. E. 1972. “Anotaciones Sobre La Enfermedad de Chagas En Panamá. Frecuencia y Distribución de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*.” *Revista de Biología Tropical* 20:167–69.
- 318.Sousa, O. E. and C. M. Johnson. 1973. “Prevalence of *Trypanosoma Cruzi* and *Trypanosoma Rangeli* in Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) Collected in the Republic of Panama.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 22(1):18–23.
- 319.Sousa, Octavio E. and Carl M. Johnson. 1971. “Frequency and Distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panamá.”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20(3):405–10.
- 320.Sousa, Octavio E. and Gary A. Dawson. 1976. “Trypanosome Infections in the Marmoset (*Saguinus Geoffroyi*) from the Panama Canal Zone”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25(3):407–9.
- 321.Sousa, Octavio E., Franklyn Samudio, Corina de Juncá, and José E. Calzada. 2006. “Molecular Characterization of Human *Trypanosoma cruzi* Isolates from Endemic Areas in Panama.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 101(4):455–57.
- 322.Spinella, Sylviane, Pascale Liegeard, and Mireille Hontebeyrie-Joskowicz. 1992. “*Trypanosoma cruzi*: Predominance of IgG2a in Nonspecific Humoral Response during Experimental Chagas’ Disease.” *Experimental Parasitology* 74(1):46–56.
- 323.Strasen, Jörn, Tatjana Williams, Georg Ertl, Thomas Zoller, August Stich, and Oliver Ritter. 2014. “Epidemiology of Chagas Disease in Europe: Many Calculations, Little Knowledge.” *Clinical Research in Cardiology* 103(1):1–10.

324. Strauss, Mariana, Miriam Palma-Vega, Desiré Casares-Marfil, Pau Bosch-Nicolau, María Silvina Lo Presti, Israel Molina, Clara Isabel González, Patricia A. Paglini, Alejandro G. Schijman, Carlos Robello, Luis E. Echeverría, Gilberto Vargas-Alarcón, José E. Calzada, Mercedes Fernández-Mestre, Manuel Fresno, Maria Jesus Pinazo, Javier Martín, and Marialbert Acosta-Herrera. 2020. “Genetic Polymorphisms of IL17A Associated with Chagas Disease: Results from a Meta-Analysis in Latin American Populations.” *Scientific Reports* 10(1):5015.
325. Stritesky, Greta L., Norman Yeh, and Mark H. Kaplan. 2008. “IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage.” *The Journal of Immunology* 181(9):5948–55.
326. Sung, Bong Hwan, Ariana von Lersner, Jorge Guerrero, Evan S. Krystofiak, David Inman, Roxanne Pelletier, Andries Zijlstra, Suzanne M. Ponik, and Alissa M. Weaver. 2020. “A Live Cell Reporter of Exosome Secretion and Uptake Reveals Pathfinding Behavior of Migrating Cells.” *Nature Communications* 11(1):2092.
327. Surman, Magdalena, Ewa Stępień, and Małgorzata Przybyło. 2019. “Proteomes Melanoma-Derived Extracellular Vesicles: Focus on Their Proteome.” *Proteomes* 7(2):21.
328. Svensson, Katrin J., Helena C. Christianson, Anders Wittrup, Erika Bourseau-Guilmain, Eva Lindqvist, Lena M. Svensson, Matthias Mörgelin, and Mattias Belting. 2013. “Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-Mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1.” *Journal of Biological Chemistry* 288(24):17713–24.
329. Szatanek, Rafał, Monika Baj-Krzyworzeka, Jakub Zimoch, Małgorzata Lekka, Maciej Siedlar, and Jarek Baran. 2017. “The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization.” *International Journal*



- of Molecular Sciences* 18(6):1153.
330. Taciak, Bartłomiej, Maciej Białasek, Agata Braniewska, Zuzanna Sas, Paulina Sawicka, Łukasz Kiraga, Tomasz Rygiel, and Magdalena Król. 2018. "Evaluation of Phenotypic and Functional Stability of RAW 264.7 Cell Line through Serial Passages." *PLoS One* 13(6):e0198943.
331. Tanowitz, Herbert B. 2012. "Pathogenesis of Chagas Disease Time to Move On." *Frontiers in Bioscience* E4(5):495.
332. Tanowitz, Herbert B., Fabiana S. Machado, David C. Spray, Joel M. Friedman, Oren S. Weiss, Jose N. Lora, Jyothi Nagajyothi, Diego N. Moraes, Nisha Jain Garg, Maria Carmo P. Nunes, and Antonio Luiz P. Ribeiro. 2015. "Developments in the Management of Chagas Cardiomyopathy." *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 13(12):1393–1409.
333. Tanowitz, Herbert B., Louis M. Weiss, and Susan P. Montgomery. 2011. "Chagas Disease Has Now Gone Global." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(4):e1136.
334. Tarleton, Rick L. 2016. "Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored." *Trends in Molecular Medicine* 22(10):835–38.
335. Tarleton, Rick L., Richard Reithinger, Julio A. Urbina, Uriel Kitron, and Ricardo E. Gürtler. 2007. "The Challenges of Chagas Disease— Grim Outlook or Glimmer of Hope?" *PLoS Medicine* 4(12):e332.
336. Teixeira, A. R. L., G. Teixeira, V. Macedo, and A. Prata. 1978. "Acquired Cell Mediated Immunodepression in Acute Chagas' Disease." *Journal of Clinical Investigation* 62(6):1132–41.
337. Teixeira, Antonio R. L., Rubens J. Nascimento, and Nancy R. Sturm. 2006. "Evolution and Pathology in Chagas Disease - A Review." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 101(5):463–91.
338. Teixeira, Mauro M., Ricardo T. Gazzinelli, and João S. Silva. 2002.

- “Chemokines, Inflammation and *Trypanosoma cruzi* Infection.” *Trends in Parasitology* 18(6):262–65.
339. Théry, Clotilde, Muriel Boussac, Philippe Véron, Paola Ricciardi-Castagnoli, Graça Raposo, Jérôme Garin, and Sebastian Amigorena. 2001. “Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles.” *The Journal of Immunology* 166(12):7309–18.
340. Thomas, G., N. A. Burnham, T. A. Camesano, and Q. Wen. 2013. “Measuring the Mechanical Properties of Living Cells Using Atomic Force Microscopy.” *J. Vis. Exp* (76):50497.
341. Tian, Tian, Yan Liang Zhu, Yue Yuan Zhou, Gao Feng Liang, Yuan Yuan Wang, Fei Hu Hu, and Zhong Dang Xiao. 2014. “Exosome Uptake through Clathrin-Mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating MiR-21 Delivery.” *Journal of Biological Chemistry* 289(32):22258–67.
342. Tian, Tian, Yuanyuan Wang, Haitao Wang, Zhaoqi Zhu, and Zhongdang Xiao. 2010. “Visualizing of the Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Exosomes by Live-Cell Microscopy.” *Journal of Cellular Biochemistry* 111(2):488–96.
343. Tibayrenc, Michel and Francisco J. Ayala. 1988. “Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas’ disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance.” *Evolution* 42(2):277–92.
344. Tobys, David, Lisa Maria Kowalski, Eva Cziudaj, Stefan Müller, Peter Zentis, Elke Pach, Paola Zigrino, Tobias Blaeske, and Stefan Höning. 2021. “Inhibition of Clathrin-Mediated Endocytosis by Knockdown of AP-2 Leads to Alterations in the Plasma Membrane Proteome.” *Traffic* 22(1-2):6-22.
345. Toribio, Víctor, Sara Morales, Soraya López-Martín, Beatriz Cardeñes,

- Carlos Cabañas, and María Yáñez-Mó. 2019. “Development of a Quantitative Method to Measure EV Uptake.” *Scientific Reports* 9(1):1–14.
346. Triana, Omar, Sylvia Ortiz, Jean Claude Dujardin, and Aldo Solari. 2006. “*Trypanosoma cruzi*: Variability of Stocks from Colombia Determined by Molecular Karyotype and Minicircle Southern Blot Analysis.” *Experimental Parasitology* 113(1):62–66.
347. Trocoli Torrecilhas, Ana Claudia, Renata Rosito Tonelli, Wander Rogério Pavanelli, João Santana da Silva, Robert Ivan Schumacher, Wanderley de Souza, Narcisa Cunha E Silva, Ises de Almeida Abrahamsohn, Walter Colli, and Maria Júlia Manso Alves. 2009. “*Trypanosoma cruzi*: Parasite Shed Vesicles Increase Heart Parasitism and Generate an Intense Inflammatory Response.” *Microbes and Infection* 11(1):29–39.
348. Trocoli Torrecilhas, Ana Claudia, Robert I. Schumacher, Maria Júlia, Maria Júlia M. Alves, and Walter Colli. 2012. “Vesicles as Carriers of Virulence Factors in Parasitic Protozoan Diseases.” *Microbes and Infection* 14(15):1465–74.
349. Ueno, Yoshiki, Yasuyuki Nakamura, Masayuki Takahashi, Tohru Inoue, Shigeru Endo, Masahiko Kinoshita, and Tsutomu Takeuchi. 1995. “A Highly Suspected Case of Chronic Chagas’ Heart Disease Diagnosed in Japan.” *Japanese Circulation Journal* 59(4):219–23.
350. Umezawa, E. S., M. S. Nascimento, and A. M. S. Stolf. 2001. “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *Trypanosoma Cruzi* Excreted-Secreted Antigens (TESA-ELISA) for Serodiagnosis of Acute and Chronic Chagas’ Disease.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 39(3):169–76.
351. Umezawa, Eufrosina S., Alejandro O. Luquetti, Gabriela Levitus, Carlos Ponce, Elisa Ponce, Diana Henriquez, Susana Revollo, Bertha Espinoza,

- Octavio Sousa, Baldip Khan, and José Franco da Silveira. 2004. "Serodiagnosis of Chronic and Acute Chagas' Disease with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Proteins: Results of a Collaborative Study in Six Latin American Countries." *Journal of Clinical Microbiology* 42(1):449–52.
352. Umezawa, Eufrosina S., Marilda S. Nascimento, Norival Kesper, José R. Coura, José Borges-Pereira, Angela C. V. Junqueira, and Mario E. Camargo. 1996. "Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute, and Chronic Chagas' Disease." *Journal of Clinical Microbiology* 34(9):2143–47.
353. Vago, Annamaria R., Luciana O. Andrade, Adriana A. Leite, d'Ávila Reis, Andrea M. Macedo, Sheila J. Adad, Sebastian Tostes, Maria da Consolação V. Moreira, Geraldo Brasileiro Filho, and Sérgio D. J. Pena. 2000. "Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease: Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organs." *American Journal of Pathology* 156(5):1805–9.
354. van Dongen, Helena M., Niala Masoumi, Kenneth W. Witwer, and D. Michiel Pegtel. 2016. "Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(2):369–86.
355. Varikuti, Sanjay, Bijay Kumar Jha, Erin A. Holcomb, Jodi C. McDaniel, Manjula Karpurapu, Nidhi Srivastava, Bradford S. McGwire, Abhay R. Satoskar, and Narasimham L. Parinandi. 2020. "The Role of Vascular Endothelium and Exosomes in Human Protozoan Parasitic Diseases." *Vessel Plus* 4:28.
356. Vasquez, Ana Maria de, Franklyn E. Samudio, Azael Saldaña, Hector M. Paz, and José E. Calzada. 2004. "Eco-Epidemiological Aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and Their Vector (Rhodnius

- Pallescens) in Panama.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46(4):217–22.
357. Venkateshaiah, Abhilash, Vinod V. T. Padil, Malladi Nagalakshmaiah, Stanisław Waclawek, Miroslav Černík, and Rajender S. Varma. 2020. “Microscopic Techniques for the Analysis of Micro and Nanostructures of Biopolymers and Their Derivatives.” *Polymers* 12(3):512.
358. Verani, Jennifer R., Amy Seitz, Robert H. Gilman, Carlos Lafuente, Gerson Galdos-Cardenas, Vivian Kawai, Elizabeth De Lafuente, Lisbeth Ferrufino, Natalie M. Bowman, Viviana Pinedo-Cancino, Michael Z. Levy, Francis Steurer, Charles W. Todd, Louis V. Kirchhoff, Lilia Cabrera, Manuela Verastegui, and Caryn Bern. 2009. “Geographic Variation in the Sensitivity of Recombinant Antigen-Based Rapid Tests for Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80(3):410–15.
359. Verçosa, A. F. A., V. M. B. Lorena, C. L. Carvalho, M. F. A. D. Melo, M. G. A. Cavalcanti, E. D. Silva, A. G. P. Ferreira, V. R. A. Pereira, W. V. Souza, and Y. M. Gomes. 2007. “Chagas’ Disease: IgG Isotypes against Cytoplasmic (CRA) and Flagellar (FRA) Recombinant Repetitive Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagasic Patients.” *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 21(5):271–76.
360. Verweij, Frederik Johannes, Maarten P. Bebelman, Connie R. Jimenez, Juan J. Garcia-Vallejo, Hans Janssen, Jacques Neefjes, Jaco C. Knol, Richard de Goeij-de Haas, Sander R. Piersma, S. Rubina Baglio, Matthijs Verhage, Jaap M. Middeldorp, Anoeck Zomer, Jacco van Rheenen, Marc G. Coppelino, Ilse Hurbain, Graça Raposo, Martine J. Smit, Ruud F. G. Toonen, Guillaume van Niel, and D. Michiel Pegtel. 2018. “Quantifying Exosome Secretion from Single Cells Reveals a Modulatory Role for GPCR Signaling.” *Journal of Cell Biology* 217(3):1129–42.

361. Vezenov, Dmitri V., Aleksandr Noy, and Paul Ashby. 2005. "Chemical Force Microscopy: Probing Chemical Origin of Interfacial Forces and Adhesion." *Journal of Adhesion Science and Technology* 19(3–5):313–64.
362. Vidarsson, Gestur, Gillian Dekkers, and Theo Rispen. 2014. "IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions." *Frontiers in Immunology* 5:520.
363. Wang, Wei, Duo Peng, Rodrigo P. Baptista, Yiran Li, Jessica C. Kissinger, and Rick L. Tarleton. 2021. "Strain-Specific Genome Evolution in *Trypanosoma cruzi*, the Agent of Chagas Disease." *PLoS Pathogens* 17(1):e1009254.
364. Webber, Jason and Aled Clayton. 2013. "How Pure Are Your Vesicles?" *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1).
365. Westenberger, Scott J., Christian Barnabé, David A. Campbell, and Nancy R. Sturm. 2005. "Two Hybridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*." *Genetics* 171(2):527–43.
366. Whitlaw, J. T. and B. N. Chaniotis. 1978. "Palm Trees and Chagas' Disease in Panama." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27(5):873–81.
367. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000 : Brasilia, Brazil) and World Health Organization (2003). "Control de La Enfermedad de Chagas : Segundo Informe Del Comité de Expertos de La OMS." Geneva: World Health Organ Tech Rep Ser 905:1–109.
368. Wiklander, Oscar P. B., Joel Z. Nordin, Aisling O'Loughlin, Ylva Gustafsson, Giulia Corso, Imre Mäger, Pieter Vader, Yi Lee, Helena Sork, Yiqi Seow, Nina Heldring, Lydia Alvarez-Erviti, C. I. Edvard Smith, Katarina Le Blanc, Paolo Macchiarini, Philipp Jungebluth, Matthew J. A. Wood, and Samir El Andaloussi. 2015. "Extracellular Vesicle in Vivo Biodistribution Is Determined by Cell Source, Route of Administration

- and Targeting.” *Journal of Extracellular Vesicles* 4:26316.
369. Wilkowsky, S. E., M. A. Barbieri, P. Stahl, and E. L. D. Isola. 2001. “*Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion.” *Experimental Cell Research* 264(2):211–18.
370. Willms, Eduard, Carlos Cabañas, Imre Mäger, Matthew J. A. Wood, and Pieter Vader. 2018. “Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression.” *Frontiers in Immunology* 9:738.
371. Wu, Bo, Chunhong Huang, Midori Kato-Maeda, Philip C. Hopewell, Charles L. Daley, Alan M. Krensky, and Carol Clayberger. 2008. “IL-9 Is Associated with an Impaired Th1 Immune Response in Patients with Tuberculosis.” *Clinical Immunology* 126(2):202–10.
372. Wu, Yin, Wutian Wu, Wai Man Wong, Eliot Ward, Adrian J. Thrasher, David Goldblatt, Mohamed Osman, Paul Digard, David H. Canaday, and Kenth Gustafsson. 2009. “Human  $\Gamma\delta$  T Cells: A Lymphoid Lineage Cell Capable of Professional Phagocytosis.” *The Journal of Immunology* 183(9):5622–29.
373. Wu, Yueting, Wentao Deng, and David J. Klinken. 2015. “Exosomes: Improved Methods to Characterize Their Morphology, RNA Content, and Surface Protein Biomarkers HHS Public Access.” *Analyst* 140:6631–42.
374. Wu, Zhenyu, Lingling Wang, Jiaying Li, Lifu Wang, Zhongdao Wu, and Xi Sun. 2019. “Extracellular Vesicle-Mediated Communication within Host-Parasite Interactions.” *Frontiers in Immunology* 10:3066.
375. Xu, Rong, David W. Greening, Hong Jian Zhu, Nobuhiro Takahashi, and Richard J. Simpson. 2016. “Extracellular Vesicle Isolation and Characterization: Toward Clinical Application.” *Journal of Clinical Investigation* 126(4):1152–62.

376. Xu, Zhiwei, Xianli Yuan, Qiaoyan Gao, Yan Li, and Mingcai Li. 2021. "Interleukin-38 Overexpression Prevents Bleomycin-Induced Mouse Pulmonary Fibrosis." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 394(2):391–99.
377. Yáñez-Mó, María, Pia R. M. Siljander, Zoraida Andreu, Apolonija Bedina Zavec, Francesc E. Borràs, Edit I. Buzas, Krisztina Buzas, Enriqueta Casal, Francesco Cappello, Joana Carvalho, Eva Colás, Anabela Cordeiro-da Silva, Stefano Fais, Juan M. Falcon-Perez, Irene M. Ghobrial, Bernd Giebel, Mario Gimona, Michael Graner, Ihsan Gursel, Mayda Gursel, Niels H. H. Heegaard, An Hendrix, Peter Kierulf, Katsutoshi Kokubun, Maja Kosanovic, Veronika Kralj-Iglic, Eva-Maria Krämer-Albers, Saara Laitinen, Cecilia Lässer, Thomas Lener, Erzsébet Ligeti, Aija Linē, Georg Lipps, Alicia Llorente, Jan Lötvall, Mateja Manček-Keber, Antonio Marcilla, Maria Mittelbrunn, Irina Nazarenko, Esther N. M. Nolte-‘t Hoen, Tuula A. Nyman, Lorraine O’Driscoll, Mireia Olivan, Carla Oliveira, Éva Pállinger, Hernando A. del Portillo, Jaume Reventós, Marina Rigau, Eva Rohde, Marei Sammar, Francisco Sánchez-Madrid, N. Santarém, Katharina Schallmoser, Marie Stampe Ostenfeld, Willem Stoorvogel, Roman Stukelj, Susanne G. Van der Grein, M. Helena Vasconcelos, Marca H. M. Wauben, and Olivier De Wever. 2015. "Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions." *Journal of Extracellular Vesicles* 4(1):27066.
378. Yuan, Xianli, Xiao Peng, Yan Li, and Mingcai Li. 2015. "Role of IL-38 and Its Related Cytokines in Inflammation." *Mediators of Inflammation* 2015:807976.
379. Zanluqui, Nagela Ghabdan. 2015. "Macrophage Polarization in Chagas Disease." *Journal of Clinical and Cellular Immunology* 6(2).
380. Zhang, Yanshu, Aiko Yoshida, Nobuaki Sakai, Yoshitsugu Uekusa,



- Masahiro Kumeta, and Shige H. Yoshimura. 2017. "In Vivo Dynamics of the Cortical Actin Network Revealed by Fast-Scanning Atomic Force Microscopy." *Microscopy* 66(4):272–82.
- 381.Zingales, B., SG Andrade, MRS Briones, DA Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, AM Macedo, CR Machado, MA Miles, AJ Romanha, NR Sturm, M. Tibayrenc, and AG Schijman. 2009. "A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104(7):1051–54.
- 382.Zingales, Bianca, Michael A. Miles, David A. Campbell, Michel Tibayrenc, Andrea M. Macedo, Marta M. G. Teixeira, Alejandro G. Schijman, Martin S. Llewellyn, Eliane Lages-Silva, Carlos R. Machado, Sonia G. Andrade, and Nancy R. Sturm. 2012. "The Revised *Trypanosoma Cruzi* Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological Relevance and Research Applications." *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 12(2):240–53.
- 383.Zingales, Bianca. 2018. "*Trypanosoma cruzi* Genetic Diversity: Something New for Something Known about Chagas Disease Manifestations, Serodiagnosis and Drug Sensitivity." *Acta Tropica* 184:38–52.
- 384.Zulantay, I., W. Apt, L. C. Gil, C. Rocha, K. Mundaca, A. Solari, G. Sánchez, C. Rodriguez, G. Martínez, L. M. De Pablos, L. Sandoval, J. Rodríguez, S. Vilchez, and A. Osuna. 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 and Parasitology* 101(8):673–79.

## Referencias

---